



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO**

FACULTAD DE CIENCIAS

**ACTIVIDAD MICROBIANA ANAEROBIA EN SEDIMENTOS DE
LAGOS SALINOS DE MÉXICO**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

B I O L O G A

P R E S E N T A:

FÁTIMA LI HAU



DIRECTORA DE TESIS

DRA. NATHALIE ROBERTE CHANTAL CABIROL

2018

Ciudad Universitaria, CD. Mx.



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

AGRADECIMIENTOS

A la Dra. Nathalie y al Dr. Marcelo, ha sido un honor.

Al laboratorio del Dr. Dr. Luc Dendooven del departamento de Biotecnología de Cinvestav Zacatenco, en especial a Marco Luna y Blanca por todo su apoyo en los análisis cromatográficos.

A todo el personal administrativo de la Facultad de ciencias, por la increíble disposición y apoyo en todos los trámites para llevar a cabo esta tesis.

A la Dra. María Edith Ponce Márquez por todo el apoyo para obtener equipo de microbiología.

DEDICATORIA

A mi mamá, gracias por tanto esfuerzo y mitocondrias.

CONTENIDO

AGRADECIMIENTOS	I
DEDICATORIA	I
LISTA DE TABLAS	IV
LISTA DE FIGURAS	IV
1 RESUMEN	1
2 INTRODUCCIÓN.....	3
3 MARCO TEÓRICO	5
3.1 Ciclos biogeoquímicos	5
3.1.1 Ciclo del agua	5
3.1.2 Ciclo del carbono	6
3.1.3 Ciclo del nitrógeno	9
3.1.4 Ciclo del azufre.....	12
3.2 Lagos salinos	14
3.2.1 Sedimentos de lagos salinos	15
3.2.2 Lagos salinos en México.....	16
3.3 Metabolismo microbiano anaerobio	18
3.3.1 Metanogénesis.....	18
3.3.2 Metanotrofia anaerobia	20
3.3.3 Sulfatorreducción.....	21
3.3.4 Oxidación Anaerobia del Amonio	23
3.4 Sitios de estudio.....	25
3.4.1 San Antonio Texcala.....	25
3.4.2 Lago de Totolcingo.....	26
3.4.3 Lago de Texcoco.....	27
4 JUSTIFICACIÓN	29
5 OBJETIVO GENERAL	30
5.1 Objetivos particulares.....	30
6 MATERIALES Y MÉTODO	31
6.1 Sitio de Muestreo y toma de muestra	31
6.2 Enriquecimiento de microorganismos halófilos funcionales anaerobios.....	35
6.3 Aislamiento de microorganismos halófilos funcionales anaerobios	37
6.4 Cinética enzimática de la función anammox en el Ex – Lago de Texcoco	37

6.5	Análisis fisicoquímicos	38
6.5.1	Determinación del biogás	38
6.5.2	Cuantificación de nitrato (NO_3^-), nitrito (NO_2^-) y amonio (NH_4^+)	38
7	Resultados y discusión	39
7.1	Actividad de Oxidación anaerobia del amonio (anammox) en el Ex-Lago de Texcoco	39
7.2	Actividad anaerobia en Lago de Totolcingo y Salinas de Tehuacán, Puebla.	44
7.2.1	Metanogénesis y sulfatoreducción.....	45
7.2.2	Oxidación anaerobia del metano.....	46
7.2.3	Oxidación anaerobia del amonio	47
7.2.4	Aislamiento de microorganismos halófilos funcionales anaerobios	47
8	Conclusiones	50
9	BIBLIOGRAFIA.....	52
10	ANEXO 1.....	54

LISTA DE TABLAS

Tabla 1 Coordenadas GPS de los sitios de muestreo.....	31
Tabla 2 Características fisicoquímicas de los suelos muestreados del Ex Lago de Texcoco (Febrero 2014) (Caudan, 2015).....	39
Tabla 3 Tasa de consumo y producción de las formas de nitrógeno durante la actividad anammox de las 3 cinéticas: tiempo inicial, 40 días de enriquecimiento (cinéticas 1 y 2) (Caudan, 2015) y 229 días de enriquecimiento (cinética 3) (presente estudio).....	40
Tabla 5 Tabla de Presencia/Ausencia de actividad microbiana.....	44
Tabla 6 Cepas cultivadas, colonias con mayor producción por sitio.	47

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 Ciclo biogeoquímico del agua y la influencia de las actividades sociales	6
Figura 2 Ciclo del carbono y la influencia de las actividades sociales, modificado de D. Schimel et. al, 2003.....	8
Figura 3 Ciclo del nitrógeno. Modificado de Rojas-Oropeza, 2012.	12
Figura 4 Ciclo del azufre. Modificado de Robinson y Robbins, 2012.....	14
Figura 5 Proceso de producción de sal en el Valle de Tehuacán, Puebla.	17
Figura 6 Gen de función codificando para la metilcoenzima-M reductasa (mcrA) y arqueas metanógenas cultivadas.....	19
Figura 7 Gen de función codificando para la metano-monooxigenasa (pmoA) y arqueas metanotrófas cultivadas.....	¡Error! Marcador no definido.
Figura 8 Gen de función codificando para la sulfitoreductasa disimilatoria (dsrA) y bacterias sulfatoreductoras cultivadas.....	23
Figura 9 Gen de función codificando para la hidrazina oxidoreductasa (hzoA) y bacterias anammox cultivadas.	24
Figura 10 Zapotitlán Salinas, Puebla - vista general del área de estudio	25
Figura 11 Lago de Totolcingo, Puebla - vista general del área de estudio	26
Figura 12 Ex-lago de Texcoco, Estado de México - vista general del área de estudio.....	27
Figura 13 Salineras de San Antonio Texcala	32
Figura 14 Toma de muestra Salineras de San Antonio Texcala, pozo antiguo. (TX) (Izq.) Se observa el horizonte del agua (flecha) que refleja la cueva. (Der.) Se observa la coloración de la muestra en la draga.	32
Figura 15 Salineras de Jardín Botánico Helia Bravo.....	33
Figura 16 Toma de muestra de Secador de sal, Jardín Botánico Helia Bravo. (a) Se observa la coloración rosada del secador de sal. (b) Sedimento del secador de sal. Se observa una coloración verde/rosada/amarilla en el mismo. (c) Toma de parámetros fisicoquímicos del agua. (d) Obtención de sedimento del secador de sal.....	33

Figura 17 Toma de muestra Pozo en uso, Jardín Botánico Helia Bravo. (a) Se observa la profundidad del pozo. (b) Toma de parámetros fisicoquímicos (c, d) Obtención de muestra de sedimento utilizando draga.	34
Figura 18 Lago de Totolcingo	34
Figura 19 Toma de muestra Totolcingo. (a) Obtención de parámetro fisicoquímicos (b) Obtención de muestra de sedimento (c) Sedimento húmedo (d) Suelo seco con florecimiento de Tequesquite (flecha)	35
Figura 20 Obtención de extracto de suelo. (Izq a derecha) TX, HBr, HBp, HBP, T.....	36
Figura 21 Medios de cultivo para AMH y AMA (Antes de ser inoculados), de izquierda a derecha por sitio: TC, HBp, HBr y TX. Se observa la coloración diferente de cada uno debido al contenido mineral de la fase acuosa. 36	36
Figura 22 De los cultivos enriquecidos al aislamiento por la técnica de <i>roll-tube</i> (Hungate, 1969).	37
Figura 23 Producción de N_2 en microcosmos de suelos del Ex Lago de Texcoco, después de 229 días de enriquecimiento a la condición anammox – para cada salinidad: Sitio 1, ■; sitio 2, ◆; sitio 3, ▲.....	41
Figura 24 Consumo de NH_4^+ y NO_2^- en microcosmos de suelos del Ex Lago de Texcoco, después de 229 días de enriquecimiento a la condición anammox – para cada salinidad: Sitio 1, ■; sitio 2, ◆; sitio 3, ▲.....	42
Figura 25 Actividad microbiana anaerobia presente, en cultivos de colonias, por sitio.	48

1 RESUMEN

La versatilidad de los metabolismos microbianos ha permitido que éstos conduzcan la mayoría de los flujos biológicos de elementos, especialmente de los seis más importantes para la vida (C, N, O, S y P) (Offre et al., 2013). En muchos casos, vías metabólicas idénticas pueden utilizarse en un sentido u otro, dependiendo de qué proceso sea termodinámica y bioenergéticamente favorable. Algunos procesos, además, están conectados directamente con rutas metabólicas de otros elementos por lo que es común encontrar cooperaciones sinérgicas de varias especies (Falkowski et al., 2008).

Durante el estudio y análisis de los ciclos biogeoquímicos, se trabaja con bioprocesos separados en compartimentos y subcompartimentos que permiten reconocer procesos bioquímicos de transporte y transformación de elementos en distintas especies químicas. Sin embargo, el conocer y determinar taxonómicamente al microorganismo responsable, hoy tiene relevancia. Es deseable y necesario redirigir los esfuerzos a aislamientos de estas cepas funcionales con los actuales conocimientos y avances técnicos y comenzar a depurar las bases de datos de OTU's.. Este esfuerzo es aún más importante al trasladar las técnicas a sitios salinos que han sido poco estudiados en cuanto al papel funcional que tienen en el ecosistema y que, al contrario, muchas veces se estudian como sitios a remediar. El estudio de la microbiología funcional de sedimentos salinos brindará una nueva visión de su papel en el ecosistema.

En el presente estudio se realizaron enriquecimientos anaerobios de suelos de sedimentos salinos, además de cinética enzimática de un Lago salino-sódico (Ex Lago de Texcoco). Se obtuvieron diversos enriquecimientos de colonias de diferentes funciones: metanogénesis, metanotrofia, anammox y sulfato reducción.

2 INTRODUCCIÓN

La Tierra, con aproximadamente 4.5 miles de millones de años, experimentó en la primera mitad de su historia evolutiva enormes alteraciones químicas (Stüeken et al., 2016). El enfriamiento del planeta y los sucesivos procesos geoquímicos produjeron una separación diferencial de la materia. Como consecuencia, se formaron los continentes, masas de agua y atmósfera; así se obtuvieron las matrices en las que se movilizan los elementos químicos del planeta. El relieve terrestre generó nuevas divisiones espaciales de acuerdo con la altitud, posición y consecuentemente, la interacción con las otras dos matrices.

Con la dinámica terrestre movilizando materia y energía en la Tierra, se preparó el escenario para nuevos procesos químicos basados en la matriz oceánica. Así, surgió un nuevo proceso capaz de utilizar la energía restante, generar propia y transformar el ambiente para su preservación: vida. A partir de ello, los responsables de alterar las distintas especies químicas presentes en el planeta fueron los procesos metabólicos microbianos. Nuestro planeta refleja en la actualidad el desenlace evolutivo de la experimentación microbiana sobre las condiciones terrestres (Falkowski et al., 2008).

Todas las formas de vida conocidas obtienen energía necesaria para crecer, reproducirse y mantenerse a partir de reacciones óxido-reducción (redox). El primer proceso respiratorio de la vida sucedió en condiciones anaerobias. Millones de años después, debido a cambios en la atmósfera terrestre, la oxidación de la atmósfera tomo lugar como el nuevo gran evento planetario. Mediante respiración anaerobia y aerobia, utilizan cadenas de donadores y aceptores de electrones, cuyas reacciones son catalizadas por enzimas. Debido a ello, es imprescindible para todos los organismos disponer de una fuente constante de compuesto orgánicos e inorgánicos proveedores de energía y nutrientes (Offre et al., 2013)

La disponibilidad de estos compuestos recae en una red compleja de reacciones que involucran a los seres vivos y a procesos abióticos, que controlan el flujo y transformación de los elementos entre diferentes componentes

del sistema terrestre (litósfera, hidrósfera, atmósfera) (Ciais et al., 2013). Un gran reto para la ciencia sigue siendo entender el ensamble de la maquinaria microbiana y los mecanismos que regulan la operación y mantenimiento del reciclaje elemental en la biosfera (Falkowski et al., 2008).

La versatilidad de los metabolismos microbianos ha permitido que éstos conduzcan la mayoría de los flujos biológicos de elementos, especialmente de los seis más importantes para la vida (C, N, O, S y P) (Offre et al., 2013). En muchos casos, vías metabólicas idénticas pueden utilizarse en un sentido u otro, dependiendo de qué proceso sea termodinámica y bioenergéticamente favorable. Algunos procesos, además, están conectados directamente con rutas metabólicas de otros elementos por lo que es común encontrar cooperaciones sinérgicas de varias especies (Falkowski et al., 2008).

Las principales condiciones ambientales que delinear la presencia de grupos microbianos y procesos biogeoquímicos son: temperatura, radiación, pH, presión, potencial redox y salinidad (Falkowski et al., 2008). Este reciclaje de especies químicas tiene un efecto a escala global, que se ha intentado mapear, dando lugar a representaciones de lo que sucede en los ciclos biogeoquímicos del carbono (C), nitrógeno (N) y azufre (S) en el planeta Tierra.

Recientemente ha crecido la necesidad de conocer cómo sucede el reciclaje de nutrientes en ambientes extremófilos. Una de las condiciones que más ha tomado relevancia debido al cambio de uso de suelo, los consecuentes efectos del cambio climático y la desertificación, es el estudio de los ambientes salinos y alcalinos. Aún es poco conocido el papel global que tienen los ambientes salinos en los ciclos biogeoquímicos, por lo que es apremiante conocer la función dinámica de los microorganismos presentes.

3 MARCO TEÓRICO

3.1 Ciclos biogeoquímicos

El movimiento de los nutrientes en la biosfera sigue una red compleja que involucra procesos biológicos y ambientales. Para conceptualizar y comprender cómo funcionan estas redes se han estudiado como circuitos semiabiertos conectados entre ellos, con un flujo central. Este estudio nos ha permitido ver el flujo como un ciclo con entradas, salidas y subprocesos. Esta manera clásica de compartimentar permite comprender aspectos particulares, pero no la visión general. De este modo, entendemos un ciclo biogeoquímico como el flujo de un elemento y sus distintas especies químicas (Falkowski et al., 2008; Offre et al., 2013; Rosswall, 1981).

A pesar de ello, los intentos por comprender un ciclo aislado de otro resultan insuficientes, debido a la fuerte interconexión que tienen entre ellos. El resultado del acoplamiento de estos ciclos es que la biosfera puede alcanzar un reciclaje de nutrientes relativamente autosuficiente por escalas de tiempo muy grandes, pero a escala geológica la perpetuación de la vida aún depende de procesos geológicos (Falkowski et al., 2008).

A continuación, se realiza una descripción de lo general a lo particular de los ciclos biogeoquímicos de interés para este trabajo.

3.1.1 *Ciclo del agua*

El agua (H₂O) del planeta es una cantidad específica que no ha variado desde su formación: la hidrósfera cuenta con aproximadamente $1.360 \times 10^6 \text{ km}^3$ y se puede encontrar en todas sus formas físicas. Termodinámicamente, el motor que mueve a esta enorme hidrosfera es la energía térmica proveída por el sol a la atmósfera, presentando a nivel planetario procesos físicos de flujos de masas de agua fría y caliente, evaporación, precipitación, escorrentía e infiltración (Huntington, 2006). Además, influyen procesos biológicos como la transpiración. Las características de estas masas de agua durante su flujo pueden verse modificadas su calidad

por procesos químicos, biológicos y sociales. En los últimos 100 años, aspectos sociales han modificado de modo importante la cantidad, flujo y calidad de agua (Figura 1).



Figura 1 Ciclo geoquímico del agua y la influencia de las actividades sociales. Li Hau F. 2018, Datos obtenidos de Taikan et al., 2004.

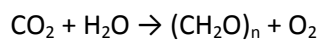
3.1.2 *Ciclo del carbono*

El carbono es considerado el elemento más importante a nivel biológico. Aproximadamente el 50% del peso seco de plantas y microorganismos es carbono (Rosswall, 1981)

El ciclo del carbono incluye el movimiento, el mismo a través de tres principales reservorios: la atmósfera, los océanos y el sistema terrestre. De los tres, la litosfera es la que contiene la mayor cantidad de carbono, pero es

la atmósfera la que actúa como unión entre los otros reservorios (Falkowski, 2012; Servan-Schreiber et al., 1990).

El océano, juega un papel crucial en la concentración de dióxido de carbono atmosférico (CO₂). Esto es debido a procesos físicos, químicos y biológicos. Actualmente, existen reportados seis mecanismos de fijación de carbono inorgánico (CO₂/ HCO₃⁻) por la biosfera. Uno de los más importantes es el ciclo de Calvin-Benson-Bassham, donde la enzima RubisCO juega un papel principal. Este ciclo está presente en plantas y cianobacterias, y acoplado a la fotosíntesis oxigénica. La fórmula general de la fijación de C mediante fotosíntesis oxigénica es:



Sin embargo, existen varios microorganismos capaces de fijar C a través de ciclos y rutas como: el ciclo Arnon-Buchanan (TCA inverso, rTCA), la ruta de Wood-Ljungdahl (Acetil-CoA inverso), el biciclo del 3-hidroxiopropionato, el ciclo del hidroxipropionato-hidroxiбутirato, y el ciclo del dicarboxilato-hidroxiбутirato. Sin embargo, aún se desconoce el impacto de estos ciclos en la biogeoquímica global del ciclo del C (Falkowski, 2012).

El carbono que ha sido fijado puede ser empleado por otros organismos para formar componentes celulares, carbohidratos y ácidos nucleicos. Al degradar carbono orgánico, podemos encontrar dos estados de oxidación principales, metano (CH₄) y CO₂. La producción de metano es llevada a cabo exclusivamente, por arqueas metanogénicas. Mientras que la oxidación a CO₂ puede ser llevada a cabo por distintos tipos de organismos, ya sea por fermentación, y respiración aerobia o anaerobia (Schimel & Weintraub, 2003) (Figura 2).

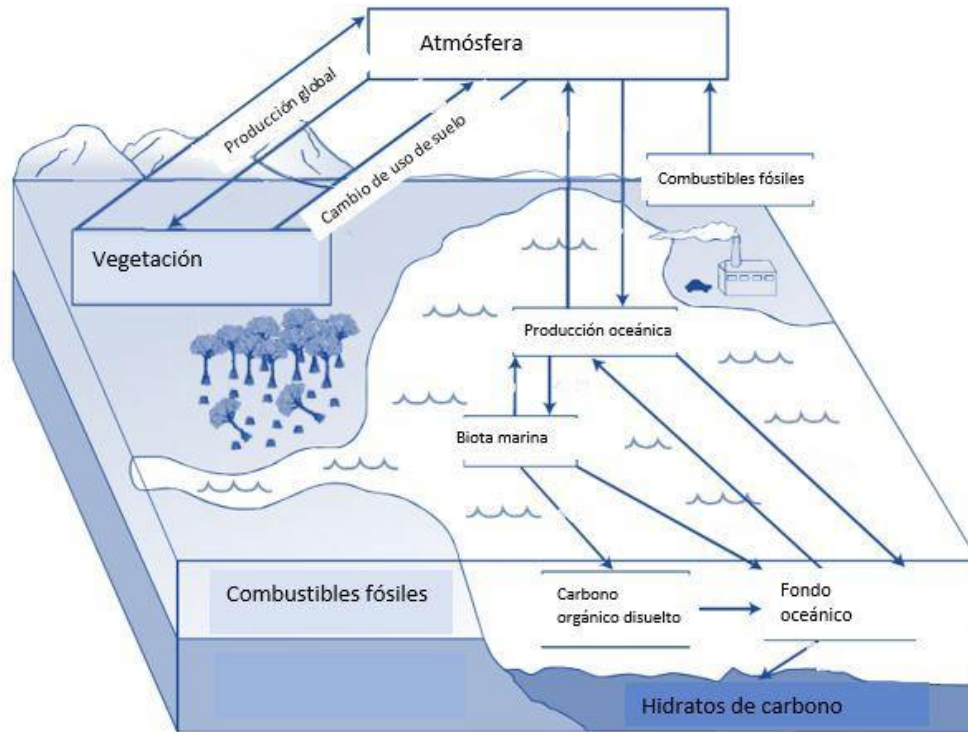


Figura 2 Ciclo del carbono y la influencia de las actividades sociales, modificado de D. Schimel et. al, 2003.

La metanogénesis produce aproximadamente 1 Gt de metano por año, lo cual representa el 74% de las emisiones anuales netas de metano a la atmósfera. También es importante considerar el metano encerrado en los depósitos subterráneos y permafrost generado por las arqueas metanógenas en la degradación del petróleo crudo y del carbón, así como materia orgánica sepultada en el subsuelo (Offre et al., 2013).

La producción de CH_4 se regula, por microorganismos oxidantes del metano. Actualmente, se han descrito dos grupos principales de organismos metanótrofos: i) bacterias que acoplan enzimas monooxigenasas y ii) las arqueas metanótrofes anaerobias o ANME. Estas arqueas son anaerobias estrictas como las arqueas

metanógenas; obtienen su energía por oxidación del CH_4 y reducción de un aceptor electrónico diferente de O_2 , como sulfato (SO_4^{2-}) en ambientes salinos (Offre et al., 2013).

3.1.3 *Ciclo del nitrógeno*

No existe ninguna forma de vida conocida que pueda sobrevivir sin N, ya que biomoléculas básicas como los aminoácidos y ácidos nucleicos, lo contienen (Ochoa-Hueso, 2017) Tal es su importancia que regula la productividad biológica en el océano y en algunos sistemas terrestres (Stüeken et al., 2016).

La importancia del nitrógeno no es una casualidad, es de los elementos más abundantes en la atmósfera terrestre, y tiene la capacidad de formar enlaces covalentes versátiles con C. Adicionalmente, el nitrógeno es un elemento muy activo en el proceso redox en agua y, por lo tanto, una fuente de energía electroquímica (Stüeken et al., 2016).

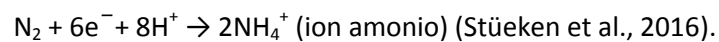
El ciclo del nitrógeno revela la versatilidad de este. Ocurre en estados de valencia desde -3 a +5 (Rosswall, 1981). En compuestos biológicos está presente casi exclusivamente en el estado más reducido. El ciclo del nitrógeno incluye procesos oxidativos y reductores en los que procariontes juegan un papel central (P. Cabello et al., 2004)

A pesar de ser un elemento abundante en la Tierra, sólo 0.001% del nitrógeno total se encuentra en la biosfera y sólo 6% en la atmósfera. La mayor parte del N se encuentra en litósfera. De todo el N que forma parte del ciclo biogeoquímico, sólo 0.04% ocurre en compuestos asimilables e indispensables para la vida (Offre et al., 2013; Stüeken et al., 2016).

El nitrógeno presente en la atmósfera, está compuesto mayoritariamente de moléculas de dinitrógeno (N_2) constituye el 78% de la misma. La mayoría de los organismos vivos son incapaces de asimilar esta fuente de N

directamente. Sin embargo, existen grupos específicos de procariontes capaces de asimilar el nitrógeno atmosférico y transformarlo en moléculas asimilables para otros organismos. En este caso, la entrada de N₂ lo veremos como punto inicial para entender el ciclo. A este proceso se le conoce como *fijación* (P. Cabello et al., 2004; García-Velázquez & Gallardo, 2017).

La *fijación* biológica del N₂ es llevada a cabo por bacterias de vida libre, arqueas, cianobacterias y bacterias endosimbiontes. La fijación de nitrógeno es llevada a cabo por la enzima nitrogenasa. Al conjunto de organismos con esta capacidad se les conoce como *diazótrofos* (García-Velázquez & Gallardo, 2017). La ecuación que resume este proceso metabólico es la siguiente:



La *asimilación* del nitrógeno puede ser a través del ion amonio (NH₄) o sales de nitrato en algunos microorganismos y plantas. El amonio puede ser metabolizado por dos rutas diferentes, glutamato deshidrogenasa (GDH) o glutamina sintetasa/glutamato sintetasa (GS/COGAT). El resultado es la inmovilización del nitrógeno en biomasa (Rosswall, 1981).

No todo el amonio que es tomado del ambiente es transformado a componentes biológicos. Éste también es empleado como fuente de energía al oxidarlo a nitrato (NO₃⁻), en ambientes con oxígeno, vía la *nitrificación*. Este proceso consiste en la oxidación de amonio (NH₄⁺) a nitrito (NO₂⁻) y su posterior conversión a NO₃⁻. Hasta hace poco, se creía que solo bacterias litotróficas y microorganismos heterotróficos estaban involucradas en la nitrificación. Ahora se sabe que algunas arqueas poseen esta capacidad (grupo AOA, arqueas oxidantes del amonio) (Francis et al., 2005; Offre et al., 2013).

La nitrificación tiene una gran importancia en agricultura, ya que provee de nitrato al suelo. El nitrato es una de las dos fuentes de nitrógeno mayormente asimilada por las plantas. Simultáneo a la nitrificación, existe la *desnitrificación* y la oxidación anaerobia del amonio, ambos procesos regeneran el mayor reservorio de N_2 .

La producción biológica de N_2 ocurre por dos procesos: desnitrificación y oxidación anaerobia del amonio (anammox) (Offre et al., 2013). La desnitrificación es una forma de respiración anaerobia que utiliza NO_3^- o NO_2^- como aceptores de electrones y resulta en la formación de compuestos gaseosos de nitrógeno (NO , N_2O y N_2). Este proceso es llevado a cabo generalmente en condiciones microaerofílicas o anóxicas (Offre et al., 2013). El metabolismo anammox es, hasta ahora, exclusivo de bacterias del orden Brocardiales y es extremadamente difícil de obtener cultivos aislados (Dalsgaard et al., 2005).

Además de estos procesos, existe una división conceptual de *mineralización* e *inmovilización* del nitrógeno. La mineralización es la producción de amonio (NH_4^+) a partir de compuestos orgánicos, resulta de la degradación de proteínas, polipéptidos, nucleoproteínas, ácidos nucleicos entre otros. La inmovilización es el proceso contrario, la construcción de compuestos complejos a partir de simples, biosíntesis (Rosswall, 1981; Schlichting, 1978).

Ya se ha hablado de la producción de amonio a partir de nitrógeno atmosférico. De la producción de nitrato a partir de amonio y viceversa. Además, se ha hablado de la producción de dinitrógeno a partir de nitrato y amonio. Estos procesos de manera general nos dan el panorama de los movimientos de nitrógeno en la biosfera y con los diferentes componentes del planeta (Figura 3).

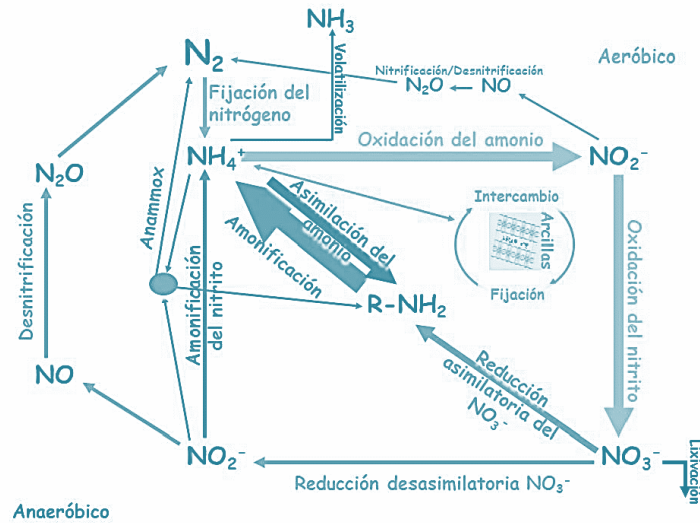


Figura 3 Ciclo del nitrógeno. Modificado de Rojas-Oropeza, 2012.

3.1.4 Ciclo del azufre

El azufre (S) en el planeta se encuentra principalmente en la litósfera, aproximadamente el 95% del azufre total. La mayor parte del azufre restante se encuentra en cuerpos de agua, incluido el océano. El azufre restante contiene apenas el <0.001% del total global (Lens, 2009).

El azufre es un nutriente esencial de plantas, animales y microorganismos. A pesar de ser abundante en el planeta, generalmente se encuentra en especies químicas no utilizables por los organismos (Schlichting, 1978). Las transformaciones de azufre tienen gran importancia en la composición de los océanos y en el balance redox de la superficie terrestre (Loka Bharathi, 1987).

El ciclo del azufre involucra reacciones de óxido-reducción entre el estado más reducido, ácido sulfhídrico (H_2S), al más oxidado, el sulfato (SO_4^{2-}). Puede actuar como donador o aceptor de electrones. El azufre se transforma con respecto a su estado de oxidación, formación de compuestos orgánicos e inorgánicos y el estado físico en el que se encuentra. En condiciones oxidantes, la especie química más estable es SO_4^{2-} , mientras que, en condiciones reductoras, se forma sulfuro (S^{2-}) (Lens, 2009).

En el ciclo del azufre se pueden diferenciar cinco procesos principales (Schlichting, 1978):

- Descomposición de compuestos orgánicos de azufre
- Asimilación microbiana o inmovilización de compuestos simples de azufre
- Oxidación de compuestos inorgánicos de azufre (sulfatos, tiosulfatos, politionatos y azufre elemental)
- Reducción de sulfato y otros aniones a sulfuro.
- Procesos de desproporción.

Descomposición de compuestos orgánicos de azufre. La formación y degradación de compuestos de azufre orgánico (C-SH) no es exclusiva de microorganismos. La formación de azufre orgánico es llevada a cabo por organismos fotosintéticos. El dimetil sulfuro (DMS) es el producto más común de las conversiones de azufre oceánicas. La reducción asimilatoria de sulfato, es el proceso por el que el sulfato es reducido, y luego incorporado a materia orgánica deriva en la generación de aminoácidos y cofactores metaloprotéicos (Loka Bharathi, 1987).

Las tres rutas por las que el azufre es transferido del manto a la superficie terrestre y eventualmente al océano son: i) degasamiento de dióxido de azufre (SO₂) y ácido sulfhídrico (H₂S), ii) liberación de H₂S durante circulación hidrotermal y iii) meteorización de sulfuros ígneos por circulación hidrotermal de agua marina oxigenada (Figura 4) (Canfield & Farquhar, 2012).

El ciclo biológico del azufre no solo modera la transformación del mismo en sus diferentes estados de oxidación, sino además deja firmas isotópicas de estas transformaciones en el registro geológico. En modelos biológicos, el metabolismo de reducción de sulfato puede ser asimilatorio o disimilatorio. La sulfatoreducción disimilatoria es estrictamente procarionte y es una respiración anaerobia (Ivanov, 1981).

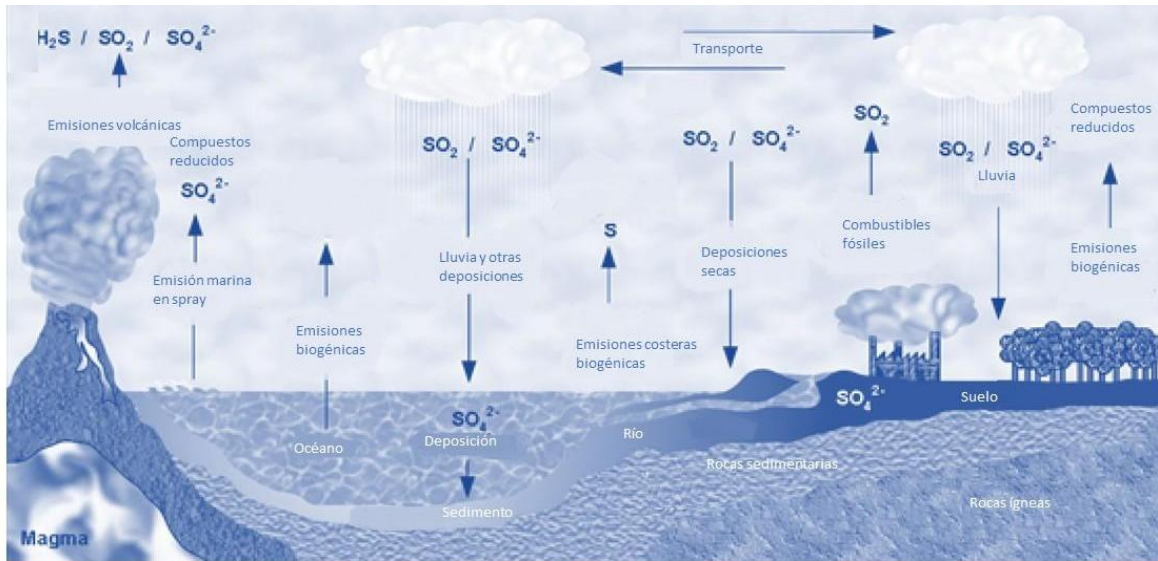


Figura 4 Ciclo del azufre. Modificado de Robinson y Robbins, 2012.

3.2 Lagos salinos

Los lagos salinos son un fenómeno natural global. Pueden encontrarse en todos los continentes y en la mayoría de los países. Los lagos salinos constituyen aproximadamente el 5% de la superficie no oceánica de la tierra, además la proporción de lagos salinos es similar a lagos de agua dulce (Casamayor et al., 2013). El rango de salinidad de un lago salino puede ir desde >3.2% sales a hipersalino con >20% de sales. Esto incluye como lago salino a los cuerpos de agua con salinidad igual o mayor a la del mar (Litchfield, 2011). Cabe destacar que la mayoría de los limnólogos de aguas interiores consideran un lago salino como aquel con contenido de sales mayor o igual a 3 g l^{-1} (Alcocer & Hammer, 1998).

Una característica general de los lagos salinos es que son terminales, es decir, no hay un flujo de salida significativo. Aunque en algunos lagos los componentes químicos no se acumulan, en los lagos salinos la composición de solutos se incrementa y por ello se convierte en salino. Esto puede ser causado por una evaporación que exceda a la entrada de agua, debido a que la entrada de agua sea salina o a ambas (Eugster & Hardie, 1978). Las condiciones necesarias para que la evaporación excede la entrada de agua se tiene

principalmente en los cinturones de alta presión desérticos de las zonas subtropicales y polares (Eugster & Hardie, 1978; Rutishauser et al., 2018).

Usualmente se divide a los lagos salinos en dos tipos principales: atalashalinos y talashalinos. Atalashalino se refiere a lagos con una composición química diferente (o con proporción diferente) a la marina, mientras que talashalino se refiere a lagos con radio catiónico similar al oceánico (Litchfield, 2011).

La composición química de estos lagos es variada, a pesar de ello tienen algunas similitudes. En general, no se encuentran peces en lagos con salinidades mayores al 4%. Otros organismos eucariontes si se encuentran a mayores salinidades, en especial algas, camarones y moscas. La diversidad de algas depende de la salinidad. Además, es común encontrar aves asociadas a estos cuerpos de agua, que se alimentan de los eucariontes pequeños antes mencionados. Recientemente se ha comenzado a estudiar hongos presentes en lagos salinos (Litchfield, 2011).

El dominio Bacteria es predominante a concentraciones altas de sal. Sin embargo, arriba de 15% Archaea es el dominio más común. Solo recientemente se ha comenzado a revelar la diversidad genética de las comunidades microbianas que habitan los lagos salinos (Casamayor et al., 2013).

3.2.1 *Sedimentos de lagos salinos*

Los sedimentos de lagos salinos han sido investigados por el potencial que tienen para determinar proporciones isotópicas estables y por lo tanto la edad de los sedimentos. Una característica importante de los sedimentos de lagos salinos es que al aumentar o disminuir la salinidad del agua suprayacente, también aumenta (o disminuye) la del agua intersticial del sedimento. Estos cambios también afectan la biología de los sedimentos, los cuales están dominados por tapetes microbianos productores de azufre y metano en condiciones anaerobias (Litchfield, 2011).

Los tapetes microbianos son comunidades del bento dominadas por microorganismos y que forman capas cohesivas en la superficie del sedimento. En la mayoría de los tapetes, los organismos fotótrofos productores de oxígeno son los productores primarios. Los microorganismos quimioorganótrofos viven de los productos de desecho de los productores primarios. Debido a la alta tasa de respiración, usualmente se pueden encontrar condiciones anóxicas solo a algunos milímetros de la superficie del sedimento (Guerrero & Wit, 1992).

La literatura en cuanto a microbiología funcional de sedimentos anóxicos de lagos salinos es escasa. Es necesario dirigir estudios en este tema para completar el conocimiento en la ecología microbiana de estos ambientes y el potencial biotecnológico.

3.2.2 *Lagos salinos en México*

En México, los lagos salinos son relativamente comunes debido a casi el 65% del territorio mexicano entra en los cinturones desérticos en los que normalmente se encuentran estos lagos. El segundo lago más grande de México es uno salado. A pesar de la abundancia, pocos lagos salinos han sido estudiados. Aún menos estudiados sobre microbiología funcional (Alcocer & Hammer, 1998).

A pesar de que los lagos salinos pueden encontrarse en todo el país, existe un patrón de distribución que aumenta en incidencia hacia el nor-noroeste. En 1998, Alcocer y Hammer publicaron un artículo de investigación acerca de los principales lagos salinos de México y hasta ahora es el compendio de información más completo. De su publicación ya han pasado más de veinte años, por lo que es importante retomar y renovar la información que se tiene acerca de los mismos.

3.2.2.1 *Sal e Historia de Secadores de Sal de Tehuacán (Puebla)*

La antigua cosmovisión mesoamericana consideraba a la sal como un residuo del cuerpo de los ancestros y de los dioses. La producción de sal en Puebla, México, tiene raíces históricas que vienen desde épocas

prehispánicas. Se inició con los Popolocas que habitaban el valle de Tehuacán, como una moneda de cambio y para brindar tributo. Existen evidencias de ocupación humana en el valle desde 200 A.C., desde aquel tiempo la producción de sal tradicional ha sido parte del desarrollo comercial de la zona. Zapotitlán Salinas, es una comunidad que se encuentra ubicada la población de San Antonio Texcala, y forma parte de la región fisiográfica de la Sierra Madre del Sur. El valle obtuvo las sales que ahora se encuentran en el suelo y manto freático en el Jurásico y Cretácico, cuando la zona era oceánica (Castellón Huerta, 2009).

A pesar de no haber cambios importantes en las técnicas de obtención de sal, existen algunos cambios como implementación de bombas para acarrear agua a partes altas, proceso que antiguamente era llevado a cabo por *cienteros*, personas que acarreaban agua en pozos estrechos como el que se muestra en la figura 5a.



Figura 5 Proceso de producción de sal en el Valle de Tehuacán, Puebla. Li Hau F. 2018.

Tras llevar el agua a zonas altas, se llenan estanques someros donde la alta radiación solar permitía la evaporación y consecuente acumulación de sales en los mismos (Figura 5b). Posterior a la primera concentración de sales el agua es trasvasada a un estanque adyacente y el anterior es lavado, el sedimento se desecha. Con el paso de los días y al acumularse la sal y aumentar la pureza de esta se forman cristales en la parte superior del estanque (Figura 5c). Después de seis semanas aproximadamente se puede obtener la sal para consumo humano.

3.2.2.2 *Tequesquite en Texcoco y Totolcingo*

El tequesquite (del náhuatl *tetl*: roca y *quixquitl*: brotar, roca brotante) es un complejo mineral alcalino, conocido en México desde la época prehispánica y comúnmente utilizado en preparación de alimentos. Antiguamente se distinguían cuatro clases de tequesquite: espumilla, confitillo, cascarilla y polvillo. En un estudio realizado por Flores-Hernández y Martínez-Jerónimo (2016), se mostró que cada tipo de tequesquite tenía composición química diferente en proporción, variando la cantidad de carbonato de sosa anhidro, sulfato de sosa, cloruro de sodio, agua, materias terrosas, sales insolubles y materia orgánica.

3.3 **Metabolismo microbiano anaerobio**

3.3.1 *Metanogénesis*

Los organismos capaces de generar metano son exclusivamente pertenecientes al dominio Archaea. Los metanógenos están unidos por tres características principales: forman grandes cantidades de metano como consecuencia de su metabolismo, son anaerobios estrictos sensibles a oxígeno y pertenecen al dominio Archaea. Es importante destacar que existen otros organismos que forman metano como consecuencia de su metabolismo, pero no es la vía principal ni es en grandes cantidades; al contrario, las arqueas metanógenas son productoras obligadas de este compuesto (Offre et al., 2013).

Una característica de las metanógenas es que requieren de un potencial redox muy bajo para sobrevivir, debido a ello están restringidas a ambientes extremadamente anóxicos. Han sido encontradas en un amplio rango de temperatura (de 0 a 100°C) y en concentraciones de salinidad desde agua dulce a hipersalina. A pesar de la variedad de ambientes donde se pueden encontrar, los sustratos utilizados son pocos. Los principales son H₂/CO₂ y acetato. Algunas además son capaces de utilizar metanol, trimetilamina y dimetilsulfuro. Todos estos compuestos son transformados a metano (Campanaro et al., 2016).

La mayor producción de metano en suelos se ha atribuido a la metanogénesis, en micrositios anaerobios del suelo. Existe además una división metabólica de las metanógenas de acuerdo al donador de electrones ya sea H_2/CO_2 , formato, acetato y compuestos *metilo* (alcoholes y metilaminas) (Campanaro et al., 2016). Sin embargo, la última reacción es común a todas las metanógenas: la actividad de la metil coenzima M-reductasa permite la producción de metano a partir de metil coenzima-M.

Debido a las características ambientales de los metanogénicos, además, dada la sintrofia de los procesos en los que están ensambladas. Se ha optado por métodos cultivo-independientes para su estudio mediante PCR seguida de métodos de verificación como DGGE, TGGE, RISA, entre otros métodos y finalmente secuenciación.

Estos estudios permiten tener información sobre el ensamble funcional de las comunidades microbianas. Al realizar una búsqueda basada solamente en secuencias de genes funcionales en bases de datos como la del *National Center for Biotechnology Information* (NCBI) de secuencias reportadas existentes y cuántas de ellas pertenecen a organismos en cultivos puros, la relación es muy baja, como se muestra en la Figura 6.

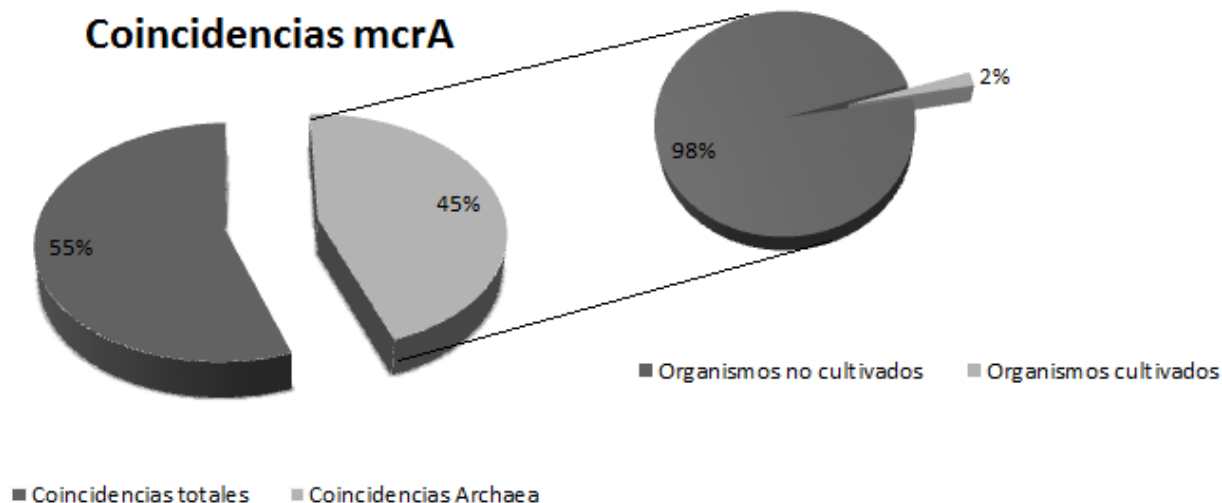
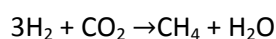


Figura 6 Distribución del gen de función codificando para la metilcoenzima-M reductasa (*mcrA*) y metanógenas cultiadas y no cultivadas en la base de datos del NCBI.

De 75089 secuencias que coinciden, 33627 pertenecen a Archaea y de estas, 667 son de organismos cultivados.

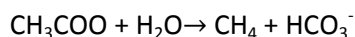
3.3.1.1 *Archaeas Metanógenas Hidrogenófilas*

Las arqueas metanógenas hidrogenófilas se encuentran distribuidas a escala global y son responsables de una tercera parte de la producción biológica de metano. La metanogénesis hidrogenófila empieza con la reducción de CO₂ hasta el metil coenzima-M (CH₃-S-CoM) utilizando una cadena de donadores y aceptores de electrones (Campanaro et al., 2016; Houweling et al., 2017). Siguiendo la siguiente reacción:



3.3.1.2 *Archaeas Metanógenas Acetoclásticas*

Las arqueas metanógenas acetoclásticas metabolizan ácido acético y son responsables de los dos tercios restantes de la producción global de metano. La metanogénesis acetoclástica empieza con la reducción de CO₂ hasta el acetil coenzima-A utilizando una cadena de donadores y aceptores de electrones (Campanaro et al., 2016; Houweling et al., 2017). Siguiendo la siguiente reacción:



3.3.2 *Metanotrofía anaerobia*

La oxidación anaerobia del metano (AOM) mediada por microorganismos es un factor importante en la disminución del metano atmosférico: los microorganismos con metabolismo AOM son responsables de consumir 5% del metano total que es tomado de la atmósfera por procesos químicos y biológicos. Una parte del metano es consumido por arqueas anaerobias. Los organismos anaerobios metanótrofos son caracterizados por capacidad de crecer con metano como fuente de carbono y energía: estudios dependientes e independientes de cultivo han ayudado a entender el papel que juegan en los ciclos biogeoquímicos, en especial de C y N, pero también de algunos metales (Knief, 2015).

Archaeas del grupo ANME (oxidación anaerobia del metano, por sus siglas en inglés) unen la oxidación de metano con la reducción de sulfato, en ambientes salinos con bacterias sulfatoreductoras (Winkel et al., 2018). Sin embargo, entender los factores que controlan el metabolismo de metano y la ecología requiere conocer diferentes grupos de metanótrofos. Existen diferencias en los sistemas enzimáticos, las rutas metabólicas, la composición de las células, los mecanismos regulatorios y las respuestas nutricionales (Hanson et al., 1996). Una de las ecuaciones que resumen el metabolismo ANME es la siguiente:

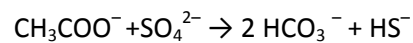
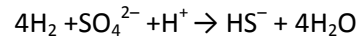


Aunque los estudios cultivo-independientes han ayudado a conocer miles de secuencias de los llamados “fastidiosos microorganismos” por la dificultad que representa su aislamiento (Aoki et al., 2014), la mayoría de estas secuencias son microorganismos “desconocidos sin cultivar”. Esto limita enormemente la capacidad de interpretar los datos obtenidos debido a falta de información sobre su fisiología y metabolismo. Además, descubrimientos de enzimas similares a las que se buscan en estudios moleculares para metanótrofos, llaman a tener mayor cuidado en la interpretación de las secuencias (Knief, 2015). Este argumento, por sí mismo, aunado a la dificultad de su estudio se ve reflejado en multitud de trabajos en donde nuevamente se recurre a la biología molecular y a ser reportados como unidades operacionales taxonómicas (OTU’s, por sus siglas en inglés)

3.3.3 *Sulfatoreducción*

Los organismos sulfatoreductores (SR) utilizan el sulfato como aceptor de electrones para respiración anaerobia de una gran variedad de compuestos orgánicos e inorgánicos. El sulfuro es el producto final de la sulfatoreducción, como se observa en la reacción más adelante (Muyzer & Stams, 2008). Algunos de los compuestos orgánicos que utilizan son acetato, H₂/CO₂, formato, propionato, acetaldehído, etanol, aminoácidos y otros (Camacho, 2009). Los organismos SR son comunes en ambientes anóxicos y tienen una

gran importancia en el ciclo del carbono y azufre. Algunas ecuaciones que resumen las distintas rutas metabólicas SR son las siguientes:



Se han utilizado, como en muchos casos, diferentes técnicas para estudiar estos organismos. Las bacterias SR presentan un reto para su cultivo, ya que pocas pueden ser cultivadas. La mayor parte de la información ha sido obtenida por técnicas moleculares. Las técnicas moleculares nos dan un panorama general del metabolismo y diversidad de SR, pero para tener conocimiento específico es necesario obtener cultivos puros y estudiar su fisiología (Muyzer y Stams, 2008).

Las bacterias sulfatoreductoras son anaerobias estrictas. Sin embargo, algunas especies sobreviven tiempos cortos en ambientes oxigenados. Las bacterias sulfatoreductoras proveen a las comunidades bacterianas de capas inferiores de sulfuro, en especial a bacterias sulfuro-oxidantes (Camacho, 2009). Han sido encontradas en ambientes variados, pH de 2 a lagos de carbonatos, ambientes hipersalinos y fondo marino, en general todos los ambientes extremos. Aunque son de vida libre, generalmente se encuentran asociadas a otros microorganismos igualmente extremófilos. En la Figura 7, se observa el porcentaje de coincidencia de bacterias sulfatoreductoras determinadas por cultivo puro.

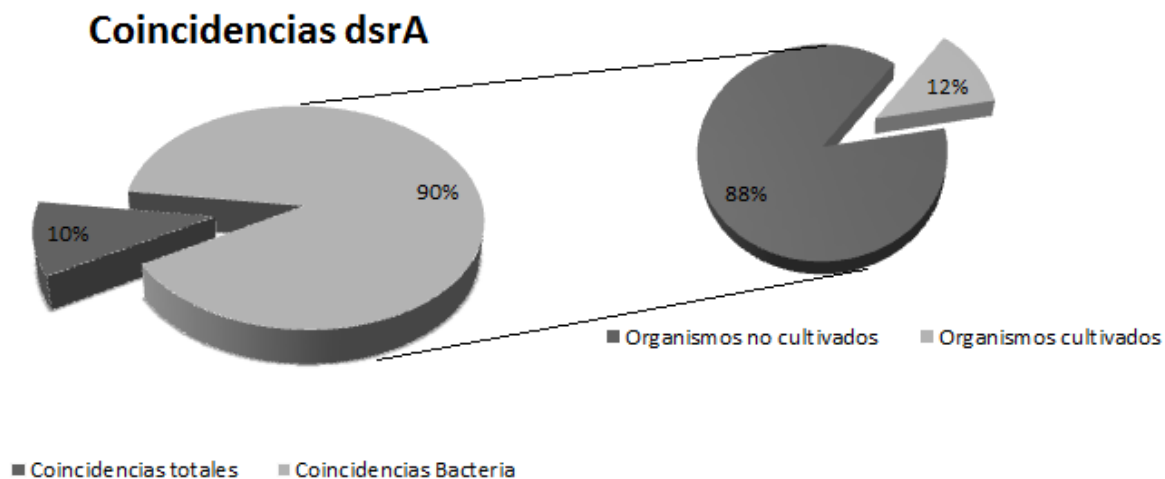
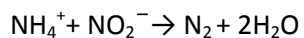


Figura 7 Distribución del gen de función codificando para la sulfitoreductasa disimilatoria (dsrA) y su distribución en bacterias sulfatoreductoras cultivadas y no cultivadas en la base de datos del NCBI.

De 14667 secuencias que coinciden, 13130 pertenecen a Bacteria y de estas, 1592 son de organismos cultivados.

3.3.4 Oxidación Anaerobia del Amonio

El metabolismo anammox se refiere a la oxidación anaerobia del amonio, por sus siglas en inglés y utiliza nitrito como aceptor final de electrones y produce gas dinitrógeno, ver ecuación (M. J. Cabello et al., 2009). Las bacterias anammox contribuyen a la pérdida de nitrógeno global, aproximadamente a la mitad de esta. A la actualidad, a pesar de los intensos intentos solo se han logrado identificar 20 especies (Gao et al., 2018). Se muestra la reacción general a continuación:



Existen tres características importantes de las bacterias anammox. Primera, la presencia de un anammoxosoma, un compartimento celular, característico de los *Planctomycetes* que contiene enzimas especializadas en el

metabolismo. Segundo, una membrana de glicerolípidos característica debido a los fosfolípidos en escalera. Tercero, falta de peptidoglicano. La tercera característica requiere más estudio (Gao et al., 2018).

Aunque los genomas de varias bacterias anammox han sido secuenciados, la función de la mayoría de las secuencias se mantiene desconocida. Se requiere más información sobre la fisiología de estos microorganismos. La falta de conocimiento del metabolismo y la imprecisión del conocimiento actual obstaculizan las investigaciones sobre bacterias de este grupo. La falta de cultivos puros (Figura 8) reduce la posibilidad de incrementar conocimiento sobre su genética, bioquímica, metabolismo, fisiología, taxonomía, evolución e interacciones ecológicas (Gao et al., 2018).

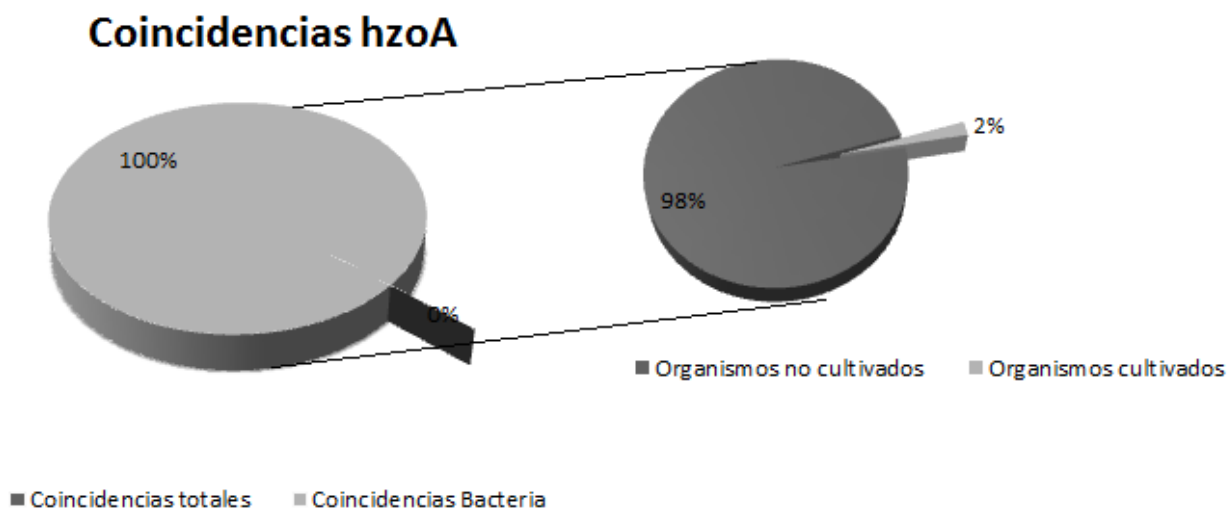


Figura 8 Distribución de gen de función para la hidrazina oxidoreductasa (hzoA) y su distribución en bacterias anammox cultivadas y no cultivadas en la base de datos del NCBI.

De 520 secuencias que coinciden, 520 pertenecen a Bacteria y de estas, 10 son de organismos cultivados u obtenidos en cultivos de enriquecimiento.

3.4 Sitios de estudio

3.4.1 *San Antonio Texcala*

La primera localidad fue el ejido San Antonio Texcala del municipio de Zapotitlán Salinas, Puebla. Se localiza en el valle de Tehuacán-Cuicatlán. La altitud promedio es de 1600 msnm, con una temperatura anual promedio de 18.6°C.

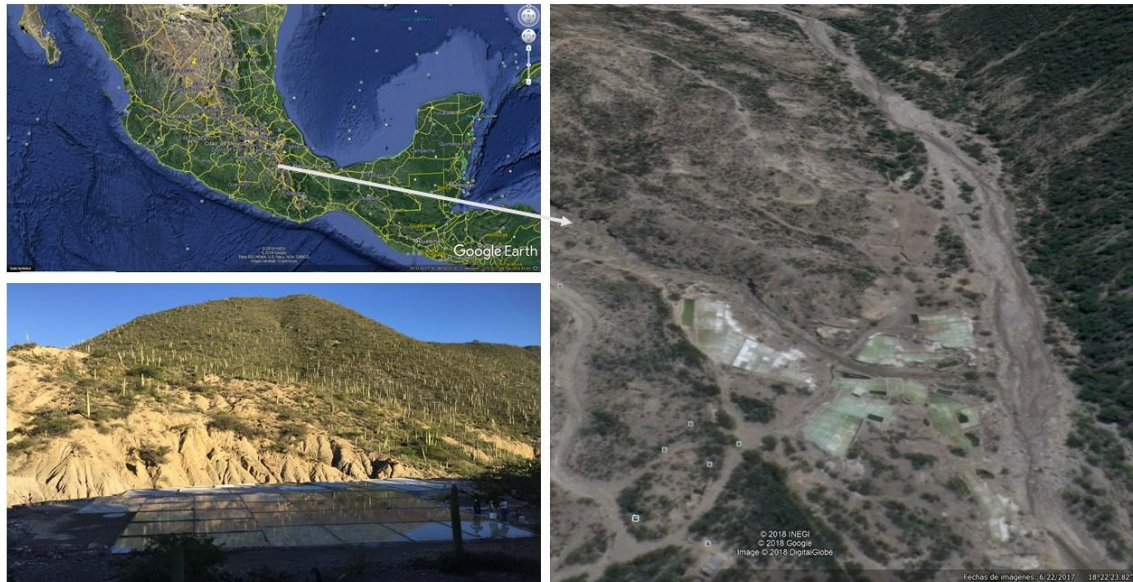


Figura 9 Zapotitlán Salinas, Puebla - vista general del área de estudio. Li Hau F., 2018, Google Earth, accesado Mayo 2018.

El nombre de San Antonio Texcala proviene del Náhuatl, significa “Lugar donde nace el agua de la piedra”, de acuerdo con la tradición oral se refiere al ónix que se encontraba en el peñasco donde se ubican los principales sitios de explotación de éste y de donde surge el agua que alimenta las salineras (Macías-Cuellar et al., 2010). La producción de sal ha sido la actividad económica predominante en la comunidad, incluso antes de la conquista española. Algunos de los complejos de extracción de sal tienen más de 450 años de antigüedad, aunque la tradición salinera se ha ido perdiendo debido al variable precio en el mercado, la dificultad de su obtención y la migración (Flores-hernández & Martínez-jerónimo, 2016; Thomé-Ortiz et al., 2017) (Figura 9).

El municipio de Zapotitlán Salinas tiene un clima correspondiente, de acuerdo con la clasificación de Koppen a seco o semiárido con régimen de lluvias en verano con un cociente menor de 22.9°C , es decir BS. Los suelos son derivados de evaporitas, halomórficos con diferentes estados de salinidad y alcalinidad.

3.4.2 *Lago de Totolcingo*

El área de estudio está en el estado de Puebla, límite del de Tlaxcala. En época de inundación, su área superficial alcanza $857,5 \text{ km}^2$. La temperatura media anual es de 13.89°C y la precipitación de 426.4 mm , por lo cual se caracteriza con un clima estepario seco. La época seca se caracteriza por la escasa precipitación ($75\text{-}100 \text{ mm}$) y la gran fluctuación de temperatura ($3\text{-}21^{\circ}\text{C}$). El agua intersticial es altamente alcalina ($\text{pH} = 10,4$) y solución salina (50 mS / cm) (Alcocer et al., 1996) (Figura 10).



Figura 10 Lago de Totolcingo, Puebla - vista general del área de estudio Li Hau F., 2018, Google Earth, accesado Mayo 2018.

3.4.3 *Lago de Texcoco*

El área de estudio pertenece a la zona conocida como el Valle de Anáhuac; localizada al oriente del Valle de México, es una de las cuencas endorreicas características de la zona. La región estudiada (altitud 2237 msnm) está situada en el centro de la zona federal de lo que se conoce como el lago de Texcoco. Tras el cierre de la compañía Sosa Texcoco, se establecieron las colonias de Jardines de Morelos y Nueva Santa Rosa. La zona de muestreo está ubicada en las coordenadas N 19°29'39.61", O 99°00'04.18".

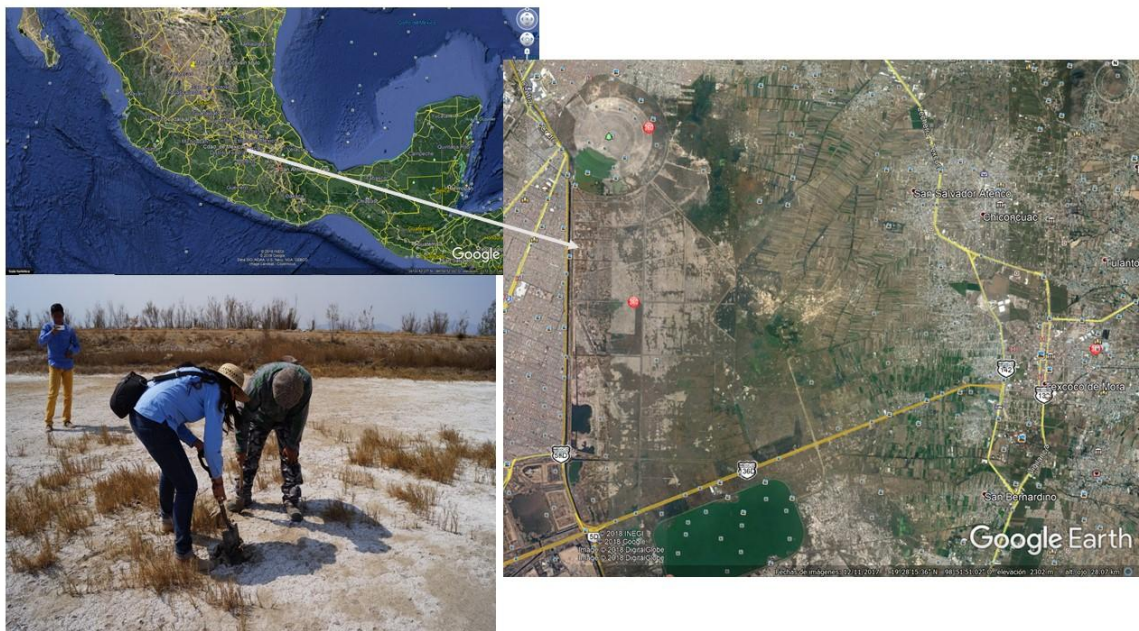


Figura 11 Ex-lago de Texcoco, Estado de México - vista general del área de estudio Li Hau F., 2018, Google Earth, accesado Mayo 2018..

El Lago de Texcoco ha sido de los más importantes de México debido a la cantidad de recursos que se han extraído a lo largo de su historia. Se tiene registrada la presencia de peces e insectos comestibles como el ahuate. Sin embargo, el tequesquite ha sido el recurso más valioso. Otro recurso que se extraía del gigantesco evaporador solar de la compañía Sosa Texcoco, conocido como el caracol, era el alga espirulina. Este nombre de debe a la forma espiral de esta cianobacteria verde-azul que es considerada uno de los alimentos más nutritivos

debido a la cantidad de proteínas presentes por gramo. Al cierre de actividades de la compañía, se dejó de obtener este recurso y los otros antes descritos.

Esta zona fue elegida por su alta variabilidad espacial de concentración de sales dentro de una misma área y por considerarse zona poco perturbada por las anteriores obras de rehabilitación (Fernández-Buces et al., 2006). El suelo superficial tiene en general un aspecto de sequedad y es quebradizo al contacto, además de la presencia de grietas en algunas zonas sin vegetación. Cabe señalar que en esta zona se encontraba establecida una población de pasto salado, *Distichlis spicata*, la cual varía en cobertura, crecimiento y asociación con otras especies de plantas en relación con la salinidad del suelo (Figura 11). Actualmente, este sitio se encuentra en la zona del proyecto del nuevo aeropuerto de la Ciudad de México.

4 JUSTIFICACIÓN

Durante el estudio y análisis de los ciclos biogeoquímicos, se trabaja con bioprocesos separados en compartimentos y subcompartimentos que permiten reconocer procesos bioquímicos de transporte y transformación de elementos en distintas especies químicas. Este modo de trabajo se limita a reconocer y detallar parámetros fisicoquímicos ambientales que afectan a los procesos intercelulares en las rutas de especiación elemental, secuencias de material genético, codones o genes involucrados en el ensamble de enzimas, reconstrucción de los procesos de interacción enzima – energía, potencial redox y destino de las moléculas resultantes y listas para el siguiente proceso posible. De este modo se obtiene una idea de la función celular y ambiental del proceso, además de la magnitud de su impacto. Sin embargo, no se reconoce en modo determinante al microorganismo responsable de portar esa maquinaria genética, su función e importancia ecológica. En los reportes se asumen como aproximaciones taxonómicas y se registra como unidades taxonómicas operacionales (OTU's), que abundan y predominan en la base de datos. Este modo de trabajo ilustra la conveniencia de superar el aislamiento clásico del microorganismo y avanzar en el conocimiento de su intervención ecológica a través de su función. Sin embargo, el conocer y determinar taxonómicamente al microorganismo responsable, hoy tiene relevancia. Es deseable y necesario redirigir los esfuerzos a aislamientos de estas cepas funcionales con los actuales conocimientos y avances técnicos y comenzar a depurar las bases de datos de OTU's. Los beneficios pueden ser amplios en términos del conocimiento evolutivo, fisiológico, morfológico, del ciclo de vida, nicho-específicas, biogeográfico, ecológico, biotecnológico y climático. Este esfuerzo es aún más importante al trasladar las técnicas a sitios salinos que han sido poco estudiados en cuanto al papel funcional que tienen en el ecosistema y que, al contrario, muchas veces se estudian como sitios a remediar. El estudio de la microbiología funcional de sedimentos salinos brindará una nueva visión de su papel en el ecosistema.

5 OBJETIVO GENERAL

Determinar la presencia de microorganismos (dominios Archaea y Bacteria), de grupos funcionales involucrados en metanogénesis, oxidación anaerobia del metano (ANME), sulfatorreducción y oxidación anaerobia del amonio (anammox) en sedimentos de ambientes salino-sódicos (Ex-Lago de Texcoco, Lago de Totolcingo, Secadores de sal de San Antonio Texcala y pozos de abastecimiento de agua salina).

5.1 Objetivos particulares

Determinar la actividad bioquímica de los microorganismos funcionales de metanogénesis, ANME, sulfatorreducción y anammox en microcosmos (medio líquido).

Realizar aislamientos de colonias de grupos funcionales mediante la técnica de *roll-tube*, posterior a enriquecimiento de estas, en medio líquido función-específico.

6 MATERIALES Y MÉTODO

6.1 Sitio de Muestreo y toma de muestra

En la Tabla 1 se muestran los sitios de toma de muestra con el nombre de los sitios efectuados en el estado de Puebla y Estado de México, el nombre de identificación y las coordenadas de localización.

Tabla 1 Coordenadas GPS de los sitios de muestreo.

Nombre del sitio	Coordenadas	Fecha de toma de muestra
Ex - Lago de Texcoco	19.497278N -99.000056O	Febrero 2014
San Antonio Texcala (Pozo antiguo) (TX)	18.40072° N 97.44547° O	15-October-2016
Jardín Botánico "Helia Bravo" (Secador de sal) (HBr)	18.34627° N 97.45018° O	15-October-2016
Jardín Botánico "Helia Bravo" (Pozo) (HBp)	18.34680 °N 97.44883°O	15-October-2016
Lago de Totolcingo (T)	19.29553°N 97.59528 °O	16-October-2016

El sitio del Ex – Lago de Texcoco fue muestreado durante un periodo anterior al presente estudio. De los sitios de Puebla, se tomaron muestras de sedimento y agua. La toma de muestras se ilustra de la Figura 12 a la .

Las muestras se mantuvieron en hielo desde la fecha de toma hasta llegar al laboratorio (24 a 36 horas) donde se mantuvieron en refrigeración (-5°C). En laboratorio se tomaron muestras microbiológicas (10g), conservadas en nitrógeno líquido para análisis moleculares posteriores.



Figura 12 Salineras de San Antonio Texcala



Figura 13 Toma de muestra Salineras de San Antonio Texcala, pozo antiguo. (TX) (Izq.) Se observa el horizonte del agua (flecha) que refleja la cueva. (Der.) Se observa la coloración de la muestra en la draga. Li Hau F., 2018.



Figura 14 Salineras de Jardín Botánico Helia Bravo



Figura 15 Toma de muestra de Secador de sal, Jardín Botánico Helia Bravo. (a) Se observa la coloración rosada del secador de sal. (b) Sedimento del secador de sal. Se observa una coloración verde/rosada/amarilla en el mismo. (c) Toma de parámetro fisicoquímicos del agua. (d) Obtención de sedimento del secador de sal. Li Hau F., 2018.



Figura 16 Toma de muestra Pozo en uso, Jardín Botánico Helia Bravo. (a) Se observa la profundidad del pozo. (b) Toma de parámetros fisicoquímicos (c, d) Obtención de muestra de sedimento utilizando draga Li Hau F., 2018.



Figura 17 Lago de Totolcingo

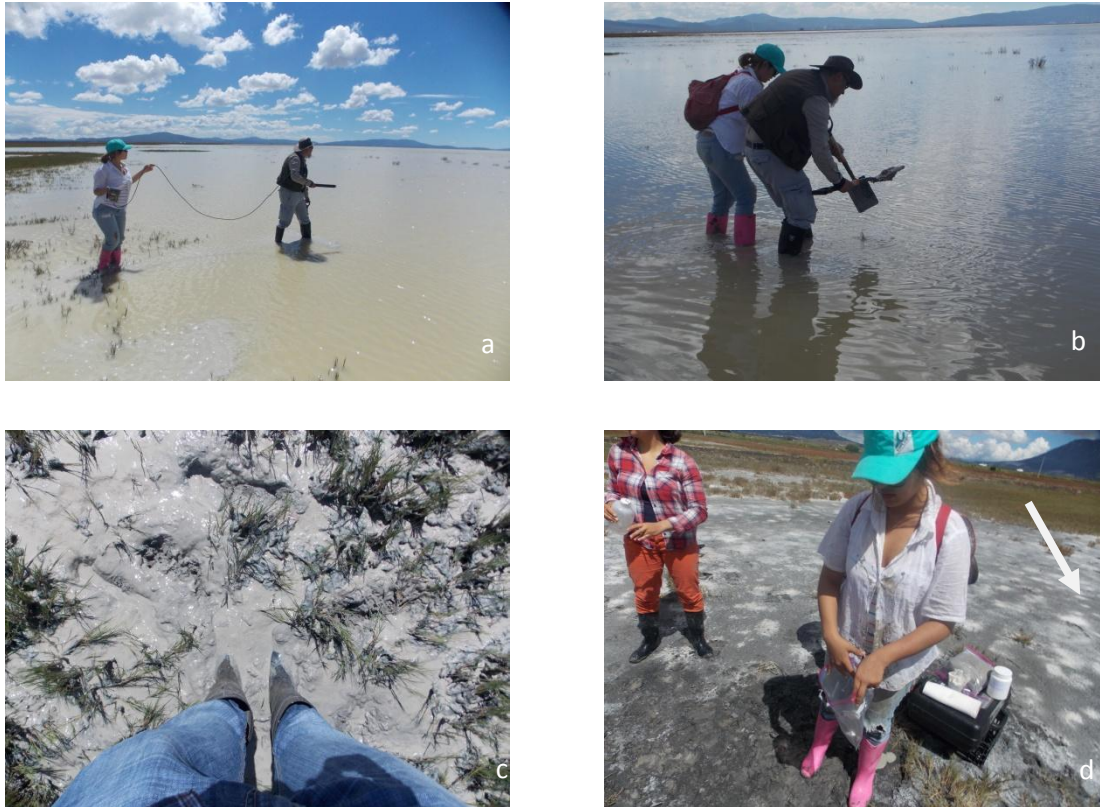


Figura 18 Toma de muestra Totolcingo. (a) Obtención de parámetro fisicoquímicos (b) Obtención de muestra de sedimento (c) Sedimento húmedo (d) Suelo seco con florecimiento de Tequesquite (flecha) Li Hau F., 2018.

6.2 Enriquecimiento de microorganismos halófilos funcionales anaerobios

De los sitios de Puebla se realizaron extractos para fase acuosa de medios líquidos diferenciales (AMA, AMH Y ANME) colocando 100 ml muestra + 400 ml agua destilada en autoclave. La fase acuosa fue recuperada en frascos estériles y mantenida en refrigeración (-5°C) (Figura 19). Para los medios anammox y SR no se utilizó fase acuosa diferencial por falta de extracto de suelo. De los sitios del Ex – Lago de Texcoco, no se pudo realizar los diferentes enriquecimientos funcionales de estudio, debido a muestras iniciales insuficientes que no se pudieron repetir por causa de falta de acceso y probable modificación de los sitios seguido al arranque del proyecto del Nuevo Aeropuerto de la Ciudad de México.

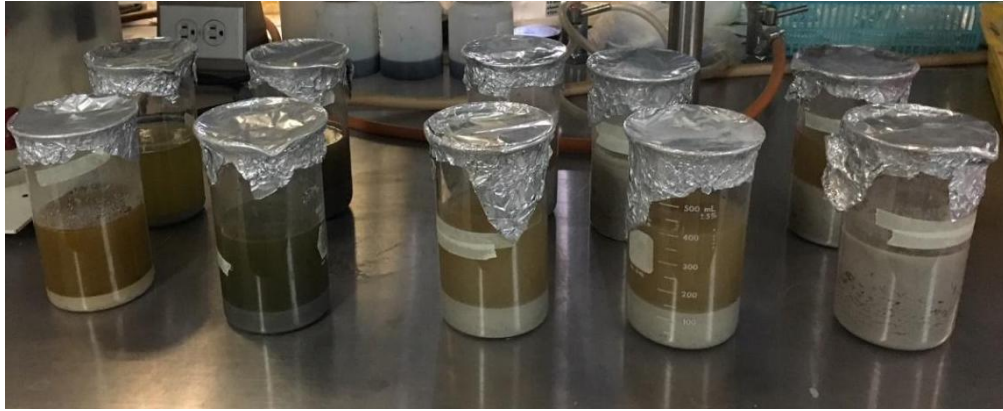


Figura 19 Obtención de extracto de suelo. (Izq a derecha) TX, HBr, HBp, HBP, T. Li Hau F., 2018.

Se realizaron medios de cultivo de enriquecimiento para cada función específica: ANME (Archaeas metanótrofas anaerobias, por sus siglas en inglés), AMH (Archaeas metanógenas hidrogenófilas), AMA (Archaeas metanógenas acetoclásticas), BSR (Bacterias Sulfatoreductoras) y anammox (Bacterias oxidantes anaeróticamente del amonio, por sus siglas en inglés) (Anexo 1). En cada frasco (2 x función x sitio) se colocaron 2 g de suelo y se mantuvieron a 20°C. Los frascos se observaron semanalmente y se purgó la atmósfera con mezclas gaseosas de $N_2-CO_2 + 25\% CH_4$, H_2-CO_2 , N_2 , N_2-CO_2 y He, respectivamente de acuerdo con la función (Figura 20). Los enriquecimientos fueron re-inoculados posteriormente en dos ocasiones (promedio de seis meses de incubación por etapa).



Figura 20 Medios de cultivo para AMH y AMA (Antes de ser inoculados), de izquierda a derecha por sitio: TC, HBp, HBr y TX. Se observa la coloración diferente de cada uno debido al contenido mineral de la fase acuosa Li Hau F., 2018.

6.3 Aislamiento de microorganismos halófilos funcionales anaerobios

De cada cultivo de enriquecimiento (segunda etapa) para cada función específica, ANME, AMH, AMA, BSR y anammox, se realizaron etapas de aislamiento por medio de la técnica de *roll-tube* a base de los medios específicos citados anteriormente (Hungate, 1969) (Figura 21). La atmósfera anaerobia de cada frasco se realizó específicamente a su función correspondiente. La temperatura de incubación fue de 20°C.



Figura 21 De los cultivos enriquecidos al aislamiento por la técnica de *roll-tube* (Hungate, 1969). Fotos Li Hau F., 2018.

6.4 Cinética enzimática de la función anammox en el Ex – Lago de Texcoco

En estudios anteriores, se elaboraron enriquecimiento de la actividad anammox del sitio Ex – Lago de Texcoco. Dos cinéticas de actividad anammox fueron realizadas con 6 suelos del Ex lago de Texcoco (6 sitios diferentes). Tres de estos sitios tenían una salinidad baja (conductividad de $8.0 \pm 2.8 \text{ mS.cm}^{-1}$, pH 9.1 ± 0.1) y 3 una salinidad alta (conductividad de $58.7 \pm 13.9 \text{ mS.cm}^{-1}$, pH 10.0 ± 0.1). 40 g de suelo fueron colocados en 57 frascos de 125 mL por cada sitio, y estos frascos fueron alimentados con un medio de cultivo específico del metabolismo anammox (Anexo 1). Cada frasco fue cerrado herméticamente y el aire fue purgado con helio por 5 min. Las dos cinéticas se realizaron: una al tiempo inicial correspondiente al tiempo de muestreo (Febrero 2014), y otra después de 40 días de enriquecimiento anammox. Las cinéticas se mantuvieron en una incubadora a 23 °C. Se componen de 6 puntos que se distribuyen en 16 días. Para cada punto de esta cinética, las medidas fueron realizadas con tres frascos de cada uno de los 6 sitios del ex lago de Texcoco. 20 mL de gas fueron tomados de cada frasco y conservados en frascos de 25 mL anteriormente purgados con helio para medida de la

concentración de dinitrógeno (N_2). Un total de 24 g de suelo fue sacado de cada frasco para medida de cantidad de nitrato (NO_3^-), nitrito (NO_2^-) y amonio (NH_4^+). Entre cada cinética, los microcosmos fueron realimentados con 2 mL de medio de cultivo suplementado con una fuente de carbono (Caudan, 2015).

Sin embargo, las dos cinéticas realizadas no permitieron la publicación de los resultados. Por lo tanto, en este estudio, se repitió una tercera cinética después de 229 días de enriquecimiento. El protocolo fue idéntico al desarrollado en las dos cinéticas anteriores.

6.5 Análisis fisicoquímicos

6.5.1 *Determinación del biogás*

La medición de las concentraciones de N_2 en muestras de biogás de los microcosmos se realizó utilizando un cromatógrafo de gases de marca Perkin Elmer, equipado con un detector de conductividad térmica (TCD) (Planta potabilizadora, CINVESTAV – IPN). La medición de las concentraciones de CO_2 y CH_4 en muestras de gases se realizó utilizando un cromatógrafo de gases de marca Agilent 4890D® (Agilent Technologies, Palo Alto, California, E.U.A.), equipado con un detector de ionización de flama (FID) acoplado a un metanizador (Laboratorio Ecología molecular, CINVESTAV – IPN).

6.5.2 *Cuantificación de nitrato (NO_3^-), nitrito (NO_2^-) y amonio (NH_4^+)*

Las cuantificaciones de nitratos, nitritos y amonio se determinaron de los extractos con K_2SO_4 , mediante un método colorimétrico en un analizador automático San Plus System-Skalar® en el Laboratorio de Ecología Molecular, Departamento de Biotecnología e Ingeniería, CINVESTAV.

7 Resultados y discusión

7.1 Actividad de Oxidación anaerobia del amonio (anammox) en el Ex-Lago de Texcoco

En los suelos de los 6 sitios muestreados, el pH revela una fuerte alcalinidad. Se observa una baja y alta conductividad eléctrica correspondiente respectivamente a una baja y fuerte salinidad (Tabla 2).

Tabla 2 Características fisicoquímicas de los suelos muestreados del Ex Lago de Texcoco (Febrero 2014) (Caudan, 2015).

Suelo	pH _{H₂O}	CE _s ^a	CRA ^b	Humedad	Vegetación
		dS.m ⁻¹	g.kg ⁻¹ suelo seco	%	Descripción
Salinidad 1	9.1 ± 0.1	34.2 ± 2.8	580	18.0 ± 1.6	Abundante <i>Distichlis spicata</i> (altura pasto: 30cm), poco <i>Eragrostis obtusiflora</i> , poco <i>Chenopodium mexicana</i>
Salinidad 2	10.0 ± 0.1	119.93 ± 13.9	540	17.4 ± 0.2	Poco <i>Distichlis spicata</i> (altura pasto: 10cm)

^aCEs Conductividad eléctrica del extracto saturado, ^bCRA Capacidad de Retención de agua

Después de 229 días de enriquecimiento en condiciones de oxidación anaerobia del amonio, se observó un consumo significativo de amonio y nitrito, con una producción significativa de dinitrógeno. Es posible comparar las tasas de consumo y producción de las diferentes especies de nitrógeno durante la fase exponencial de la cinética, con las tasas promedio de las tres cinéticas después de varios tiempos de enriquecimiento (

Tabla 3).

La producción de N_2 y las concentraciones de NH_4^+ y NO_2^- en suelos de microcosmos de salinidades estudiadas se representan en las Figura 22 y Figura 23.

Tabla 3 Tasa de consumo y producción de las formas de nitrógeno durante la actividad anammox de las 3 cinéticas: tiempo inicial, 40 días de enriquecimiento (cinéticas 1 y 2) (Caudan, 2015) y 229 días de enriquecimiento (cinética 3) (presente estudio)

	Salinidad 1			Salinidad 2		
	Sitio 1	Sitio 2	Sitio 3	Sitio 1	Sitio 2	Sitio 3
Promedio de velocidad máxima (Pendiente de fase exponencial de las cinéticas 1 y 2 (mg kg^{-1} suelo seco d^{-1})) (Caudan, 2015)						
Consumo NH_4^+	1.98	2.02	2.13	3.32	3.04	1.92
Consumo NO_2^-	1.26	1.35	1.19	1.09	1.21	1.23
Producción N_2	6.39	3.82	5.54	2.29	2.71	2.85
Pendiente de fase exponencial de la cinética 3 (mg kg^{-1} suelo seco d^{-1}) (este estudio)						
Consumo NH_4^+	16.70	15.07	13.37	64.81	37.93	15.27
Consumo NO_2^-	1.99	2.39	1.35	1.13	3.24	4.99
Producción N_2	57.55	98.80	27.17	24.72	36.27	32.09
<i>p-values</i> (Producción N_2 entre cinéticas "1-2" y "3")	0.00001	0.04033	0.00759	0.00267	0.00189	0.00025

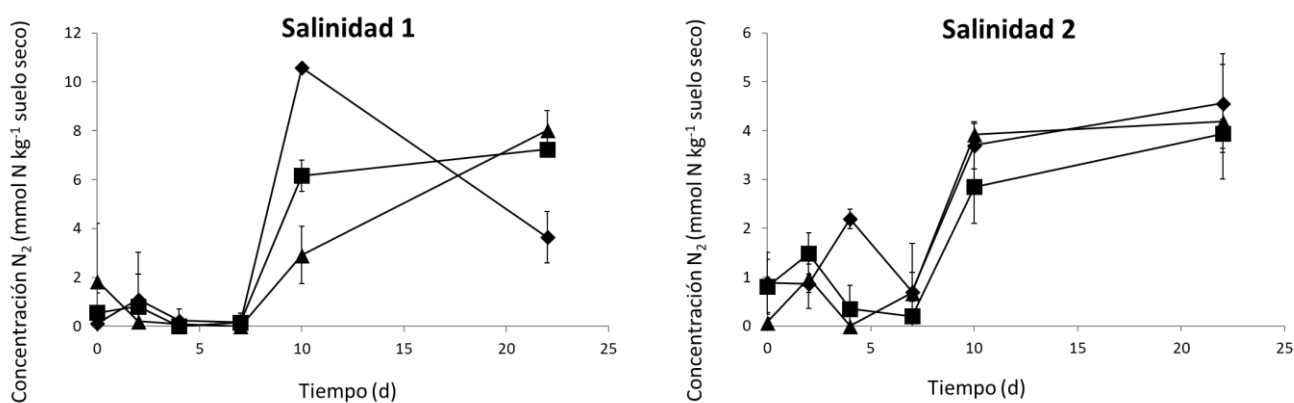


Figura 22 Producción de N_2 en microcosmos de suelos del Ex Lago de Texcoco, después de 229 días de enriquecimiento a la condición anammox – para cada salinidad: Sitio 1, ■; sitio 2, ◆; sitio 3, ▲.

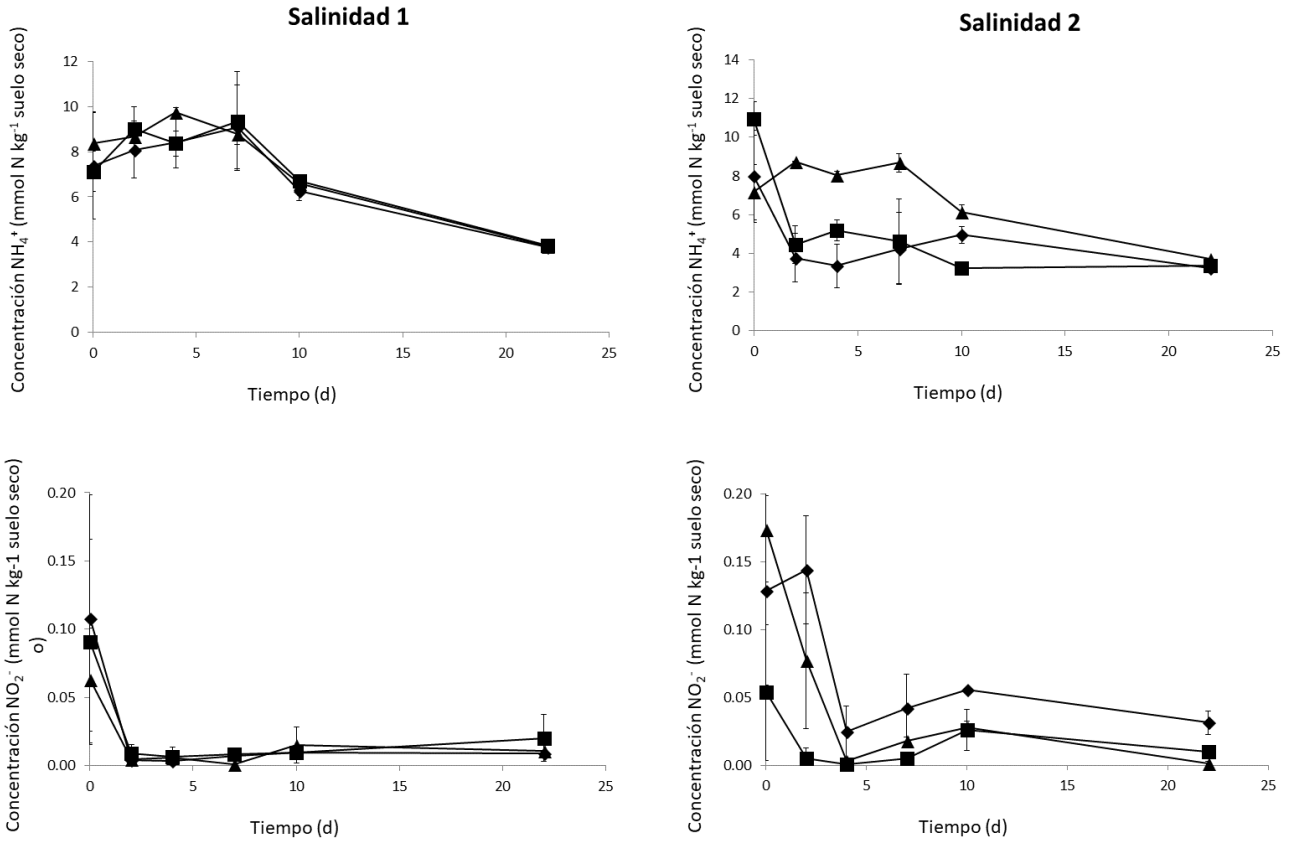


Figura 23 Consumo de NH_4^+ y NO_2^- en microcosmos de suelos del Ex Lago de Texcoco, después de 229 días de enriquecimiento a la condición anammox – para cada salinidad: Sitio 1, ■; sitio 2, ◆; sitio 3, ▲.

Se observa una producción de N_2 en los microcosmos de las dos salinidades (Figura 22). La cinética realizada en suelos esterilizados (no mostrados) no presenta producción, lo que implica que lo observado sí es inducida por la actividad microbiana anaerobia. También se puede observar que la producción de gas en los sitios de salinidad 2 es al menos tan importante como en el suelo de la salinidad 1.

Se observa en la

Tabla 3 un aumento en la cinética 3, de la velocidad de consumo de NH_4^+ y producción de N_2 hasta 10 veces mayor a las cinéticas 1 y 2. Rojas-Oropeza (2012) determinó una baja diversidad de la función anammox por amplificación del gen *hzoA* en el suelo del Ex Lago de Texcoco. Por lo tanto, el periodo de enriquecimiento de 229 días permitió el crecimiento del número de células bacterianas anammox que se reflejó en el aumento de su actividad. Se propone que en estudios posteriores se analice la estructura funcional de la muestra enriquecida.

Como se esperaba en el caso de una actividad de anammox, las concentraciones de NH_4^+ y NO_2^- siguieron la tendencia opuesta con la disminución de estas formas de nitrógeno. Mientras que, en cada caso, el NO_2^- prácticamente desapareció por completo en menos de dos días, el NH_4^+ mostró una disminución promedio del 54% durante la cinética, ambos en el caso de cada suelo de salinidad (Figura 23). Después del período de enriquecimiento de anammox de 229 días, la conversión estequiométrica de NO_2^- y NH_4^+ a N_2 es completa en los suelos estudiados, en base al proceso anammox, donde 1 mol de NH_4^+ resultó en 1.02 mol de N_2 (Saricheewin et al., 2010). Esas mediciones destacan la asociación del consumo de NO_2^- y NH_4^+ con la producción de N_2 . Cada vez, el elemento limitante es el NO_2^- , ya que el nutriente prácticamente se consume desde el cuarto día de cinética para cada sitio de ambas salinidades. Se nota que la velocidad de anammox es ligeramente más alta en el caso de los suelos de salinidad 1.

En el medio utilizado en el presente estudio, pueden encontrarse las condiciones necesarias para tener presencia de desnitrificación y consecuente producción de N_2 . Sin embargo, la actividad anammox detectada durante la cinética del presente estudio se relaciona con los resultados de Rojas-Oropeza (2012), donde se determinó la presencia de dos unidades operacionales taxonómicas (OTU's) similares a Candidatus *Jettenia caeni* del phylum Planctomycetes (árbol filogenético actualizado a 2017). Es recomendable en futuros estudios adicionar acetileno al microcosmo para inhibir la actividad de la enzima nitroso reductasa (*nosZ*) que permite la reducción del óxido nitroso (N_2O) a N_2 , junto con el uso de NH_4^+ marcado.

Las bacterias anammox son responsables de casi el 35% de la remoción de nitrógeno en sitios anaerobios (Dalsgaard et al., 2005), este metabolismo produce hasta la mitad del N_2 global a nivel marino en columnas de aguas anóxicas. El cambio de uso de suelo en sitios que albergan estas comunidades bacterianas tiene un efecto global aún desconocido.

Adicionalmente, es interesante añadir que, aunque se trabaja sobre la oxidación anaerobia del amonio como metabolismo principal, en las condiciones de la tierra primitiva donde se tenían altas concentraciones de amoniaco debido a la actividad geológica de la Tierra (Klotz & Stein, 2008), no es difícil imaginar que se utilizara el amoniaco atmosférico en el metabolismo microbiano. Esto podría ser llevado a cabo aún en la actualidad por bacterias presentes en lagos como Ex Lago de Texcoco que, sin embargo (Dalsgaard et al., 2005).

7.2 Actividad anaerobia en Lago de Totolcingo y Salinas de Tehuacán, Puebla.

Después de 12 meses de cultivo en medio líquido de enriquecimiento (microcosmos) se observó actividad microbiana, como aumento de la presión de gas en los microcosmos de todos los medios funcionales: es decir, metanogénesis acetoclástica, metanogénesis hidrogenófila, oxidación anaerobia del metano y oxidación anaerobia del amonio. En microcosmos de sulfatoreducción la producción de H_2S con la precipitación de gránulos de sulfuro de hierro (FeS) (Tabla 4).

Tabla 4 Tabla de Presencia/Ausencia de actividad microbiana

	San Antonio Texcala	Helia Bravo secador rosa	Helia bravo pozo	Totolcingo
Metanogénesis acetoclástica (mmol CH_4)	0.105	0.343	0.076	0.039
Metanogénesis hidrogenófila (mmol CH_4)	0.022	0.037	0.053	0.023
Oxidación anaerobia del metano (mmol CO_2)	0.092	0.094	0.09	0.099

Oxidación anaerobia del amonio (mmol N₂)	0.5	0.523	0.012	0.61
Sulfatoreducción	FeS	FeS	FeS	FeS

Las concentraciones de sal en los microcosmos (100g/L) corresponden a un 10% de NaCl lo cual se relaciona con el favorecimiento de microorganismos moderadamente halófilos (Andrei et al., 2015). Las cinco funciones estudiadas se encuentran presentes y se podría relacionar con una alta diversidad en ambientes salinos como lo cita Andrei y colaboradores (2015). Estudios futuros deberán determinar la estructura funcional con técnicas independientes de cultivo como secuenciación de nueva generación.

7.2.1 *Metanogénesis y sulfatoreducción*

En el caso de metanogénesis acetoclástica e hidrogenófila, de acuerdo con el balance estequiométrico basado en el medio de cultivo y el biogás producido, tuvieron los siguientes porcentajes de actividad: TX 17.3-17%, HBR 56.2-29%, HBP 12.5-20.7% y TC 6-16%, respectivamente. La diversidad de los sitios estudiados da lugar a variados análisis de resultados.

En todos los tratamientos a los que se sometieron las muestras, el Lago de Totolcingo presentó una actividad menor a los sitios de explotación antropogénica. Las sales presentes en el Lago de Totolcingo de acuerdo con Alcocer y Hammer (1998) son NaCl, Na₂CO₃, Na₂SO₄ y KCl. La presencia de sulfato en el agua representa una característica ambiental que favorece la sulfatoreducción (Shabir et al., 2008). Así, la actividad de las bacterias sulfatoreductoras en el sitio Totolcingo, se evidenció con una fuerte pigmentación negra en los microcosmos. La mayor actividad de las arqueas metanógenas hidrogenófilas (16%), en comparación con las acetoclásticas

(6%), se podría explicar por la presencia de NaCO_3 que permitiría disminuir la dominancia de las bacterias sulfatoreductoras (Litchfield, 2011).

En el caso de el secador del Jardín Botánico Helia Bravo y el pozo que alimenta los secadores de este, podemos ver que la mayor actividad está presente en el secador. Debido a que los medios fueron adicionados con 100g/L de sal, es comprensible que las condiciones favorezcan el crecimiento de microorganismos halófilos. El secador por definición tiene mayor concentración de sal que el pozo, por lo que los organismos presentes en la muestra del secador ya han sufrido diversos procesos de selección hacia la halofilia estricta.

El pozo antiguo de San Antonio Texcala, que solía utilizarse en el periodo precolonial y que actualmente esta en desuso, presenta una actividad metanogénica muy similar al pozo del Jardín Botánico Helia Bravo. Ambos sitios son alimentados por el mismo acuífero y las condiciones probablemente favorecen los microorganismos halotolerantes (Eugster & Hardie, 1978).

7.2.2 Oxidación anaerobia del metano

Para la función de oxidación anaerobia del metano, conocida también como metanogénesis reversa, se obtuvo: TX 69.13%, HBR 70.1%, HBP 67.6% y TC 74%, de porcentaje de actividad. Es notable que la actividad, a la salinidad del medio es alta. Existe poca información aún en esta actividad, la cual se conoce desde apenas 20 años (Cui et al., 2015). En estos ambientes las arqueas del grupo ANME son las principales reguladoras de las emisiones de metano al ambiente. Offre y colaboradores (2013) citan la importancia de las arqueas metanótrofas anaerobias a nivel global y especialmente en ambientes salinos. El sitio de Totolcingo presenta una actividad ligeramente mayor a los demás sitios lo cual se podría relacionar con la presencia de NaSO_4 en el agua (Alcocer & Hammer, 1998; Mengmeng et al., 2014).

7.2.3 Oxidación anaerobia del amonio

Para la función de oxidación anaerobia del amonio, se obtuvo: TX 90.4%, HBR 94.7%, HBP 2.2% y TC 110%, de porcentaje de actividad. Nuevamente se observa una diferencia entre los sitios Jardín Botánico Helia Bravo Pozo y Secador Rosa (HBP y HBR, respectivamente), donde el pozo presenta una muy baja actividad anammox. Las bacterias de este grupo son comunes en ambientes de agua dulce y salina, contribuyen a la mitad de la pérdida de nitrógeno mundial (Gao et al., 2018). En ambientes salinos el género *Candidatus Scalindua* es predominante.

7.2.4 Aislamiento de microorganismos halófilos funcionales anaerobios

En el presente estudio se obtuvieron 2, 2, 3 y 4 colonias de bacterias sulfatoreductoras, respectivamente en los sitios TX, HBR, HBP y TC. Estos microorganismos son los más representados en los porcentajes de cultivos puros (Figura 7). Además, en estos ambientes salinos tienen las condiciones favorecidas para su crecimiento. Contrastantemente las bacterias anammox que tienen una gran sintrofia, representan un reto en su aislamiento y se refleja en el bajo número de organismos aislados (Figura 8) y en colonias producidas en este estudio (Tabla 5; Figura 24). La eficiencia de aislamiento en metanogénesis y metanotrofia anaerobia fue provechosa. Sin embargo, es necesario realizar más etapas de aislamiento seguido por cinéticas enzimáticas para cada función.

Tabla 5 Cepas cultivadas, colonias con mayor producción por sitio.

	San Antonio Texcala	Helia Bravo secador rosa	Helia bravo pozo	Totalcingo
Metanogénesis acetoclástica (mmol CH ₄)	155.64 (6 colonias)	-	-	-
Metanogénesis hidrogenófila (mmol CH ₄)	1.45 (4 colonias)	-	17.86 (7 colonias)	445.95 (2 colonias)
Oxidación anaerobia del metano (mmol CO ₂)	-	303.7 (2 colonias)	282.13 (4 colonias)	-

Oxidación anaerobia del amonio (mmol N₂)	-	-	313.343 (1 colonia)	-
Sulfatorreducción	FeS (2 colonias)	FeS (2 colonias)	FeS (3 colonias)	FeS (4 colonias)

Los alcances de realizar aislamientos de microorganismos de esto tipo son variados, incluyendo ciencia básica como estudios bioquímicos, fisiológicos, ambientales, ecológicos y biotecnológicos como obtención de enzimas importantes en procesos industriales, estabilizadores osmóticos, pigmentos, exopolisacáridos utilizados como agentes gelificantes (Oren, 2002).

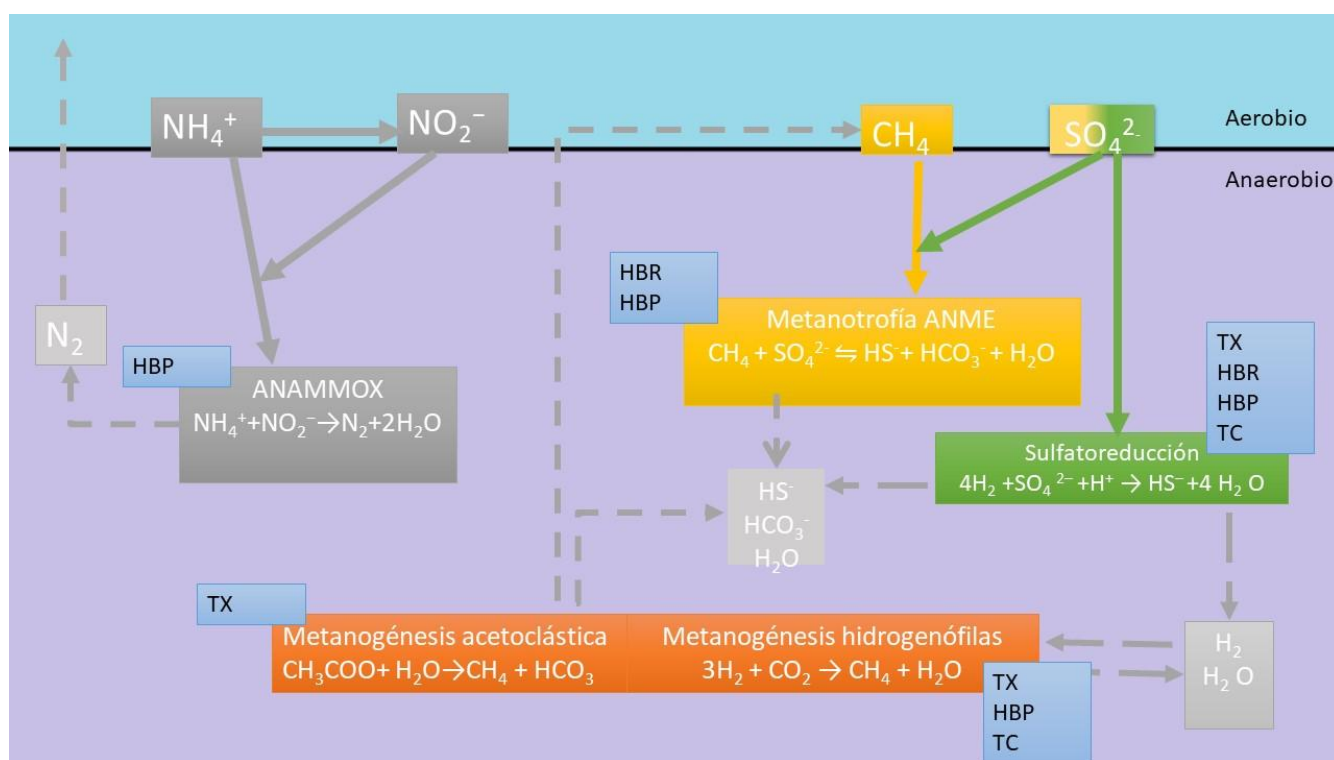


Figura 24 Actividad microbiana anaerobia presente, en cultivos de colonias, por sitio Li Hau F., 2018.

Otro punto a discutir sobre metabolismo microbiano anaerobio en ambientes extremos, es la tierra primitiva. Actualmente la hipótesis de presencia de CH_4 y NH_3 en la atmósfera de la Tierra primitiva, ayuda a resolver el problema del sol “débil” durante los primeros Giga-años de formación terrestre, aunque una capa de CO_2 más gruesa también podría resolver este problema (Chyba, 2010). Aunque existen diversos puntos en contra a la hipótesis de una atmósfera rica en CH_4 y NH_3 , la posibilidad de que hubiera presencia de NH_3 y la subsecuente presencia de metabolismo microbiano que utilizara este compuesto bajo las condiciones anóxicas de la atmósfera primitiva existe y pudo haber tenido un gran impacto en el ciclo del nitrógeno en la Tierra primitiva (Francis et al., 2005). En la actualidad, existen ambientes extremos que simulan microescenarios del fondo evolutivo que pudo haber existido en la Tierra primitiva. Pueden estudiarse estos procesos y el metabolismo microbiano presente en los mismos durante eventos geológicos como actividad volcánica (Hynek et al., 2018). El presente estudio abre la pauta para generar nuevas preguntas sobre el reciclaje de nutrientes en la Tierra primitiva y plantear nuevas hipótesis sobre nuevas rutas metabólicas en ambientes salinos anaerobios.

Conclusiones

En el suelo salino sódico del ex Lago de Texcoco, se observó actividad anammox después de un periodo de enriquecimiento de 229 días. Para detectar la actividad anammox el periodo de enriquecimiento fue necesario y estuvo relacionado con una baja actividad enzimática inicial.

En los sedimentos de sitios salinos de Puebla, las actividades de metanogénesis acetoclástica, metanogénesis hidrogenófila, oxidación anaerobia del metano, sulfatorreducción y anammox están presentes a altas concentraciones de sal que corresponden a metabolismos halófilos moderados. Los sitios conservados no presentan contraste notable con los sitios de uso antropogénico.

Es importante señalar que ya que los sitios salinos pueden tener sales diferentes, la composición del sitio se refleja en el metabolismo predominante, por lo que es necesario realizar estudios en diversos sitios salinos y su aporte diferencial al ecosistema.

La actividad microbiana, no sólo es importante a nivel funcional, el estudio de la vida a altas concentraciones de sal ayuda a ensanchar los límites conocidos para la misma y a generar nuevo conocimiento que puede ser utilizado para la obtención, por ejemplo, de enzimas halófilas para procesos industriales o biotecnológicos, pero antes es necesario realizar estudios como este, que nos den un panorama general del funcionamiento del sitio.

La presencia de microorganismos con actividad de metanogénesis acetoclástica, metanogénesis hidrogenófila, oxidación anaerobia del metano, sulfatorreducción y anammox en ambientes salinos, así como la obtención de cultivos puros, representa un gran interés en el conocimiento del ciclo de carbono, nitrógeno y azufre en ambientes extremos y la evolución de la Tierra.

En el presente estudio se realizaron enriquecimientos de Puebla y del Estado de México. En todos los sitios se observó actividad microbiana a altas concentraciones de sal. El hecho de que estos metabolismos funcionales importantes en el reciclaje de nutrientes a nivel global estén presentes en sedimentos salinos refleja la importancia del estudio de los mismos y el papel que los sitios salinos, comunes en México, tienen a escala global.

8 BIBLIOGRAFIA

- Alcocer, J., & Hammer, U. T. (1998). Saline lake ecosystems of Mexico. *Aquatic Ecosystem Health and Management*, 1(October), 37–41.
- Alcocer, J., Lugo, A., Escobar, E., & Sanchez, M. (1996). The macrobenthic fauna of a former perennial and now episodically filled Mexican saline lake. *International Journal of Salt Lake Research*, 5(3), 261–274. <https://doi.org/10.1007/BF01997141>
- Andrei, A.-Ș., Robeson, M. S., Baricz, A., Coman, C., Muntean, V., Ionescu, A., ... Banciu, H. L. (2015). Contrasting taxonomic stratification of microbial communities in two hypersaline meromictic lakes. *The ISME Journal*, 9(12), 2642–2656. <https://doi.org/10.1038/ismej.2015.60>
- Aoki, M., Ehara, M., Saito, Y., Yoshioka, H., Miyazaki, M., Saito, Y., ... Imachi, H. (2014). A long-term cultivation of an anaerobic methane-oxidizing microbial community from deep-sea methane-seep sediment using a continuous-flow bioreactor. *PLoS ONE*, 9(8). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0105356>
- Cabello, M. J., Castellanos, M. T., Romojaro, F., Martínez-Madrid, C., & Ribas, F. (2009). Yield and quality of melon grown under different irrigation and nitrogen rates. *Agricultural Water Management*, 96(5), 866–874. <https://doi.org/10.1016/J.AGWAT.2008.11.006>
- Cabello, P., Roldan, M. D., & Moreno-Vivian, C. (2004). Nitrate reduction and the nitrogen cycle in archaea. *Microbiology*, 150(11), 3527–3546. <https://doi.org/10.1099/mic.0.27303-0>
- Camacho, A. (2009). *Sulfur Bacteria. Encyclopedia of Inland Waters*. <https://doi.org/10.1016/B978-012370626-3.00128-9>
- Campanaro, S., Treu, L., Kougiyas, P. G., De Francisci, D., Valle, G., & Angelidaki, I. (2016). Metagenomic analysis and functional characterization of the biogas microbiome using high throughput shotgun sequencing and a novel binning strategy. *Biotechnology for Biofuels*, 9(1), 1–17. <https://doi.org/10.1186/s13068-016-0441-1>
- Canfield, D. E., & Farquhar, J. (2012). The Global Sulfur Cycle. In A. H. Knoll, D. E. Canfield, & K. K. O. (Eds.), *Fundamentals of Geobiology* (1, pp. 49–64). Wiley-Blackwell.
- Casamayor, E. O., Triadó-Margarit, X., & Castañeda, C. (2013). Microbial biodiversity in saline shallow lakes of the Monegros Desert, Spain. *FEMS Microbiology Ecology*, 85(3), 503–518. <https://doi.org/10.1111/1574-6941.12139>
- Castellón Huerta, B. R. (2009). Un grano de sal: aportaciones etnoarqueológicas al estudio histórico de una industria ancestral. *Anuario de Historia*, 2, 67–84. Retrieved from <http://revistas.unam.mx/index.php/anhist/article/view/31577>
- Caudan, C. (2015). *Oxidación anaerobia del amonio, ANAMMOX: actividad enzimática y diversidad microbiana funcional en suelos de México: suelo extremófilo salino-sódico (ex - lago de Texcoco), suelo de humedal (Lagunas Chaschoc, Tabasco), suelo semiarido del valle de Mezquit*.
- Chyba, C. F. (2010). Countering the early faint sun. *Science*, 328(5983), 1238–1239. <https://doi.org/10.1126/science.1189196>
- Ciais, P., Sabine, C., Bala, G., Bopp, L., Brovkin, V., Canadell, J., ... Thornton, P. (2013). The physical science basis. Contribution of working group I to the fifth assessment report of the intergovernmental panel on climate change. *Change, IPCC Climate*, 465–570. <https://doi.org/10.1017/CBO9781107415324.015>
- Dalsgaard, T., Thamdrup, B., & Canfield, D. E. (2005). Anaerobic ammonium oxidation (anammox) in the marine environment. *Research in Microbiology*, 156(4), 457–464. <https://doi.org/10.1016/j.resmic.2005.01.011>
- Eugster, H. P., & Hardie, L. A. (1978). Saline Lakes. *Chemistry, Geology, and Physics of Lakes*, (1), 237–293.
- Falkowski, P. G. (2012). The Global Carbon Cycle: Biological Processes. *Fundamentals of Geobiology*, 5–19. <https://doi.org/10.1002/9781118280874.ch2>

- Falkowski, P. G., Fenchel, T., & Delong, E. F. (2008). The microbial engines that drive earth's biogeochemical cycles. *Science*, 320(5879), 1034–1039. <https://doi.org/10.1126/science.1153213>
- Fernández-Buces, N., Siebe, C., Cram, S., & Palacio, J. L. (2006). Mapping soil salinity using a combined spectral response index for bare soil and vegetation: A case study in the former lake Texcoco, Mexico. *Journal of Arid Environments*, 65(4), 644–667. <https://doi.org/10.1016/J.JARIDENV.2005.08.005>
- Flores-hernández, D. I., & Martínez-jerónimo, F. (2016). Detailed chemical composition of tequesquite , a pre-Hispanic and traditional mineral resource used in Mexico for culinary purposes, 26(5), 31–39. <https://doi.org/10.15174/au.2016.987>
- Francis, C. A., Roberts, K. J., Beman, J. M., Santoro, A. E., & Oakley, B. B. (2005). Ubiquity and diversity of ammonia-oxidizing archaea in water columns and sediments of the ocean. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 102(41), 14683–14688. <https://doi.org/10.1073/pnas.0506625102>
- Gao, D., Wang, X., Liang, H., Wei, Q., Dou, Y., & Li, L. (2018). Anaerobic ammonia oxidizing bacteria: ecological distribution, metabolism, and microbial interactions. *Frontiers of Environmental Science and Engineering*, 12(3), 1–15. <https://doi.org/10.1007/s11783-018-1035-x>
- García-Velázquez, L., & Gallardo, A. (2017). El ciclo global del nitrógeno. Una visión para el ecólogo terrestre. *Ecosistemas*, 26(1), aa-aa. <https://doi.org/10.7818/ECOS.2017.26-1.02>
- Guerrero, & Wit. (1992). MICROBIAL MATS IN THE INLAND SALINE LAKES OF SPAIN. *Limnetica*, 8, 197–204.
- Hanson, R. S., Hanson, T. E., & Hanson, R. S. (1996). Methanotrophic bacteria. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 60(2), 439–471.
- Houweling, S., Bergamaschi, P., Chevallier, F., Heimann, M., Kaminski, T., Krol, M., ... Patra, P. (2017). Global inverse modeling of CH₄ sources and sinks: An overview of methods. *Atmospheric Chemistry and Physics*, 17(1), 235–256. <https://doi.org/10.5194/acp-17-235-2017>
- Hungate, R. E. (1969). Chapter IV A Roll Tube Method for Cultivation of Strict Anaerobes. *Methods in Microbiology*, 3, 117–132. [https://doi.org/10.1016/S0580-9517\(08\)70503-8](https://doi.org/10.1016/S0580-9517(08)70503-8)
- Huntington, T. G. (2006). Evidence for intensification of the global water cycle: Review and synthesis. *Journal of Hydrology*, 319(1–4), 83–95. <https://doi.org/10.1016/J.JHYDROL.2005.07.003>
- Hynek, B. M., Rogers, K. L., Antunovich, M., Avard, G., & Alvarado, G. E. (2018). Lack of Microbial Diversity in an Extreme Mars Analog Setting: Poás Volcano, Costa Rica. *Astrobiology*, 18(7), ast.2017.1719. <https://doi.org/10.1089/ast.2017.1719>
- Ivanov, M. V. (1981). The Global Biogeochemical Sulphur Cycle. *Some Perspectives of the Major Biogeochemical Cycles*, (October 1977), 61–78. [https://doi.org/10.1016/0016-7037\(84\)90042-5](https://doi.org/10.1016/0016-7037(84)90042-5)
- Klotz, M. G., & Stein, L. Y. (2008). Nitrifier genomics and evolution of the nitrogen cycle. *FEMS Microbiology Letters*, 278(2), 146–156. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.2007.00970.x>
- Knief, C. (2015). Diversity and habitat preferences of cultivated and uncultivated aerobic methanotrophic bacteria evaluated based on pmoA as molecular marker. *Frontiers in Microbiology*, 6(DEC). <https://doi.org/10.3389/fmicb.2015.01346>
- Lens, P. (2009). Sulfur Cycle. *Environmental and Microbial Ecology*, 37(4–5), 361–369. [https://doi.org/10.1016/S0273-1223\(98\)00095-X](https://doi.org/10.1016/S0273-1223(98)00095-X)
- Litchfield, C. D. (2011). *Encyclopedia of Geobiology*. <https://doi.org/10.1007/978-1-4020-9212-1>
- Loka Bharathi, P. A. (1987). Sulfur Cycle. *Global Ecology*, (1899), 3424–3431.
- Macías-Cuellar, H., Mtz. de Castro, M. de la P., Hernández-Moreno, M., Rosas López, R., & Sánchez-Paredes, L. (2010). *Estudio para el ordenamiento territorial comunitario del ejido San Antonio Texcala, Puebla*.
- Mengmeng, C., Anzhou, M., Hongyan, Q., Xuliang, Z., & Guoqiang, Z. (2014). Anaerobic oxidation of methane: an “active” microbial process. *MicrobiologyOpen*, 4(1), 1–11. <https://doi.org/10.1002/mbo3.232>
- Muyzer, G., & Stams, A. J. M. (2008). The ecology and biotechnology of sulphate-reducing bacteria. *Nature Reviews Microbiology*, 6(6), 441–454. <https://doi.org/10.1038/nrmicro1892>
- Ochoa-Hueso, R. (2017). El ciclo del nitrógeno y el hombre: De lo esencial a lo excesivo. *Ecosistemas*, 26(1),

- 1–3. <https://doi.org/10.7818/ECOS.2017.26-1.01>
- Offre, P., Spang, A., & Schleper, C. (2013). Archaea in Biogeochemical Cycles. *Annual Review of Microbiology*, 67(1), 437–457. <https://doi.org/10.1146/annurev-micro-092412-155614>
- Rojas Oropeza, M. (2012). *Mineralización del nitrógeno en un ecosistema extremo, el suelo salino-sódico del Ex-Lago de Texcoco*. Universidad Nacional Autónoma de México.
- Rosswall, T. (1981). The Biogeochemical Nitrogen Cycle. *Some Perspectives of the Major Biogeochemical Cycles*, 25–50.
- Rutishauser, A., Blankenship, D. D., Sharp, M., Skidmore, M. L., Greenbaum, J. S., Grima, C., ... Young, D. A. (2018). Discovery of a hypersaline subglacial lake complex beneath Devon Ice Cap, Canadian Arctic. *Science Advances*, 4(4), eaar4353. <https://doi.org/10.1126/sciadv.aar4353>
- Saricheewin, K., Sirivithayapakorn, S., Noophan, P. L., Wantawin, C., Techkarnjanaruk, S., & Munakata-Marr, J. (2010). Nitrogen removal of anammox cultures under different enrichment conditions. *Journal of Environmental Science and Health. Part A, Toxic/hazardous Substances & Environmental Engineering*, 45(14), 1832–1838. <https://doi.org/10.1080/10934529.2010.520498>
- Schimel, J. P., & Weintraub, M. N. (2003). The implications of exoenzyme activity on microbial carbon and nitrogen limitation in soil: A theoretical model. *Soil Biology and Biochemistry*, 35(4), 549–563. [https://doi.org/10.1016/S0038-0717\(03\)00015-4](https://doi.org/10.1016/S0038-0717(03)00015-4)
- Schlichting, H. E. (1978). Introduction to Soil Microbiology. *Phycologia*, 17, 447. <https://doi.org/10.2216/i0031-8884-17-4-447a.1>
- Servan-Schreiber, D., Printz, H., & Cohen, J. D. (1990). Guglielmo et al., 1990.PDF. *Science*. <https://doi.org/9780387270487>
- Shabir, G., Afzal, M., Anwar, F., Tahseen, R., & Khalid, Z. M. (2008). Biodegradation of kerosene in soil by a mixed bacterial culture under different nutrient conditions. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 61(2), 161–166. <https://doi.org/10.1016/J.IBIOD.2007.06.003>
- Stüeken, E. E., Kipp, M. A., Koehler, M. C., & Buick, R. (2016). The evolution of Earth's biogeochemical nitrogen cycle. *Earth-Science Reviews*, 160, 220–239. <https://doi.org/10.1016/j.earscirev.2016.07.007>
- Taikan, O., Entekhabi, D., & Ives Harrold, T. (2004). The global water cycle. *Geophysical Monograph*, 19(150), 397.
- Thomé-Ortiz, H., Renard-Hubert, M. C., & Jesús Contreras, D. (2017). Turismo culinario y patrimonio histórico: La ruta de la sal prehispánica en Zapotitlán Salinas, Mexico. *Dos Algarves: A Multidisciplinary E-Journal*, 30, 72–84. <https://doi.org/10.18089/DAMEj.2017.30.6>
- Winkel, M., Mitzscherling, J., Overduin, P. P., Horn, F., Winterfeld, M., Rijkers, R., ... Liebner, S. (2018). Anaerobic methanotrophic communities thrive in deep submarine permafrost. *Scientific Reports*, 8(1), 1–13. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-19505-9>

9 ANEXO 1

DSMZ Medio 921 para metanotrofas *Methylosarcina quisquillarum* y *M. fibrata* médium

(https://www.dsmz.de/microorganisms/medium/pdf/DSMZ_Medium921.pdf)

MEDIO DE CULTIVO PARA ANAMMOX (MICROCOSMOS)

Cultivo anammox 1	(g/L)
-------------------	-------

NH₄Cl 2.96

NaNO₂ 1.5

Medio basal	(g/L)
-------------	-------

KH₂PO₄ 3.0

K₂HPO₄ 4.5

Elementos traza 1.5 mL

Cultivo anammox 2	(g/L)
-------------------	-------

NH₄Cl 0.82

NaNO₂ 1.5

NH₄HCO₃ 0.085

Medio basal 1000 mL

Solución elementos trazas	(g/L)
---------------------------	-------

EDTA 5

CaCl₂·2H₂O 5.54

CuSO₄·5H₂O 1.57

(NH₄)₆Mo₇O₂₄·4H₂O 1.1

CoCl₂·6H₂O 1.6

FeCl₃ 5.0

MnCl₂ 5

MgCl₂ 5