



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
POSGRADO EN CIENCIAS DEL MAR Y LIMNOLOGÍA

**DETECCIÓN Y CARACTERIZACIÓN MOLECULAR DE LAS BACTERIAS
SULFATO REDUCTORAS EN MICROBIALITAS DE UN LAGO CRÁTER
ALCALINO DE MÉXICO**

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

MAESTRO EN CIENCIAS
LIMNOLOGÍA

PRESENTA:

JESUS TORRES HUESCA

TUTORA PRINCIPAL:

DRA. ROCIO JETZABEL ALCÁNTARA HERNÁNDEZ
(INSTITUTO DE GEOLOGÍA, UNAM)

COMITÉ TUTOR:

DRA. LUISA ISAURA FALCÓN ÁLVAREZ	INSTITUTO DE ECOLOGÍA, UNAM
DR. JAVIER ALCOCER DURAND	FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES IZTACALA, UNAM
DR. MARTÍN MERINO IBARRA	INSTITUTO DE CIENCIAS DEL MAR Y LIMNOLOGÍA, UNAM
DR. MIROSLAV MACEK	FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES IZTACALA, UNAM

CIUDAD UNIVERSITARIA, CD. MX.

ENERO 2018



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.



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
POSGRADO EN CIENCIAS DEL MAR Y LIMNOLOGÍA**

**DETECCIÓN Y CARACTERIZACIÓN MOLECULAR DE LAS BACTERIAS
SULFATO REDUCTORAS EN MICROBIALITAS DE UN LAGO CRÁTER
ALCALINO DE MÉXICO**

TESIS

QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADÉMICO DE:

MAESTRO EN CIENCIAS

LIMNOLOGÍA

PRESENTA:

JESUS TORRES HUESCA

TUTORA PRINCIPAL:

DRA. ROCIO JETZABEL ALCÁNTARA HERNÁNDEZ

(INSTITUTO DE GEOLOGÍA, UNAM)

COMITÉ TUTOR:

DRA. LUISA ISAURA FALCÓN ÁLVAREZ

DR. JAVIER ALCOGER DURAND

DR. MARTÍN MERINO IBARRA

DR. MIROSLAV MACEK

INSTITUTO DE ECOLOGÍA, UNAM

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES IZTACALA, UNAM

INSTITUTO DE CIENCIAS DEL MAR Y LIMNOLOGÍA, UNAM

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES IZTACALA, UNAM

CIUDAD UNIVERSITARIA, CD. MX., MÉXICO, ENERO 2018

Agradecimientos institucionales

A la Universidad Nacional Autónoma de México; en especial, al Posgrado en Ciencias del Mar y Limnología, por la formación académica y profesional brindada.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología, CONACYT, por la beca otorgada para realizar este posgrado.

Esta investigación fue realizada gracias al Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica con el proyecto: *El componente bacteriano y su potencial biogeoquímico en sedimentos y microbialitas de un sistema salino alcalino* UNAM-DGAPA-PAPIIT IA209516; y al proyecto CONACYT-CB 256332.

A mi directora de tesis, Dra. Rocio Jetzabel Alcántara Hernández, por el apoyo, la orientación y el tiempo que me brindó durante la realización de esta investigación.

A mi comité tutor y jurado de tesis: Dra. Luisa Isaura Falcón Álvarez, Dr. Javier Alcocer Durand, Dr. Martín Merino Ibarra, Dr. Miroslav Macek por sus comentarios, observaciones y tiempo dedicado durante la realización y revisión de esta tesis.

A Yislem Beltrán, Osiris Gaona, Luis A. Oseguera, Sergio Castillo Sandoval, Olivia Zamora Martínez, Iris Suárez Quijada, Lucy Mora Palomino, Enrique Íñiguez Pacheco y Teresa Pi i Puig, por su apoyo técnico en la realización de este proyecto.

Este trabajo se realizó en coordinación con los siguientes laboratorios: Laboratorio de Microbiología Funcional del Instituto de Geología, UNAM; Laboratorio de Ecología Bacteriana del Instituto de Ecología, UNAM; Laboratorio de Biogeoquímica Acuática del Instituto de Ciencias del Mar y Limnología, UNAM; Proyecto de Investigación en Limnología Tropical de la FES Iztacala, UNAM; Laboratorio de Cromatografía del Laboratorio Nacional de Geoquímica y Mineralogía (LANGEM); Laboratorio de Difracción de Rayos del Laboratorio Nacional de Geoquímica y Mineralogía (LANGEM); y Laboratorio de Micro-Análisis de Rocas Geotérmicas, del Centro Mexicano de Innovación en Energía Geotérmica, CICESE.

Agradecimientos personales

A mis papas Jesús y Martha, por sentar las bases de mi educación en diversos ámbitos, darme importantes enseñanzas de vida y demostrar su afecto y apoyo indiscutiblemente. Si hoy doy un paso más es gracias a que ustedes me enseñaron como hacerlo.

A mis hermanas Beatriz, Carmen y Catalina así como a mi cuñado Jesús por el apoyo incondicional, el que este hoy en día cerrando un ciclo más en mi vida, ha sido en gran manera gracias a su respaldo, ayuda y consejos. Creo que ustedes son un ejemplo a seguir, como profesionales, amigos y sobre todo, familia.

A Lorena que se ha vuelto el pilar más importante de esta etapa y que los últimos 7 años ha permanecido conmigo compartiendo momentos difíciles y fantásticos. De nuevo puedo decir que has estado presente en otro paso importante de mi carrera y es todo un placer que permanezcas a mi lado como compañera de vida.

A las familias Rosales Vega y Escobar Limón por hacerme sentir en una segunda familia, me han dejado un gran aprendizaje sobre la generosidad y amabilidad.

A mis amigos de toda la vida, Daniel, José Luis, Rodolfo, Mariana, Lola que a pesar de la distancia, siguen estando presentes y al pendiente de mí. A compañeros, amigos biólogos y miembros de mi equipo Kannabis; Gabriela, Diego, Gen, Aquino, Cesar, Ovando, Ramiro, Luis, Pablo, Aaron, Gio y Adrian por hacer divertida y amena esta etapa.

A los miembros del Laboratorio de Biogeoquímica microbiana Eduardo, Jaz, Bernardo, David por su amistad, por enseñarme, dejarme enseñarles y permitirme formar parte de un equipo de trabajo grato, divertido, amable y responsable. A Tadeo, Maye, Jair, Eli, por su amistad durante el transcurso de la maestría.

A la Dra. Rocio Alcántara, no solo por ser una asesora confiable y responsable, dejarme formar parte de su equipo de trabajo y compartir gran parte de su conocimiento conmigo sino también por brindarme anécdotas de vida, consejos y amistad. Es un privilegio el trabajar en su laboratorio.

Índice de Contenido

Índice de Contenido	i
Índice de Tablas	v
Resumen.....	vi
Abstract.....	vii
1. Introducción.....	1
1.1. Los procesos biológicos de transformación del S.....	2
1.2. La reducción de sulfato.....	2
1.2.1. Distribución y rasgos fisiológicos de las BSR.....	4
1.2.2. El empleo de herramientas metagenómicas para el estudio de las BSR.....	4
1.2.3. Las enzimas involucradas en la sulfato reducción.....	5
1.3. Los procesos de precipitación de carbonatos asociados a la sulfato reducción.....	7
1.4. Las microbialitas y su distribución en México.....	8
1.5. La microbiología de los lagos volcánicos y tipo <i>maar</i>	9
2. Justificación y preguntas de investigación.....	11
2.1. Justificación.....	11
2.2. Preguntas de investigación.....	12
3. Hipótesis.....	12
4. Objetivos.....	13
4.1. Objetivo General.....	13
4.2. Objetivos Específicos.....	13
5. Área de estudio.....	14
6. Metodología experimental.....	16
6.1. Muestreo.....	16
6.2. Análisis geoquímicos.....	17
6.3. Caracterización mineralógica de las microbialitas.....	18
6.4. Análisis del componente biológico.....	18
6.4.1. Extracción de DNA metagenómico de microbialitas.....	18
6.4.2. Amplificación y secuenciación de fragmentos 16S rDNA.....	19
6.4.3. Análisis genes asociados a la sulfato reducción (<i>dsrAB</i>).....	19

6.4.4.	Purificación y ligación de genes asociados a la transformación de S (dsrAB)	20
6.5.	Análisis de secuencias	20
6.6.	Comparación de ensamblajes sulfato reductores en microbialitas y sedimentos	21
7.	Resultados	22
7.1.	Caracterización fisicoquímica del ambiente acuático	22
7.1.1.	Perfiles verticales de OD y temperatura (Circulación)	22
7.1.2.	Perfiles verticales de OD y temperatura (Estratificación)	23
7.1.3.	Concentración de iones mayores, alcalinidad, sulfatos y sulfuros en la vertical	24
7.1.4.	Parámetros fisicoquímicos del agua circundante en las microbialitas de litoral	25
7.1.5.	Concentración de iones en el agua circundante de las microbialitas	26
7.2.	Caracterización mineralógica y elemental de las microbialitas	27
7.2.1.	Composición mineralógica de las microbialitas	27
7.2.2.	Análisis de azufre total en microbialitas de profundidad	28
7.3.	Diversidad genética de organismos asociados al ciclo del S en microbialitas	30
7.3.1.	Análisis de grupos sulfato reductores en las microbialitas a partir de análisis 16S rDNA	30
7.3.2.	Análisis de grupos sulfato reductores en las microbialitas a partir del análisis dsrAB	33
8.	Discusión	36
8.1.	Caracterización fisicoquímica del ambiente acuático	36
8.2.	Caracterización geoquímica de las microbialitas	39
8.2.1.	Análisis DRX en microbialitas	39
8.2.2.	Análisis de azufre total en microbialitas de profundidad	40
8.3.	Diversidad genética y abundancia de potenciales BSR en microbialitas	41
8.3.1.	Grupos sulfato reductores en las microbialitas a partir del análisis 16S rDNA	41
8.3.2.	Detección de grupos sulfato reductores en las microbialitas mediante secuencias dsrA	42
9.	Conclusiones	45
10.	Perspectivas y alcances	46
	Referencias	47
	Anexos	55

Índice de Figuras

Figura 1. Procesos biológicos de transformación del azufre.	1
Figura 2. Enzimas, transportadores y acarreadores electrónicos implicados en la respiración anaerobia de sulfato. Tomado de Oliveira et al. (2008).	6
Figura 3. La enzima sulfito reductasa y los genes que codifican para esta enzima. a) Esquema de listones de la sulfito reductasa DsrAB ($\alpha_2\beta_2$) (PDB 3MM5). b) Distribución de genes de la sulfato reducción en Bacteria y Arquea. Tomado y modificado de LeGall y Fauque (1988) y Zverlov et al. (2005)	7
Figura 4. Ubicación del lago Alchichica, al sur se pueden apreciar otros lagos cráter de la Cuenca Oriental de Puebla: Atexcac, La Preciosa (Las Minas) y Quechulac. Tomado de Google Earth (2016).	14
Figura 5. Vista del lago cráter Alchichica, al fondo se alcanza a apreciar el Volcán Pico de Orizaba. Tomado de Google Earth (2016).	15
Figura 6. Muestreo de microbialitas en el lago cráter Alchichica. a) Sitios muestreados en el litoral. Microbialitas a b) 3 m, c) 30 m, y d) corte transversal de una microbialita del sitio A2a.	16
Figura 7. Microbialitas en el lago cráter Alchichica muestreadas en la vertical del litoral a 30 m de profundidad.	17
Figura 8. Perfiles verticales de oxígeno disuelto y temperatura del periodo de circulación (marzo, 2016).	22
Figura 9. Perfiles verticales de oxígeno disuelto y temperatura del periodo de estratificación (septiembre, 2016).	23
Figura 10. Corte transversal de una microbialita superficial ($z=0$), a) microscopía óptica, b) fluorescencia de rayos X, la intensidad del color verde corresponde a la abundancia relativa de azufre total en la microbialita.	29
Figura 11. Corte transversal de una microbialita de profundidad 20 m ($z=20$), a) microscopía óptica, b) fluorescencia de rayos X.	29
Figura 12. Abundancia relativa de BSR encontradas en microbialitas (Mi) del lago cráter Alchichica.	31
Figura 13. Análisis de componentes principales (PCA) de la distribución de los grupos sulfato reductores en las microbialitas del lago cráter Alchichica.	32
Figura 14. Gel de electroforesis de fragmentos dsrAB obtenidos por PCR anidado con los primers dsr-1F: dsr-4R para las microbialitas y sedimentos de Alchichica.	33
Figura 15. Dendrograma de fragmentos DsrA obtenidos de microbialitas y sedimentos del lago cráter Alchichica.	35
Figura 16. Distribución de sodio, cloruro y sulfato en la columna de agua del lago cráter Alchichica durante el periodo de mezcla y circulación, 2017.	38

Figura 17. Porcentaje de representación promedio de las secuencias 16S rDNA de organismos con potencial sulfato reductor en microbialitas y sedimentos superficiales (0-7 cm) del lago de Alchichica. _____ 41

Figura 18. Análisis de componentes principales (PCA) de los grupos fototróficos encontrados en las microbialitas del lago cráter Alchichica. _____ 44

Índice de Tablas

Tabla 1. Reacciones de oxidación y reducción del ciclo del S. Modificada de Canfield y Farquhard (2013).	2
Tabla 2. Principales géneros de Bacteria y Arquea que llevan a cabo la respiración anaerobia de sulfato (Tomado de Sievert et al., 2007; Zhou et al., 2011)	3
Tabla 3 Concentración de iones mayores en la columna de agua	24
Tabla 4. Concentración de sulfuros en la columna de agua.	25
Tabla 5. Parámetros determinados in situ en el agua circundante a las microbialitas del litoral.	26
Tabla 6. Concentración de iones mayores en muestras de agua circundante a microbialitas Marzo, 2016.	27
Tabla 7. Resultados de la caracterización mineralógica en microbialitas de litoral y profundidad.	28
Tabla 8. Rendimiento de DNA metagenómico de microbialitas y el número de secuencias 16S rDNA obtenidas.	30
Tabla 9. Número de clonas, fragmentos y secuencias dsrAB obtenidas	34

Resumen

Las microbialitas son estructuras organosedimentarias que se han depositado y acrecido como resultado de la actividad microbiana; principalmente por bacterias, cianobacterias y microalgas. Estas estructuras presentan una gran diversidad filogenética y metabólica asociada al tapete microbiano; donde se llevan a cabo interacciones biológicas, procesos biogeoquímicos y procesos de precipitación mineral (activos o inducidos). Estudios previos sugieren que las bacterias reductoras de sulfato (BSR) podrían estar involucradas en el proceso de litificación, junto con las cianobacterias y otros heterótrofos aeróbicos.

El lago cráter Alchichica es un sistema salino alcalino que presenta este tipo de estructuras organosedimentarias distribuidas en el litoral y hasta más de 30 m de profundidad. En este estudio se identificaron las BSR por métodos independientes de cultivo en varias microbialitas distribuidas a lo largo del litoral y en profundidad. Se analizaron un total de 11 microbialitas de litoral y cuatro en un gradiente vertical (3, 10, 20 y 30 metros de profundidad). Se realizó un estudio de la región hipervariable V4 del 16S rDNA para identificar las bacterias y arqueas presentes mediante secuenciación masiva. También se construyeron librerías de clonas para secuenciar los genes *dsrA*, que codifican para la subunidad α de la sulfito reductasa, clave para la sulfato reducción.

La caracterización mineralógica de las microbialitas mostró una composición principalmente de aragonita e hidromagnesita en concentraciones variables. Asimismo, se determinó que el S encontrado en estas microbialitas, se encuentra asociado al tapete microbiano dentro de los primeros milímetros de la estructura. La abundancia relativa de BSR potenciales (basada en el 16S rDNA total), fue de aproximadamente el 1.1%, donde los órdenes Desulfobacterales y Syntrophobacterales fueron los más representados. Paralelamente, los genes *dsrAB* también se amplificaron para confirmar la presencia de BSR. Las secuencias DsrA de las microbialitas se relacionaron con aquellas de BSR de las familias Desulfobacteraceae y Syntrophobacteraceae. En las microbialitas de litoral se encontraron 7 filotipos *dsrA*, mientras que en las microbialitas de 10 a 30 m sólo se encontró uno.

Este estudio representa la primera exploración molecular funcional dirigida para determinar y caracterizar las bacterias sulfato reductoras en las microbialitas del lago cráter Alchichica. Nuestros resultados sugieren que las BSR en microbialitas tienen una abundancia relativa baja (~1%). Sin embargo, éstas pueden ser importantes en la composición y estructura del tapete microbiano de las microbialitas al estar acopladas con la fotosíntesis anoxigénica de grupos como Chromatiales, principalmente en las que se encuentran por debajo de 10 m de profundidad.

Abstract

Microbialites are organosedimentary structures that have been deposited and accreted as the result of microbial activity, mainly by bacteria, cyanobacteria and microalgae. These structures present a great phylogenetic and metabolic diversity associated with the microbial mat, where biological interactions, biogeochemical processes and mineral precipitation processes (active or induced), occur. Previous studies suggest that sulfate reducing bacteria (SRB) could be involved in the lithification process, together with cyanobacteria and other aerobic heterotrophs.

Alchichica crater-lake is a saline alkaline system that presents these organosedimentary structures distributed in the littoral and until 30 m depth. In this study, we identify the SRB by culture independent methods in various microbialites distributed along the littoral and depth. A total of 11 littoral microbialites and four in depth (3, 10, 20 y 30 m) were analyzed. We surveyed the V4 hypervariable region of the 16S rDNA to identify the bacteria and archaea present, using a high-throughput sequencing platform. Clone libraries were also constructed to sequence the *dsrA* gene, which encodes for the α subunit of the sulfite reductase, key for sulfate reduction.

The mineralogical characterization of microbialites showed a main composition of aragonite and hydromagnesite in variable concentrations. It was also determined that the total S in these microbialites was associated with the first millimeters of the organosedimentary structure. The relative abundance of potential SRB (based on total 16S rDNA sequences) was of nearly 1.1%, where the Desulfobacterales and Syntrophobacterales were the most represented orders. In addition, *dsrAB* genes were also amplified to confirm the presence SRB. The DsrA sequences were related to Desulfobacteraceae and Syntrophobacteraceae. Littoral microbialites showed 7 phylotypes of *dsrA*, while microbialites at 10 to 30 m depth only displayed one.

This study represented the first molecular functional survey to determine and characterize the sulfate reducing bacteria in lake Alchichica microbialites. Our results suggest that SRB have a low relative abundance (~1%). Nonetheless, this group can be important by being coupled with the anoxygenic photosynthesis carried out by Chromatiales order, mainly below 10 m depth.

1. Introducción

El azufre (S) es uno de los elementos más abundantes en el planeta Tierra. Éste se encuentra principalmente en forma de piritita (FeS_2) o yeso (CaSO_4) en rocas y sedimentos, y en forma de sulfato en agua del mar (Muyzer y Stams, 2008). El sulfato (SO_4^{2-}) es la forma más estable del azufre en ambientes óxicos, mientras que las formas reducidas (de -2 y 0) son comunes en ambientes anóxicos (Sievert *et al.*, 2007). El ciclo del azufre es complejo por la amplia gama de estados de oxidación del mismo (-2 a +6), y puede ser transformado tanto química como biológicamente (Sievert *et al.*, 2007; Muyzer y Stams, 2008). En las transformaciones biológicas, los microorganismos juegan un papel fundamental por la serie de reacciones óxido reducción que llevan a cabo (Fig. 1). Por lo que este ciclo depende de los microorganismos, quienes actúan también en otros ciclos como el del carbono, el nitrógeno, el fósforo y el hierro (Sievert *et al.*, 2007).

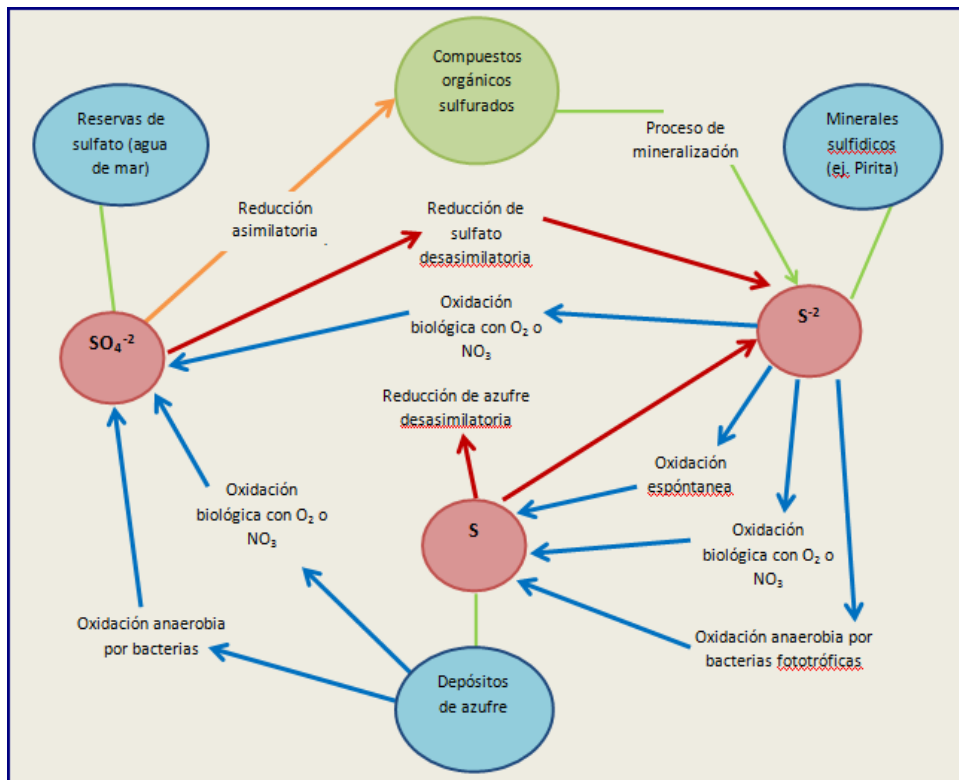


Figura 1. Procesos biológicos de transformación del azufre.

1.1. Los procesos biológicos de transformación del S

Los compuestos del azufre pueden ser usados como aceptores o donadores electrónicos dependiendo su estado de oxidación. Estos procesos incluyen la reducción de sulfato o de azufre elemental por bacterias sulfato reductoras quimiorganotróficas, y procesos oxidativos como la oxidación del azufre (por bacterias sulfurosas quimiolitotróficas) (Sievert *et al.*, 2007; Muyzer y Stams, 2008). Debido a la variedad de compuestos del S y a sus diferentes estados de oxidación, existe una gran diversidad de procesos asociados a la transformación biológica de este elemento (Tabla 1).

Tabla 1. Reacciones de oxidación y reducción del ciclo del S. Modificada de Canfield y Farquhard (2013).

$\text{SO}_4^{2-} + 2[\text{CH}_2\text{O}]_n^* \rightarrow \text{H}_2\text{S} + 2\text{HCO}_3^-$	Sulfato reducción
$2\text{SO}_3^{2-} + 3\text{CH}_2\text{O} + \text{H}^+ \rightarrow 2\text{H}_2\text{S} + 3\text{HCO}_3^-$	Sulfito reducción
$4\text{S}^0 + 4\text{H}_2\text{S} \rightarrow 3\text{H}_2\text{S} + \text{SO}_4^{2-} + 2\text{H}^+$	Desproporción de azufre
$4\text{SO}_3^{2-} + 2\text{H}^+ \rightarrow \text{H}_2\text{S} + 3\text{SO}_4^{2-}$	Desproporción de sulfito
$\text{S}_2\text{O}_3^{2-} + \text{H}_2\text{O} \rightarrow \text{H}_2\text{S} + \text{SO}_4^{2-}$	Desproporción de tiosulfato
$\text{H}_2\text{S} + \text{CO}_2 \rightarrow \text{CH}_2\text{O} + \text{H}_2\text{O} + 2\text{S}^0$	Oxidación fototrófica de sulfuro a azufre
$\text{H}_2\text{S} + 2\text{CO}_2 + \text{H}_2\text{O} \rightarrow 2\text{CH}_2\text{O} + \text{SO}_4^{2-} + 2\text{H}^+$	Oxidación fototrófica de sulfuro a sulfato
$2\text{S}^0 + 3\text{CO}_2 + 5\text{H}_2\text{O} \rightarrow 3\text{CH}_2\text{O} + 2\text{SO}_4^{2-} + 4\text{H}^+$	Oxidación fototrófica de azufre a sulfato

* $[\text{CH}_2\text{O}]_n$, fórmula condensada de las moléculas orgánicas, donde $n \geq 2$

1.2. La reducción de sulfato

La sulfato reducción involucra la reducción de la forma más oxidada del azufre (*i.e.* sulfato, SO_4^{2-}). Este proceso puede ser asimilatorio –para la obtención de S para construcción de biomoléculas–, o en la respiración anaerobia de sulfato –para la obtención de energía– (Rabus *et al.*, 2013). Los microorganismos sulfato reductores han sido organismos importantes desde el surgimiento de la vida; y consecuentemente, durante gran parte de la historia evolutiva del planeta Tierra. Así mismo, la evidencia isotópica indica que el proceso de reducción de sulfato evolucionó antes que la fotosíntesis oxigénica por cianobacterias (Baumgartner *et al.*, 2006; Braissant *et al.*, 2007).

Filogenéticamente, los microorganismos que participan en los procesos de metabolización y recirculación del azufre se encuentran distribuidos entre grandes linajes (Sievert *et al.*, 2007). Hasta el momento, se tiene registro de procesos de sulfato reducción

en microorganismos de los dominios Bacteria y Arquea (Tabla 2). Sin embargo, existe registro de procesos de sulfato reducción asimilatoria en *Euglena gracilis*, ciliados, plantas y otros eucariontes (Patron *et al.*, 2008). En este tipo de reducción, los microorganismos pueden reducir el sulfato a sulfuro dirigido a la formación de compuestos orgánicos como aminoácidos (cisteína y metionina), coenzimas (coenzima A, biotina y tiamina) y la formación de grupos azufre-hierro en metaloproteínas (Fe₄S₄) (Atlas y Bartha, 2002; Sievert *et al.*, 2007; Muyzer y Stams, 2008).

Respecto a los procesos de respiración anaerobia de sulfato, las *arqueas sulfato reductoras* (pertenecientes al orden Archaeoglobales) son de importancia biogeoquímica en ambientes termófilos, v.g. ventilas hidrotermales y pozas de campos geotérmicos (Rabus *et al.*, 2013). Mientras que en ambientes fríos y templados existe la predominancia de las *bacterias sulfato reductoras* (BSR). De esta manera, una gran parte de los géneros de BSR son encontrados dentro de δ -Proteobacteria y familias como Nitrospiraceae (Nitrospirae), Thermodesulfobacteriaceae (Firmicutes) y Thermodesulfobiceae (Firmicutes), principalmente (Sievert *et al.*, 2007; Muyzer y Stams, 2008; Zhou *et al.*, 2011). Para fines de esta tesis, nos referiremos en adelante a los organismos sulfato reductores como aquellos capaces de respirar anaeróbicamente sulfato.

Tabla 2. Principales géneros de Bacteria y Arquea que llevan a cabo la respiración anaerobia de sulfato (Tomado de Sievert *et al.*, 2007; Zhou *et al.*, 2011)

Género	Afiliación filogenética
<i>Desulfovibrio</i> <i>Desulfobacter</i> <i>Desulfolobus</i> <i>Desulfosarcina</i> <i>Desulfonema</i> <i>Desulfococcus</i> <i>Syntrophobacter</i>	Bacteria, Proteobacteria, Deltaproteobacteria
<i>Thermodesulfovibrio</i>	Bacteria, Nitrospirae, Nitrospira, Nitrospirales, Nitrospiraceae
<i>Desulfotomaculum</i> <i>Desulfosporosinus</i>	Bacteria, Firmicutes, Clostridia, Clostridiales, Peptococcaceae
<i>Archaeoglobus</i>	Archaea, Euryarchaeota, Archaeoglobi, Archaeoglobales, Archaeoglobaceae

1.2.1. Distribución y rasgos fisiológicos de las BSR

Durante muchos años, las BSR han sido consideradas como organismos anaerobios estrictos, ya que emplean el sulfato en reacciones de energía-rendimiento como aceptor de electrones en respiración anaerobia (Freyre, 2006; Sievert *et al.*, 2007), por lo que se distribuyen universalmente en sedimentos marinos y de agua dulce (Dolla *et al.*, 2006; Muyzer y Stams, 2008). Sin embargo, la capacidad de algunas BSR para sobrevivir a una exposición transitoria de oxígeno y realizar procesos sus procesos metabólicos en estas condiciones ha comenzado a ser documentada (Sigalevich y Cohen, 2000; Cypionka, 2000; Mogensen *et al.*, 2005; Baumgatner *et al.*, 2006; Braissant *et al.*, 2007).

Por lo tanto, se puede decir que las BSR son un grupo heterogéneo de bacterias que habitan primordialmente ecosistemas anaerobios (Hansen, 1994); generando iones sulfhidrilo (S^{2-}) como compuestos finales de su metabolismo (Muyzer y Stams, 2008). También pueden metabolizar una variedad de compuestos que van del hidrógeno (H_2), hasta ácidos orgánicos (lactato, acetato, etc.), y varios tipos de compuestos aromáticos (Atlas y Bartha, 2002; Freyre, 2006; Braissant *et al.*, 2007). Paralelo a la gran diversidad de los sustratos donadores de electrones que pueden usar las BSR, éstas pueden encontrarse en una serie de ambientes de entre un amplio margen de pH, temperatura y salinidad (Atlas y Bartha, 2002).

1.2.2. El empleo de herramientas metagenómicas para el estudio de las BSR

Los estudios sobre las BSR se han centrado principalmente a sedimentos marinos, ventilas hidrotermales, tapetes o costras microbianas, entre otros (Caumette, 1986; Amann *et al.*, 1992; Teske *et al.*, 1998; Minz *et al.*, 1999; Bosak y Newman, 2003; Muyzer y Stams, 2008; Barton y Fauque, 2009, Sorokin *et al.*, 2011a; 2011b; 2012; 2014). Sin embargo, existen muy pocos trabajos referentes a las BSR en lagos, los cuales se enfocan principalmente a los sedimentos profundos o tapetes microbianos de la zona litoral (Sass *et al.*, 1997, 1998; Wright, 1999).

El estilo de vida -en ocasiones estrictamente anaeróbico- y la lenta tasa de crecimiento de las BSR, las vuelven difíciles de aislar e identificar por medio de técnicas de cultivo. Por esta razón se han utilizado enfoques alternativos independientes de cultivo, particularmente basados en la secuencia del gen 16S rRNA para caracterizar las comunidades bacterianas proporcionando un marco más general para estudios de su diversidad y abundancia microbiana en ambientes naturales (Guan *et al.*, 2014). Sin embargo, los organismos sulfato reductores no forman un grupo filogenéticamente coherente, y se encuentran en diversos grupos de Bacteria y Arquea (Tabla 2), por lo que este marcador presenta problemas técnicos en la asignación de las capacidades sulfato reductoras.

Por lo tanto, el empleo de genes funcionales (*i.e.* involucrados en la función de la sulfato reducción) se ha implementado para identificar a las BSR responsables de este proceso biogeoquímico en diversos ambientes (Wagner *et al.*, 1998; Dhillon *et al.*, 2003; Guan *et al.*, 2013; 2014; Angermeyer *et al.*, 2016). Específicamente, uno de los genes altamente conservados en las BSR, codifica a la enzima sulfito reductasa no asimilatoria (Dsr), que realiza un paso enzimático clave en la reducción de sulfato y se encuentra en todos los sulfato reductores conocidos (Wagner *et al.*, 1998). Consecuentemente, ha sido el más empleado en varios estudios de microorganismos sulfato reductores.

1.2.3. Las enzimas involucradas en la sulfato reducción

A pesar de ser de origen polifilético y tener diversas adaptaciones fisiológicas, las BSR hasta el momento descritas se unifican al tener la misma vía central para la respiración de sulfato con las enzimas ATP sulfurilasa (Sat), adenilsulfato reductasa (Apr) y (bi)sulfito reductasa no asimilatoria (Dsr) como eje rector del proceso (Oliveira *et al.*, 2008).

La sulfato reducción es un proceso citosólico de óxido reducción acoplado en la membrana citoplasmática, por lo que involucra una serie de transportadores, acarreadores electrónicos, y enzimas citosólicas y de membrana (Fig. 2) (Oliveira *et al.*, 2008). Primeramente, un transportador específico permite el paso del SO_4^{2-} al citosol, donde es fosforilado por la enzima ATP sulfurilasa (Sat), y convertido en el intermediario adenosinfosulfato (APS). APS es luego reducido por la adenilsulfato reductasa

(AprAB), a sulfito SO_3^{2-} , el cual, será finalmente convertido a H_2S por la sulfito reductasa no asimilatoria (DsrABC). En todos estos procesos de reducción, existen proteínas de membrana que aportan los electrones necesarios (DsrMKJOP y QmoABC).

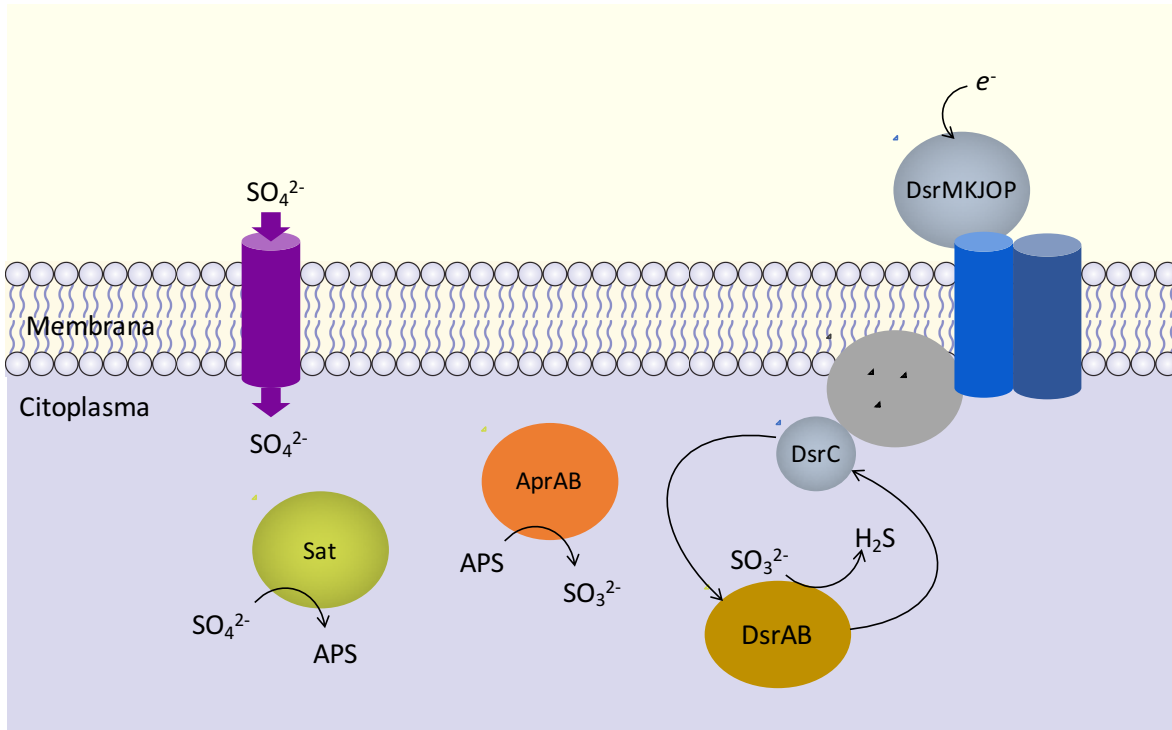


Figura 2. Enzimas, transportadores y acarreadores electrónicos implicados en la respiración anaerobia de sulfato. Tomado de Oliveira *et al.*, (2008).

Dsr es, comúnmente, la enzima más empleada en el estudio de organismos sulfato reductores. La enzima se compone de 2 subunidades enzimáticas (α y β) que corresponden a DsrA y DsrB, y están codificadas por los genes *dsrA* y *dsrB*, respectivamente (Fig. 3a). En algunas bacterias como *Desulfovibrio vulgaris*, esta enzima viene acoplada a la subunidad γ (DsrC), y que tiene la función de transporte de electrones (Oliveira *et al.*, 2008). Dsr pertenece a una familia de proteínas que también incluyen la sulfito reductasa asimiladora (aSiR), a las reductasas de nitrito (aNiR), a las aSiRs monoméricas de bajo peso molecular y otras dSiRs como AsrC y Fsr (Crane *et al.*, 1996; Loy *et al.*, 2008).

Los genes *dsrA* y *dsrB* son parálogos, y muy probablemente se derivan de un evento de duplicación de genes temprano que precedió a la separación de los dominios de Arquea y Bacteria (Wagner *et al.*, 1998; Dahl *et al.*, 1993), de acuerdo con un inicio muy temprano

de la reducción biológica de sulfito. Igualmente, se conservan en todos los genomas de los organismos sulfato reductores identificados hasta el momento (Fig. 3b).

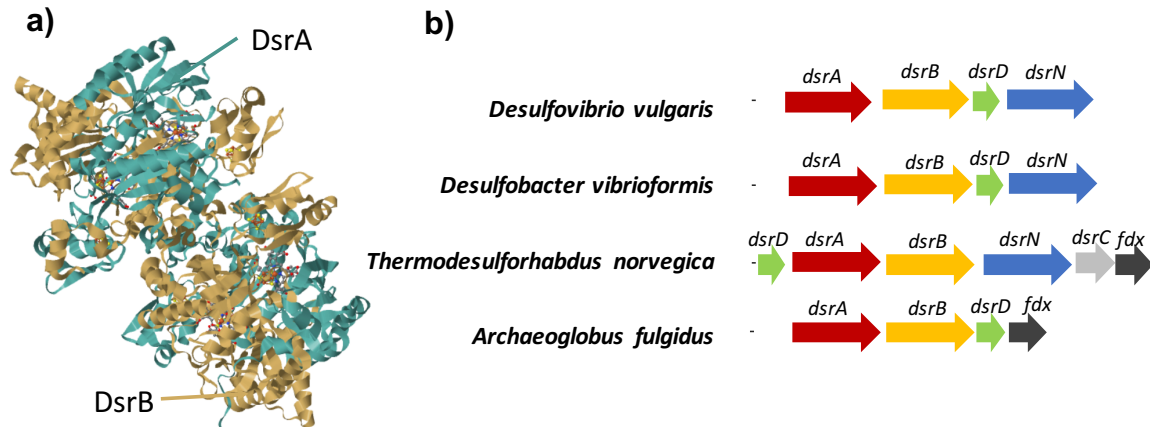


Figura 3. La enzima sulfito reductasa y los genes que codifican para esta enzima. a) Esquema de listones de la sulfito reductasa DsrAB ($\alpha 2\beta 2$) (PDB 3MM5). b) Distribución de genes de la sulfato reducción en Bacteria y Arquea. Tomado y modificado de LeGall y Fauque (1988) y Zverlov *et al.*, (2005)

Las secuencias *dsrAB* ha permitido la inferencia de las secuencias aminoácidas de DsrAB. Los análisis de DsrAB han mostrado que existe una aproximación adecuada de la filogenia de esta enzima, además de que es posible distinguir entre la enzima reductiva y la oxidante (Wasmund *et al.*, 2017).

1.3. Los procesos de precipitación de carbonatos asociados a la sulfato reducción

Investigaciones previas mencionan que las BSR podría estar participando en procesos de litificación en tapetes microbianos, donde se combinan los procesos metabólicos de estas bacterias con las cianobacterias y otros heterótrofos aeróbicos, todos promoviendo la precipitación y disolución de carbonato de calcio (Baumgatner *et al.*, 2006). Asimismo, los organismos que reducen SO_4^{2-} y consumen ácidos orgánicos, producen grandes cantidades de sustancias exopoliméricas (EPS) (Bosak y Newman, 2006). Las BSR facilitan el

incremento de la cantidad (o disponibilidad) de iones carbonato en el EPS, al consumir sulfato y producir sulfuro aumentando el pH y por tanto la alcalinidad (Ecuaciones 1 y 2).



De esta manera las BSR pueden ser consideradas parte de los microorganismos que participan en la precipitación de carbonatos en consorcios microbianos complejos como tapetes y microbialitas. Los cuales a su vez proporcionan sitios de nucleación heterogénea para fomentar los procesos de litificación (Braissant *et al.*, 2007).

1.4.Las microbialitas y su distribución en México

Las microbialitas son estructuras organosedimentarias que se han depositado y acrecido como resultado de la actividad microbiana (bacterias, cianobacterias, y microalgas), del sedimento detrítico y la precipitación mineral local (Burne, 1987). Estas estructuras presentan una gran diversidad filogenética y metabólica –asociada al tapete microbiano– (Reid *et al.*, 2000; Centeno *et al.*, 2012), donde se dan interacciones biológicas y diversos procesos biogeoquímicos y de precipitación mineral (activa o inducida).

Las microbialitas representan también los ecosistemas geomicrobiológicos por excelencia con un registro fósil, que se remonta a 3500 millones de años (Grotzinger y Knoll, 1999). Las microbialitas antiguas formaron enormes arrecifes de carbonato comparables en tamaño a los arrecifes de coral modernos, dominando la vida en nuestro planeta durante el 80% de la historia de la Tierra (Awramik, 1984). Los microbialitos modernos, por el contrario, son relativamente raros, pero se han encontrado en diversos hábitats, incluyendo ambientes de agua dulce, marinos e hipersalinos (Laval *et al.*, 2000; Reid *et al.*, 2003; Breitbart *et al.*, 2009; Santos *et al.*, 2010; Centeno *et al.*, 2012; Farías *et al.*, 2013; Schneider *et al.*, 2013; Perissinotto *et al.*, 2014).

En México, existe registro de estos análogos modernos, y recientemente se ha estudiado su diversidad biológica, su diversidad microbiana y los factores que estructuran la composición del componente bacteriano (Centeno *et al.*, 2012). Entre los sistemas más

estudiados se encuentran los de Cuatro Ciénegas (Coahuila) y los del lago cráter Alchichica (Puebla) (Breibart *et al.*, 2009; Couradeau *et al.*, 2011; Centeno *et al.*, 2012).

1.5. La microbiología de los lagos volcánicos y tipo *maar*

Los lagos volcánicos han sido estudiados ampliamente en otros países. Sin embargo, en México se encuentran pocas investigaciones sobre ellos. En México existen diversos lagos asociados a procesos de vulcanismo o magmatismo, como los que se encuentran en las cercanías del Valle Santiago, el lago cráter de Tacámbaro (Michoacán), y los lagos *maars* de la cuenca oriental de Puebla, entre otros (Arredondo *et al.*, 1983). Los primeros estudios realizados en estos sistemas describen generalmente sólo la geología y el origen de los lagos, como en el caso de los denominados Axalapazcos de Puebla (Arredondo *et al.*, 1983).

Existen investigaciones que se han enfocado al estudio de las comunidades microbianas, como aquellos en el lago Isabela, Nayarit (Alcocer *et al.*, 1998), o el fitoplancton en La Alberca en Tacámbaro, Michoacán (Hernández-Morales *et al.*, 2011). Sin embargo, las investigaciones sobre las BSR en estos sistemas han sido escasas, y sólo reportados en tapetes microbianos, lodos, y en un geyser del sistema hidrotermal “Los Azufres” (Michoacán) (Brito *et al.*, 2014).

En cuanto a los lagos tipo *maar* de la Cuenca Oriental en Puebla, los trabajos se han centrado principalmente en el lago Alchichica, donde se ha estudiado principalmente su morfometría (Arredondo *et al.*, 1983) y su hidrodinámica (Alcocer y Lugo, 2003); su geología y la química de sus aguas (Armienta *et al.*, 2008; Can, 2011; Mancilla, 2012). Los estudios de la comunidad microbiana se han enfocado al fitoplancton (Oliva *et al.*, 2001; Alcocer, 2008), ciliados (Lugo *et al.*, 1998; Bautista y Macek, 2012; Macek *et al.*, 2017) y la comunidad de picoplancton autotrófico y picoplancton heterotrófico, donde se encontraron grupos pertenecientes a las BSR en la columna de agua (Hernández-Avilés *et al.*, 2010; Bautista y Macek, 2012).

Las microbialitas del lago Alchichica muestran diferencias en la estructura de la comunidad comparadas con otras de México, y ésta se encuentra influenciada

principalmente por la conductividad eléctrica y el pH (Centeno *et al.*, 2012). Los estudios previos del componente microbiano muestran que tienen una gran diversidad de cianobacterias, bacterias heterótrofas –incluyendo Planctomycetes, Bacteroidetes, Acidobacteria, y Proteobacteria–, y algunas litotróficas del ciclo del N en las microbialitas (Couradeau *et al.*, 2011; Couradeau *et al.*, 2011; Centeno *et al.*, 2012; Valdespino-Castillo *et al.*, 2014; Alcántara-Hernández *et al.*, 2017). Hasta la fecha no existen estudios sobre los organismos sulfato reductores en estas estructuras organosedimentarias. Sin embargo, los análisis de diversidad 16S rRNA muestran que existen bacterias potencialmente sulfato reductoras, dentro de los filas Deltaproteobacteria y Firmicutes (Couradeau *et al.*, 2011; Centeno *et al.*, 2012).

2. Justificación y preguntas de investigación

2.1. Justificación

Existe poca información acerca de la reducción de sulfato en lagos tipo *maar* en México. Varios estudios han sugerido que el pH y la salinidad influyen determinantemente la estructura del ensamble bacteriano. Paralelamente, las altas concentraciones de compuestos de azufre en estos lagos impulsan su ciclaje de forma activa. La parte oxidativa del ciclo del S es llevada a cabo por microorganismos quimiolitotrófos aerobios y fototróficos anoxigénicos. Mientras que la reductora es llevada a cabo por las BSR, un grupo muy poco estudiado en México pero que complementan una fracción importante de este ciclo.

Existe una distribución diferencial de las BSR dependiendo de varios factores como la concentración de oxígeno o el potencial redox. Inicialmente éstas fueron descritas como microorganismos anaerobios estrictos; sin embargo, se ha encontrado también BSR que pueden acoplarse a rutas ligadas al metabolismo aerobio. La columna de agua del lago Alchichica presenta concentraciones considerables de compuestos de azufre, aunado a variaciones en la concentración de oxígeno. El lago tiene una hidrodinámica en la cual se mantiene estratificado aproximadamente 8 meses del año (monomítico cálido), presentando anoxia en el hipolimnion. Estas condiciones favorecen potenciales reducidos apropiados para el metabolismo reductor del azufre. Asimismo, las microbialitas tienen un gradiente de oxígeno en los primeros milímetros de profundidad, en los que la sulfato reducción forma parte importante de los procesos biológicos, pero que no ha sido estudiada en detalle.

Las BSR también se relacionan metabólicamente con otros microorganismos que llevan a cabo procesos en diversos ciclos biogeoquímicos como los del carbono, nitrógeno y el procesamiento biótico del hierro. Por ejemplo, interactúan con organismos fototróficos anoxigénicos y oxidadores de metano anaerobios, entre otros. En las microbialitas y tapetes microbianos litificados, la precipitación de carbonatos es un proceso que puede estar asociado a la sulfato reducción.

El lago cráter Alchichica es un sistema cuya hidrodinámica ha sido estudiada durante varios años; sin embargo, los microorganismos encargados del ciclaje biogeoquímico del

azufre en las microbialitas –y que pueden estar involucrados en procesos de precipitación– no han sido estudiados aún. Por ello, se plantea el estudio de las Bacterias Sulfato Reductoras (BSR) en las diferentes microbialitas distribuidas en el litoral y en la vertical de un lago tipo *maar*, incluyendo también el análisis de las características fisicoquímicas y geoquímicas en cada nicho de estudio.

2.2.Preguntas de investigación

El presente proyecto de investigación plantea: i) identificar a los organismos sulfato reductores en diferentes microbialitas del lago cráter Alchichica en un gradiente vertical y en litoral, ii) describir el ambiente fisicoquímico y iii) determinar las diferencias entre las comunidades sulfato reductoras en el mismo gradiente vertical.

3. Hipótesis

La estructura de la comunidad sulfato reductora presentará diferencias entre las microbialitas de litoral y aquellas a > 3 m de profundidad, debido a que la composición de los tapetes microbianos está menos desarrollada conforme a la profundidad. Siendo Desulfobacteraceae la familia sulfato reductora más representada, ya que es una de las más distribuidas por su flexibilidad metabólica y fisiológica.

4. Objetivos

4.1. Objetivo General

- Detectar e identificar las BSR presentes en microbialitas en el lago Alchichica, Puebla.

4.2. Objetivos Específicos

- Determinar los parámetros de conductividad eléctrica (CE), pH, temperatura, oxígeno disuelto (OD), aniones y cationes y la concentración de formas de azufre en el agua circundante y en un perfil de la columna de agua del lago.
- Describir la diversidad bacteriana relacionada a la sulfato reducción en microbialitas mediante 16S rDNA, tanto del litoral, como en un gradiente vertical a diferentes profundidades.
- Identificar las BSR presentes en microbialitas mediante secuenciación de los genes *dsrAB*, tanto del litoral, como en un gradiente vertical a diferentes profundidades.

5. Área de estudio

El lago Alchichica es un lago cráter tipo *maar*, el cual surge de una explosión debido al contacto del magma con el agua del manto freático (Gasca, 1981). Es el más grande de los lagos conocidos como los Axalapascos (Fig. 4). Se encuentra situado en el Eje Neovolcánico Transversal en la cuenca oriental de Puebla (19° 24' N, 97° 24' O), a una altitud de 2300 m sobre el nivel del mar.

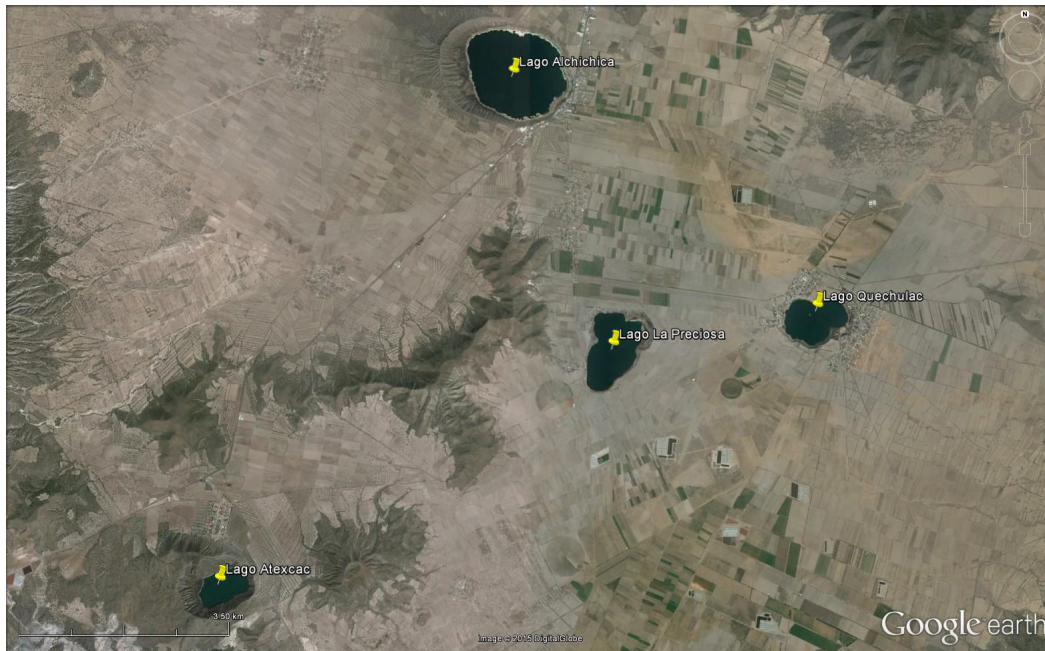


Figura 4. Ubicación del lago Alchichica, al sur se pueden apreciar otros lagos cráter de la Cuenca Oriental de Puebla: Atexcac, La Preciosa y Quechulac. Tomado de Google Earth (2016).

El lago tiene un diámetro de 1.81 km y una batimetría con una profundidad máxima de 62 m y la media de 41 m (Filonov *et al.*, 2006) (Fig. 5). Lo cual representa que sea el lago de mayor volumen de aguas atalasoalinas de México (Arredondo *et al.*, 1983; Alcocer y Escobar, 1990; Vilaclara *et al.*, 1993; Alcocer y Lugo, 2003). El clima es subárido, esto indica que la evaporación es mayor a la precipitación y por tanto se provoca una concentración de sales (Caballero *et al.*, 2003). La temperatura anual oscila entre 5.5 y 30°C (media de 14.4°C), precipitación anual menor a los 400 mm y evaporación de 500 a 600 mm (Alcocer y Escobar, 2007; Alcocer y Filonov, 2007; Adame *et al.*, 2008). Su hidrodinámica lo caracteriza como monomítico cálido ya que se mantiene estratificado la

mayor parte del año (desde finales de marzo hasta diciembre) y en mezcla durante el invierno hemisférico (diciembre a marzo) (Alcocer y Filonov, 2007; Adame *et al.*, 2008; Alcocer *et al.*, 2008).

La columna de agua es alcalina (pH 8.7-9.2) y salina (TDS=8.5 g l⁻¹) (Vilaclara *et al.*, 1993). Los aniones dominantes son los cloruros e hidrogenocarbonatos sobre los carbonatos y sulfatos, mientras que los cationes dominantes son el sodio y el magnesio sobre el potasio y el calcio (Alcocer y Lugo, 2003; Armienta *et al.*, 2008; Can, 2011; Mancilla, 2012).



Figura 5. Vista del lago cráter Alchichica, al fondo se alcanza a apreciar el Volcán Pico de Orizaba. Tomado de Google Earth (2016).

El lago se caracteriza por tener biota endémica y por estructuras organosedimentarias denominadas microbialitas (Alcocer y Escobar, 2007), las cuales pueden ser de forma columnar o escalariforme (esponjosa). Éstas se encuentran distribuidas a lo largo del litoral del lago, así como en un gradiente vertical hasta 12 o 14 m de profundidad (Tavera y Komárek, 1996; Couradeau *et al.*, 2011). Sin embargo, equipos de buceo han detectado estas estructuras hasta 30 m de profundidad.

6. Metodología experimental

6.1. Muestreo

Para observar la dinámica de nutrientes en la columna de agua del lago, se plantearon dos muestreos, uno en estratificación y otro en mezcla, donde se colectaron muestras para caracterización geoquímica y se determinaron perfiles (temperatura, pH, oxígeno disuelto, conductividad eléctrica [CE], etc.). Se muestreó el día 19 de marzo del 2016 para representar la etapa hidrodinámica de mezcla ($z=0, 4, 6, 13, 20, 30, 50$ y 61 m), y el 20 de septiembre para observar la estratificación ($z=1, 8, 14, 21, 22, 30, 45, 60$). Las muestras de columna de agua se obtuvieron siguiendo los procedimientos reportados en Ardiles *et al.* (2011).

Para la colecta de microbialitas de litoral se siguieron los protocolos descritos en Valespino-Castillo *et al.* (2014). El muestreo se realizó los días 19, 20 y 21 de marzo del 2016. Para las muestras de litoral se colectaron 13 microbialitas (~ 10 g) (Fig. 6).

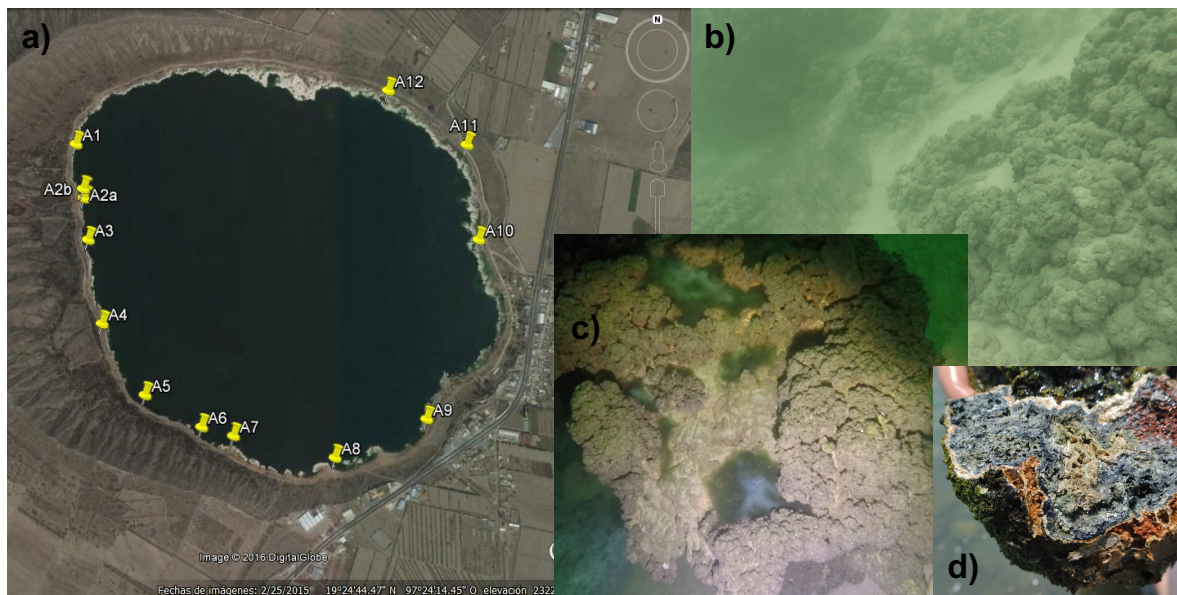


Figura 6. Muestreo de microbialitas en el lago cráter Alchichica. a) Sitios muestreados en el litoral. Microbialitas a b) 3 m, c) 30 m, y d) corte transversal de una microbialita del sitio A2a.

Para el estudio de las microbialitas en la vertical se colectaron muestras a 3, 10, 20 y 30 m de profundidad (Fig. 7). Para la conservación del DNA, las muestras de microbialitas fueron congeladas en N₂ líquido inmediatamente después de su colecta en campo. Todo fue colectado en condiciones tales que se evite la contaminación por bacterias exógenas. Una vez en el laboratorio, las muestras fueron congeladas a -20°C hasta su procesamiento.

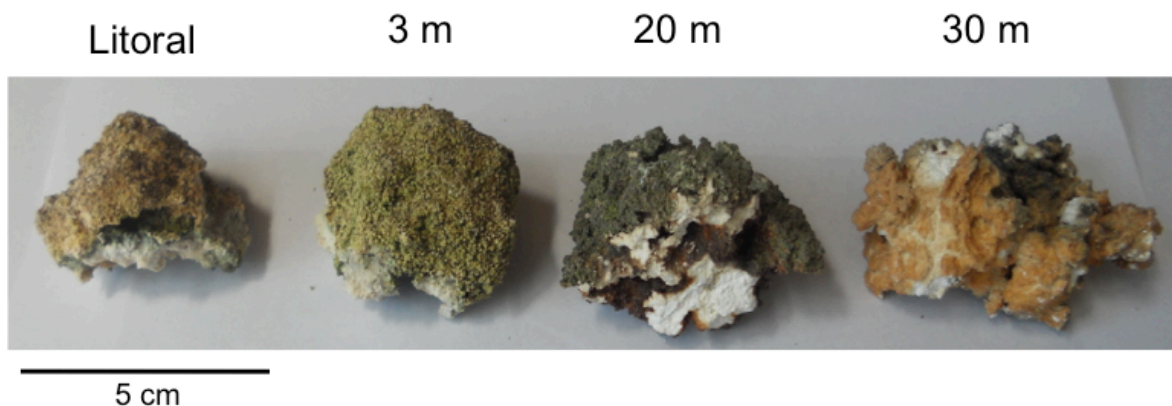


Figura 7. Microbialitas del lago cráter Alchichica muestreadas en la vertical del litoral a 30 m de profundidad.

6.2. Análisis geoquímicos

En las muestras de agua se determinaron nitratos y nitritos (NO_3^- , NO_2^-), alcalinidad, sulfuros y iones dominantes (Na^+ , K^+ , Ca^{2+} , Mg^{2+} , Cl^- , HCO_3^- , SO_4^{2-}). Los análisis de nitratos y nitritos se realizaron en el laboratorio de Biogeoquímica Acuática del Instituto de Ciencias del Mar y Limnología, UNAM. Para ello se empleó un autoanализador Skalar SanPlus (Skalar Analytical) empleando los métodos de Grasshoff *et al.* (1983) y los circuitos de Kirkwood (1994). Para los iones mayores, la determinación se hizo mediante cromatografía de iones con un cromatógrafo Waters y un detector de conductividad eléctrica (Modelo 432) (Waters), en el laboratorio de Cromatografía del Laboratorio Nacional de Geoquímica y Mineralogía. Los cationes (Na^+ , K^+ , Ca^{+2} , Mg^{+2}) fueron separados con la columna Metrosep C6 250 (Metrohm), mientras que para los aniones (HCO_3^- , Cl^- , SO_4^{-2}) se empleó la columna IC-Pak Anion HR (Waters), siguiendo la metodología descrita en Zamora Martínez *et al.* (2016). En este caso, la validación y

reproducibilidad de la técnica, permite no tener réplicas técnicas. Pese a que los boratos son iones importantes en el lago cráter Alchichica (Mancilla-Villa *et al.*, 2014), éstos no fueron cuantificados, ya que el método de cromatografía no está establecido para ello. Respecto a los carbonatos, éstos tampoco pudieron ser determinados empleando este método (limitaciones por las especificaciones de la columna); por lo que se determinaron por alcalinidad empleando el método de indicadores. El análisis de sulfuros se realizó por el método yodométrico en el laboratorio de Química Analítica del Instituto de Geofísica, UNAM.

6.3. Caracterización mineralógica de las microbialitas.

Se caracterizó la composición mineralógica de 2 muestras de litoral (una columnar y otra esponjosa), y de 4 microbialitas a diferentes profundidades (3, 10, 20 y 30 m) en el Laboratorio de Difracción de Rayos X del Laboratorio Nacional de Mineralogía y Geoquímica (LANGEM). Las muestras se molturaron y homogeneizaron mediante un mortero de ágata, se tamizaron y se midieron utilizando un portamuestras de aluminio (fracciones no orientadas) de doble carga. La medición se realizó en el intervalo angular 2θ de 5° a 70° en escaneo por pasos con un “step scan” de 0.003° (2θ) y un tiempo de integración de 40s por paso en un Difractómetro EMPYREAN, obteniendo así los difractogramas. Para observar la composición elemental de azufre (S), se llevó a cabo un análisis de distribución elemental por fluorescencia de rayos X, en la Unidad de microanálisis de rocas – CeMIEGeo.

6.4. Análisis del componente biológico

6.4.1. Extracción de DNA metagenómico de microbialitas.

Se extrajo DNA metagenómico de las microbialitas en litoral y en un gradiente vertical con el kit de extracción de DNA PowerSoil de MoBio (MoBio, Qiagen) con ligeras modificaciones al protocolo. Para maximizar la biomasa a procesar, se raspó y consideró la

parte del tapete microbiano de la microbialita, hasta juntar 0.25 g de muestra, todo en condiciones asépticas. El DNA obtenido fue eluido en 40 μ l de buffer de elución (TE) incluido en el kit de elución. La cantidad de DNA extraído fue verificada mediante fluorometría empleando el Qubit™ 3.0 Fluorometer (Thermo Fisher Scientific), y con los ensayos de alta y amplia sensibilidad dependiendo de la muestra (Qubit dsDNA HS Assay Kit y Qubit dsDNA BR Assay Kit).

6.4.2. Amplificación y secuenciación de fragmentos 16S rDNA

Para observar la composición global 16S rDNA en las microbialitas, se hizo un análisis empleando la región V4 del 16S rDNA con los primers 515F-806R. Los fragmentos se amplificaron y secuenciaron de forma masiva mediante la plataforma Illumina MiSeq. Para ello se emplearon los métodos previamente descritos en Carrillo-Araujo *et al.* (2015) y los sugeridos por Caporaso *et al.* (2010; 2012). Para este proceso se solicitó el apoyo técnico del personal del Laboratorio de Ecología de Bacteriana del Instituto de Ecología. Las secuencias fueron obtenidas por extremos pareados (*pair ended*) en un secuenciador Illumina MiSeq en el centro de servicio de secuenciación de la Universidad de Yale (*Yale Center for Genome Analysis*, CT, EU).

6.4.3. Análisis genes asociados a la sulfato reducción (*dsrAB*)

Para ver la diversidad de genes asociados a la sulfato reducción, se seleccionó el gen más conservado y relacionado a la sulfato reducción: *dsrAB*. Este gen codifica para las unidades α y β de la sulfito reductasa no asimilatoria (DsrAB), para ello se emplearon los primers dsr-1F: dsr-4R [fragmento de 1900 pb] (Wagner *et al.*, 1998).

Para la obtención de amplicones *dsrAB*, cada mezcla de PCR (volumen final de 25 μ l) contenía 1.0 μ l del primer (10 μ mol), 2.0 μ l del DNA previamente extraído (1 a 20 ng DNA metagenómico), 2.5 μ l de Buffer de PCR (10X), 1.0 μ l de dNTPs (200 μ M), 3.0 μ l de BSA (10 mg ml⁻¹), 1.5 μ l de MgCl₂ (25 mM) y 0.125 μ l Taq Pol (5 U μ l⁻¹) (TaKaRa Corp., Shiga, Japón). Las condiciones del PCR fueron tomados de Wagner *et al.* (1998) y Dhillon

et al. (2003). Debido a la baja carga génica encontrada para estos genes, se realizaron protocolos de PCR anidados, empleando 2.0 µl del primer PCR como templado en una segunda reacción.

6.4.4. Purificación y ligación de genes asociados a la transformación de *S* (*dsrAB*)

Los fragmentos *dsrAB* obtenidos de las microbialitas ($z = 3, 10, 20$ y 30 m) se purificaron mediante gel empleando el *Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System* (Promega). Para después ser ligados al vector pCR™ 2.1-TOPO (3.9 kb) mediante el sistema TOPO PCR Cloning® (Invitrogen). Los vectores construidos fueron empleados para transformar células quimiocompetentes de *Escherichia coli* TOP10 (Invitrogen) y seleccionadas por α -complementación en placas de medio LB con kanamicina ($50 \mu\text{g ml}^{-1}$) y X-gal (40 mg ml^{-1}).

Las células positivas fueron resembradas por sectores en placas de LB [kanamicina ($50 \mu\text{g ml}^{-1}$) y X-gal (40 mg ml^{-1})], esperando incrementar la biomasa y comprobar entonces la presencia de insertos. Para obtener los fragmentos deseados, se llevó a cabo un PCR-colonia (colony PCR) con los primers específicos M13F/M13R, para después comprobar el tamaño de los amplicones obtenidos. Los insertos con el tamaño adecuado (v.g. $1900 \text{ pb} + 200 \text{ pb}$) fueron transvasados a una placa para su envío al servicio de secuenciación (Macrogen, Corea del Sur), los cuales fueron secuenciados con el primer M13F, en un equipo 3730X DNA Analyzer (Applied Biosystems, Foster City, CA) en el servicio de secuenciación de Macrogen (Macrogen Inc., Corea del Sur).

6.5. Análisis de secuencias

Los datos de secuenciación 16S rDNA generados fueron analizados mediante el programa QIIME (Caporaso *et al.*, 2010; 2012). Previamente, los extremos pareados fueron alineados y unificados en una sola secuencia mediante FLASH (Magoč y Salzberg, 2011), y las quimeras eliminadas con USEARCH (Edgar, 2010). Las secuencias se clasificaron en

diferentes grupos taxonómicos bacterianos mediante la base de datos GreenGenes (<http://greengenes.lbl.gov/>) y Ribosomal Database Project (RDP) (Wang *et al.*, 2007). De estas tablas de abundancia se evaluaron los grupos sulfato reductores y su abundancia relativa. Los datos fueron rarefactados a 20,000 secuencias.

Las secuencias *dsrAB* se alinearon con SeaView, donde fueron editadas. Debido a la información obtenida de la secuenciación Sanger, sólo se consideró una sección del gen *dsrA* (~540 pb). Las secuencias fueron traducidas a proteínas, y alineadas para después emplear la secuencia nucleotídica según el uso de codón. Mediante el programa Mothur v.1.25.1 (Schloss *et al.*, 2009), se agruparon las secuencias en filotipos (cut off 95% similitud). Para realizar el dendrograma, se compararon las secuencias obtenidas con la base de datos del NCBI empleando el programa nBLAST (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>). Las secuencias fueron traducidas a proteínas DsrA y se analizaron por Máxima Verosimilitud empleando el modelo WAG en el programa PhyML, empleando 1000 repeticiones para observar la solidez de la reconstrucción (Guindon y Gascuel, 2003). El árbol fue editado con el programa MEGA, todas las secuencias empleadas de las bases de datos cuentan con el número de acceso.

6.6. Comparación de ensamblajes sulfato reductores en microbialitas y sedimentos

Para poner en perspectiva los datos generados sobre la abundancia de BSR en las microbialitas, se emplearon datos provenientes de sedimentos bénticos colectados en la misma temporada en el lago cráter Alchichica por el grupo de trabajo. La colección del material se hizo con nucleadores o contenedores que nos permitieron considerar las capas superiores de los mismos, es decir, un rango entre 0-7 cm. Se colectaron cerca de 17 muestras que fueron procesadas de manera similar a las microbialitas, i.e. empleando el mismo kit de extracción, protocolo de amplificación y secuenciación, así como análisis de secuencias. Estas muestras también sirvieron como controles positivos para la búsqueda de genes *dsrAB*.

7. Resultados

7.1. Caracterización fisicoquímica del ambiente acuático

7.1.1. Perfiles verticales de OD y temperatura (Circulación)

De acuerdo al perfil de oxígeno disuelto (OD) y temperatura (T, °C), se aprecia que la columna de agua comienza con el proceso de estratificación, a partir de los 4 m hasta los 13 m de profundidad (Fig. 8). A partir de esta zona la temperatura se homogeniza, y por tanto la zona de mezcla aún se mantiene en toda la columna de agua. El porcentaje de saturación del OD no llega a la anoxia (aunque se esperaría que en los 62 m se presentara), manteniéndose hasta los 60 m con un valor subsaturado de hasta el 50% (Fig. 8). De los 0 a los 13 m aproximadamente, tenemos una zona sobresaturada de OD.

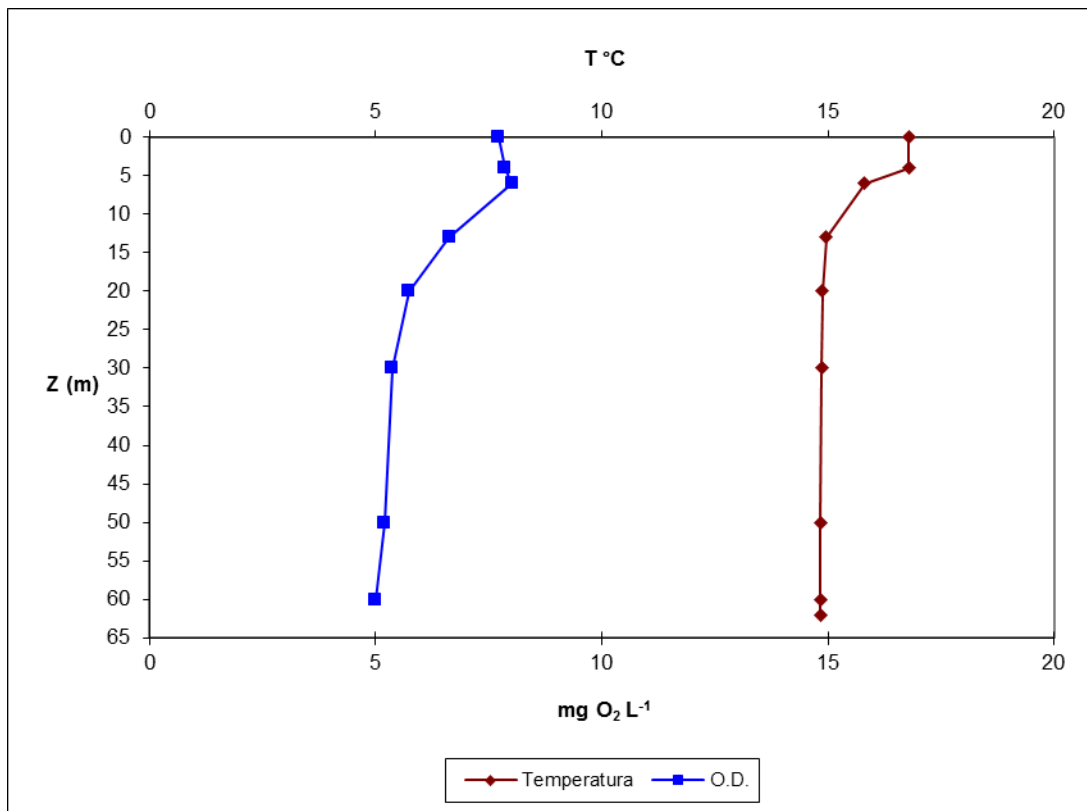


Figura 8. Perfiles verticales de oxígeno disuelto y temperatura del periodo de circulación (marzo, 2016).

7.1.2. Perfiles verticales de OD y temperatura (Estratificación)

En la figura 9 se muestra el perfil de oxígeno disuelto (OD) y temperatura (T, °C) durante el mes de septiembre de 2016. Se aprecia que, en la columna de agua correspondiente al periodo de estratificación, ésta se encuentra bien establecida. La columna de agua presentó una estructura bien definida de los tres estratos (epilimnion, metalimnion e hipolimnion). El epilimnion e hipolimnion presentaron una amplitud de sus estratos similar en metros. El epilimnion se encontró hasta los 20 m con una temperatura mayor a los 19°C. El *techo* del metalimnion se encontró a los 21 m de profundidad y el *piso* a los 30 m. A partir de los 31 m se tuvo el hipolimnion con una temperatura aproximada de 15°C (Fig. 9).

La oxiclina coincidió con la termoclina, comenzando en los 21 m, y terminando a los 30 m donde el sensor ya no detectó oxígeno disuelto (OD). El ORP, presentó valores reducidos hasta los 33 m de profundidad (Anexo B, Fig. B1). El pH presentó un máximo de 9.17 en el epilimnion, y un mínimo de 9.05 en el fondo de la columna de agua.

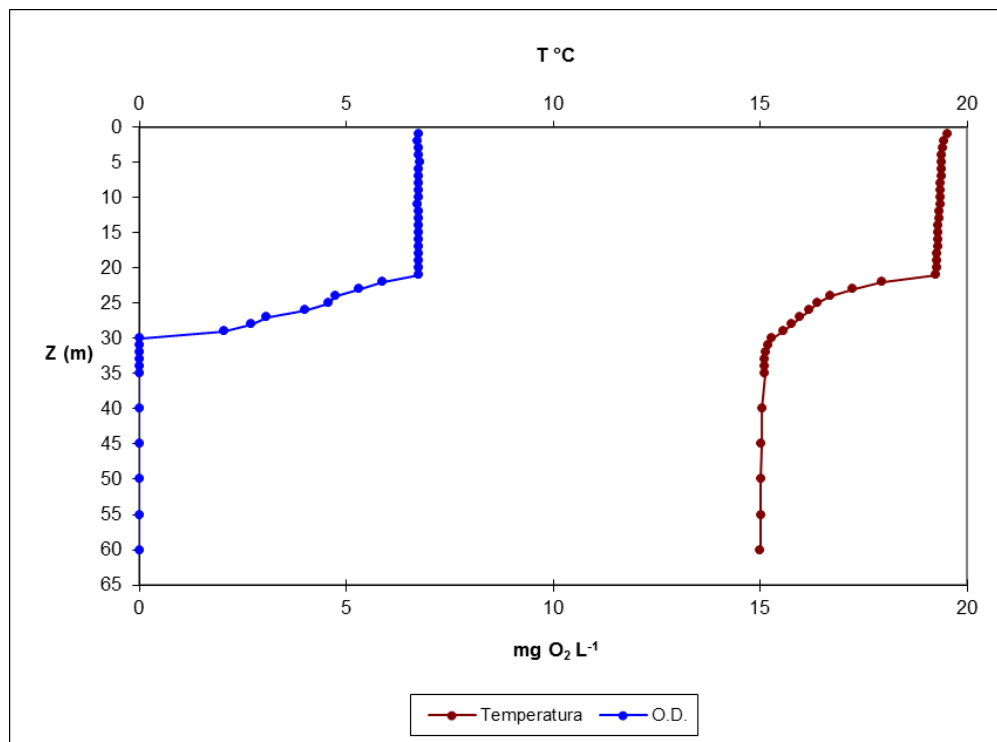


Figura 9. Perfiles verticales de oxígeno disuelto y temperatura del periodo de estratificación (septiembre, 2016).

7.1.3. Concentración de iones mayores, alcalinidad, sulfatos y sulfuros en la vertical

El análisis de iones mayores mostró que los aniones más concentrados en la columna de agua durante el periodo de circulación fueron los cloruros (2837 mg l^{-1}), seguidos de los bicarbonatos (1358 mg l^{-1}). Mientras que la concentración promedio de cationes fue de 1850 mg l^{-1} de Na^+ , 174 mg l^{-1} de K^+ , 11.4 mg l^{-1} de Ca^{2+} y 334 mg l^{-1} de Mg^{2+} (Tabla 3). Durante la estratificación, la dominancia de iones fue similar, en aniones la concentración promedio de cloruros fue de 3372 mg l^{-1} y 1146 mg l^{-1} de HCO_3^- . Y para cationes fue de 2411 mg l^{-1} de Na^+ , 22 mg l^{-1} de K^+ , 6 mg l^{-1} de Ca^{2+} y 435 mg l^{-1} de Mg^{2+} (Tabla 3).

Tabla 3. Concentración de iones mayores en la columna de agua.

z (m)	Na^+	K^+	Ca^{2+}	Mg^{2+}	HCO_3^-	Cl^-	SO_4^{2-}
	mg l^{-1}	mg l^{-1}	mg l^{-1}	mg l^{-1}	mg l^{-1}	mg l^{-1}	mg l^{-1}
Circulación							
4	2290	214	15.2	413	1603	3435	1062
13	2258	216	13.0	410	1598	3495	1069
30	1660	155	9.5	300	1365	2562	857
50	1505	141	9.5	272	1110	2320	702
61	1539	146	9.8	278	1116	2374	727
0 (lit)*	1584	150	11.9	288	1131	2436	734
4 (lit)	1268	120	9.6	230	1033	1946	586
6 (lit)	1525	143	12.4	275	1090	2354	726
10 (lit)	1576	150	10.2	284	1125	2424	750
Estratificación							
1	2296	224	6.7	437	1117	3607	1076
8	2493	222	7.0	435	1025	3909	1084
14	2369	223	6.0	435	1162	3673	1090
21	2335	222	6.7	435	1174	3643	1095
22	2298	222	6.4	432	1163	3595	1086
30	2426	223	6.3	435	1160	3787	1088
45	2469	223	6.7	435	1190	3843	1080
60	2604	224	6.0	437	1177	4115	1099

*(lit) muestras tomadas en el litoral del lago

Respecto a la concentración de CO_3^{2-} y HCO_3^- del sistema, en las muestras de agua se determinó por el método de los indicadores. En los resultados, se pudo observar una ligera dominancia de bicarbonatos (1517 mg l^{-1} promedio) sobre carbonatos (1492 mg l^{-1} promedio) durante la circulación (Anexo C, Tabla C1); sugiriendo un equilibrio. Mientras que, durante la estratificación, el pH registrado en el lago Alchichica osciló entre 9.05 y 9.17 (Anexo C, Tabla C2); con una dominancia mayor de carbonatos (1996 mg l^{-1} promedio) a la de bicarbonatos (1033 mg l^{-1} promedio) (Tabla 3).

El sulfato también se encontró como un anión dominante, con concentraciones promedio en la vertical de 883 mg l^{-1} durante la circulación, y 966 mg l^{-1} en la estratificación (Tabla 3). Asimismo, no se detectaron sulfuros durante la circulación, pero sí durante la estratificación a los 45 m de profundidad (0.74 mg l^{-1}) y a los 60 m (2.06 mg l^{-1}) (Tabla 4), sugiriendo procesos de sulfato reducción en el fondo del lago durante el período de estratificación.

Tabla 4. Concentración de sulfuros en la columna de agua.

Circulación		Estratificación	
z (m)	Sulfuros (mg l^{-1})	z (m)	Sulfuros (mg l^{-1})
4	Nd	1	Nd
13	Nd	8	Nd
30	Nd	14	Nd
50	Nd	21	Nd
61	Nd	22	Nd
		30	Nd
		45	0.74
		60	2.06

*Nd: No detectado por el método iodométrico, límite de detección 1 mg l^{-1}

7.1.4. Parámetros fisicoquímicos del agua circundante en las microbialitas de litoral

La ubicación de los sitios para los muestreos de las microbialitas fue rodeando todo el lago con el fin de obtener muestras representativas de todo el litoral (circunferencia). Se determinaron *in situ* los valores fisicoquímicos del agua circundante a las microbialitas

muestreadas en la cara que da al lago (Tabla 5). El pH fue alcalino y varió entre 8.8 y 9 unidades. La temperatura presentó diferencias de hasta de 1°C (entre los 16.4 y 17.4 °C). El porcentaje de oxígeno disuelto fue de subsaturado en las primeras dos muestras (88%) a sobresaturado en las restantes, llegando hasta un 122%. El ORP promedio fue de +207 mV, teniendo principalmente un ambiente oxidante.

Tabla 5. Parámetros determinados in situ en el agua circundante a las microbialitas del litoral.

Sitio	Coordenadas UTM	Altitud (m)	pH	Temp (°C)	Conductividad eléctrica (mS cm ⁻¹)	ORP (mV)	Oxígeno disuelto (%)
Alchi 1	0666781 2147816	2328	8.82	16.85	10.43	209.7	88.9
Alchi 2a	0666812 2147638	2328	8.96	16.73	10.28	208.9	88.3
Alchi 2b	0666816 2147602	2328	9.04	16.72	10.08	208	118.6
Alchi 3	0666835 2147436	2326	8.87	16.67	10.51	208.3	112.2
Alchi 4	0666922 2147102	2327	9.08	17.28	10.15	206.2	120.5
Alchi 5	0667078 2146813	2326	8.93	16.67	10.13	207	121.2
Alchi 6	0667311 2146693	2327	9.07	16.75	10.05	206.5	117.1
Alchi 7	0667444 2146658	2323	9.06	16.73	9.79	206.7	109.1
Alchi 8	0667865 2146575	2328	9.03	16.98	9.589	207	119.6
Alchi 9	0668243 2146732	2324	8.95	16.43	9.736	204.8	116.4
Alchi 10	0668450 2147450	2325	8.93	16.97	9.881	205.7	96
Alchi 11	0668398 2147828	2324	8.8	17.87	5.442	203.2	122.4

7.1.5. Concentración de iones en el agua circundante de las microbialitas

El agua circundante a los microbialitas de litoral presentó las concentraciones más altas de iones respecto a la columna de agua (Tabla 6). La concentración promedio de cationes fue de 2.15 g l⁻¹ de Na⁺, 0.2 g l⁻¹ de K⁺, 0.01 g l⁻¹ de Ca²⁺ y 0.41 g l⁻¹ de Mg²⁺. Mientras que los aniones fueron de 3.28 g l⁻¹ Cl⁻, 1.68 g l⁻¹ de HCO₃⁻, y 0.98 g l⁻¹ de SO₄²⁻. El sitio ALCHI-

11L mostró diferencias en los parámetros fisicoquímicos, así como en la concentración de iones; probablemente por las condiciones locales e hidrodinámicas del subsitio.

Tabla 6. Concentración de iones mayores en muestras de agua circundante a las microbialitas en Marzo, 2016.

		Na ⁺	K ⁺	Ca ²⁺	Mg ²⁺	HCO ₃ ⁻	Cl ⁻	SO ₄ ²⁻
		mg l ⁻¹	mg l ⁻¹	mg l ⁻¹	mg l ⁻¹	mg l ⁻¹	mg l ⁻¹	mg l ⁻¹
ALCHI-1L	Microbialita	2258	210	14.2	409	1366	3444	1050
ALCHI-2L	Microbialita	2282	212	14.0	416	1590	3479	1056
ALCHI-3L	Microbialita	2276	212	14.9	412	1515	3489	1069
ALCHI-4L	Microbialita	2272	214	11.4	412	1530	3474	1072
ALCHI-5L	Microbialita	2352	221	15.1	416	1552	3533	1070
ALCHI-6L	Microbialita	2325	217	14.1	418	1550	3566	1066
ALCHI-7L	Microbialita	2261	211	17.1	413	1733	3466	974
ALCHI-8L	Microbialita	2182	203	11.8	397	1700	3365	1011
ALCHI-9L	Microbialita	2293	212	13.5	411	1734	3546	1066
ALCHI-10L	Microbialita	2255	211	12.0	410	1718	3398	1035
ALCHI-11L	Microbialita	865	91	17.1	502	2518	1243	309
ALCHI-12L	Microbialita	2221	208	10.9	416	1671	3393	1015

7.2. Caracterización mineralógica y elemental de las microbialitas

7.2.1. Composición mineralógica de las microbialitas

En este estudio, se caracterizó la composición mineralógica de 2 muestras de litoral (una columnar y otra esponjosa), y de 4 microbialitas a diferentes profundidades (3, 10, 20 y 30 m). Nuestros resultados sugieren que las microbialitas, en general, tienen dos formas minerales predominantes: la hidromagnesita y aragonita. Siendo esta proporción diferente entre las microbialitas columnares y esponjosas de litoral (Tabla 7). La estructura de las microbialitas de z10, z20 y z30 muestran un predominio de aragonita sobre la hidromagnesita; mientras que en la microbialita z3, la hidromagnesita fue la dominante. Para z30, existe la presencia de una forma de carbonato de magnesio (huntita), una fase común en sistemas evaporíticos ricos en Mg.

Tabla 7. Resultados de la caracterización mineralógica en microbialitas de litoral y profundidad.

Microbialita	FASES IDENTIFICADAS	SEMICUANT (RIR) y Rietveld	Observaciones
A3 (litoral columnar)	Aragonita: CaCO ₃	91	Predominio de aragonita.
	Hidromagnesita: Mg ₅ (CO ₃) ₄ (OH) ₂ ·4H ₂ O	9	
A11 (litoral esponjosa)	Aragonita: CaCO ₃	14	Predominio de hidromagnesita.
	Hidromagnesita: Mg ₅ (CO ₃) ₄ (OH) ₂ ·4H ₂ O	86	
z3	Aragonita: CaCO ₃	29	Predominio de hidromagnesita.
	Hidromagnesita: Mg ₅ (CO ₃) ₄ (OH) ₂ ·4H ₂ O	71	
z10	Aragonita: CaCO ₃	70	Predominio de aragonita.
	Hidromagnesita: Mg ₅ (CO ₃) ₄ (OH) ₂ ·4H ₂ O	30	
z20	Aragonita: CaCO ₃	53	Predominio de aragonita.
	Hidromagnesita: Mg ₅ (CO ₃) ₄ (OH) ₂ ·4H ₂ O	47	
z30	Aragonita: CaCO ₃	11	La <i>huntita</i> es una fase común en sistemas evaporíticos ricos en Mg.
	Hidromagnesita: Mg ₅ (CO ₃) ₄ (OH) ₂ ·4H ₂ O	43	
	Huntita: Mg ₃ Ca(CO ₃) ₄	46	

7.2.2. Análisis de azufre total en microbialitas de profundidad

El azufre, al ser un elemento de interés en el presente estudio, se determinó como azufre total en las microbialitas. Para ello, se empleó fluorescencia de rayos X, que nos permite determinar la abundancia relativa elemental a diferentes niveles de profundidad en la muestra. Se realizó un corte transversal de una microbialita superficial (z=0) y otra a 20m (z=20), esto con el fin de identificar las zonas en las que puede estar más activo el ciclo del azufre, y por consiguiente la sulfato reducción.

En las siguientes figuras (Figs. 10 y 11) se aprecia que el azufre en la microbialita superficial y de profundidad, está principalmente asociado al tapete microbiano.

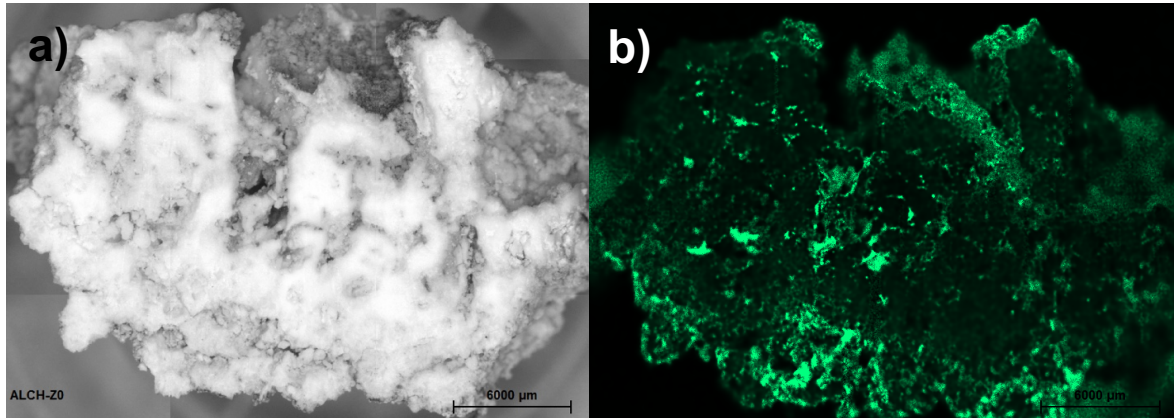


Figura 10. Corte transversal de una microbialita superficial ($z=0$), a) microscopía óptica, b) fluorescencia de rayos X, la intensidad del color verde corresponde a la abundancia relativa de azufre total en la microbialita.

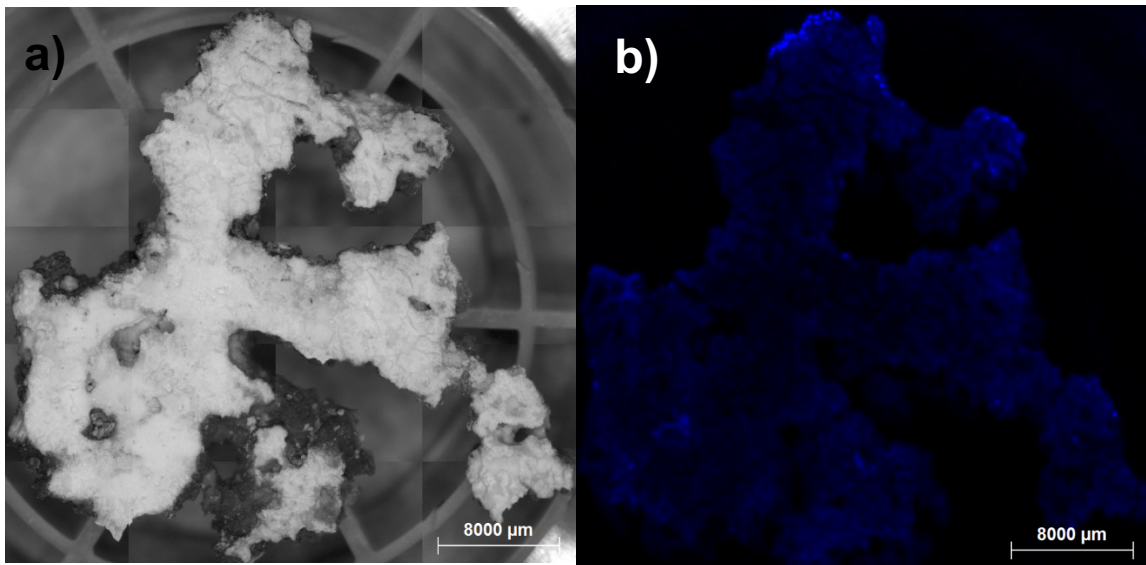


Figura 11. Corte transversal de una microbialita de profundidad 20 m ($z=20$), a) microscopía óptica, b) fluorescencia de rayos X, la intensidad del color azul corresponde a la abundancia relativa de azufre total en la microbialita.

7.3. Diversidad genética de organismos asociados al ciclo del S en microbialitas

7.3.1. Análisis de grupos sulfato reductores en las microbialitas a partir de análisis 16S rDNA

Para el análisis del ensamble sulfato reductor mediante técnicas independientes de cultivo, se logró obtener DNA metagenómico de las microbialitas de litoral y profundidad. La cantidad de DNA metagenómico extraído varió de 0.171-200.00 ng μl^{-1} (Tabla 8). Del DNA metagenómico se amplificaron la región V4 del 16S rDNA y se secuenciaron mediante la plataforma Illumina MiSeq. En total se obtuvieron 1,481,624 secuencias, donde el número mínimo fue de 20,305 para una muestra de litoral (Alch.Mi.lit.4). Paralelamente, se lograron obtener secuencias 16S rDNA dentro de la vertical incluyendo Z3, Z10, Z20 y Z30, correspondientes a 3, 10, 20 y 30 m, respectivamente.

Tabla 8. Rendimiento de DNA metagenómico de microbialitas y el número de secuencias 16S rDNA obtenidas.

Muestra	DNA metagenómico obtenido ng μl^{-1}	Número de secuencias 16S rDNA obtenidas
Mi.lit.1	No determinado	139,909
Mi.lit.2A	>100	195,496
Mi.lit.2B	40.5	160,998
Mi.lit.3	No determinado	105,228
Mi.lit.4	0.793	20,305
Mi.lit.5	53	73,837
Mi.lit.6	46.4	79,417
Mi.lit.7	15.8	111,914
Mi.lit.8	1.88	120,747
Mi.lit.9	3.61	No secuenciado
Mi.lit.10	0.695	74,114
Mi.lit.11	0.171	92,956
Mi.lit.13	0.325	No secuenciado
Mi.Z3	3.9	20,356
Mi.Z10	18.6	91,413
Mi.Z20	6.49	77,821
Mi.Z30	0.213	117,176
	TOTAL	1,481,624

Para determinar la abundancia relativa de los microorganismos potencialmente sulfato reductores, se emplearon las tablas de abundancia relativa generadas por la clasificación con GreenGenes y el RDP, y los grupos previamente descritos en la bibliografía como sulfato reductores. Las BSR encontradas en las bases de datos generadas incluyeron los filo Firmicutes con los géneros *Desulfosporosinus* y *Desulfotomaculum*, Nitrospirae con la familia Thermodesulfobivibrionaceae, y varios géneros dentro de Deltaproteobacteria (v.g. *Desulfosarcina*, *Desulfobacter*, *Desulfonatronum*, *Desulfomicrobium*, entre otros) (Fig. 12). La abundancia relativa de sulfato reductores conocidos fue de entre el 0.01 al 1.14% de la composición procariótica total de las microbialitas.

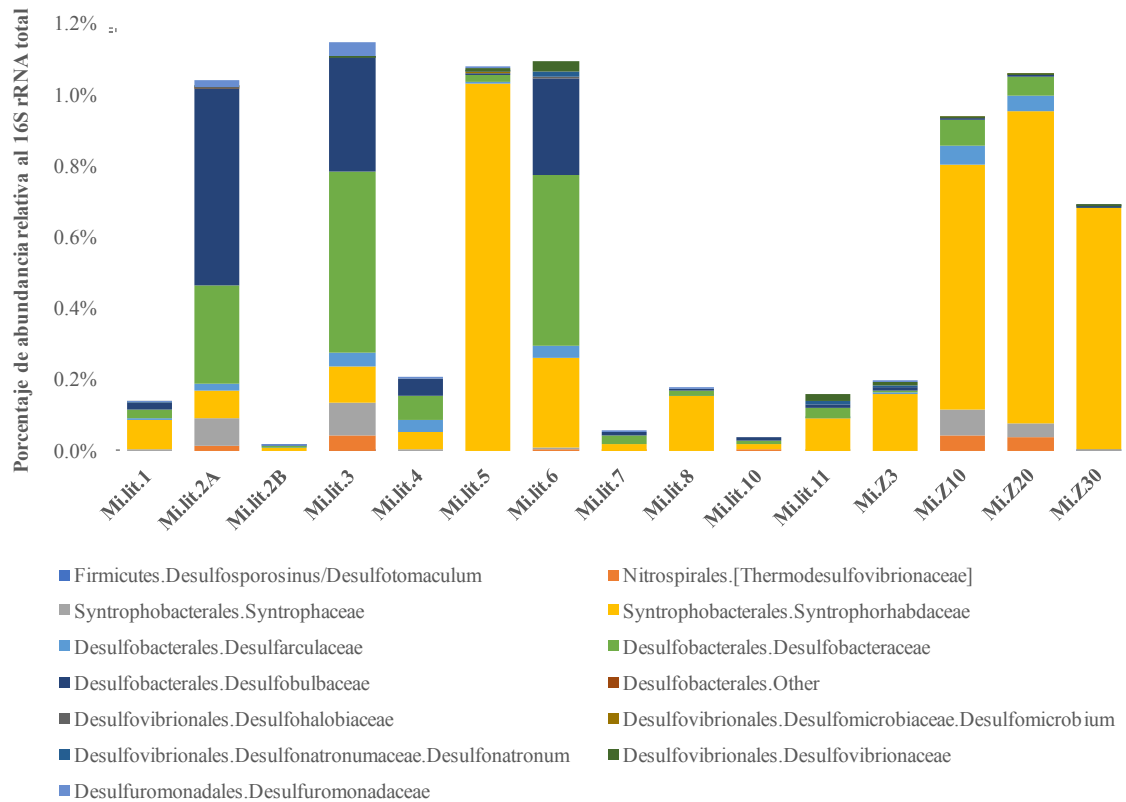


Figura 12. Abundancia relativa de BSR encontradas en microbialitas (Mi) del lago cráter Alchichica. Se enumeraron las muestras de litoral (lit) de los diferentes subsitios (1-11), y las muestras en el gradiente de profundidad se muestran como Z3 (3 m), Z10 (10 m), Z20 (20 m) y Z30 (30 m).

Los órdenes Desulfobacterales y Syntrophobacterales fueron los más importantes en las microbialitas de litoral. Mientras que, en las microbialitas en el gradiente vertical, la comunidad fue dominada por Syntrophobacterales (Z10, Z20 y Z30). Este patrón fue verificado por un análisis de componentes principales (PCA) (Fig. 13). La dominancia de la familia Syntrophorhabdaceae como grupo sulfato reductor no fue una característica única de las microbialitas por debajo de 10 m de profundidad, ya que la microbialita de litoral Mi.lit.5 también mostró ese comportamiento (Figs. 12 y 13).

Paralelamente, se formó un grupo determinado por la abundancia de la familia Desulfobacteraceae y Desulfobulbaceae (orden Desulfobacterales), integrado por microbialitas esponjosas Mi.lit.3, Mi.lit.2A y Mi.lit.6, donde cabe resaltar que fueron microbialitas de litoral con mayor abundancia de sulfato reductores potenciales (>1%).

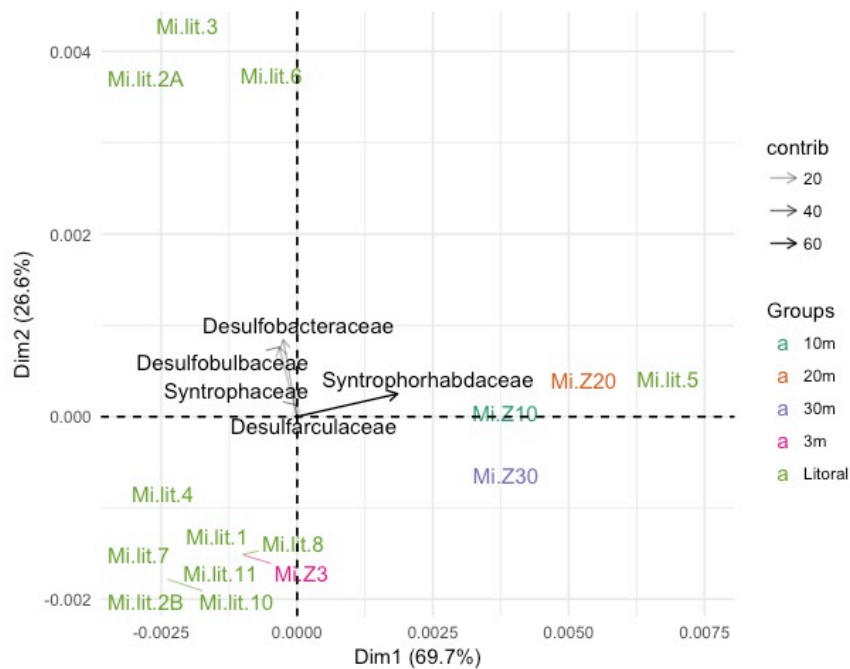


Figura 13. Análisis de componentes principales (PCA) de la distribución de los grupos sulfato reductores en las microbialitas del lago cráter Alchichica. Las microbialitas se muestran en colores acorde a su ubicación en el lago: litoral (lit), 10m (Z10), 20m (Z20), 30m (Z30). Los vectores indican los 5 grupos con mayor contribución a la agrupación, y el peso de ésta se indica en una escala de grises-negro (leyenda a la derecha).

7.3.2. Análisis de grupos sulfato reductores en las microbialitas a partir del análisis *dsrAB*

Para comprobar la presencia de BSR por métodos moleculares se empleó también un marcador involucrado en la sulfato reducción, como el gen *dsrAB*. Para la amplificación se empleó como templado DNA metagenómico de las microbialitas y se incluyó una muestra de sedimento superficial (0-1 cm) del lago Alchichica, esto con el fin de tener un control positivo para la sulfato reducción. Los ensayos demostraron que, para obtener amplicones *dsrAB* de microbialitas, era necesario hacer un protocolo anidado de PCR empleando los primers *dsr*-1F: *dsr*-4R (Fig. 14).

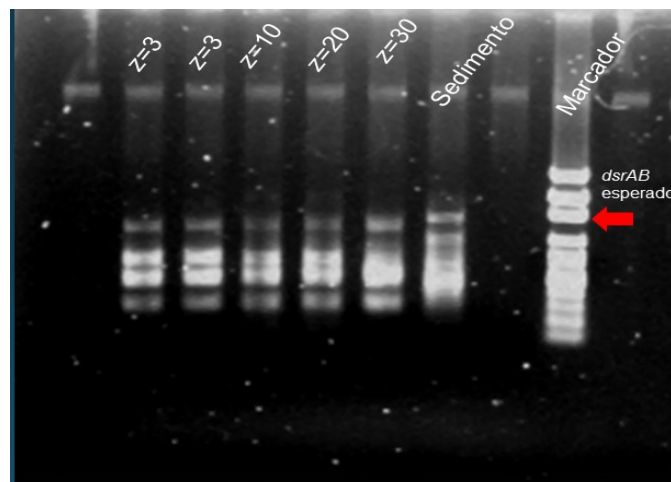


Figura 14. Gel de electroforesis de fragmentos *dsrAB* obtenidos por PCR anidado con los primers *dsr*-1F: *dsr*-4R para las microbialitas y sedimentos de Alchichica. En la parte superior se indica el tipo de muestra empleado como DNA templado. El marcador es de 100 pb y el tamaño esperado del amplicón esperado es de 1900 pb. La flecha roja señala la altura del amplicón esperado (gel de 1% agarosa, teñido con bromuro de etidio y fotodocumentado bajo luz UV)

Los fragmentos amplificados se lograron analizar por clonación/secuenciación. El tamaño del amplicón (1900 pb) limitó la eficiencia de clonación, y sólo se obtuvieron librerías para $z = 0$ m (muestra Mi.lit.2A), Z10, Z30 y sedimentos. Se realizó un segundo

intento para obtener las librerías de clonas de $z=20$ m; sin embargo, no hubo resultados positivos (Tabla 9).

Tabla 9. Número de clonas, fragmentos y secuencias *dsrAB* obtenidas

Librería	Clonas obtenidas	Fragmentos enviados a secuenciar	Secuencias <i>dsrA</i> obtenidas
Mi.lit.A13	15	Sin inserción	-
Mi.lit.A2	35	15	9
Mi.Z3	Sin transformación*	-	-
Mi.Z10	19	10	4
Mi.Z20	Sin transformación	-	-
Mi.Z30	100	9	2
Sedimentos	10	6	2
TOTAL	179	40	17

*Sin transformación, es decir, el vector no pudo ser incorporado exitosamente por cepas de *E. coli* quimiocompetentes.

Las secuencias *dsrA* obtenidas fueron alineadas y agrupadas en filotipos al 95% de identidad nucleotídica. Éstos compartían entre un 85 y 96% de identidad con secuencias *dsrA* de bacterias no cultivables de las bases de datos (NCBI-GenBank, agosto 2017). En total, se identificaron 9 filotipos *dsrA*, de los cuales hubo uno que solo se encontró en sedimentos, 6 en la microbialita de litoral y uno entre las microbialitas analizadas (litoral, Z10 y Z30) (Fig. 15).

El dendrograma sugiere que, los filotipos *dsrA* encontrados se afilian a Deltaproteobacteria incluyendo Syntrophobacterales, Desulfobacterales y Desulfovibrionales, principalmente (Fig. 15). Las secuencias de la microbialita de litoral Mi.lit.A2 se relacionaron con *Desulfomonile tiedjei*, *Desulfobacterium/Desulfosarcina* sp. y *Desulfonema ishimotonii*. También se notó que los filotipos *Desulfobacterium/Desulfosarcina* presentes en la microbialita de litoral, fueron constantes en las microbialitas de profundidad ($z=10$ y 30 m).

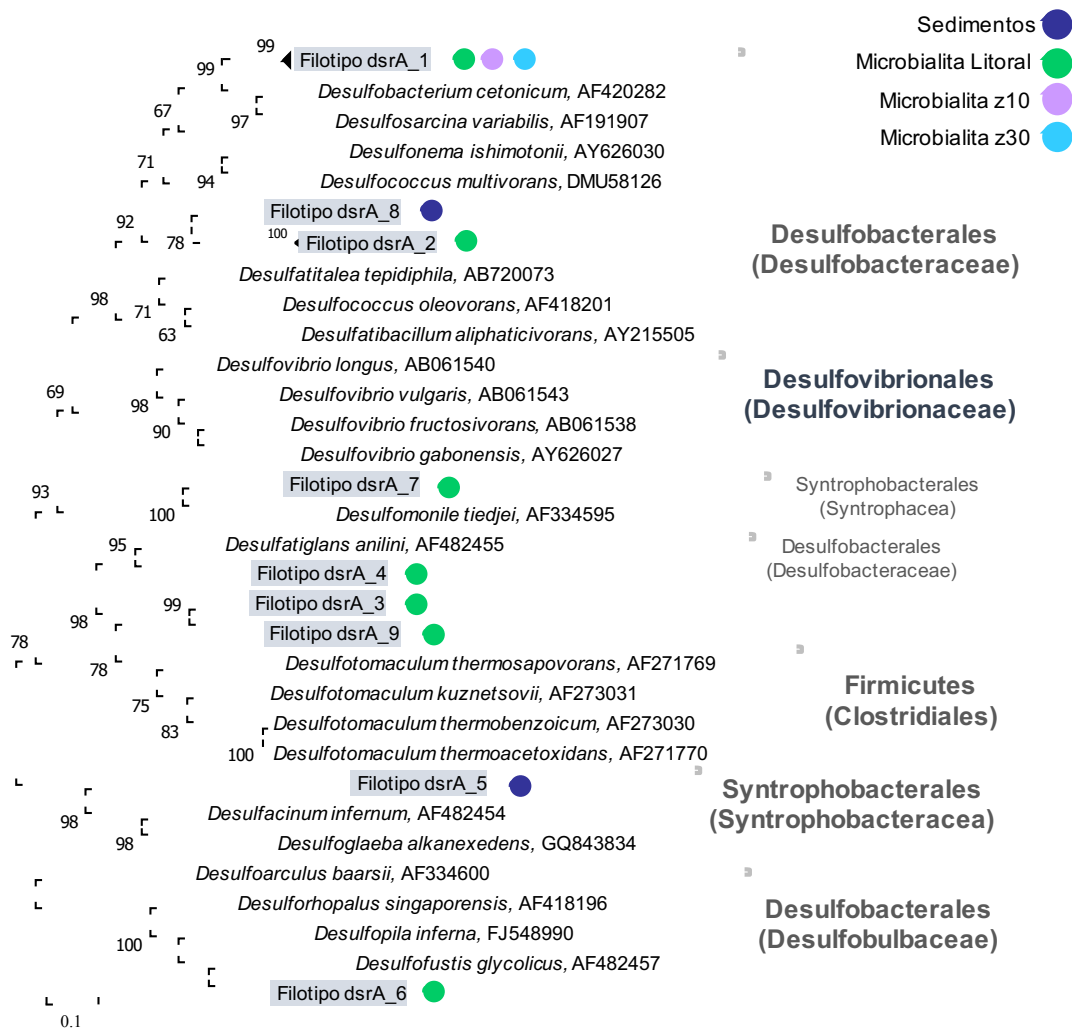


Figura 15. Dendrograma de fragmentos DsrA obtenidos de microbialitas y sedimentos del lago cráter Alchichica. El dendrograma fue computado por máxima verosimilitud (en PhyML), empleando el modelo WAG, y con 1000 repeticiones para soportar las ramas. Los números indicados en los nodos es el porcentaje de soporte de cada grupo. En la parte superior se muestran los códigos para mencionar la pertenencia de los filotipos obtenidos.

8. Discusión

8.1. Caracterización fisicoquímica del ambiente acuático

Los perfiles de temperatura y oxígeno disuelto mostraron las dos etapas hidrodinámicas que se planteó encontrar durante los dos meses de muestreo (marzo y septiembre 2016), característicos de lagos tropicales profundos como es el caso del lago Alchichica. Presentando una etapa de mezcla durante el invierno hemisférico y el resto del año se encuentra estratificado, que corresponde con un comportamiento hidrodinámico de monomixis (Filonov *et al.*, 2006; Adame *et al.*, 2008). Así, el muestreo de marzo 2016 correspondió con una etapa de mezcla y para septiembre, el sistema se encontraba la etapa de estratificación bien establecida de acuerdo con la amplitud de los estratos, variación de la temperatura y ubicación de la termoclina en los perfiles verticales (Figs. 8 y 9). Durante la mezcla, la columna de agua mostró oxígeno disuelto suficiente para favorecer los procesos metabólicos aerobios (5 a 8 mg l⁻¹), mientras que, en la estratificación, el oxígeno disuelto se encontró >5 mg l⁻¹ hasta los 30 m. Por lo que se puede decir que, el agua circundante a las microbialitas muestreadas tienen un ambiente aerobio.

El análisis de iones mayores durante el periodo de estratificación y circulación, arrojó que los aniones más concentrados en la columna de agua son los cloruros seguidos de los bicarbonatos y sulfatos. Mientras que los cationes dominantes son el sodio y magnesio sobre potasio y calcio (Tabla 3). Estos patrones concuerdan con diversos trabajos reportados en el lago Alchichica para este periodo (Alcocer y Lugo, 2003; Can, 2011; Mancilla, 2012), mientras que los valores de concentración general fueron más altos en comparación con los reportados por Armienta *et al.* (2008).

Si se toma en cuenta la composición edáfica y el tipo de rocas predominantes en la cuenca, los cationes más abundantes en el cuerpo de agua son: el sodio y el magnesio. El sodio, es de origen no marino [atalasohalino] (Macek *et al.*, 2007), y el magnesio resulta de una sobresaturación de minerales de magnesio y silicato de magnesio (dolomita y magnesita) propios de una interacción del agua con rocas ígneas comunes de un lago volcánico.

Los iones como Na⁺ y Cl⁻, se encontraron bajo el mismo patrón de dominancia iónico en el agua circundante a las microbialitas de litoral (Tabla 6). Sin embargo, se encontraron

más concentrados en relación con los determinados en la columna de agua. Esto puede ser debido a que los procesos de evaporación en la zona litoral son mucho mayores, y por tanto la concentración iónica mayor (Alcocer *et al.*, 2016). En el litoral, el porcentaje de oxígeno disuelto (OD), fue de subsaturado en las primeras dos muestras (88%) a sobresaturado en las restantes, llegando hasta un 122%. Esto probablemente sea debido a la productividad primaria llevada a cabo por el fitoplancton (Adame *et al.*, 2008). El ORP fue característico de un ambiente oxidante, ya que en promedio se obtuvieron valores de +203 a 209 mV (Tabla 3). Estudios previos en el lago sugieren condiciones similares en el litoral con valores de +311 a 341 mV (Marzo 2007) (Alcocer *et al.*, 2016). Estas condiciones son limitantes para los microorganismos sulfato reductores, ya que éstos se ven favorecidos en condiciones microóxicas o anóxicas (Hansen, 1994; LeGall, 1996).

Respecto a las formas de azufre en el lago de Alchichica, se determinaron los sulfatos y sulfuros por diferentes metodologías. Los sulfatos están indicados como elementos dominantes en los lagos tipo *maar*, salino alcalinos y volcánicos (Armienta *et al.*, 2008; Sorokin *et al.*, 2010) y se encontraron en valores cercanos a los 1050 mg l⁻¹. Durante el periodo de mezcla se notó una disminución en la concentración de SO₄²⁻ en la columna de agua conforme a la profundidad; sin embargo, no se encontró la presencia de sulfuros. Al observar los patrones de variabilidad de iones conservativos como el Na⁺ y Cl⁻ en la columna de agua, se notó que éstos también disminuían hacia el fondo (Fig. 16). Esto sugiere que la disminución de SO₄²⁻ en la vertical por un proceso mayoritariamente abiótico o un error metodológico en la determinación.

El pH es un parámetro que define al lago Alchichica como un sistema alcalino. Durante el desarrollo del presente estudio, se registraron valores entre 9.0 y 9.2 en la columna de agua; cercanos a los que reporta Mancilla (2012) (pH 9.3). De acuerdo con el sistema buffer de los lagos, los valores de pH por arriba de 9 implican que las concentraciones de bicarbonatos y carbonatos se encuentran en un punto de disociación (pK_a) donde el carbonato comienza a aumentar significativamente, con una ligera dominancia de los bicarbonatos (Hutchison, 1957; Gómez *et al.*, 2014).

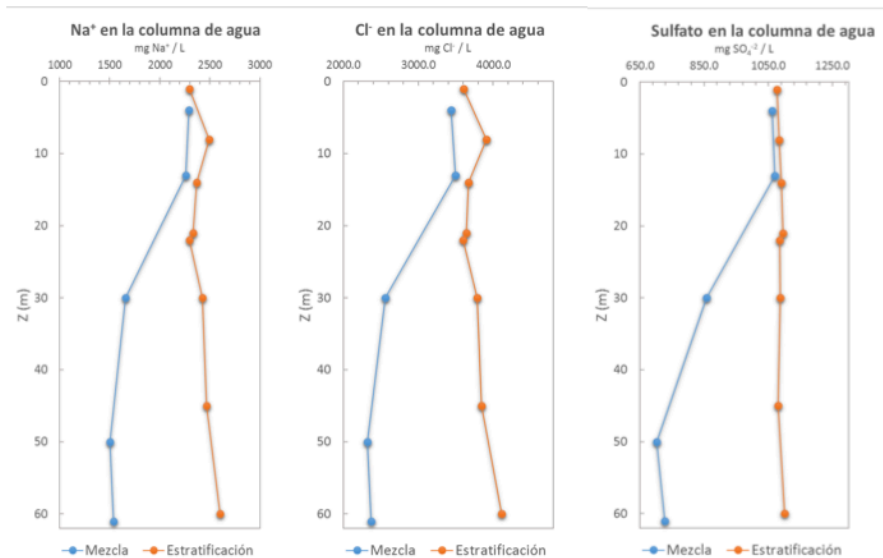


Figura 16. Distribución de sodio, cloruro y sulfato en la columna de agua del lago cráter Alchichica durante el periodo de mezcla y circulación, 2017.

El pH registrado en el lago Alchichica osciló entre 9 y 9.2 durante el periodo de estratificación. Los resultados de alcalinidad sugieren que la concentración de carbonatos es mayor a la de bicarbonatos (Anexo C, Tabla C2); y aparentemente, con una distribución casi homogénea en la vertical. Sin embargo, para el periodo de circulación, el pH osciló entre los 8.9 y 9.1 y la columna de agua presenta una concentración de bicarbonatos ligeramente mayor a la de carbonatos (Anexo C, Tabla C1). Armienta *et al.* (2008), Can (2011) y Mancilla (2012) presentan un patrón de equilibrio parecido al obtenido con el periodo de circulación para el lago Alchichica; sin embargo, no especifican en qué momento se realizó el muestreo.

Consecuentemente, las concentraciones de carbonatos y bicarbonatos son dinámicas y dependientes al tiempo de muestreo en este sistema. Lo cual concuerda con estudios previos en la columna de agua del lago cráter Atexcac (Escobar-Torres, 2015). La dinámica de estas especies (CO_3^{2-} y HCO_3^-) está entonces asociada con pequeñas variaciones en el pH, y refleja la concentración de algunas formas de carbono específicas dependiendo del punto de transición o transformación. Estas variaciones en las formas químicas en algunas ocasiones llegan a ser relacionadas con procesos biológicos específicos, que dan como resultado esta alternancia de las formas aniónicas en el sistema buffer. Por ejemplo, los procesos de precipitación de carbonatos como resultado de algunos metabolismos de cianobacterias, algunos heterótrofos aeróbicos y anaeróbicos (Baumgartner *et al.*, 2006).

8.2. Caracterización geoquímica de las microbialitas

8.2.1. Análisis DRX en microbialitas

El cálculo de los índices de saturación mineral para Alchichica muestra que, la saturación con respecto a los minerales del carbonato en el lago se encuentra sobresaturada. Para la aragonita, la saturación es aproximadamente diez veces mayor que el equilibrio y existe una sobresaturación que puede llegar a provocar una precipitación extracelular (Każmierczak *et al.*, 2011). Favoreciendo entonces la formación de microbialitas en ambos sentidos, biótica y abióticamente (Hansen, 1994; Baumgartner *et al.*, 2006; Braissant *et al.*, 2007).

Estudios previos muestran que las microbialitas esponjosas están compuestas principalmente por hidromagnesita ($\text{Mg}_5(\text{CO}_3)_4(\text{OH})_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$), mientras que las microbialitas columnares son una mezcla de calcita de magnesio (Mg-calcita) y aragonita (Każmierczak *et al.*, 2011). Las microbialitas con tapetes microbianos de cianobacterias vivas se producen al menos a una profundidad de 14 m (Tavera y Komarek, 1996; Kaźmierczak *et al.*, 2011). Sin embargo, nuestra investigación mostró microbialitas hasta los 30 m con un tapete microbiano vivo, aunque menos este tiene un menor grosor que los de litoral y diferente coloración (Fig. 7).

Los resultados por medio del análisis DRX sugieren que las microbialitas en general, tienen dos formas minerales predominantes: hidromagnesita y aragonita. Siendo esta proporción diferente entre las microbialitas columnares y esponjosas del litoral (Tabla 7). Para las microbialitas de litoral y 3 m de profundidad, nuestros datos coinciden con los Kaźmierczak *et al.* (2011), quienes estudiaron microbialitas de litoral y hasta 4 m de profundidad. En estos resultados se encuentra un predominio de hidromagnesita para las microbialitas esponjosas, y de aragonita para las columnares. Sin embargo, la composición mineral de las microbialitas esponjosas a 10, 20 y 30 m profundidad muestran patrones variables de las fases minerales. Kaźmierczak *et al.* (2011) comenta que las microbialitas esponjosas cuentan con una capa de aragonita que se precipita en el tapete de cianobacterias vivas o inmediatamente debajo de ella. Esta aragonita luego se transforma en hidromagnesita, la cual puede estar en una mezcla junto con huntita. Esta mezcla de minerales (*i.e.* aragonita, hidromagnesita y huntita) fue encontrada en z30; siendo la huntita una fase común en sistemas evaporíticos ricos en Mg. La dominancia de aragonita e

hidromagnesita en microbialitas es favorecida bajo condiciones del lago, donde las altas concentraciones de Mg sobre Ca, favorece la precipitación de estas formas minerales de Mg (aragonita e hidromagnesita), pero no de calcita.

Nuestros datos sugieren que no existe un patrón de distribución o dominancia en la composición de microbialitas en un gradiente vertical. Sin embargo, existen cambios en la relación de hidromagnesita y aragonita de las microbialitas conforme a la profundidad de las microbialitas, aunque esto debe soportarse con un número mayor de muestras.

8.2.2. Análisis de azufre total en microbialitas de profundidad.

Existe poca información sobre el ciclaje y las formas de azufre en microbialitas (Dupraz y Vissecher, 2015). Se sabe que el azufre se encuentra en altas concentraciones en el lago Alchichica (Armienta *et al.*, 2008). Su origen geológico ha contribuido a las altas concentraciones de sulfatos en la columna de agua, donde es un parámetro importante para la dinámica química del sistema, así como, para la actividad microbiana particularmente, para los procesos llevados a cabo por las bacterias sulfato reductoras (Sievert *et al.*, 2007; Muyzer y Stams, 2008).

En esta tesis se planteó identificar las zonas donde el azufre se encuentra distribuido en la estructura de la microbialita. Los resultados mostraron que el S se encuentra en todas las microbialitas, y está asociado principalmente a la superficie activa. La microbialita de litoral tenía una mayor distribución superficial de azufre en comparación con la microbialita de 20 m (Figs. 10 y 11). Esto puede ser debido a que, a mayor profundidad, superficie activa de la microbialita se encuentra menos consolidada. En el caso de este sistema acuático, la deposición de formas de S en las microbialitas se encuentra restringido a pequeñas zonas donde existen condiciones apropiadas para su metabolismo (Baumgatner *et al.*, 2006; Braissant *et al.*, 2007).

8.3. Diversidad genética y abundancia de potenciales BSR en microbialitas

8.3.1. Grupos sulfato reductores en las microbialitas a partir del análisis 16S rDNA.

La composición microbiana en microbialitas del lago Alchichica, basada en 16S rDNA, mostró una abundancia relativa del 1.1% de microorganismos potenciales para llevar a cabo la sulfato reducción. Esto indica que las BSR se encuentran en poca abundancia en las microbialitas. Para observar la proporción de BSR en otro sistema sésil en el lago, se realizó un análisis similar con los sedimentos (litoral de 0-7 cm) (empleando datos generados en el grupo de trabajo), y se observó que éstos tienen una abundancia promedio del 8% del total de las secuencias 16S rDNA (Fig. 17). Esto sugiere que en el lago Alchichica, los sedimentos son los mayores albergues de BSR del sistema, y las microbialitas contienen una abundancia relativa menor.

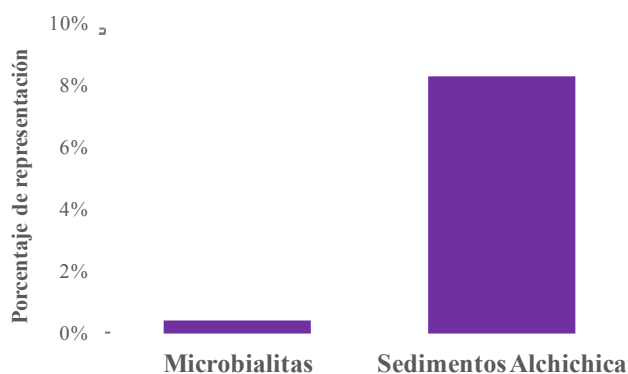


Figura 17. Porcentaje de representación promedio de las secuencias 16S rDNA de organismos con potencial sulfato reductor en microbialitas y sedimentos superficiales (0-7 cm) del lago de Alchichica.

La reducción del sulfato acoplada a la oxidación de la materia orgánica es un importante mecanismo de diagénesis en sedimentos (Froelich *et al.*, 1979; D'Hondt *et al.*, 2004). Las investigaciones genéticas funcionales (Leloup *et al.*, 2006; 2007; Lever, 2012) y taxonómicas (Teske *et al.*, 1998; Hubert *et al.*, 2009; Aullo *et al.*, 2013) detectan frecuentemente la presencia de BSR en sedimentos anóxicos poco profundos.

Los órdenes Desulfobacterales y Syntrophobacterales fueron los más importantes en las microbialitas de litoral del lago Alchichica. Mientras que, en las microbialitas en el gradiente vertical, la comunidad fue dominada por Syntrophobacterales (Z3, Z10, Z20 y Z30). Sin embargo, esta distribución no puede ser vista como una tendencia, ya que la microbialita de litoral Mi.lit.5 también mostró cerca de 1.0% de Syntrophobacterales. Más estudios deben realizarse para encontrar las causas de estas variaciones espaciales que comienzan a observarse. Cabe destacar que estos grupos son característicos de tapetes microbianos (Dhillon *et al.*, 2003; Foti *et al.*, 2007; Sorokin *et al.*, 2010; Wong *et al.*, 2015; 2017), y sedimentos lacustres y marinos. Los órdenes Syntrophobacterales y Desulfobacterales han sido detectados previamente en sistemas salinos y/o alcalinos, incluyendo los lagos soda (Foti *et al.*, 2007; Sorokin *et al.*, 2010). Asimismo, algunos de los grupos representativos en este estudio, son similares con los encontrados en microbialitas de Shark Bay (Casaburi *et al.*, 2016), donde Deltaproteobacteria correspondió al 3.2% de la abundancia bacteriana. Las BSR encontradas en las microbialitas de Shark Bay fueron principalmente bacterias asociadas con los órdenes Desulfobacterales (1.7%) y Desulfovibrionales (0.2%) (Casaburi *et al.*, 2016).

8.3.2. Detección de grupos sulfato reductores en las microbialitas mediante secuencias *dsrA*.

El análisis de los fragmentos DsrA ayudó a corroborar que en la diversidad genética de las microbialitas, existía el potencial genético para codificar la enzima clave de la sulfato reducción. En este análisis se detectaron 9 filotipos de los cuales, 7 correspondieron a microbialitas, y 2 filotipos a los sedimentos del mismo lago (nuevamente, empleados como control) (Fig. 15). Los filotipos de microbialitas y sedimentos no se compartieron entre ambos compartimientos, sugiriendo una composición diferente entre sedimentos y microbialitas.

El filotipo *dsrA_1* fue aquel con mayor abundancia y se encontró en las microbialitas de litoral y en aquellas a 10 y 30 m de profundidad. Este filotipo se agrupó dentro de secuencias de BSR del orden de Desulfobacterales, junto con otras tres (*dsrA_2*, *dsrA_4* y

dsrA_6). Desulfobacterales y Syntrophobacterales son considerados organismos altamente organotróficos, y sus principales fuentes de carbono son el acetato, así como el lactato, el piruvato y el etanol (Caumette, 1986; Gibson, 1990; Dannenberg *et al.*, 1992). La alta flexibilidad metabólica de las BSR (oxidan >125 componentes orgánicos) (Hansen, 1994) pone a éstos microorganismos como excelentes degradadores de la materia orgánica bajo condiciones anóxicas/microóxicas y en presencia de formas reducidas de S. En sedimentos marinos de Guaymas se han encontrado cepas oxidadoras de acetato pertenecientes al género *Desulfobacter* (Dhillon *et al.*, 2003).

Los análisis de 16S rDNA mencionan que en las microbialitas de la vertical –Z3, Z10, Z20 y Z30– se detectó BSR de la familia Syntrophorhabdaceae (Fig. 12). Ninguna secuencia *dsrA* recuperada de las microbialitas se asoció a este grupo. Esta discrepancia puede ser debida al bajo número de clonas obtenido para las librerías z20 y z30, o a que los primers empleados son selectivos secuencias la familia Desulfobacteraceae (Wagner *et al.*, 1998).

Cuando se realizó el estudio de las BSR mediante el marcador *dsrA* fue necesario llevar a cabo un protocolo que pudiera detectar el bajo número de copias presentes. Este comportamiento coincidió con la abundancia relativa de BSR detectadas mediante 16S rDNA (Fig. 12). La baja abundancia de estos genes fue también confirmada por Ruvindy *et al.* (2016), donde, a partir de una secuenciación masiva *shotgun* de DNA extraído de microbialitas de Shark Bay, se observó que no existían secuencias relacionadas con *dsrAB*. Contrariamente, la presencia de los genes codificantes para la sulfato adeniltransferasa (Sat) y la adenilsulfato reductasa (ApsAB) fue confirmada. Estos genes están involucrados en las rutas de reducción y oxidación de azufre (Ruvindy *et al.*, 2016). Las rutas de oxidación de los compuestos del azufre están principalmente asociadas a procesos de fotosíntesis anoxigénicos, presentes en bacterias verdes (Chloroflexi) y púrpuras del azufre (Chromatiales). Estos fotótrofos tienen un fotosistema que emplea formas reducidas de azufre (v.g. H₂S) como donadores electrónicos, produciendo SO₄⁻³.

En las microbialitas del lago cráter Alchichica, se encontró que la distribución de los grupos fototróficos principales, sí responde a un gradiente de profundidad (Fig. 18). El análisis de componentes principales mostró que organismos como Cyanobacteria -y microalgas determinadas como secuencias 16S rDNA de cloroplastos-, están presentes en

las muestras de microbialitas de litoral. Mientras que, en muestras profundas de 10, 20 y 30 m, las muestras están dominadas por Chromatiales (Gammaproteobacteria). Las bacterias púrpura del azufre se caracterizan por tener bacterioclorofilas *a* y *b*, las cuales absorben fotones con longitudes de onda hacia el infrarrojo (800-810, 830-890, 835-850, 1015-1035 nm) (Blankenship, 2006). Sugerimos que el aumento de las bacterias púrpuras del azufre en profundidad (10-30 m) se asocia a su composición pigmentaria, aunque esta caracterización es aún necesaria.

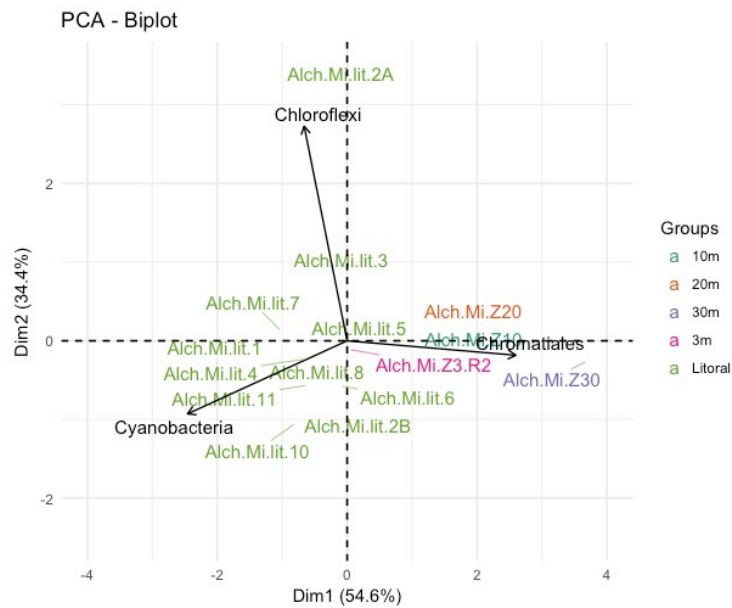


Figura 18. Análisis de componentes principales (PCA) de los grupos fototróficos encontrados en las microbialitas del lago cráter Alchichica.

Como resultado, existe un número más grande de organismos fotosintéticos anoxigénicos dependientes de S en las microbialitas de profundidad que en el litoral. Consecuentemente, las microbialitas de profundidad (10, 20 y 30 m) a pesar de tener tapetes microbianos más delgados, cuentan con características que pueden ser suficientes para el desarrollo de las BSR.

9. Conclusiones

La abundancia relativa de grupos potenciales sulfato reductores -basado en el análisis de 16S rDNA-, así como la baja carga génica *dsrAB* en las microbialitas del lago Alchichica; sugieren que las BSR se encuentran en una baja proporción (~1%), a comparación de otros grupos como las cianobacterias. Probablemente, el papel de las BSR en la precipitación de carbonatos sea menor en las microbialitas del lago Alchichica que el de las cianobacterias.

Asimismo, nuestros datos sugieren que existen diferencias entre los microorganismos potencialmente sulfato reductores de las microbialitas en un gradiente de profundidad en el lago cráter Alchichica, de acuerdo a lo esperado con la hipótesis planteada inicialmente en este trabajo. Sin embargo, la familia Desulfobacteraceae no dominó en todas las microbialitas del gradiente vertical, siendo sólo dominante en las microbialitas de litoral, mientras que en el gradiente vertical de 3 a 30 m fue Syntrophobacteraceae.

10. Perspectivas y alcances

El presente trabajo representa la primera exploración funcional dirigida para determinar y caracterizar las bacterias sulfato reductoras en las microbialitas del lago cráter Alchichica. Nuestros resultados sugieren que las BSR se encuentran una abundancia relativa menor a la de los sedimentos; sin embargo, no se sabe su actividad y la capacidad de reducción que tienen dentro del sistema. Nuestro estudio está basado en la huella de DNA, por lo que intuimos el componente potencial en la sulfato reducción, quedaría por delante emplear otro tipo de herramientas corroborar el papel de las BSR en el ciclaje del S, y posiblemente su papel en la precipitación y formación de microbialitas.

Asimismo, las microbialitas de profundidad parecen tener grupos sulfuro oxidadores dentro del orden de Chromatiales que son importantes y están acoplados a Syntrophobacterales. No existe información a la fecha del papel de la fotosíntesis anoxigénica acoplada a la oxidación del azufre en las microbialitas del lago, y se sugiere que ésta juega un papel importante en estratos más profundo del lago, donde la radiación infrarroja puede sostener a grupos fotosintéticos dependientes de bacterioclorofilas *a* y *b*.

Referencias

- Adame, M. F., Alcocer, J., y Escobar, E. (2008). Size-fractionated phytoplankton biomass and its implications for the dynamics of an oligotrophic tropical lake. *Freshwater Biology*, 53(1), 22-31.
- Alcántara-Hernández, R. J., Valdespino-Castillo, P. M., Centeno, C. M., Alcocer, J., Merino-Ibarra, M., y Falcón, L. I. (2017). Genetic diversity associated with N-cycle pathways in microbialites from Lake Alchichica, Mexico. *Aquatic Microbial Ecology*, 78(2), 121-133.
- Alcocer, J., Lugo, A., Del Rosario M., y Escobar, E. (1998). Isabela Crater-Lake: a Mexican insular saline lake. *Hydrobiologia*. 381 (1-3), 1-7.
- Alcocer, J., Lugo, A., Escobar, E., Sánchez, M. D. R., y Vilaclara, G. (2001). Water column stratification and its implications in the tropical warm monomictic Lake Alchichica, Puebla, Mexico. *Internationale Vereinigung fur Theoretische und Angewandte Limnologie Verhandlungen*, 27(5), 3166-3169.
- Alcocer, J., y Escobar-Briones, E. (2007). On the ecology of *Caecidotea williamsi* Escobar-Briones y Alcocer (Crustacea: Isopoda: Asellidae) from Alchichica saline lake, Central Mexico. *Hydrobiologia*, 576(1), 103-109.
- Alcocer, J., y Filonov, A. E. (2007). A note on the effects of an individual large rainfall event on saline Lake Alchichica, Mexico. *Environmental Geology*, 53(4), 777-783.
- Alcocer, J., Escobar, E., y Oseguera, L. A. (2008). Acoplamiento pelágico-bentónico: respuesta de la zona bentónica profunda a la sedimentación del florecimiento invernal de diatomeas en el lago oligotrófico Alchichica, Puebla, México. *Hidrobiológica*. 18 (1), 115-122.
- Alcocer, J., Escobar, E., Řezníčková, P., y Oseguera, L. A. (2016). La comunidad de macroinvertebrados bentónicos litorales como un reflejo de la heterogeneidad ambiental. *Hidrobiológica*, 26(3), 403-418.
- Amann, R. I., Stromley, J., Devereux, R., Key, R. y Stahl, D. A. (1992). Molecular and microscopic identification of sulfate-reducing bacteria in multispecies biofilms. *Applied and Environmental Microbiology*. 58(2), 614-623.
- Angermeyer, A., Crosby, S. C., y Huber, J. A. (2016). Decoupled distance–decay patterns between *dsrA* and 16S rRNA genes among salt marsh sulfate-reducing bacteria. *Environmental microbiology*, 18(1), 75-86.
- Ardiles, V., Alcocer, J., Vilaclara, G., Oseguera, L. A., y Velasco, L. (2012). Diatom fluxes in a tropical, oligotrophic lake dominated by large-sized phytoplankton. *Hydrobiologia*, 679(1), 77-90.
- Armienta, M. A., Vilaclara, G., De la Cruz-Reyna, S., Ramos, S., Cenicerros, N., Cruz, O., Aguayo, A. y Arcega-Cabrera, F. (2008). Water chemistry of lakes related to active and inactive Mexican volcanoes. *Journal of Volcanology and Geothermal Research*. 178(2), 249-258.
- Arredondo-Figueroa, J. L., Borrego-Enríquez, L. E., Castillo-Domínguez, R. M. y Valladolid-Laredo, M. A. (1983). Batimetría y morfometría de los lagos “maars” de la cuenca de Oriental, Puebla, México. *Biotica*. 8(1), 37-47.
- Atlas R. y Bartha R. (2002). Ecología microbiana y microbiología ambiental. *Pearson Educación*. España. 422-429.

- Aüllo, T., Ranchou-Peyruse, A., Ollivier, B. y Magot, M. (2013). Desulfotomaculum spp. and related gram-positive sulfate-reducing bacteria in deep subsurface environments. *Frontiers in Microbiology*, 4(362), 1-12.
- Awramik, S.A. (1984). Ancient stromatolites and microbial mats. In *Microbial Mats: Stromatolites*. Cohen, Y., Castenholz, R.W., y Halvorson, H.O. (eds). New York: Alan R. Liss, pp. 1–22.
- Barton, L. L. y Fauque, G. D. (2009). Biochemistry, physiology and biotechnology of sulfate-reducing bacteria. *Advances in applied microbiology*, 68, 41-98.
- Baumgartner, L. K., Reid, R. P., Dupraz, C., Decho, A. W., Buckley, D. H., Spear, J. R., Przekop, K.M. y Visscher, P. T. (2006). Sulfate reducing bacteria in microbial mats: changing paradigms, new discoveries. *Sedimentary Geology*, 185(3), 131-145.
- Bautista-Reyes, F., y Macek, M. (2012). Ciliate food vacuole content and bacterial community composition in the warm-monomictic crater Lake Alchichica, México. *FEMS microbiology ecology*, 79(1), 85-97
- Blankenship, R. E., Madigan, M. T., y Bauer, C. E. (Eds.). (2006). *Anoxygenic photosynthetic bacteria* (Vol. 2). Springer Science y Business Media
- Bosak, T. y Newman, D. K. (2003). Microbial nucleation of calcium carbonate in the Precambrian. *Geology*, 31(7), 577-580.
- Braissant, O., Decho, A. W., Dupraz, C., Glunk, C., Przekop, K. M., y Visscher, P. T. (2007). Exopolymeric substances of sulfate-reducing bacteria: interactions with calcium at alkaline pH and implication for formation of carbonate minerals. *Geobiology*, 5(4), 401-411.
- Breitbart, M., Hoare, A., Nitti, A., Siefert, J., Haynes, M., Dinsdale, E., y Hollander, D. (2009). Metagenomic and stable isotopic analyses of modern freshwater microbialites in Cuatro Ciénegas, Mexico. *Environmental microbiology*, 11(1), 16-34.
- Brito, E. M., Villegas-Negrete, N., Sotelo-González, I. A., Caretta, C. A., Goñi-Urriza, M., Gassie, C., Hakil, F., Colin, Y., Duran, R., Gutiérrez-Corona, F., Piñón-Castillo, H. A., Cuevas-Rodríguez, G., Malm, O., Torres, J. P., Fahy, A., Reyna-López, G. E. y Guyoneaud, R. (2014). Microbial diversity in Los Azufres geothermal field (Michoacán, Mexico) and isolation of representative sulfate and sulfur reducers. *Extremophiles*, 18(2), 385-398.
- Burne, R. V., y Moore, L. S. (1987). Microbialites: organosedimentary deposits of benthic microbial communities. *Palaios*, 241-254.
- Caballero, M., Vilaclara, G., Rodríguez, A., y Juárez, D. (2003). Short-term climatic change in lake sediments from lake Alchichica, Oriental, Mexico. *Geofísica Internacional*, 42(3), 529-537.
- Can, C. A. (2011). Calidad de las aguas para riego en la cuenca del Oriental y sierra Norte, estados de Puebla, Tlaxcala y Veracruz. Tesis grado de Doctor en Ciencias. Postgrado de Hidrociencias. Colegio de Postgraduados. México.
- Canfield, D. E., y Farquhar, J. (2012). The Global Sulfur Cycle. *Fundamentals of Geobiology* (pp. 49-64): John Wiley y Sons, Ltd.
- Caporaso, J. G., Kuczynski, J., Stombaugh, J., Bittinger, K., Bushman, F. D., Costello, E. K., y Huttley, G. A. (2010). QIIME allows analysis of high-throughput community sequencing data. *Nature Methods*, 7(5), 335-336.
- Caporaso, J. G., Lauber, C. L., Walters, W. A., Berg-Lyons, D., Huntley, J., Fierer, N., y Gormley, N. (2012). Ultra-high-throughput microbial community analysis on the Illumina HiSeq and MiSeq platforms. *The ISME Journal*, 6(8), 1621.

- Carrillo-Araujo, M., Taş, N., Alcántara-Hernández, R. J., Gaona, O., Schondube, J. E., Medellín, R. A., y Falcón, L. I. (2015). Phyllostomid bat microbiome composition is associated to host phylogeny and feeding strategies. *Frontiers in Microbiology*, 6.
- Casaburi, G., Duscher, A. A., Reid, R. P., y Foster, J. S. (2016). Characterization of the stromatolite microbiome from Little Darby Island, The Bahamas using predictive and whole shotgun metagenomic analysis. *Environmental microbiology*, 18(5), 1452-1469.
- Caumette, P. (1986). Phototrophic sulfur bacteria and sulfate-reducing bacteria causing red waters in a shallow brackish coastal lagoon. (Prevost Lagoon, France). *FEMS Microbiology Ecology*. 38(2), 113-124.
- Centeno, C. M., Legendre, P., Beltrán, Y., Alcántara-Hernández, R. J., Lidström, U. E., Ashby, M. N., y Falcón, L. I. (2012). Microbialite genetic diversity and composition relate to environmental variables. *FEMS microbiology ecology*, 82(3), 724-735.
- Couradeau, E., Benzerara, K., Moreira, D., Gerard, E., Kazmierczak, J., Tavera, R. y López-García, P. (2011). Prokaryotic and eukaryotic community structure in field and cultured microbialites from the alkaline Lake Alchichica (Mexico). *PLoS One*. 6(12), 28767-28767.
- Couradeau, E., Benzerara, K., Gérard, E., Moreira, D., Bernard, S., Brown, G. E. y López-García, P. (2012). An early-branching microbialite cyanobacterium forms intracellular carbonates. *Science*. 336(6080), 459-462.
- Crane, B. R., y Getzoff, E. D. (1996). The relationship between structure and function for the sulfite reductases. *Current opinion in structural biology*, 6(6), 744-756.
- Cypionka, H. (2000). Oxygen Respiration by *Desulfovibrio spp.* *Annual Reviews in Microbiology*. 54(1), 827-848.
- Dahl, C., Kredich, N. M., DEUTzMANN, R. A. I. N. E. R., y Trlfer, H. G. (1993). Dissimilatory sulphite reductase from *Archaeoglobus fulgidus*: physico-chemical properties of the enzyme and cloning, sequencing and analysis of the reductase genes. *Microbiology*, 139(8), 1817-1828.
- Dannenberg, S., Kroder, M., Dilling, W., y Cypionka, H. (1992). Oxidation of H₂, organic compounds and inorganic sulfur compounds coupled to reduction of O₂ or nitrate by sulfate-reducing bacteria. *Archives of Microbiology*, 158(2), 93-99.
- Dhillon, A., Teske, A., Dillon, J., Stahl, D. A., y Sogin, M. L. (2003). Molecular characterization of sulfate-reducing bacteria in the Guaymas Basin. *Applied and Environmental Microbiology*, 69(5), 2765-2772.
- D'hondt, S., Jørgensen, B. B., Miller, D. J., Batzke, A., Blake, R., Cragg, B. A., y Holm, N. G. (2004). Distributions of microbial activities in deep seafloor sediments. *Science*, 306(5705), 2216-2221.
- Dolla, A., Fournier, M. y Dermoun, Z. (2006). Oxygen defense in sulfate-reducing bacteria. *Journal of biotechnology*. 126(1), 87-100.
- Dupraz, C. y Visscher, P. T. (2005). Microbial lithification in marine stromatolites and hypersaline mats. *Trends in microbiology*. 13(9), 429-438.
- Edgar, R. C. (2010). Search and clustering orders of magnitude faster than BLAST. *Bioinformatics*, 26(19), 2460-2461.
- Escobar L. y Torres J., (2016). Aislamiento y caracterización de la diversidad de bacterias sulfato reductoras durante el Evento de Emblanquecimiento “Whiting Event” en el lago cráter Atexcac, Puebla. Tesis para obtener el título de Biólogo. FES Zaragoza. UNAM. México.

- Fariás, M. E., Rascovan, N., Toneatti, D. M., Albarracín, V. H., Flores, M. R., Poiré, D. G., y Polerecky, L. (2013). The discovery of stromatolites developing at 3570 m above sea level in a high-altitude volcanic lake Socompa, Argentinean Andes. *PLoS one*, 8(1), e53497.
- Filonov, A., Tereshchenko, I., y Alcocer, J. (2006). Dynamic response to mountain breeze circulation in Alchichica, a crater lake in Mexico. *Geophysical Research Letters*, 33(7).
- Foti, M., Sorokin, D. Y., Lomans, B., Mussman, M., Zacharova, E. E., Pimenov, N. V., y Muyzer, G. (2007). Diversity, activity, and abundance of sulfate-reducing bacteria in saline and hypersaline soda lakes. *Applied and environmental microbiology*, 73(7), 2093-2100.
- Freyre F. (2006). Caracterización de bacterias alcalofilas sulfoxidantes. Tesis para obtener el grado de Maestría en Biotecnología. Universidad Autónoma Metropolitana. Iztapalapa. División de Ciencias Biológicas y de la Salud. México. 87.
- Froelich, P.N., Klinkhammer, G.P., Bender, M.L., Luedtke, N.A., Heath, G.R., Cullen, D., et al. (1979). Early oxidation of organic matter in pelagic sediments of the Eastern equatorial Atlantic: Suboxic diagenesis. *Geochimica et Cosmochimica Acta* 43, 1075–1090.
- Gasca, A. (1981). Algunas notas de la génesis de los lagos cráter de la Cuenca de Oriental, Puebla, Tlaxcala y Veracruz. Instituto Nacional de Antropología e Historia. Departamento de Prehistoria. México, 55 p. (Colección Científica Prehistórica N° 98).
- Gibson, G. R. (1990). Physiology and ecology of the sulphate-reducing bacteria. *Journal of Applied Bacteriology*. 69(6), 769-797.
- Gómez, M. J. L., Blancas, A. G., Constanzo, C. E. y Cervantes, S. A. (2014). Análisis de calidad de aguas naturales y residuales con aplicación a la microescala. FES Zaragoza. UNAM. México. 53, 62, 67-69, 75.
- Grotzinger, J.P., and Knoll, A.H. (1999). Stromatolites in Precambrian carbonates: evolutionary mileposts or environmental dipsticks? *Annu Rev Earth Planet Sci* 27, 313–358.
- Guan, J., Xia, L. P., Wang, L. Y., Liu, J. F., Gu, J. D., y Mu, B. Z. (2013). Diversity and distribution of sulfate-reducing bacteria in four petroleum reservoirs detected by using 16S rRNA and *dsrAB* genes. *International Biodeterioration y Biodegradation*, 76, 58-66.
- Guan, J., Zhang, B. L., Mbadinga, S. M., Liu, J. F., Gu, J. D., y Mu, B. Z. (2014). Functional genes (*dsr*) approach reveals similar sulphidogenic prokaryotes diversity but different structure in saline waters from corroding high temperature petroleum reservoirs. *Applied microbiology and biotechnology*, 98(4), 1871-1882.
- Guindon, S., y Gascuel, O. (2003). A simple, fast, and accurate algorithm to estimate large phylogenies by maximum likelihood. *Systematic biology*, 52(5), 696-704.
- Hansen, T. A. (1994). Metabolism of sulfate-reducing prokaryotes. *Antonie van Leeuwenhoek*. 66(1-3), 165-185.
- Hernández-Avilés J. S. Macek M. Alcocer J. López B. Merino M. (2010). Prokaryotic picoplankton dynamics in a warm-monomictic saline lake: temporal and spatial variation in structure and composition. *Journal of Plankton Research*. 32, 1301-1314.
- Hernandez-Morales, R. H., Ortega, M. R., Sánchez, J. D., Alvarado, R. y Aguilera, M. S. (2013). Distribución estacional del fitoplancton en un lago cálido monomictico en

- Michoacán, México. *Biológicas Revista de la DES Ciencias Biológico Agropecuarias Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo*. 13(2), 21-28.
- Hubert, C., Voordouw, G., y Mayer, B. (2009). Elucidating microbial processes in nitrate- and sulfate-reducing systems using sulfur and oxygen isotope ratios: the example of oil reservoir souring control. *Geochimica et Cosmochimica Acta*, 73(13), 3864-3879.
- Hutchinson, G. E., y Löffler, H. (1956). The thermal classification of lakes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 42(2), 84-86.
- Karnachuk, O. V., Pimenov, N. V., Yusupov, S. K., Frank, Y. A., Puhakka, Y. A. y Ivanov, M. V. (2006). Distribution, diversity, and activity of sulfate-reducing bacteria in the water column in Gek-Gel Lake, *Azerbaijan Microbiology*. 75(1), 82-89.
- Kaźmierczak, J., Kempe, S., Kremer, B., López-García, P., Moreira, D., y Tavera, R. (2011). Hydrochemistry and microbialites of the alkaline crater lake Alchichica, Mexico. *Facies*, 57(4), 543-570.
- Laval, B., Cady, S.L., Pollack, J.C., McKay, C.P., Bird, J.S., Grotzinger, J.P., et al. (2000). Modern freshwater microbialite analogues for ancient dendritic reef structures. *Nature* 407, 626–629.
- LeGall, J., y Fauque, G. (1988). Dissimilatory reduction of sulfur compounds, in: *Biology of Anaerobic Microorganisms*, Chapter 11 (A.J.B. Zehnder, ed.), John Wiley and Sons, Inc., New York, pp. 587–639.
- Le Gall, J., y Xavier, A. V. (1996). Anaerobes response to oxygen: the sulfate-reducing bacteria. *Anaerobe*, 2(1), 1-9.
- Leloup, J., Fossing, H., Kohls, K., Holmkvist, L., Borowski, C., y Jørgensen, B.B. (2006). Sulfate-reducing bacteria in marine sediment (Aarhus Bay, Denmark): Abundance and diversity related to geochemical zonation. *Environmental Microbiology* 11, 1278–1291.
- Leloup, J., Loy, A., Knab, N. J., Borowski, C., Wagner, M., y Jørgensen, B. B. (2007). Diversity and abundance of sulfate-reducing microorganisms in the sulfate and methane zones of a marine sediment, Black Sea. *Environmental Microbiology*, 9(1), 131-142.
- Lever, M. A. (2012). Acetogenesis in the energy-starved deep biosphere: a paradox? *Front. Microbiol.* 2, 284.
- Loy, A., Duller, S., y Wagner, M. (2008). Evolution and ecology of microbes dissimilating sulfur compounds: insights from siroheme sulfite reductases. *Microbial sulfur metabolism*, 46-59.
- Lugo, A., Alcocer, J., del Rosario M., y Escobar, E. (1998). Littoral protozoan assemblages from two Mexican hyposaline lakes. *Hydrobiologia*, 381(1), 9-13.
- Macek, M., Vilaclara, G., Lugo, A. y Alcocer, J. (2007). Lago de Atexcac. 199-201 en: De la Lanza Espino, G. Las aguas interiores de México: conceptos y caso. AGTEditor. México. 695.
- Macek, M., Peštová, D., y Pérez, M. E. M. (2017). Seasonal and spatial dynamics of a ciliate assemblage in a warm-monomictic Lake Alchichica (Puebla, Mexico). *Hidrobiologica*, 18(1), 25-35.
- Magoč, T., y Salzberg, S. L. (2011). FLASH: fast length adjustment of short reads to improve genome assemblies. *Bioinformatics*, 27(21), 2957-2963.
- Mancilla, O. (2012). Índices de salinidad y calidad de las aguas superficiales. Tesis para obtener el título de Doctor en Ciencias. Postgrado de Hidrociencias. Colegio de Postgraduados. México.

- Mancilla-Villa, O. R., Bautista-Olivas, A. L., Ortega-Escobar, H. M., Ramírez-Ayala, C., Reyes-Ortigoza, A.L., Flores-Magdaleno, H., González-Eguiarte, D.R., y Guevara-Gutiérrez, R. D. (2014). Contenido de boro en el agua superficial de Puebla, Tlaxcala y Veracruz. *Tecnología y ciencias del agua*. 5(5), 97-109.
- Mayén-Estrada, R., Reyes-Santos, M. y Aguilar-Aguilar, R. (2014). Biodiversidad de Ciliophora en México. *Revista mexicana de biodiversidad*. 85, 34-43.
- Minz, D., Flax, J. L., Green, S. J., Muyzer, G., Cohen, Y., Wagner, M. y Stahl, D. A. (1999). Diversity of sulfate-reducing bacteria in oxic and anoxic regions of a microbial mat characterized by comparative analysis of dissimilatory sulfite reductase genes. *Applied and Environmental Microbiology*. 65(10), 4666-4671.
- Mogensen, G. L., Kjeldsen, K. U. y Ingvorsen, K. (2005). *Desulfovibrio aerotolerans* sp.nov., an oxygen tolerant sulphate-reducing bacterium isolated from activated sludge. *Anaerobe*. 11(6), 339-349.
- Muyzer, G. y Stams, A. J. (2008). The ecology and biotechnology of sulphate-reducing bacteria. *Nature Reviews Microbiology*. 6(6), 441-454.
- Oliva, M. G., Lugo, A., Alcocer, J., Peralta, L. y Del Rosario Sánchez, M. (2001). Phytoplankton dynamics in a deep, tropical, hyposaline lake. *Hydrobiologia*. 466(1-3), 299-306.
- Oliveira, T. F., Vornrhein, C., Matias, P. M., Venceslau, S. S., Pereira, I. A., y Archer, M. (2008). The crystal structure of *Desulfovibrio vulgaris* dissimilatory sulfite reductase bound to DsrC provides novel insights into the mechanism of sulfate respiration. *Journal of Biological Chemistry*, 283(49), 34141-34149.
- Patron, N. J., Durnford, D. G., y Kopriva, S. (2008). Sulfate assimilation in eukaryotes: fusions, relocations and lateral transfers. *BMC evolutionary biology*, 8(1), 39.
- Perissinotto, R., Bornman, T.G., Steyn, R.P., Miranda, N.F., Dorrington, R.A., Matcher, G.F., et al. (2014). Tufa stromatolite ecosystems on the South African south coast. *S Afr J Sci* 110, 1–8
- Rabus R, Hansen TA y Widdel F (2013). Dissimilatory Sulfate- and Sulfur-Reducing Prokaryotes. The Prokaryotes: Prokaryotic Physiology and Biochemistry, (Rosenberg E, DeLong EF, Lory S, Stackebrandt E y Thompson F, eds.), pp. 309-404. Springer Berlin Heidelberg, Berlin, Heidelberg.
- Reid, R.P., Visscher, P.T., Decho, A.W., Stolz, J.F., Bebout, B.M., Dupraz, C., et al. (2000). The role of microbes in accretion, lamination and early lithification of modern marine stromatolites. *Nature* 406, 989–992.
- Reid, R.P., James, N.P., Macintyre, I.G., and Dupraz, C.P. (2003). Shark Bay stromatolites: microfabrics and reinterpretation of origins. *FACIES* 49, 299–324.
- Ruvindy, R., White III, R. A., Neilan, B. A., y Burns, B. P. (2016). Unravelling core microbial metabolisms in the hypersaline microbial mats of Shark Bay using high-throughput metagenomics. *The ISME journal*, 10(1), 183.
- Santos, F., Pena, A., Nogales, B., Soria-Soria, E., Del Cura, M.A., Gonzalez-Martin, J.A., and Anton, J. (2010). Bacterial diversity in dry modern freshwater stromatolites from Ruidera Pools Natural Park, Spain. *Syst Appl Microbiol* 33, 209–221.
- Sass, H., Cypionka, H. y Babenzien, H. D. (1997). Vertical distribution of sulfate-reducing bacteria at the oxic-anoxic interface in sediments of the oligotrophic Lake Stechlin. *FEMS Microbiology Ecology*. 22(3), 245-255.

- Sass, H., Wieringa, E., Cypionka, H., Babenzien, H. D. y Overmann, J. (1998). High genetic and physiological diversity of sulfate-reducing bacteria isolated from an oligotrophic lake sediment. *Archives of microbiology*. 170(4): 243-251.
- Schloss, P. D., Westcott, S. L., Ryabin, T., Hall, J. R., Hartmann, M., Hollister, E. B., y Sahl, J. W. (2009). Introducing mothur: open-source, platform-independent, community-supported software for describing and comparing microbial communities. *Applied and environmental microbiology*, 75(23): 7537-7541.
- Schneider, D., Arp, G., Reimer, A., Reitner, J., y Daniel, R. (2013). Phylogenetic analysis of a microbialite-forming microbial mat from a hypersaline lake of the Kiritimati atoll, Central Pacific. *PLoS ONE* 8, e66662.
- Sievert, S. M., Kiene, R. P. y Schultz-Vogt, H. N. (2007). The sulfur cycle. *Oceanography*. 20(2), 117-123.
- Sigalevich, P. y Cohen, Y. (2000). Oxygen-Dependent Growth of the Sulfate-Reducing Bacterium *Desulfovibrio oxyclinae* in Coculture with *Marinobacter* sp. Strain MB in an Aerated Sulfate-Depleted Chemostat. *Applied and environmental microbiology*. 66(11), 5019-5023.
- Sorokin, D. Y., Kuenen, J. G. y Muyzer, G. (2011). The microbial sulfur cycle at extremely haloalkaline conditions of soda lakes. *Frontiers in Microbiology*. 2(44), 1-16.
- Sorokin, D. Y., Tourova, T. P., Kolganova, T. V., Detkova, E. N., Galinski, E. A. y Muyzer, G. (2011). Culturable diversity of lithotrophic haloalkaliphilic sulfate-reducing bacteria in soda lakes and the description of *Desulfonatronum thioautotrophicum* sp. nov., *Desulfonatronum thiosulfatophilum* sp. nov., *Desulfonatronovibrio thiodismutans* sp. nov., and *Desulfonatronovibrio magnus* sp. nov. *Extremophiles*. 15(3), 391-401.
- Sorokin, D. Y., Tourova, T. P., Panteleeva, A. N. y Muyzer, G. (2012). *Desulfonatronobacter acidivorans* gen. nov., sp. nov. and *Desulfobulbus alkaliphilus* sp. nov., haloalkaliphilic heterotrophic sulfate-reducing bacteria from soda lakes. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*. 62(Pt 9), 2107-2113.
- Sorokin, D. Y., Berben, T., Melton, E. D., Overmars, L., Vavourakis, C. D. y Muyzer, G. (2014). Microbial diversity and biogeochemical cycling in soda lakes. *Extremophiles*. 18(5), 791-809.
- Tavera, R., y Komárek, J. (1996). Cyanoprokaryotes in the volcanic lake of Alchichica, Puebla State, Mexico. *Arch. Hydrobiol. (Suppl.)(Algol. Stud.)*, 117, 511-538.
- Teske, A., Ramsing, N. B., Habicht, K., Fukui, M., Küver, J., Jørgensen, B. B. y Cohen, Y. (1998). Sulfate-reducing bacteria and their activities in cyanobacterial mats of Solar Lake (Sinai, Egypt). *Applied and environmental microbiology*. 64(8), 2943-2951.
- Valdespino-Castillo, P. M., Alcántara-Hernández, R. J., Alcocer, J., Merino-Ibarra, M., Macek, M., y Falcón, L. I. (2014). Alkaline phosphatases in microbialites and bacterioplankton from Alchichica soda lake, Mexico. *FEMS microbiology ecology*, 90(2), 504-519.
- Vilaclara, G., Chávez, M., Lugo, A., y González, H. (1993). Comparative description of crater-lakes basic chemistry in Puebla State, Mexico. *Proceedings-International Association of Theoretical and Applied Limnology*, 25, 435-435.
- Wagner, M., Roger, A. J., Flax, J. L., Brusseau, G. A., y Stahl, D. A. (1998). Phylogeny of dissimilatory sulfite reductases supports an early origin of sulfate respiration. *Journal of bacteriology*, 180(11), 2975-2982.

- Wang, Q., Garrity, G. M., Tiedje, J. M., y Cole, J. R. (2007). Naive Bayesian classifier for rapid assignment of rRNA sequences into the new bacterial taxonomy. *Applied and environmental microbiology*, 73(16), 5261-5267.
- Wasmund, K., Mußmann, M., y Loy, A. (2017). The life sulfuric: Microbial ecology of sulfur cycling in marine sediments. *Environmental Microbiology Reports*.
- Wong, H. L., Smith, D. L., Visscher, P. T., y Burns, B. P. (2015). Niche differentiation of bacterial communities at a millimeter scale in Shark Bay microbial mats. *Scientific reports*, 5.
- Wong, H. L., Visscher, P. T., White III, R. A., Smith, D. L., Patterson, M. M., y Burns, B. P. (2017). Dynamics of archaea at fine spatial scales in Shark Bay mat microbiomes. *Scientific Reports*, 7.
- Wright, D. T. (1999). The role of sulphate-reducing bacteria and cyanobacteria in dolomite formation in distal ephemeral lakes of the Coorong region, South Australia. *Sedimentary Geology*. 126(1), 147-157.
- Zamora O, Montaña J., Galindo V., Siebe C., y Prado B., (2016). Determinación simultánea de cationes mayoritarios en muestras de agua residual por medio de cromatografía de iones con detección conductimétrica. *Revista internacional de contaminación ambiental* 32, 293-301
- Zverlov, V., Klein, M., Lückner, S., Friedrich, M. W., Kellermann, J., Stahl, D. A., y Wagner, M. (2005). Lateral gene transfer of dissimilatory (bi) sulfite reductase revisited. *Journal of Bacteriology*, 187(6), 2203-2208.

Anexos

A. Anexo A. Difractogramas de las microbialitas en estudio.

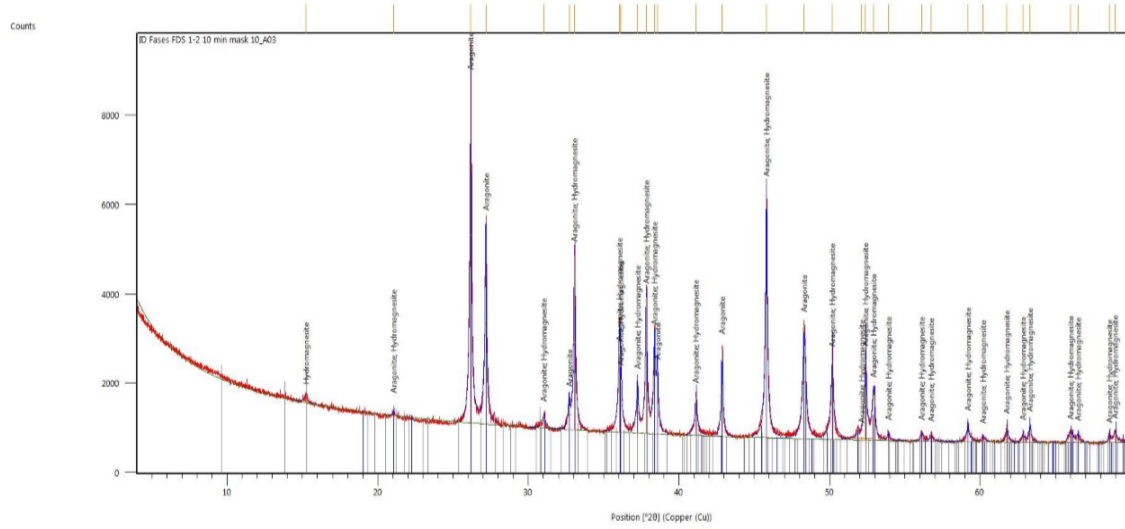


Figura A1. Difractograma de microbialita esponjosa (A11) tomada de la zona litoral del lago Alchichica (Marzo 2016).

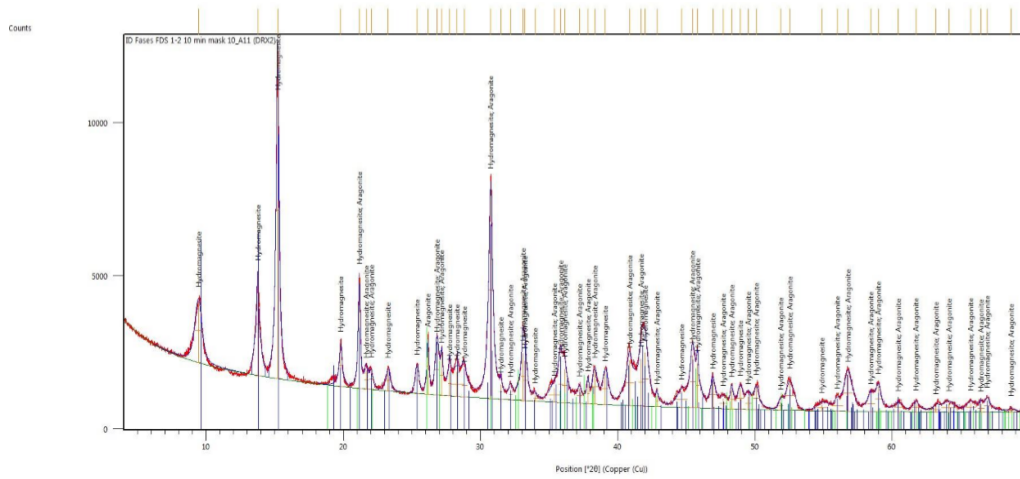


Figura A2. Difractograma de microbialita esponjosa (A11) tomada de la zona litoral del lago Alchichica (Marzo 2016).

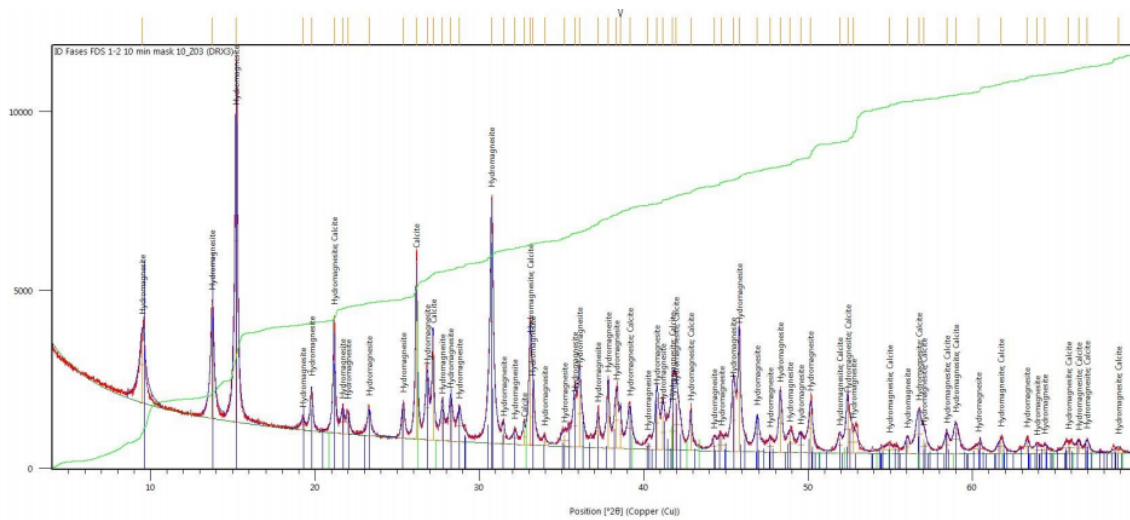


Figura A3. Difractograma de microbialita de 3m de profundidad (z3) tomada del lago Alchichica (Marzo 2016).

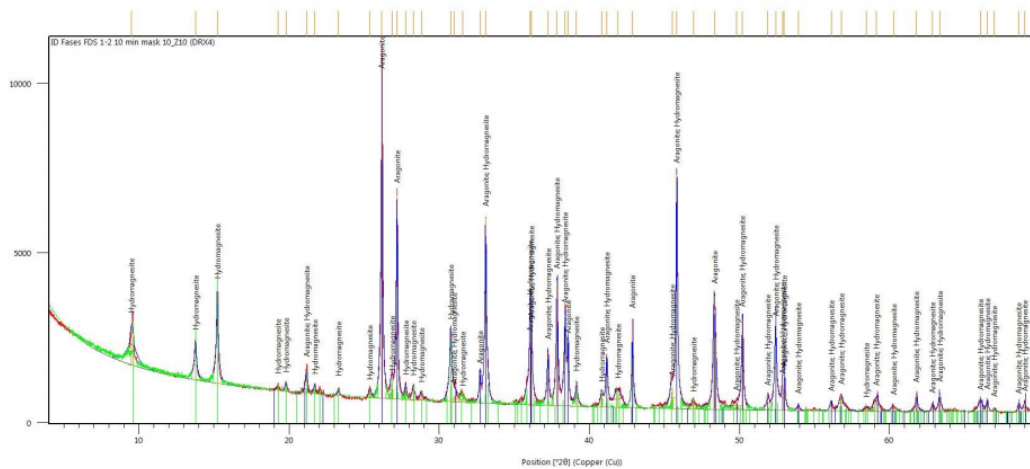


Figura A4 Difractograma de microbialita de 10m de profundidad (z10) tomada del lago Alchichica (Marzo 2016).

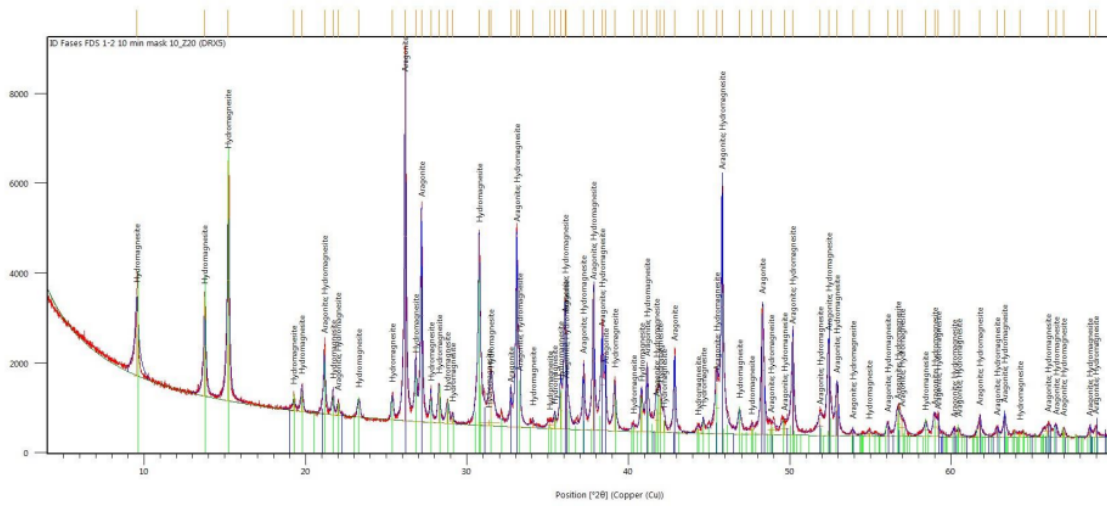


Figura A5. Difractograma de microbialita de 20m de profundidad (z20) tomada del lago Alchichica (Marzo 2016).

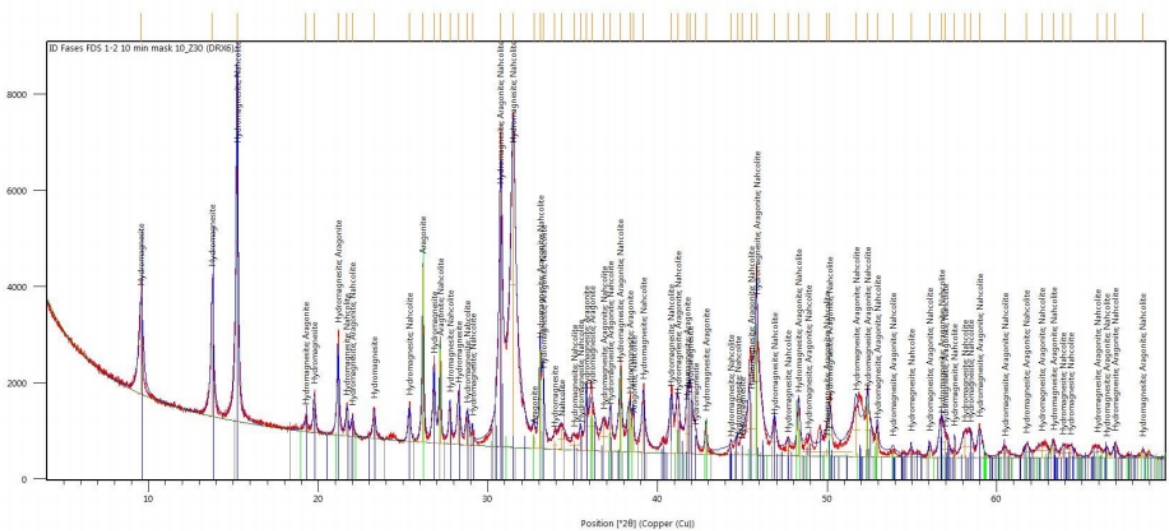


Figura A6. Difractograma de microbialita de 20m de profundidad (z20) tomada del lago Alchichica (Marzo 2016).

B. Anexo B. Perfil de pH y ORP en la vertical en Septiembre 2016

■

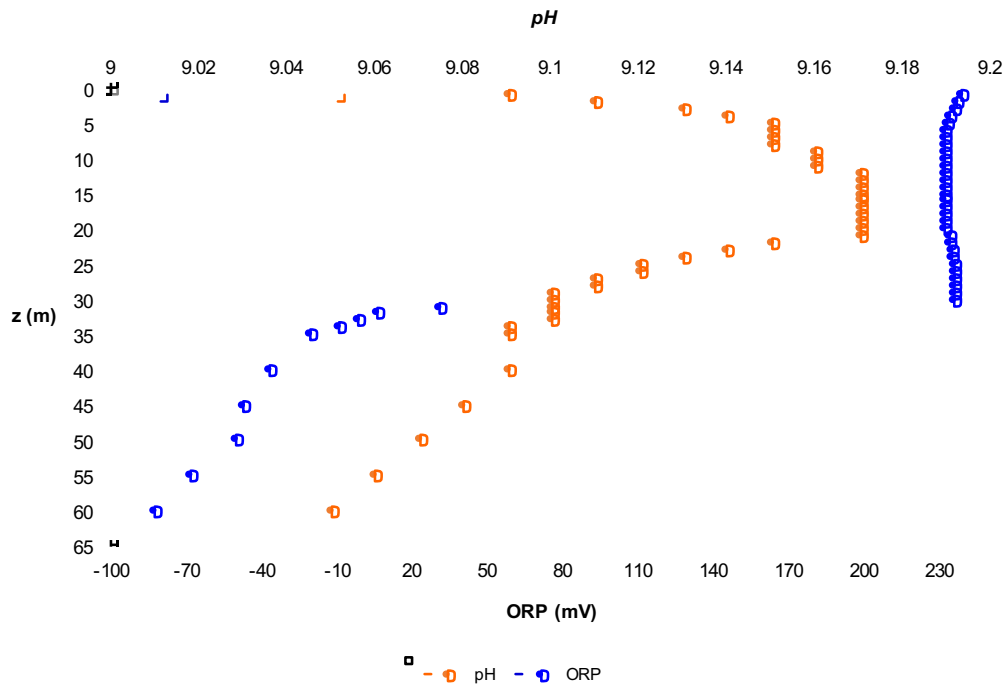


Figura B1. Perfiles verticales de pH y ORP en la columna de agua, septiembre 2016.

C. Anexo C. Concentración de iones mayores en la vertical.

Tabla C1. Concentración de CO_3^{2-} y HCO_3^- obtenidos por el método de indicadores en la columna de agua y agua circundante a microbialitas de litoral (ML), en circulación.

Periodo de mezcla					
z (m)	pH	Alcalinidad meq l ⁻¹			Cromatografía de Iones (meq l ⁻¹)
		CO_3^{2-}	HCO_3^-	Total	HCO_3^-
4	9	29.0	31.6	60.6	26.3
6	9.1	28.6	31.2	60.4	ND*
13	9.1	29.5	31.2	60.7	26.2
20	9.1	27.9	33.2	61.2	NC
30	9.1	28.1	32.8	61.0	22.4
50	9.1	37.6	19.2	56.8	18.2
61	9	27.9	32.7	60.7	18.3
Alchi 2 (ML)	8.96	28.4	29.8	58.2	26.1
Alchi 3 (ML)	8.87	28.2	30.2	58.3	24.8
Alchi 5 (ML)	8.93	28.6	29.5	58.2	25.4

Tabla C2. Concentración de CO_3^{2-} y HCO_3^- obtenidos por el método de indicadores en la columna de agua, y circundante a microbialitas de litoral (ML), en estratificación.

Periodo de estratificación					
z (m)	pH	Alcalinidad meq l ⁻¹			Cromatografía de Iones (mg l ⁻¹)
		CO_3^{2-}	HCO_3^-	Total	HCO_3^-
1	9.09	42.4	22.4	64.7	18.3
8	9.15	43.0	22.8	65.8	16.8
14	9.17	43.9	20.6	64.5	19.0
18	9.17	4.5	19.0	23.5	NC
21	9.17	42.6	22.9	65.4	19.2
22	9.15	47.1	16.5	63.6	19.1
30	9.1	41.3	26.3	67.6	19.0
45	9.08	53.6	9.5	63.0	19.5
60	9.05	40.9	26.2	67.2	19.3
10m (ML)	NC	45.4	20.0	65.4	NC
20M (ML)	NC	44.7	19.7	64.4	NC

*En gris y negritas, muestras con posible error metodológico según las tendencias observadas en la determinación de bicarbonato por cromatografía de iones.