



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS**

FACULTAD DE CIENCIAS, UNAM

**ESTUDIO EVOLUTIVO DEL METABOLISMO DE METANOGÉNESIS Y SU RELACIÓN
CON OTROS METABOLISMOS AUTOTRÓFICOS DE FIJACIÓN DE CARBONO**

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

DOCTOR EN CIENCIAS

PRESENTA:

ISRAEL MUÑOZ VELASCO

TUTOR PRINCIPAL DE TESIS

Dr. ARTURO CARLOS II BECERRA BRACHO

FACULTAD DE CIENCIAS, UNAM

COMITÉ TUTOR

Dra. MARÍA COLÍN GARCÍA

INSTITUTO DE GEOLOGÍA, UNAM

Dr. LUIS DAVID ALCARAZ PERAZA

FACULTAD DE CIENCIAS, UNAM

CD. MX., DICIEMBRE, 2020



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



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
RADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

FACULTAD DE CIENCIAS, UNAM

**ESTUDIO EVOLUTIVO DEL METABOLISMO DE METANOGÉNESIS Y SU RELACIÓN
CON OTROS METABOLISMOS AUTOTRÓFICOS DE FIJACIÓN DE CARBONO**

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

DOCTOR EN CIENCIAS

PRESENTA:

ISRAEL MUÑOZ VELASCO

TUTOR PRINCIPAL DE TESIS

Dr. ARTURO CARLOS II BECERRA BRACHO

FACULTAD DE CIENCIAS, UNAM

COMITÉ TUTOR

Dra. MARÍA COLÍN GARCÍA

INSTITUTO DE GEOLOGÍA, UNAM

Dr. LUIS DAVID ALCARAZ PERAZA

FACULTAD DE CIENCIAS, UNAM

MÉXICO, CD. MX. 2020.

COORDINACIÓN DEL POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS
FACULTAD DE CIENCIAS
DIVISIÓN ACADÉMICA DE INVESTIGACIÓN Y POSGRADO
OFICIO FCIE/DAIP/441/2020
ASUNTO: Oficio de Jurado

M. en C. Ivonne Ramírez Wence
Directora General de Administración Escolar, UNAM
Presente.

Me permito informar a usted que en la reunión ordinaria del Subcomité de Biología Experimental y Biomedicina del Posgrado en Ciencias Biológicas, celebrada el día **28 de septiembre de 2020** se aprobó el siguiente jurado para el examen de grado de **DOCTOR EN CIENCIAS** del estudiante **MUÑOZ VELASCO ISRAEL** con número de cuenta **305324690** con la tesis titulada: "**Estudio evolutivo del metabolismo de la metanogénesis y su relación con otros metabolismos autotróficos de fijación de carbono**", realizada bajo la dirección del **DR. ARTURO CARLOS II BECERRA BRACHO**:

Presidente:	DR. ANTONIO EUSEBIO LAZCANO-ARAUJO REYES
Vocal:	DRA. ALICIA NEGRÓN MENDOZA
Secretario:	DR. LUIS DAVID ALCARAZ PERAZA
Suplente:	DR. LUIS JOSÉ DELAYE ARREDONDO
Suplente:	DRA. ROCÍO JETZABEL ALCÁNTARA HERNÁNDEZ

Sin otro particular, me es grato enviarle un cordial saludo.

A T E N T A M E N T E
"POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU"
Cd. Universitaria, Cd. Mx., a 05 de noviembre de 2020

COORDINADOR DEL PROGRAMA



DR. ADOLFO GERARDO NAVARRO SIGÜENZA



COORDINACIÓN DEL POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

Unidad de Posgrado, Edificio D, 1º Piso. Circuito de Posgrados, Ciudad Universitaria
Alcaldía Coyoacán. C. P. 04510 CDMX Tel. (+5255)5623 7002 <http://pbiol.posgrado.unam.mx/>

Agradecimientos Institucionales

Al Posgrado en Ciencias Biológicas, UNAM, por aceptarme en su programa de Doctorado, programa de alta exigencia académica.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) por el apoyo económico otorgado durante la duración de mis estudios de Doctorado (número de CVU 696280, periodo correspondiente del 01 de marzo de 2018 al 28 de febrero de 2022 y corresponde a la convocatoria titulada "Becas Nacional (Tradicional) 2018 - 1").

A DGAPA-UNAM por el apoyo económico otorgado al proyecto PAPIIT-IV100218.

A mi Tutor Principal: El Dr. Arturo Carlos II Becerra Bracho por sus enseñanzas, su amplia experiencia y su exigencia como tutor de mi proyecto doctoral, sus enseñanzas contribuyen enormemente a mi formación académica.

A los miembros de mi Comité Tutor: Dra. María Colín García y Dr. Luis David Alcaraz Peraza por sus observaciones, comentarios, exigencias y amplias sugerencias al trabajo realizado durante los estudios de doctorado.

Agradecimientos a título personal

Al Técnico Académico Dr. Ricardo Hernández Morales por su ayuda técnica, por los programas bioinformáticos realizados y sus comentarios al escrito.

Al Técnico Académico Dr. José Alberto Campillo Balderas por su ayuda técnica y comentarios al escrito.

Agradezco especialmente a los miembros de mi comité evaluador de examen de candidatura, el Dr. Luis David Alcaraz Peraza, la Dra. Alicia Negrón, el Dr. Enrique Merino, la Dra. Luisa Falcón y el Dr. Luis Delaye Arredondo, ya que sus comentarios enriquecieron enormemente uno de los artículos derivado de los estudios de doctorado, sus enseñanzas y críticas perdurarán durante mi vida académica.

Al Dr. Luis Delaye Arredondo y la Dra. Alicia Negrón quienes revisaron el trabajo del ciclo reverso en diferentes fases de avance.

A mi tutore, el Dr. Arturo Becerra, por todas las enseñanzas, por la enorme confianza que depositó en mí, pero sobre todo por compartir su conocimiento y por brindarme su amistad.

A The Very Great Dominus et Magister Emeritus et Invictus, el Dr. Antonio Lazcano, por brindarme su amistad tan grande y por ser tan generoso a la hora de compartir sus conocimientos con todos nosotros.

Al Dr. Juli Peretó, por la gran colaboración que inició con los trabajos de metanogénesis y que ahora continúan con los de ciclo reverso del ácido tricarbóxico, por sus enseñanzas y sobre todo por su gran amistad.

Al Dr. Carlos García-Ferrís, por la colaboración con los escritos derivados del doctorado, así como por sus observaciones y sugerencias a los trabajos escritos de los cuales somos coautores, por su amistad tan sincera.

A los Macacos, siempre estaré agradecido con el grupo de trabajo de Origen de la Vida, siempre exigiendo que los trabajos sean de alta calidad.

A los miembros de mi comité tutor, la Dra. María Colín García y el Dr. Luis David Alcaraz Peraza, por su apoyo incondicional durante los estudios de doctorado, por sus comentarios tan acertados.

Dedicatoria

-A todos aquellos que han contribuido a mi formación académica, la lista es enorme y no me queda más que agradecer de esta manera.

-A mi familia, especialmente a mi madre y hermanos, quienes ciegamente creyeron en mí, hasta cuando yo dudé y no sabía si lo lograría.

-Especialmente a mi padre, a quién me hubiera gustado abrazar fuertemente y decirle lo logré.

Índice

II	Resúmen-----	Pág. 1
III	Abstract-----	Pág. 2
IV	Introducción-----	Pág. 3
	IV.1 Metabolismo -----	Pág. 3
	IV.2 Evolución metabólica-----	Pág. 4
	IV.3 Metabolismos autotróficos de fijación de carbono-----	Pág. 7
	IV.4 Metanogénesis-----	Pág. 8
	IV.5 Evolución de la metanogénesis-----	Pág. 10
	IV.6 Planteamiento del problema-----	Pág. 12
	IV.7 Introducción a la parte metodológica-----	Pág. 12
V	Artículo requisito-----	Pág. 15
VI	Artículos aceptados o publicados y/o manuscritos de artículos donde el alumno es autor o coautor-----	Pág. 29
VII	Discusión general y conclusiones -----	Pág. 29
	VII.1 Qué se sabe después de nuestro trabajo-----	Pág. 29
	VII.2 Oxidación de metano-----	Pág. 30
	VII.3 Producción de metano fuera del dominio Archaea-----	Pág. 32
	VII.4 Otras rutas autotróficas de fijación de carbono. El caso del ciclo reverso del ácido tricarbóxico o rTCAXIII-----	Pág. 32
	VII.5 LUCA y los metabolismos autotróficos de fijación de carbono-----	Pág. 41
	VII.6 El futuro de las investigaciones sobre el origen y evolución de metabolismos autotróficos de fijación de carbono-----	Pág. 43
VIII.	Anexos o material suplementario-----	Pág. 44
	VIII.1 Artículos enviados para su publicación, en donde el alumno es coautor-----	Pág. 44
IX	Referencias bibliográficas-----	Pág. 74

I. Lista de figuras y tablas

Figuras

Figura 1. Evolución del metabolismo I -----	Pág. 5
Figura 2. Evolución del metabolismo II -----	Pág. 6
Figura 3. Hipótesis sobre el origen de la metanogénesis -----	Pág. 11
Figura 4. Historia evolutiva de las MCR -----	Pág. 33
Figura 5. Rutas autotróficas de fijación de carbono-----	Pág. 35
Figura 6. Ciclo reverso del ácido tricarbóxico -----	Pág. 36
Figura 7. Distribución de los metabolismos autotróficos de fijación de carbono -----	Pág. 38
Figura 8. Historia evolutiva enzimas del ciclo reverso del ácido tricarbóxico -----	Pág. 39
Figura 9. Red filogenética -----	Pág. 40
Figura 10. Evolución ACL -----	Pág. 41

Tablas

Tabla 1. Organismos capaces de realizar metanogénesis -----	Pág. 9
Tabla 2. Organismos capaces de realizar rTCA -----	Pág. 37

II. Resumen

El surgimiento y evolución de rutas metabólicas es un tema de gran interés en estudios sobre el origen de la vida. Algunos de los metabolismos propuestos, como los primeros en surgir, son los metabolismos autotróficos de fijación de carbono, de los cuales sabemos que existen siete, 1) el ciclo reductor del ácido tricarbóxico (rTCA, por sus siglas en inglés o ciclo de Arnon-Buchanan), 2) el biciclo del 3-hidroxipropionato, 3) el ciclo reductor de las pentosas fosfato (Calvin-Benson-Bassham), 4) la ruta reductora de la acetil-CoA (Wood-Ljungdahl o WL), 5) el ciclo del 3-hidroxipropionato/4-hidroxibutirato, 6) el ciclo del dicarboxilato-4-hidroxibutirato y 7) la ruta reductora de la glicina. De esas siete distintas rutas metabólicas, la ruta reductora de la Acetil CoA o ruta de Wood-Ljungdahl (WL), es la única que se encuentra distribuida en organismos pertenecientes tanto al dominio Bacteria (en bacterias acetogénicas) como al dominio Archaea (en arqueas metanogénicas), es simple y lineal (en cuanto a número de reacciones) y junto con la ruta reductora del ácido tricarbóxico, ha sido propuesta como una de las rutas más antiguas y las primeras en aparecer, pudiendo estar presentes, en el Último Ancestro Común de todos los organismos (LCA, por sus siglas en inglés).

En este trabajo se analizó la historia evolutiva de algunas de las enzimas clave de las rutas de WL y del rTCA, con la finalidad de saber si estos metabolismos formaban parte del repertorio metabólico del último ancestro en común. En el caso de la ruta de WL, los resultados muestran que dichas enzimas tienen una trayectoria evolutiva en la que ha habido múltiples transferencias y posibles pérdidas en linajes no metanógenos: por lo que se puede sugerir que la ruta de WL no pudo estar presente, en su totalidad, en el LCA. Por tanto, ni la metanogénesis, ni la acetogénesis pudieron estar presentes en el LCA. En el caso del rTCA, los resultados aún son preliminares, pero la evolución de las enzimas clave de esta ruta metabólica podría demostrar que estudios previos pueden estar equivocados en algunas inferencias y por tanto, que es difícil pensar que el rTCA dio origen al ciclo de Krebs.

III. Abstract

The emergence and evolution of metabolic pathways is a topic of great interest in studies on the origins of life. Some of the early metabolisms proposed, are the autotrophic carbon fixation metabolisms, of which we know there are seven, 1) the reducing tricarboxylic acid cycle (rTCA cycle or Arnon-Buchanan cycle), 2) the 3-hydroxypropionate bicycle, 3) the pentose phosphate reducing cycle (Calvin-Benson-Bassham cycle), 4) the acetyl-CoA reducing pathway (Wood-Ljungdahl or WL for short), 5) the 3-hydroxypropionate/4-hydroxybutyrate cycle, 6) the dicarboxylate-4-hydroxybutyrate cycle, and 7) the reductive glycine pathway. Of these seven different metabolic pathways, the Acetyl CoA reducing pathway, is the only one that is distributed in organisms belonging to both, the Bacteria (in acetogenic bacteria) and the Archaea (in methanogenic archaea) domains, this metabolism is simple and linear (in terms of number of reactions) and together with the rTCA cycle, it has been proposed as the oldest metabolisms and as the first to appear, and may be present, in the Last Common Ancestor of all organisms (LCA for short).

In this work, the evolutionary history of some of the key enzymes of the WL and rTCA pathways was analysed in order to know if these metabolisms were part of the LCA's metabolic repertoire. The WL pathway results indicate that these enzymes have an evolutionary trajectory in which there have been multiple horizontal transfers and possible losses in non-methanogenic lineages. So it can be suggested that the WL pathway could not be present as a whole, in the LCA. Therefore, neither methanogenesis nor acetogenesis could be present in the LCA. In the case of the rTCA cycle, the results are still preliminary, but they show that the evolution of the key enzymes of this metabolic pathway shows us that previous studies may be wrong in some inferences, and that it is difficult to think that the rTCA cycle gave rise to the Krebs cycle.

IV. Introducción

IV.1 Metabolismo

Se puede definir al metabolismo, de manera muy amplia, a la suma de todos los procesos químicos (bioquímicos) que pueden producir o consumir energía en un organismo vivo (De Berardinis y Thompson 2012). Se han descrito una enorme cantidad de procesos metabólicos que conforman una gran red de reacciones bioquímicas interconectadas y que por sí solas son capaces de explicar el flujo energético dentro de un ambiente celular (Kanehisa 2019). Estas reacciones tienen lugar tanto en los componentes celulares como los subcelulares de todos los seres vivos. El *¿cómo han surgido y cómo han evolucionado* los distintos procesos metabólicos?, son preguntas que se encuentran muy vigentes y que pueden ser abordadas desde diferentes perspectivas, con diferentes enfoques metodológicos (Scossa y Fernie, 2020). Tratando de responder las preguntas antes mencionadas, toman gran importancia aquellos metabolismos que son indispensables para que un ser vivo subsista, o bien, aquellas reacciones bioquímicas que forman parte del llamado metabolismo central. El metabolismo puede ser dividido, a grandes rasgos, en 1) reacciones que forman moléculas más complejas (en cuanto a estructura química se refiere) a partir de otras más simples (anabolismo); 2) reacciones que degradan moléculas y que liberan energía durante dicho proceso (catabolismo), y finalmente 3) las que ayudan a eliminar (rutas de eliminación de residuos) los productos de desecho de las dos anteriores (De Berardinis y Thompson 2012).

De todas las rutas metabólicas que conocemos (<https://metacyc.org/>), aquellas que se piensan que fueron las primeras en surgir, son algunas de las más estudiadas en años recientes (Borrel *et al.*, 2016; Williams *et al.*, 2017; Preiner *et al.*, 2019; Preiner *et al.*, 2020; Xavier *et al.*, 2020). Entre todos los tipos de rutas metabólicas, destacan las que tienen la capacidad de fijar carbono celular, a partir de moléculas inorgánicas, y con ello formar moléculas más complejas, a la vez de que se obtiene energía, todo en un mismo proceso. Éstas son las llamadas rutas metabólicas *autotróficas de fijación de carbono* (Berg *et al.*, 2010; Hügler y Sievert 2011), y algunas son relativamente simples, en cuanto a número de reacciones (p. ej. la ruta de Wood-Ljungdahl). Recientemente, se ha generado evidencia experimental, en donde por medio de simulaciones se logra la formación de distintos compuestos (p. ej. formato y acetato) análogos a los formados en algunas rutas metabólicas de fijación de carbono (Preiner *et al.*, 2020). Además, hay estudios en los que se logra la formación de compuestos intermediarios de dichos metabolismos, sin la intervención de ninguna enzima catalizadora de las reacciones químicas (Keller *et al.*, 2014; 2016; 2017; Messner *et al.*, 2017; Muchowska *et al.*, 2017;

2019; 2019). Otro tipo de estudios tratan de simular las condiciones ambientales en las que se piensa pudieron surgir los primeros seres vivos (p. ej. manantiales, fuentes y reactores hidrotermales) (White *et al.*, 2020) y unos cuantos buscan una aproximación desde una perspectiva de genómica comparada y evolutiva, con la finalidad de tratar de explicar la antigüedad de estos diferentes metabolismos autotróficos (Berg *et al.*, 2010; Williams *et al.*, 2017; Muñoz-Velasco *et al.*, 2019, Borrel *et al.*, 2019). En el campo de origen de la vida, estas aproximaciones se diferencian de acuerdo con el enfoque que se toma. Dicho enfoque, puede ser desde una perspectiva de simulación de evolución química en ambientes prebióticos (aproximaciones **bottom-up**) o bien, desde un enfoque evolutivo basado en el análisis genómico comparado (aproximaciones **top-down**), en donde se analizan aquellas características compartidas en todos los seres vivos conocidos (Peters y Williams 2012).

IV.2 Evolución metabólica

En cuanto a la evolución de los distintos metabolismos se tienen diversas teorías de cómo éstos pudieron haber surgido y cómo pudieron pasar posteriormente a la descendencia (con modificaciones). Entre estas ideas destacan la de la **evolución retrógrada** (Figura 1a), en donde Horowitz (Horowitz 1945, 1965) propone que las enzimas biosintéticas emergen por duplicación génica y que las primeras enzimas en surgir son las que catalizan las reacciones finales de una ruta metabólica. Mientras que, los compuestos más simples y los primeros en ser utilizados en esta ruta se acaban en la sopa primordial, por lo que, según este modelo, comienzan a surgir enzimas que catalizan reacciones para suplir la falta de dichos compuestos químicos más sencillos. De este modo las primeras enzimas en surgir fueron las que catalizan las reacciones finales de una ruta metabólica y las últimas son aquellas que catalizan las primeras reacciones de la misma ruta. Por otro lado, la **hipótesis de Granick** (Granick 1957) propone lo contrario a la hipótesis retrógrada. En esta hipótesis (Figura 1b), las primeras enzimas en surgir son las que catalizan las reacciones iniciales de una ruta metabólica, conforme avanza la ruta metabólica surgen nuevas enzimas que catalizan las reacciones necesarias para avanzar en dicha ruta, de modo que los compuestos más simples preceden, evolutivamente hablando, a aquellos compuestos más complejos, así como las respectivas enzimas que catalizan las interconversiones bioquímicas.

Una de las hipótesis más aceptadas y con más evidencia es la **hipótesis de evolución de metabolismos tipo patchwork** (Ycas 1974; Jensen 1976), que propone que las rutas metabólicas surgen a partir del reclutamiento de enzimas preexistentes (primordiales) que tienen la capacidad de sintetizar varias reacciones metabólicas, es decir, son poco específicas y el surgimiento de nuevas

rutas se da por medio de duplicación de dichas enzimas y su posterior neo funcionalización (Figura 2a).

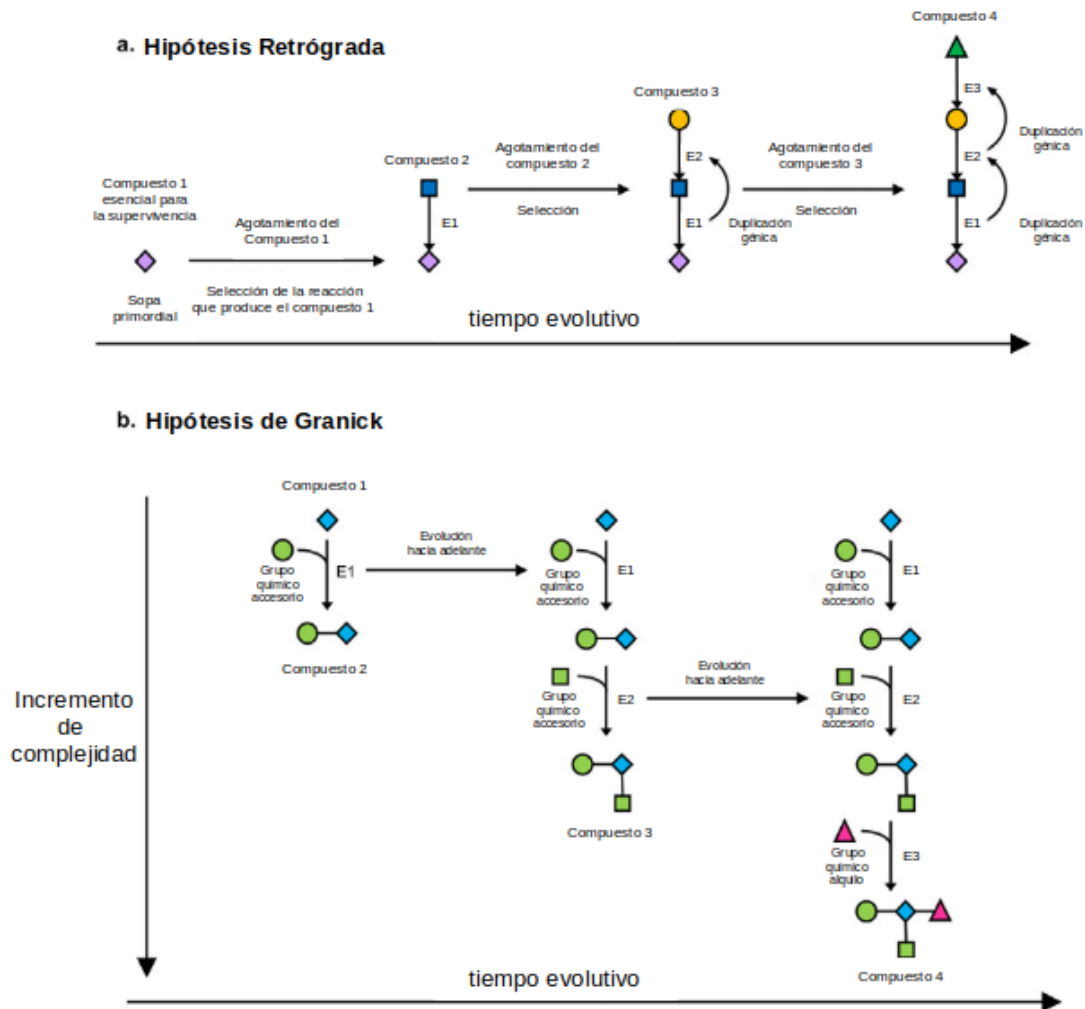


Figura 1. A. Hipótesis de evolución metabólica propuesta por Horowitz (evolución retrógrada), el surgimiento de nuevas enzimas se da debido a la escasez de compuestos sencillos, por lo que las enzimas más recientes son las que sintetizan las primeras reacciones en una ruta metabólica. B. Evolución del metabolismo propuesta por Granick, en la cual las enzimas más recientes en la historia evolutiva, corresponden a las que sintetizan los pasos finales de una ruta metabólica (modificada de Scossa y Fernie, 2020).

Por otro lado, la **hipótesis de coraza** (Figura 2b), propuesta por Morowitz (Morowitz 1999), propone que la primera ruta metabólica en surgir, para la fijación de C, fue la ruta reductiva del ácido tricarbóxico; la cual según su idea, evolucionó sin la necesidad de enzimas. Adicionalmente, se propone que las reacciones que se dieron en el mundo de la química prebiótica se mantienen de manera “grabada” en los metabolismos ahora existentes. También asume que posteriormente se

formaron metabolismos como la glucólisis, la biosíntesis de ácidos grasos y el ciclo del ácido tricarbóxico y que a partir de estos se formaron en un segundo nivel metabolismos relacionados como la síntesis de aminoácidos y en un tercer nivel la síntesis de purinas, pirimidinas y otros cofactores (Fani y Fondi, 2009; Fani 2012; Scossa y Fernie, 2020).

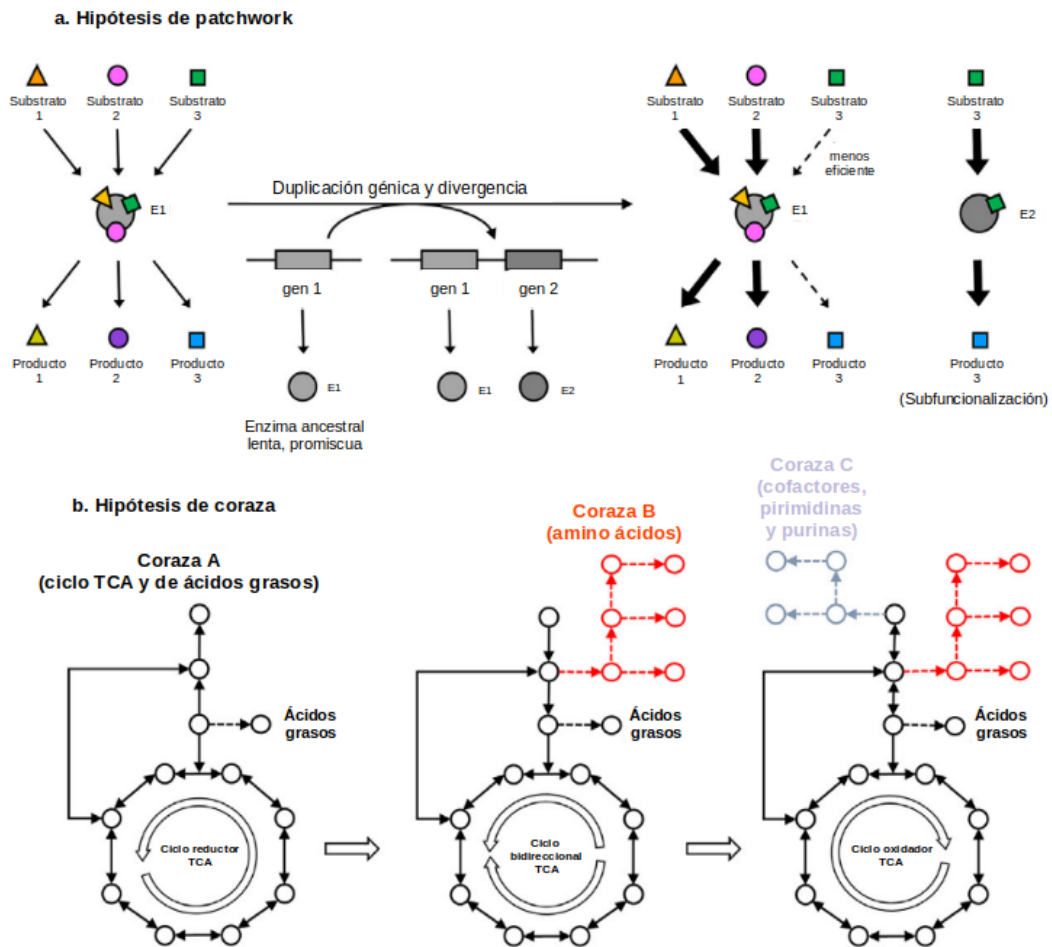


Figura 2. A. Hipótesis de evolución metabólica tipo patchwork, el surgimiento de nuevas enzimas se da debido a eventos de duplicación génica y posterior divergencia, así como eventos de neofuncionalización. B. Evolución del metabolismo tipo coraza, en la cual las rutas metabólicas se ensamblan alrededor de rutas preexistentes, usándolas como “andamio”, en esta hipótesis el ciclo de los ácidos tricarbóxicos juega un papel primordial (modificada de Scossa y Fernie, 2020).

Finalmente **la teoría semi enzimática** propuesta por Lazcano y Miller en 1999, guarda similitudes con la propuesta de Horowitz, pero estos autores toman en cuenta el uso de compuestos que se forman como resultado de rutas preexistentes, o bien el uso de compuestos formados de manera prebiótica y tomados del medio ambiente e incorporados a las primeras rutas metabólicas. Esta hipótesis propone que las primeras enzimas se originan por medio de duplicaciones génicas, lo cual

pudo haber dado origen a enzimas con actividades catalíticas muy similares (por ejemplo las deshidrogenasas de alanina y valina) y que este proceso bien podría estar operando de manera muy similar en el desarrollo de algunas rutas degradativas, como lo son las de degradación de toxinas y contaminantes (Lazcano y Miller 1999).

IV.3 Metabolismos autotróficos de fijación de carbono

A todos los organismos que son capaces de asimilar moléculas de CO₂ inorgánico (o también HCO₃⁻), mediante reacciones de reducción y de convertirlas en compuestos más complejos (p. ej. carbohidratos, proteínas, ácidos grasos, etc.), se les denomina organismos autótrofos (Glueck *et al.*, 2010). Sabemos que, a la fecha, existen siete diferentes rutas de fijación autotróficas de carbón, listadas a continuación: a) El ciclo reductor (reverso) del ácido tricarboxílico, b) El biciclo del 3-hidroxiacetato, c) El ciclo del 3-hidroxiacetato/4-hidroxiacetato, d) El ciclo dicarboxilato/4-hidroxiacetato, e) La ruta reductiva de la Acetil-CoA o ruta de Wood-Ljungdahl, f) El ciclo de Calvin-Benson-Bassham y finalmente, g) La ruta reductora de la glicina, de reciente descubrimiento (Sánchez-Andrea *et al.*, 2020). Se han hecho extensas revisiones bibliográficas (Berg *et al.*, 2010, Hügler y Sievert, 2011, Fuch 2011) de dichas rutas de fijación de carbono y conocemos algunos aspectos como su distribución y posible origen, todos estos metabolismos están presentes en linajes específicos, ya sea en arqueas (Berg *et al.*, 2010) o en bacterias, pero no con representantes de ambos dominios (Hügler y Sievert, 2011).

De todas las rutas autotróficas conocidas, la ruta reductora de la Acetil Coenzima A o ruta de Wood-Ljungdahl es la única ruta que produce energía y fija carbón simultáneamente, es aparentemente simple (en cuanto al número de reacciones enzimáticas necesarias para convertir CO₂ en energía y carbón celular) y tiene la característica de ser completamente lineal, en lugar de una ruta autocatalítica (Peretó 2012), a diferencia de las otras rutas de fijación de carbono autotróficas conocidas (Hügler y Sievert, 2011). También se sabe que es la única ruta autotrófica que se encuentra distribuida en los dominios Bacteria y Arquea (Berg *et al.*, 2010), aunque con variaciones. En bacterias participa en el proceso mejor conocido como homoacetogénesis en donde a partir de hidrógeno y CO₂ se forma acetato (Shin *et al.*, 2016). Mientras que en el dominio Arquea, las que son capaces de sintetizar metano a partir de hidrógeno y CO₂ tienen esta ruta (Borrel *et al.*, 2016), por esas razones se ha propuesto como una de las primeras rutas autotróficas en aparecer en la historia de la vida (Sousa *et al.*, 2013). Por lo que, se ha sugerido que el último ancestro en común de todos los organismos existentes hoy en día (LCA por el acrónimo en inglés Last Common Ancestor) era

capaz de fijar carbón de manera autotrófica a través de la ruta de reducción de acetil CoA (Williams *et al.*, 2017) y de producir energía por medio del proceso metabólico de metanogénesis (Borrel *et al.*, 2016; Martin *et al.*, 2016).

Sin embargo, un análisis más detallado de ésta ruta autotrófica de fijación de carbono, nos permite observar que solo la rama carbonilo está compartida en ambos dominios, ya que la rama metilo es diferente en cuanto al número de enzimas, mismas que no son homólogas entre ellas, así como en el número de reacciones metabólicas (Martin y Russell 2007). Otra gran diferencia es el uso de coenzimas, las cuales son específicas de cada una de las variantes de estas rutas metabólicas (Graham y White 2002). A pesar de las grandes diferencias entre ambas variantes, se ha propuesto que los metabolismos de producción de metano son de los metabolismos más antiguos en surgir (Martin y Russell, 2007; Sousa *et al.*, 2013).

IV.4 Metanogénesis

Existen tres distintas formas de producción biológica de metano: la denominada *metanogénesis hidrogenotrófica*, en donde el organismos toma dióxido de carbono (CO₂) e hidrógeno (H₂) como compuestos iniciales y los reduce hasta formar metano. La *metanogénesis acetoclástica*, en donde se toma acetato y por medio de una serie de reacciones metabólicas se forma metano. Y por último, la *metanogénesis metilotrófica*, en donde los organismos metanógenos toman diversos compuestos metilados [entre los que destacan metanol, metilaminas (mono, di y trimetilamina) y tioles metilados (dimetilsulfuro y metilmercaptopropianato)] a los que les extraen un grupo metilo y éste es transformado en metano (Ferry 1999, Whitman *et al.*, 2006, Lessner 2009, Costa y Leight 2014). Todos los organismos que realizan metanogénesis son anaerobios, algunos micro anaerobios, extremadamente sensibles al oxígeno y pertenecen al dominio Arquea (Whitman *et al.*, 2006).

Las arqueas metanógenas son capaces de habitar una gran variedad de ambientes con rangos de temperatura muy amplios (Tabla 1). Sin embargo, todos comparten la característica de ser anaerobios estrictos y pertenecer al dominio Archaea y han sido clasificados en siete órdenes, un Phyla y dos clases. Tres Órdenes pertenecen a los metanógenos clase I (*Methanobacteriales*, *Methanopyrales* y *Methanococcales*) y otros tres a los metanógenos clase II (*Methanomicrobiales*, *Methanocellales* y *Methanosarcinales*) (Bapteste *et al.*, 2005; Borrel *et al.*, 2016). Mientras que el séptimo y último Orden propuesto, *Methanomassiliicoccales*, antes referido como *Methanoplasmatales* (Dridi *et al.*, 2012; Paul *et al.*, 2012) se ha colocado en la superclase Diaforarchaea (Petitjean *et al.*, 2015) y pertenece al orden *Thermoplasmatales*. Todos los organismos metanógenos pertenecen al Phylum Euryarchaeota.

Aunque también se han encontrado organismos pertenecientes a dos nuevos Phyla, Bathyarchaeota y Verstraetearchaeota, que potencialmente podrían llevar a cabo metanogénesis (Evans *et al.*, 2015; Vanwonterghem *et al.*, 2016). A la fecha, no se han realizado pruebas bioquímicas debido a la dificultad para cultivar estos organismos.

Tabla 1. Phyla y Órdenes en los cuales se encuentran clasificados todos los organismos capaces de realizar metanogénesis, hábitats, tipo de metanogénesis que son capaces de realizar y rango de temperatura óptimo para la supervivencia de dichos microorganismos (tomada de Muñoz Velasco I., 2017).

Phylum/Orden	Hábitat	Tipo de metanogénesis	Rango óptimo de temperatura
Confirmados			
Euryarchaeota <i>Methanobacteriales*</i>	-Sedimentos marinos y de agua dulce. -Suelos. -Tractos intestinales de animales. -Hábitats hidrotermales. -Digestores de aguas residuales. -Arrozales.	-Hidrogenotrófica -Metilotrófica.	-Entre 37 y 88 °C
Euryarchaeota <i>Methanopyrales*</i>	-Sedimentos marinos de origen hidrotermal.	-Hidrogenotrófica	-Entre 84 y 110 °C
Euryarchaeota <i>Methanococcales*</i>	-Sedimentos marinos. -Sedimentos marinos de origen hidrotermal.	-Hidrogenotrófica	-Entre 35 y 88 °C
Euryarchaeota <i>Methanomicrobiales**</i>	-Digestores anaerobios. -Aguas subterráneas. -Sedimentos marinos y de agua dulce. -Arrozales. -Campos petroleros. -Tractos intestinales de animales. -Aguas termales.	-Hidrogenotrófica	-Entre 15 y 57 °C
Euryarchaeota <i>Methanocellales**</i>	-Arrozales.	-Hidrogenotrófica	-Entre 35 y 37 °C
Euryarchaeota <i>Methanosarcinales**</i>	-Digestores anaerobios. -Sedimentos marinos y de agua dulce. -Tractos intestinales de animales. -Sedimentos hipersalinos.	-Hidrogenotrófica -Metilotrófica -Acetoclástica	-Entre 20 y 60 °C
Euryarchaeota <i>Methanomassilicoccales</i>	-Tractos intestinales de termitas y humanos	-Metilotrófica	-A 37 °C
Potenciales y por comprobar bioquímicamente			
Bathyarchaeota	-Muestras metagenómicas de agua marina.	-Metilotrófica	-?
Verstraetearchaeota	-Muestras metagenómicas de agua marina.	-Metilotrófica	-?

* Metanógenos de la clase I según la clasificación de Baptiste *et al.*, 2005.

** Metanógenos clase II según la clasificación de Baptiste *et al.*, 2005.

Nota: El Orden *Methanomassilicoccales* fue descrito (Dridi *et al.*, 2012; Paul *et al.*, 2012) y propuesto como un nuevo Orden de metanógenos (Borrel *et al.*, 2013) después de que se realizó la clasificación de Baptiste y colaboradores, en su mayor

parte la información presentada en esta tabla proviene de los trabajos de Liu y Whitman 2008; Evans *et al.*, 2015 y Vanwonterghem *et al.*, 2016.

IV.5 Evolución de la metanogénesis

Se ha propuesto que la metanogénesis se originó en el pasado, en el periodo comprendido entre 3.8-4.1 mil millones de años, jugando un papel importante en el calentamiento de la Tierra primitiva (Battistuzzi *et al.*, 2004). Sin embargo, los primeros registros de la producción biológica de metano datan de hace 3.5-3.4 mil millones de años (Ueno *et al.*, 2006); y hasta el momento no tenemos evidencia más antigua que ésta en el registro fósil.

Hasta el año 2015, todos los organismos capaces de realizar metanogénesis eran ubicados en un solo Phylum dentro del dominio Archaea, el Phylum Euryarchaeota. Los análisis filogenéticos basados en secuencias de RNA ribosomal (rRNA) y enzimas clave para el proceso metanogénico (p. ej. metil CoM reductasa) no pudieron organizarlos en un solo grupo (Figura 3A); proponiendo así dos clases (Clase I y Clase II) para tratar de explicar la historia evolutiva de dichos organismos (Baptiste *et al.*, 2005). Por estas razones, se sugería que el metabolismo del metano había surgido tempranamente en la historia evolutiva, dentro del Phylum Euryarchaeota (Baptiste *et al.*, 2005; Gribaldo y Brochier-Armanet, 2006), posteriormente heredarse a las siguientes generaciones y perderse de manera independiente en varias ocasiones durante la historia evolutiva del Phylum (Borrel *et al.*, 2013; Gao y Gupta, 2007; Gribaldo y Brochier-Armanet, 2006). No obstante, esta idea ha ido cambiando a lo largo del tiempo conforme se han realizado nuevos estudios.

Recientemente, Evans y colaboradores secuenciaron muestras ambientales y propusieron un nuevo Phylum dentro del dominio Archaea ("*Candidatus Bathyarchaeota*"). Miembros de este Phylum contienen enzimas claves para el proceso metanogénico, por lo que éste es el primer reporte de un organismo que se encuentra fuera del Phylum Euryarchaeota y que teóricamente puede realizar metanogénesis (Evans *et al.*, 2015).

Posteriormente en 2016 se analizaron cinco genomas provenientes de muestras metagenómicas, los análisis filogenéticos llevaron a proponer el nuevo Phylum "*Candidatus Verstraetearchaeota*" (Vanwonterghem *et al.*, 2016) que fue colocado como grupo hermano de TACK, término que hace referencia a los Phyla Thaumarchaeota, Aigarchaeota, Crenarchaeota y Korarchaeota (Guy y Ettema, 2011). Al igual que "*Candidatus Bathyarchaeota*", los organismos pertenecientes a "*Candidatus Verstraetearchaeota*" contienen enzimas claves para el proceso de metanogénesis basada en compuestos metilados, específicamente metabolizan metanol, metanotiol y metilamina (Vanwonterghem *et al.*, 2016). Estos descubrimientos colocan a la metanogénesis fuera del Phylum

Euryarchaeota, en donde se pensaba que se había originado (Figura 3B). Apoyando la hipótesis que propone que la metanogénesis pudo haber aparecido muy tempranamente en el ancestro de todo el dominio Archaea y posteriormente perderse en múltiples ocasiones en los diferentes linajes (Borrel *et al.*, 2016).

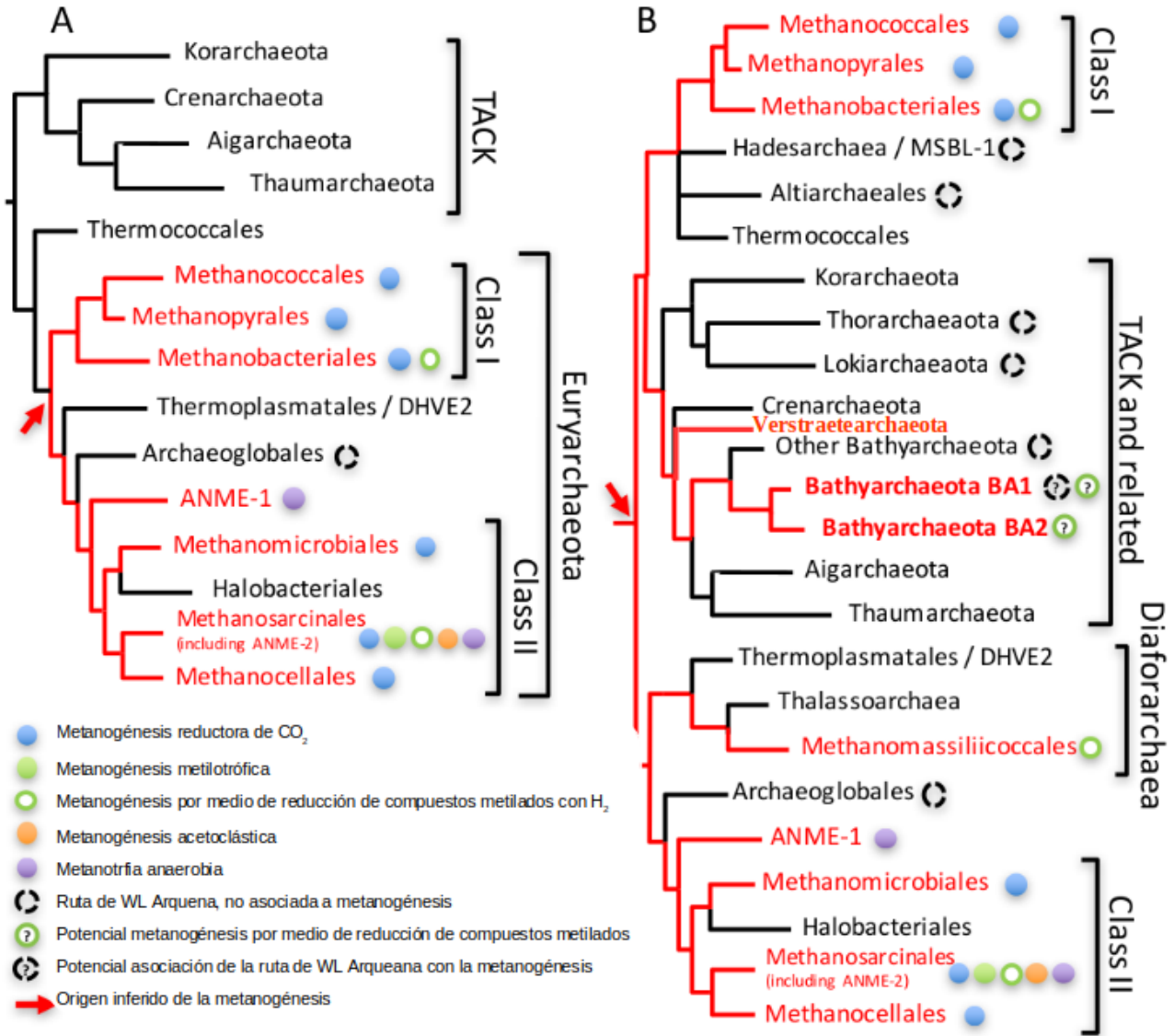


Figura 3. A. Hipótesis que se tenía sobre el origen de la metanogénesis en el ancestro del grupo Euryarchaeota. B. Hipótesis sobre el origen de la metanogénesis antes de la divergencia del dominio Archaea, esta hipótesis surge debido al descubrimiento de nuevos Phyla (p. ej. Bathyarchaeota y Verstraetearchaeota) dentro del dominio Archaea (imagen modificada de Borrel *et al.*, 2016).

A la fecha se tienen datos para proponer que sólo los organismos pertenecientes al dominio Archaea son capaces de realizar alguna de las variantes de metabolismo de metanogénesis (Evans *et al.*, 2019). Algunos autores proponen al metabolismo de metanogénesis, junto con el de acetogénesis,

como los metabolismos más antiguos en la Tierra (Martin y Russell, 2007; Sousa *et al.*, 2013). Se propone que ambos metabolismos surgieron en ambientes con temperaturas elevadas, como los que ofrecen los manantiales hidrotermales de las llamadas “white smokers” (Martin y Russell, 2007). Otras posturas más extremas ponen a la metanogénesis con fuertes implicaciones en el repertorio fisiológico del último ancestro común (LCA) (Weiss *et al.*, 2016). Sin embargo como se discutirá más adelante, parece ser que el proceso de metanogénesis es un metabolismo exclusivo de organismos pertenecientes al Phylum Euryarchaeota y todos aquellos rastros de enzimas relacionadas con este proceso metabólico, encontrados en organismos fuera de este Phylum, parecen ser el resultado de diversos procesos de transferencia horizontal e incluso de modificaciones que pudieron haber llevado a la neo funcionalización de dichas enzimas.

IV.6 Planteamiento del Problema

De manera general, se tienen dos esquemas sobre el origen de la vida (el autotrófico y el heterotrófico), así como varias hipótesis sobre el cómo se originaron y evolucionaron las primeras rutas metabólicas. Bajo un esquema autotrófico, las rutas que se proponen debieron haber surgido primero son las rutas autotróficas de fijación de carbono. Por lo que, en este trabajo se buscó analizar el posible origen y evolución de algunas de estas rutas, incluyendo la ruta de fijación de carbono por medio de la reducción de la acetil CoA ó ruta de Wood-Ljungdahl y la ruta reductiva del ácido tricarbóxico ó rTCA, por sus siglas en inglés, las cuales también se piensa, debieron haber estado en el repertorio metabólico del último ancestro en común de todos los organismos. En ambos casos nuestros resultados no muestran evidencia de que estas rutas estuvieran presentes en el repertorio metabólico del último ancestro en común de todos los organismos (LUCA), mucho menos al origen de la vida. Por el contrario, lo que los resultados sugieren, es que ambas rutas evolucionaron después de la divergencia de los dominios Bacteria y Archaea y que su distribución filogenética tan puntual es el reflejo de una historia evolutiva llena de duplicaciones génicas, transferencia vertical, así como múltiples eventos de transferencia horizontal de genes.

IV.7 Introducción a la parte metodológica

Construcción de bases de datos locales:

Para nuestro trabajo se construyeron bases de datos locales con proteomas completamente secuenciados de los dominios Archaea, Bacteria y Eukarya. Dichos proteomas fueron recuperados de la base de datos del KEGG (Kanehisa y Goto, 2000; Kanehisa *et al.*, 2014). Las bases de datos fueron formateadas para las búsquedas de secuencias homólogas por medio de BLAST, esto con la

ayuda del algoritmo `formatdb` y con la opción `-o T` para de este modo “parsear” los identificadores y posteriormente poder recuperar las secuencias de las bases de datos.

Búsqueda de secuencias homólogas:

Una vez construidas y formateadas las bases de datos locales, se realizó una búsqueda exhaustiva de secuencias homólogas, esto para cada una de las enzimas que participan en las diferentes rutas de producción de metano. En el caso de las enzimas multiméricas, se buscó a cada una de las subunidades que la conforman; dicha información fue recabada de los mapas de rutas metabólicas para metanogénesis, disponibles en la base de datos `metacyc` (Caspi *et al.*, 2014). Para la búsqueda de secuencias homólogas, primero se realizó una búsqueda utilizando la herramienta BLASTP (Altschul *et al.*, 1997), en donde se tomaron valores de corte para identidad (*identity*) y cobertura de la secuencia problema (*query coverage*) de 35% y 85% respectivamente, con una matriz de sustitución BLOSUM62. También se tomó en cuenta un valor de corte de E (e-value) menor de 1×10^{-6} teniendo siempre tamaños efectivos de la base de datos reales mayores a dos billones, esto con la finalidad de evitar la inclusión de secuencias que se parezcan sólo por azar y que no tengan una relación evolutiva con las secuencias de estudio. Las secuencias que pasaron los valores de corte en la búsqueda por medio de BLASTP, fueron recuperadas con ayuda de sus identificadores y el algoritmo `fastacmd`, posteriormente fueron alineadas con ayuda de MUSCLE v3.8.31 (Edgar, 2004) utilizando los valores predeterminados, lo que incluye un valor máximo de iteraciones igual a 16. Los alineamientos fueron revisados uno a uno con la ayuda del programa informático SeaView v4.0 (Galtier *et al.*, 1996).

Construcción de perfiles y búsqueda por medio de perfiles:

Una vez construidos los primeros alineamientos se procedió a la construcción de perfiles de modelos ocultos de Markov (HMM por las siglas en inglés, Hidden Markov Models) con ayuda del programa HMMER v3.1b1 (mayo 2013) (Finn *et al.*, 2011). Cada perfil resultante fue utilizado para llevar a cabo una búsqueda exhaustiva de las secuencias homólogas en nuestras bases de datos locales por medio de perfiles de HMMER, para los resultados se utilizaron los mismos valores de corte que para el BLASTP. Las secuencias resultantes de la búsqueda por medio de perfiles HMMER que pasaron los valores de corte fueron recuperadas de las bases de datos locales con ayuda de su identificador con el algoritmo `fastacmd`. Una vez recabadas las secuencias también fueron alineadas con el programa MUSCLE, en este punto los alineamientos se revisaron uno por uno para tratar de encontrar incongruencias en los mismos utilizando SeaView. De manera automática se eliminaron las

partes poco o nada informativas (partes pobremente alineadas y con grandes gaps) con ayuda del algoritmo trimAL v1.2rev59 (Capella-Gutiérrez *et al.*, 2009), con la opción -automated1, misma que está optimizada para la construcción de filogenias por el método de máxima verosimilitud.

Selección de modelo de sustitución y análisis filogenético:

Antes de realizar el análisis filogenético se procedió a seleccionar un modelo evolutivo que se acoplara a cada uno de los alineamientos, con la finalidad de inferir de manera más precisa cada filogenia. La selección del modelo evolutivo, o modelo de sustitución, para cada conjunto de datos (Tabla Suplementaria 1) y la construcción de filogenias de máxima verosimilitud fueron realizadas de manera automática con el software IQ-TREE multicore v1.4.2 (Nguyen *et al.*, 2015), en el caso de la selección del modelo evolutivo se indicó el parámetro -m TEST. Para cada filogenia se obtuvieron valores de soporte (bootstrap) de mil repeticiones utilizando la técnica de “*ultrafast bootstrap*” (Minh *et al.*, 2013), para esto se utiliza la opción -bb 1000.

Visualización, anotación y generación de imágenes:

La visualización, anotación, y generación de imágenes de las filogenias se realizó con el software ItoI v3 (Letunic y Bork, 2007), disponible de manera gratuita y en línea en la siguiente dirección electrónica <http://itol.embl.de/>. Cabe destacar que gran parte de la anotación de las filogenias, sobre todo la parte de los nombres se realizó de manera automática y antes de la construcción de los alineamientos con ayuda de programas informáticos desarrollados de manera exclusiva para este proyecto en lenguaje de programación Perl, con lo que se obtienen nombres de las ramas con la especie a la que pertenecen las secuencias, en lugar de con los identificadores de las secuencias encontradas en las búsquedas exhaustivas de secuencias homólogas por medio de perfiles HMMER. Una vez anotadas las filogenias es posible generar imágenes desde el portal web de itol con la opción expot.

Construcción de la filogenia de SSU-RNA

Además de las filogenias construidas para cada una de nuestras secuencias problema, también se construyó una filogenia de especies, utilizando las secuencias de RNA ribosomal de la subunidad pequeña (SSU-RNA). Para ello se tomaron como base los datos anteriormente publicados para la construcción del último árbol de la vida (Hug *et al.*, 2016), en donde se incluyen las secuencias conocidas hasta mediados de 2016; esta filogenia también fue visualizada y anotada con el software ItoI.

V. Artículo Requisito

Origins of Life and Evolution of Biospheres (2018) 48:407–420
<https://doi.org/10.1007/s11084-018-9570-9>

EARLY EVOLUTION



Methanogenesis on Early Stages of Life: Ancient but Not Primordial

Israel Muñoz-Velasco^{1,2} · Carlos García-Ferris^{3,4} · Ricardo Hernandez-Morales¹ · Antonio Lazcano^{1,5} · Juli Peretó^{3,4} · Arturo Becerra¹ 

Received: 27 August 2018 / Accepted: 19 December 2018 /
Published online: 5 January 2019
© Springer Nature B.V. 2019

Abstract

Of the six known autotrophic pathways, the Wood-Ljungdahl pathway (WL) is the only one present in both the acetate producing Bacteria (homoacetogens) and the methane producing Archaea (hydrogenotrophic methanogens), and it has been suggested that WL is one of the oldest metabolic pathways. However, only the so-called carbonyl branch is shared by Archaea and Bacteria, while the methyl branch is different, both in the number of reactions and enzymes, which are not homologous among them. In this work we show that some parts of the methyl branch of archaeal Wood-Ljungdahl pathway (MBWL) are present in bacteria as well as in non-methanogen archaea, although the tangled evolutionary history of MBWL cannot be traced back to the Last Common Ancestor. We have also analyzed the different variants of methanogenesis (hydrogenotrophic, acetoclastic and methylotrophic pathways), and concluded that each of these pathways, and every different enzyme or subunit (in the case of multimeric enzymes), has their own intricate evolutionary history. Our study supports the scenario of hydrogenotrophic methanogenesis being older than the other variants, albeit not old enough to be present in the last archaeal common ancestor.

Keywords Methanogenesis · Wood-Ljungdahl pathway · Archaea · Last common ancestor (LCA) · Methanogenic coenzymes

Introduction

The molecular details of universally distributed biological processes not only suggest the monophyletic origin of all extant forms of life, but also imply that the sets of genes encoding these complex traits became fixed long time ago. All organisms share the same genetic code,

Electronic supplementary material The online version of this article (<https://doi.org/10.1007/s11084-018-9570-9>) contains supplementary material, which is available to authorized users.

✉ Arturo Becerra
abb@ciencias.unam.mx

the same essential features of genome replication and gene expression, basic anabolic reactions, and membrane-associated ATPase-mediated energy production, along with other basic abilities, derived from a common ancestral form, i.e., the last common ancestor (LCA, a.k.a. LUCA). All known biological variations can be easily understood as the outcome of divergent processes from an ancestral life form that predated the separation of the Archaea and Bacteria domains (Becerra et al. 2007).

During the past two decades, different attempts have been made to describe the nature of the LCA (Becerra et al. 2007). The results obtained include lists of repertoires of gene sequences from incompletely represented basic biological processes, such as transcription, translation, energy metabolism, biosyntheses of nucleotides and amino acids, as well as some sequences related to replication, repair, and cellular transport. In spite of the limitations of the different methodological approaches employed, these inventories provide significant insights into LCA biological traits. However, these reconstructions are less informative about the metabolic abilities of the LCA. Some authors propose that together with acetogenesis, methanogenesis is one of the oldest metabolisms on Earth (Martin and Russell 2007; Sousa et al. 2013), and suggest that both metabolic routes emerged in a hyperthermophilic environment, such as the alkaline hydrothermal environment (Martin and Russell 2007), from an LCA endowed with geochemically-driven monocarbon-unit (C1) transformations (Sousa and Martin 2014; Weiss et al. 2016). The available information suggests that methanogenesis is present only in the Archaea domain, whereas the acetyl-CoA synthesis from CO₂, or Wood-Ljungdahl (WL) pathway, is present in both Bacteria and Archaea. Among the six known autotrophic routes, plus the recent discovery of a canonical TCA cycle flowing in reverse (Mall et al. 2018; Nunoura et al. 2018), the WL pathway is the only one that may conserve energy in addition to fixing carbon, it is a relatively simple linear route and not an autocatalytic cycle (Hügler and Sievert 2011; Peretó 2012). These traits have led to the proposal that it is the oldest autotrophic metabolism on Earth (Peretó et al. 1999; Berg et al. 2010; Fuchs 2011) that may have already been present in the LCA as a primitive, geochemically-driven version (Weiss et al. 2016).

Biologically, methane production is limited to some members of the Archaea under anaerobic conditions (Whitman et al. 2006) as well as to bacteria containing Fe-only nitrogenase (Zheng et al. 2018). Archaeal methanogenesis is the main source for biogenic methane and can follow three metabolic variants: (i) the hydrogenotrophic pathway based on CO₂ and H₂; (ii) the acetoclastic route; and (iii) those based on methyl compounds (methylotrophic) (Ferry 1999; Whitman et al. 2006; Costa and Leigh 2014). The most important source of methane on Earth is the split of acetate, which is responsible for two-thirds of the total amount produced during the last 300 years (Ferry 2010), whereas the reduction of CO₂ and the use of methylated compounds have produced the remaining amount. Geological reports of methane inclusions of possible biological origin would indicate that methanogenesis is at least 3.4–3.5 Gyr old (Ueno et al. 2006). Moreover, molecular clock analyses calibrated with horizontal gene transfer events place the divergence of this metabolism within the phylum Euryarchaeota no later than 3.5 Gyr ago (Wolfe and Fournier 2018).

Over a decade ago, all known methanogenic Archaea were believed to be part of the Euryarchaeota phylum and could not be placed in a monophyletic group. This led to the proposal that methanogens could be divided into two classes (Baptiste et al. 2005). It was argued that methanogenesis arose earlier within this phylum (Baptiste et al. 2005; Gribaldo and Brochier-Armanet 2006), was inherited vertically, and lost independently multiple times during the evolutionary history of Euryarchaeota (Borrel et al. 2013; Gao and Gupta 2007;

Gribaldo and Brochier-Armanet 2006). Recently, the hypothesis that methanogenesis is restricted to the Euryarchaeota has been challenged by Evans et al. (2015), who suggested that the discovery of partial genome sequences isolated from environmental samples of a deep aquifer were part of the new non-Euryarchaeota phylum, designated as “*Candidatus* Bathyarchaeota”, that some members included the gene repertoire necessary for a methanogenesis based on methyl C1 compounds (Evans et al. 2015). Analysis of new metagenomic samples from anaerobic digesters with a high methane flux led to the identification of the new phylum “*Ca. Verstraetearchaeota*”, which together with the “*Ca. Bathy*”-, “*Ca. Geo*”-, Thaum-, Cren- and Korarchaeota, form the superphylum TACK or Proteoarchaeota (Spang et al. 2017). Members of “*Ca. Verstraetearchaeota*” are theoretically able to produce methane using methylated compounds, specifically methanol, methanethiol and methylamine (Vanwonterghem et al. 2016). Quite surprisingly, the findings of Laso-Pérez et al. (2016) suggest that different variants of the enzyme involved in the last step of methane biosynthesis (i.e. methyl-coenzyme M reductase or MCR) can oxidize butane in a reaction that resembles “reverse methanogenesis” in anaerobic methane oxidant (ANME) organisms. Finally, the characterization of two nearly completed sequenced genomes isolated from hypersaline lakes that belong to a deep-branching Haloarchaea, the Methanonatronarchaeia, a novel euryarchaeal group of extreme halophilic methyl-reducing methanogens using C1 compounds, expands our knowledge of organisms capable of performing methanogenesis within the Euryarchaeota phylum (Sorokin et al. 2017). All of these findings indicate a much more widespread presence of methanogenesis within the Archaea than previously suspected, suggesting the early origin of this metabolic mode in the archaeal domain’s ancestor, followed by multiple losses in many different lineages that are no longer capable of methane production (Borrel et al. 2016; Williams et al. 2017).

Here we examine the phylogenetic distribution and evolution of the enzymes and the coenzymes that are essential for the different methanogenic pathways, i.e., the hydrogenotrophic, acetoclastic, and the methylotrophic routes. Our results indicate that the early evolution of methanogenesis was subject of intense horizontal gene transfers (HGT). Moreover, the uneven phylogenetic distribution of the idiosyncratic methanogenic coenzymes also suggest that the last archaeal common ancestor was not a methanogen. As a consequence, the results presented here show that methanogenic pathways cannot be used as proxies of primordial life metabolic abilities, and even less as evidence of an autotrophic origin of life in hydrothermal environments rich in transition-metal sulfides.

Material and Methods

In this work, local databases were constructed with complete proteomes, which were retrieved from the Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG) (Kanehisa et al. 2014), Reference Sequence (RefSeq) database of National Center for Biotechnology Information (NCBI) (Pruitt et al. 2007) and Joint Genome Institute’s Integrated Microbial Genomes (JGI) (Markowitz et al. 2012) databases (December of 2016 for Bacteria and Eukarya) and December of 2017 for Archaea. For the “*Ca. Verstraetearchaeota*” genomes we followed the methodology of Vanwonterghem and collaborators using OrfM (Woodcroft et al. 2016) (<https://github.com/wwood/OrfM.git>). An exhaustive homology search was performed for each one of the enzymes (and for each subunit of multimeric enzymes) of hydrogenotrophic, acetoclastic and methylotrophic methanogenesis pathways using BlastP search (Altschul et al.

1997), identity values of 35%, query coverage of 85% and e-value lower than 1×10^{-6} was taken as a cutoff. From BlastP search, sequences that pass the cutoff were aligned with MUSCLE v3.8.31 (Edgar 2004), using default parameters. An HMM profile was constructed with HMMER (Finn et al. 2011), and was used to scan the local databases, with the same values used in BlastP. Results of the HMMER search were aligned using MUSCLE. To improve the alignments, non-informative parts of the alignment (poorly aligned regions and big-gaps), were removed automatically using trimAL algorithm (Capella-Gutiérrez et al. 2009), with the “automated1” option. The substitution model selection for each alignment and inference of maximum likelihood trees was performed using IQ-TREE software (Nguyen et al. 2015), we obtained bootstrap supports values using an ultrafast bootstrap approximation (Minh et al. 2013) with 1000 replicates. Visualization, annotation and generation of images of each tree was made with iTOL software (Letunic and Bork 2016). A R script was made specifically to create the heatmaps in R v3.1.1 using *phetamap* and *RcolorBrewer* libraries. Phylogenetic trees for each gene based on untrimmed alignments were also performed (FASTA and Newick format files are available in figshare repository at <https://figshare.com/s/6d27214f324ee631a586>).

Results

Hydrogenotrophic Methanogenesis

As shown in Fig. 1a, there are seven enzymatic steps involved in the reduction of CO₂ to methane, in which several different coenzymes participate as C1- or electron-carriers (Ferry 1993; Graham and White 2002). The first enzyme that takes part in the reduction of CO₂ to methane is the six subunits formylmethanofuran dehydrogenase (FmdA-F, EC 1.2.7.12), that reduces CO₂ to formyl. There are two known isoenzymes, one containing molybdenum and another one that uses tungsten in the catalytic center. In this work, we have analyzed separately the different subunits of the molybdenum-containing enzyme (FmdA-F). Our results show a distinctive evolutionary path for each subunit, in which FmdA and FmdF are present in the three domains of life (Figs. S1 and S6), while FmdB, FmdC, FmdD and FmdE (Figs. S2-S5) are found only in Archaea and Bacteria. The enzymes catalyzing the second and third steps, formylmethanofuran tetrahydromethanopterin formyltransferase (Ftr, EC 2.3.1.101) (Fig. S7) and methenyl-H₄MPT cyclohydrolase (Mch, EC 3.5.4.27) (Fig. S8), are single unit enzymes, and are present only in Bacteria and Archaea. The next step is carried out by two different enzymes, one H₂-dependent, the N⁵, N¹⁰-methylene-tetrahydromethanopterin dehydrogenase (Hmd, EC 1.12.98.2) (Fig. S10), and another coenzyme-F₄₂₀-dependent dehydrogenase (Mtd, EC 1.5.98.1) (Fig. S9) that participates in the so called Hmd-Mtd cycle. These enzymes are restricted to Archaea, except for one *Desulfurobacterium thermolithotrophum* (Bacteria), that is endowed with the H₂-forming enzyme, the methylene-tetrahydromethanopterin dehydrogenase (Hmd) (Table S1 and Fig. S10). The methylene-H₄MPT reductase (Mer, EC 1.5.98.2) (Fig. S11), reduces the methenyl group to methyl and is broadly distributed in both Bacteria and Archaea (Table S1). In the last steps the methyl group is finally transferred, first from H₄MPT to factor III, and then to coenzyme M by the methyl-H₄MPT coenzyme M methyltransferase (EC 2.1.1.86) complex, which is located in the cellular membrane, and is composed of eight subunits (MtrA, MtrB, MtrC, MtrD, MtrE, MtrF, MtrG and MtrH). This enzyme is mainly restricted to the Archaea domain, specifically the MtrB, MtrC, MtrD, MtrE, MtrF and MtrG subunits, which are confined to the Euryarchaeota phylum (Figs. S13-S18). On the other hand, MtrA (Fig. S12) is present in members of Euryarchaeota as

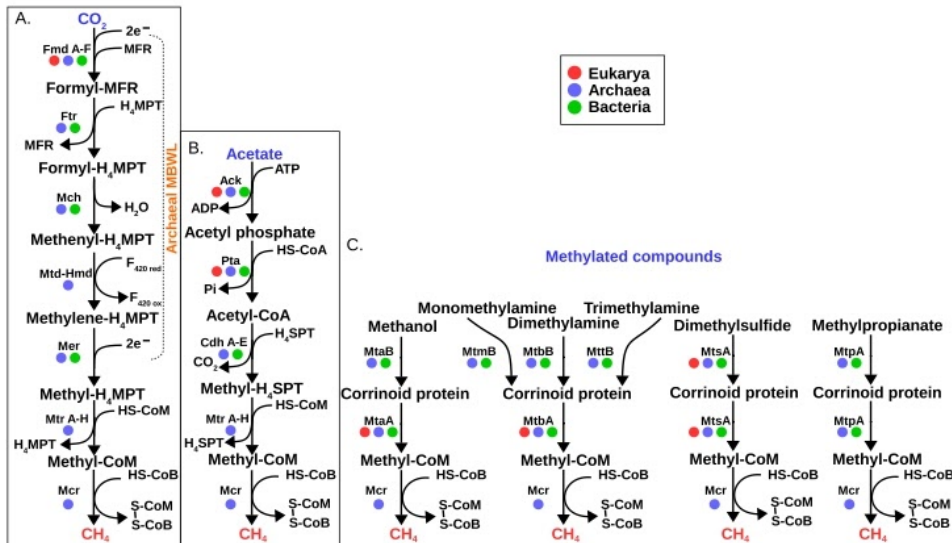


Fig. 1 Metabolic variants of biological production of methane, circles represent presence and absence of the different enzymes among the tree domains of life (Eukarya in red, Archaea in blue and Bacteria in green). **a** Hydrogenotrophic Methanogenesis in which Archaeal MBWL comprise the first five metabolic steps (from Fmd to Mcr), Mtr are shared with Acetoclastic Methanogenesis and Mcr are shared with all organisms able to do methane and in fact with all metabolic pathways of production of methane. **b** Acetoclastic Methanogenesis in which the first two steps vary from *Methanosaeta* and *Methanosarcina* species (see details in text). **c** Methylotrophic Methanogenesis, this is the most variant type of methanogenesis in terms of initial substrates and methyl transferases. Fmd Formylmethanofuran dehydrogenase. Ftr Formylmethanofuran:H₄MPT formyltransferase. Mch Methenyl:H₄MPT cyclohydrolase. Mtd-Hmd H₂-forming methylene-H₄MPT dehydrogenase. Mer F₄₂₀-dependent methylene-H₄MPT reductase. Mtr Methyl-H₄MPT:coenzyme M methyltransferase. Mcr Methyl-coenzyme M reductase. Ack Acetate Kinase. Pta Phosphotransacetylase. Cdh protein of Acetyl-CoA decarboxylase/synthase complex. MtaB and MtaA methanol specific methyltransferase, MtmB Monomethylamine specific methyltransferase. MtbB Dimethylamine specific methyltransferase. MtbA Trimethylamine specific methyltransferase. MtbA methyltransferase shared between methylamines. MtsA Dimethylsulfide specific methyltransferase. MtpA Methylpropanoate specific methyltransferase

well as in a few members of Thaumarchaeota, while MtrH (Fig. S19) has a wide distribution in Archaea and is found in “*Ca. Loki*–”, “*Ca. Thor*–”, “*Ca. Odin*–” “*Ca. Bathy*–”, “*Ca. Verstraete*–”, Cren- and Korarchaeota phyla, and in Bacteria in some members of Deltaproteobacteria, Alphaproteobacteria and Firmicutes-Clostridia.

In the last enzymatic step, the methyl group is reduced to methane. This reduction is catalyzed by methyl coenzyme M reductase (Mcr, EC 2.8.4.1). The three subunits of this enzyme (McrA, McrB and McrG) are restricted to the Archaea domain, specifically in the Eury-, “*Ca. Bathy*–” and “*Ca. Verstraete*archaeota” phyla (Figs. S20-S22). The enzyme Mtr is shared among all acetoclastic and hydrogenotrophic methanogens, while Mcr catalyzes the last crucial step for all metabolic routes of oxidation of methane, butane and production of methane in organisms capable of carrying out methanogenesis, anaerobic oxidation of methane (AOM) (Timmers et al. 2017) and butane oxidation (Laso-Pérez et al. 2016).

Acetoclastic Methanogenesis

The only two known genera capable of performing acetoclastic methanogenesis are *Methanosarcina* and *Methanosaeta* (Ferry 1992, 1999; Smith and Ingram-Smith 2007). In *Methanosarcina* the combination of acetate kinase (Ack, EC 2.7.2.1) and phosphotransacetylase

(Pta, EC 2.3.1.8) produces acetyl-CoA from acetate (Ferry 1992; Lessner 2009). On the other hand, in *Methanosaeta* these two coupled reactions are carried out by an AMP-forming acetyl-CoA synthetase (ACS, EC 6.2.1.1) (Jetten et al. 1989). The next reaction is catalyzed by CO dehydrogenase/acetyl-CoA synthase (CODH/ACS, EC 2.3.3.-) (Ferry 1997), which transfers the methyl group to tetrahydrosarcinopterin (H₄SPT). A methyltransferase then transfers the methyl group from H₄SPT to coenzyme M (CoM) and, finally, methyl-CoM reductase reduces the methyl group to methane (Ferry 1997) (see Fig. 1b).

Our results indicate that Ack (Fig. S23) is a generalist enzyme capable of activating-chemically acetate by ATP-dependent phosphorylation. It is broadly distributed in Bacteria, as well as in Eukarya (in fungi, specifically in Basidiomycetes and Ascomycetes, some plants, green algae, and protists-amebozoa), while in Archaea it is present in only *Methanosarcina* species as well as in “*Ca. Pacearchaeota*” and “*Ca. Woesearchaeota*”. On the other hand, Pta (Fig. S24) is widely distributed in Bacteria, while in Archaea it is only present in *Methanosarcina*, *Methanobacterium* and “*Ca. Woesearchaeota*”.

The CODH/ACS subunits that we have analyzed belong to class II CODH/ACS's (Lindahl and Chang 2001), which is different of the previously analyzed class I CODH/ACS's operating in WL (Becerra et al. 2014). Our results indicate that each of the CODH/ACS subunits has a different evolutionary history. The phylogenies suggest that CdhB (EC 1.2.7.4) (Fig. S26) is a subunit that has an archaeal distribution with one exception within the Bacteria “*Ca. Desulforudis audaxviator*”, which appear to be the result of horizontal gene transfers events. The subunits CdhA (EC 1.2.7.4) (Fig. S25), CdhC (EC 2.3.1.169) (Fig. S27), CdhD (EC 2.1.1.245) (Fig. S28) and CdhE (EC 2.1.1.245) (Fig. S29) are broadly distributed among Archaea and Bacteria, as reported by Adam et al. (2018).

Methyl Compound-Based Methanogenesis

The utilization of methyl compounds as precursors in methane synthesis is confined to a small group of methanogens that belong to the Methanosarcinales (*Methanosarcina* and *Methanolobus* species), Methanomassiliococcales (“*Ca. Methanomassiliicoccus*”) and Methanobacteriales (*Methanosphaera*) species, which exploit methanol, methylamines and methylated thiols (Liu and Whitman 2008) and, perhaps also to some organisms belonging to the “*Ca. Bathyarchaeota*” and “*Ca. Verstraetearchaeota*” (Evans et al. 2015; Vanwonterghem et al. 2016). The enzyme responsible for the utilization of methanol is methanol-CoM methyltransferase, which has three subunits MtaA (EC 2.1.1.246), MtaB (EC 2.1.1.90) and the non-catalytic MtaC. Only MtaA and MtaB have methyltransferase activity. Our phylogenetic analysis indicates a broad distribution of MtaA (Fig. S30) in Eukarya, Bacteria and Archaea, which suggests an intricate evolutionary history that indicates that the gene has undergone multiple horizontal gene transfer events. On the other hand, MtaB (Fig. S31) is present in Archaea, specifically in members of Euryarchaeota, and as well as in some members of Bacteria belonging to the Firmicutes-Clostridia and Deltaproteobacteria.

In the case of methylamine-dependent methanogenesis, the substrates monomethylamine, dimethylamine and trimethylamine are used by two different enzymes with methyltransferase activity. The first one is specific and it changes depending of the substrate (see Fig. 1c), while the second one, the methylated methylamine-specific corrinoid protein CoM methyltransferase (MtbA, EC 2.1.1.247), catalyzes a key step after one of the three different methylamines products (MtmB, MtbB or MttB) (Fig. 1c).

For monomethylamine, the first protein with methyltransferase activity is monomethylamine methyltransferase (MtmB, EC 2.1.1.248), which has a broad distribution in Archaea and is also found in some members of Bacteria that belong to Firmicutes. It was thought that this enzyme was restricted to Euryarchaeota and “*Ca. Verstraetearchaeota*”. However, it was found in Euryarchaeota, Crenarchaeota as well as in “*Ca. Verstraetearchaeota*” (Fig. S32). This enzyme probably first evolved in Archaea and the gene then underwent HGT to Bacteria. In the case of dimethylamine, the first enzyme with methyltransferase activity is dimethylamine methyltransferase (MtbB, EC 2.1.1.249), which is restricted to some members of the Archaea domain, including members of *Methanosarcina*, *Methanobolus*, “*Ca. Methanomassiliicoccus*” and “*Ca. Verstraetearchaeota*”, and only one Firmicutes-Clostridia (SF, S33) (*Thermacetogenium phaeum*), which is an acetate-oxidizing thermophilic bacterium. For trimethylamine, we studied the trimethylamine methyltransferase (MttB, EC 2.1.1.250). Our phylogenies indicate a very restricted distribution to some members of Archaea, all belonging to Euryarchaeota phylum, and few members of Bacteria belonging to Firmicutes-Clostridia (Fig. S34). Finally, the enzyme present in all pathways using methylamine compounds is MtbA (Fig. 1c). Phylogenetic analysis of this enzyme (Fig. S35) shows a wide distribution in Bacteria, while in Archaea is restricted to Eury-, “*Ca. Micra*”, “*Ca. Geo*”, “*Ca. Heimdall*”, “*Ca. Thor*”, “*Ca. Verstraete*” and one member of “*Ca. Lokiarchaeota*” phyla (see Table S1). In Eukaryotes it is found in some members of fungi, plants, green algae, protists and animals (Fig. S35).

Dimethylsulfide protein methyltransferase (MtsA, EC 2.1.1.251) is used for methylated thiols (dimethylsulfide) and has a broad distribution among Bacteria, but in Archaea it is confined to Eury-, “*Ca. Bathy*”, “*Ca. Loki*”, “*Ca. Micra*”, “*Ca. Geo*”, “*Ca. Heimdall*”, “*Ca. Thor*”, “*Ca. Verstraetearchaeota*” and some unclassified Archaea. Moreover, it is present in protists, fungi, animals, green algae and plants (SF, S36). The analysis of the phylogenetic distribution of the 3-(methylthio) propanoate coenzyme M methyltransferase (MtpA, EC 2.1.1.251) that uses as substrate methylmercaptopropanoate, shows that it is present in Bacteria, while in Archaea it is found in members of Eury-, “*Ca. Heimdall*”, “*Ca. Thor*” and “*Ca. Verstraetearchaeota*” phyla (Fig. S37 and Table S1). Unlike other methylated compounds methyltransferases, MtpA supplies two enzymes with methyltransferase function and therefore catalyzes two different reactions instead of only one.

As shown in supplementary material S45, trees constructed from non-trimmed alignments do not provide better resolution or substantially different topologies.

Use of Coenzymes in Methanogenesis

It is well known that nearly half of the characterized enzymes require organic cofactors or metal ions to carry out specific chemical reactions and enhance their catalytic power (Fischer et al. 2010). Enzymes involved in methanogenesis use different specific coenzymes in each step of their methane producing routes (Lessner 2009). The factor F₄₃₀, coenzyme M and coenzyme B play a key role in the last step of methane biosynthesis (Graham and White 2002). The absence of one of them interrupts this biological process. As shown in Fig. 3, organisms from Euryarchaeota phylum contain the full repertoire of enzymes required for the synthesis of F₄₃₀, M and B coenzymes. Furthermore, other organisms from the Archaea and Bacteria domains (Fig. 3 and Fig. S38) have only some coenzyme B biosynthetic enzymes that partake in other metabolic functions, like the α -amino adipic acid lysine biosynthesis (Drevland et al.

2008; Kobashi et al. 1999). Therefore, it is not surprising to find this group of enzymes in other living beings (e.g. Bacteria domain). It has been argued that since the sequences of the key Mcr enzyme and some enzymes of the methylotrophic pathway are present in some members of “*Ca. Bathyarchaeota*” and “*Ca. Verstraetearchaeota*” these organisms maybe have the ability to carry out methanogenesis based on methylated compounds (Evans et al. 2015; Vanwonterghem et al. 2016) or in the case of “*Ca. Bathyarchaeota*” a few authors propose that some members of this phylum can carry out acetogenesis with the battery of the archaean WL (He et al. 2016). However, our results show that in “*Ca. Bathyarchaeota*” the enzymes required to synthesize F_{430} are absent, as well as the majority of the enzymes for the biosynthesis of M coenzyme. On the other hand, “*Ca. Verstraetearchaeota*” lack the enzymes required for M coenzyme biosynthesis (Fig. 3). All methanogenic organisms have the enzymes required to synthesize F_{430} factor, while other non-methanogenic organisms, including bacteria, only have the first enzymes involved in this metabolic pathway. This distribution can be explained by the fact that these enzymes are also involved in precorrin biosynthesis (Zheng et al. 2016), which is important to produce cobalamin, a cofactor required for the Class II ribonucleotide reductase enzyme.

WL-Pathway (Homoacetogenesis)

In addition to the phylogenetic analysis of the enzymes involved in each of the different pathways for methanogenesis, as well as in the biosynthesis of factor F_{430} , coenzyme M and coenzyme B, we have also studied the distribution of the classical WL pathway (homoacetogenesis). Our analyses indicate that only some bacteria (for instance, Firmicutes-Clostridia, Deltaproteobacteria and Spirochaetes) have the enzymatic machinery necessary for this route (see Fig. S40), which agrees with the current understanding of the metabolic abilities of these organisms (Drake et al. 2008; Shin et al. 2016), whereas in Archaea no lineage has the complete set of enzymes required for homoacetogenesis (Figs. S39 and S41).

Discussion

As suggested by Baptiste et al. (2005), and Williams et al. (2017) and shown by our results, the distribution of hydrogenotrophic enzymes on the Archaea domain (Fig. 2) suggests that this pathway is indeed the oldest methane producing route. Although the first five steps of the hydrogenotrophic pathway correspond to the archaeal MBWL pathway (Fig. 1a), the convergence is at the chemical reaction level, but not at the enzymatic level. In other words, the origin of the hydrogenotrophic route is independent from the autotrophic WL pathway, and the present activity of CO_2 fixation in methanogenic-euryarchaeota is an analogous pathway. Moreover, the complete hydrogenotrophic route, including the key Mtr and Mcr enzymes, are exclusively present in a well-defined group of Archaea, which is formed solely by methanogenic Euryarchaeota (Fig. 2). It is important to underline that these analogous but not homologous metabolic activities, provide no evidence of autotrophic or methanogenic abilities of the archaeal ancestor, nor much less of LCA, albeit some metabolic building blocks related to specific cofactor biosynthesis (e.g. tetrahydromethanopterin) could be present in LCA (Chistoserdova 2016; Chistoserdova and Kalyuzhnaya 2018). Our results also are compatible with an independent origin of the enzymatic repertoire for the WL pathway in Bacteria and the

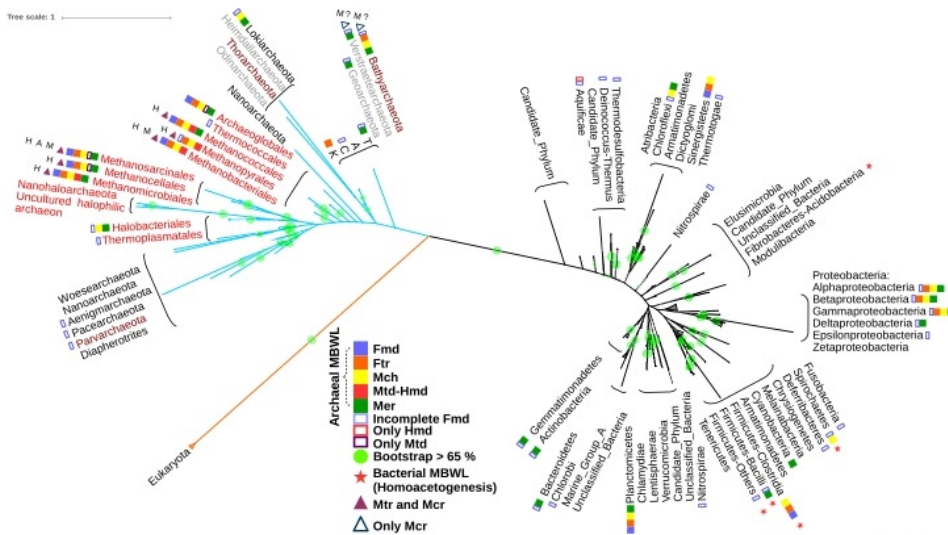


Fig. 2 Maximum likelihood SSU-rRNA phylogeny based on the last tree of life dataset (Hug et al. 2016), in which is shown the distribution of the archaeal methyl branch of Wood-Ljungdahl pathway (MBWL) or otherwise parts thereof (colored squares), as well as the distribution of Bacterial MBWL (stars) and the Mtr and Mcr enzymes (triangles), specifically which homoacetogenesis. Red labels belong to Euryarchaeota phylum. Grey labels represent putative positions of archaeal phyla that was not included in Hug's analysis. Eukarial branch is colored in orange, archaeal branches in blue and bacterial branches in black. Green circles in middle of the branches are bootstrap values >65%. In the phylogeny TACK makes reference to phyla Thaumarchaeota, Aigarchaeota, Crenarchaeota and Korarchaeota. Fmd Formylmethanofuran dehydrogenase. Ftr Formylmethanofuran- H_4 MPT formyltransferase. Mch Methenyl- H_4 MPT cyclohydrolase. Mtd-Hmd H_2 -forming methylene- H_4 MPT dehydrogenase. Mer F_{420} -dependent methylene- H_4 MPT reductase. Mtr Methyltransferase. Mcr Methyl-Coenzyme M Reductase. The letters in the middle of the white circles refer to the different types of methanogenesis, H for Hydrogenotrophic, M for Methylotrophic and A for Acetoclastic

hydrogenotrophic methanogenesis in Euryarchaeota as has been suggested by several authors (Martin and Russell 2007; Nitschke and Russell 2013; and references therein).

Together with the analysis of the evolution of enzymes with more than one subunit present here, the results suggest a patchwork evolution (Jensen 1976; Ycas 1974) of methanogenesis. Moreover, the phylogenetic distributions of domains and proteins are congruent with the idea that hydrogenotrophic methanogenesis, which can be divided into two classes, is older than acetoclastic and methylotrophic methanogenesis (Baptiste et al. 2005, Fig. 2).

The results presented here also confirm the results of Fournier and Gogarten (2008) on the distribution of Ack (Fig. S23) and Pta (Fig. S24), of the acetoclastic production of methane, and support the suggestion that both genes were transferred from Clostridia to *Methanosarcina*. We have also shown that Pta and Ack are present in protists, fungi and plants. Neither Ack nor Pta were found in *Methanosaeta*, confirming other reports (Jetten et al. 1989). *Methanosaeta* species have an AMP-forming ACS and ADP-forming ACS, that functionally can substitute the Ack and Pta activities (Berger et al. 2012). Although *Methanobacterium* is reported as a methane producer through hydrogenotrophic methanogenesis, Pta was found in its genetic repertoire, indicating its generalist character in acetate-assimilating metabolisms (see Fig. 1 and Table S1).

The analysis presented here shows that the subunit CdhB is an archaeal innovation (Fig. S26). Each subunit of the acetoclastic CODH/ACS enzyme has a different evolutionary history in Bacteria and Archaea domains, where the distribution of the subunit CdhA is particularly

important, because of its involvement in the oxidation activity of the carbonyl group. CdhB is present almost exclusively in Archaea, except for one member of Firmicutes-Clostridia (“*Ca. Desulforudis audaxviator*”) which apparently has undergone an HGT from Archaea members (Chivian et al. 2008; Bonch-Osmolovskaya 2010). Although, Class I and II CODH/ACS could function in both anabolic acetyl-CoA synthesis and catabolic acetyl-CoA cleavage, their high divergences shown in sequences from CdhC, CdhD subunits (Figs. S42 and S43), and the distinctive rate activity found in different grown conditions (Matschiavelli et al. 2012), suggest a specialization process.

The methylotrophic methanogenesis can be seen like a salvage pathway in which different methylated compounds are integrated to energy metabolism. The simplicity of the route (which requires only methyltransferases and the Mcr enzyme), suggests that this type of methanogenesis arose early in Archaea. However, the distribution of this type of methanogenesis (see Fig. 2 and Table S1) does not support this idea. Moreover, the phylogenetic distributions of MtaA, MtbA, MtsA and MtpA, which participate in the second step on the different methylotrophic pathways, are clearly related to their bacterial counterparts, and can be explained by a series of HGT events (see Figs. S30 and S35–37).

The high frequency of HGT found in many of the subunits and enzymes present in methanogenic pathways from non-methanogenic archaea, bacteria and in some cases even eukarya, suggest that these proteins can participate in other metabolic processes. This appears to be the case of the tungsten-containing formylmethanofuran dehydrogenase subunit E (FwdE) which, in addition of methanogens, is conserved in acetogens where its function is unclear but may have a DNA-binding property as indicated by Shin et al. 2016.

Concluding Remarks

As shown here and in other works (Baptiste et al. 2005; Liu and Whitman 2008; Williams et al. 2017), the distribution and phylogeny of the enzymes that catalyze methane production clearly suggests that the hydrogenotrophic pathway is older than the acetoclastic and methylotrophic routes. Although the evolution of methanogenesis is not free from HGT, the key enzymes Mtr and Mcr and the hydrogenotrophic route are complete only in Euryarchaeota members. However, in the case of the Mcr enzyme they are also present in “*Ca. Bathyarchaeota*” and “*Ca. Verstraetearchaeota*”. Furthermore, the distribution of the biosynthetic proteins of the essential coenzymes of the methanogenesis process (for example factor F₄₃₀, coenzyme M and coenzyme B), is also very peculiar, as they are found only in the Euryarchaeota phylum (see Fig. 3). In consequence, as shown in this work, the distribution of enzymes contradicts proposals of a methanogenic last archaeal common ancestor (Borrel et al. 2016) and do not support the idea that this pathway evolved during the very early stages of life. In other words, methanogenesis is clearly an ancient metabolism but not a truly primordial one. Moreover, the outcome of the analysis of distribution of the methanogenic coenzymes and their biosynthetic enzymes question the methanogenic abilities of some members belonging to “*Ca. Bathyarchaeota*” and also some belonging to “*Ca. Verstraetearchaeota*” (see Fig. S44).

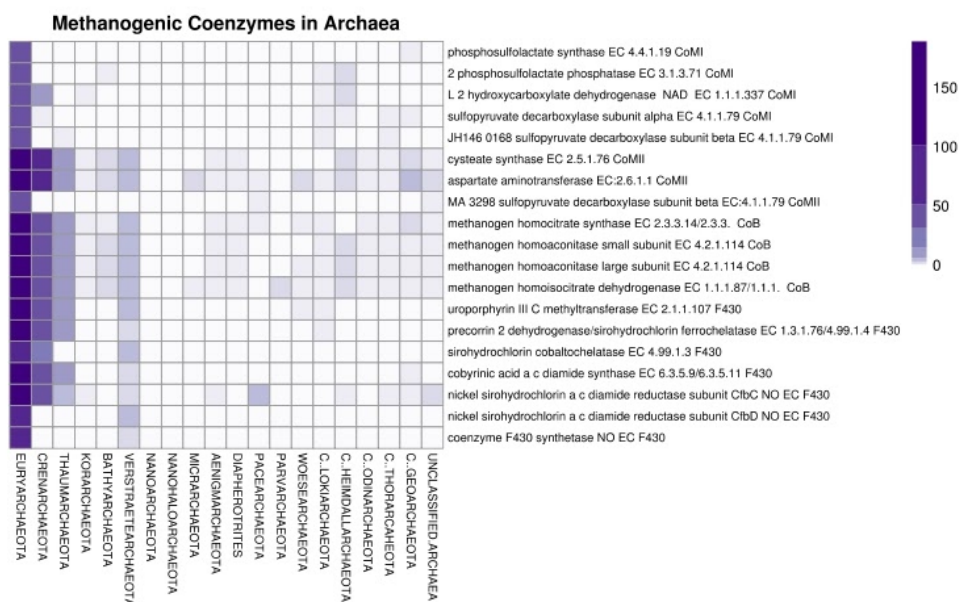


Fig. 3 Heatmap distribution of the enzymes involved in the biosynthesis pathways of factor F_{430} (F_{430}), the two known coenzyme M biosynthetic pathways (CoMI and CoMII) and the biosynthetic pathway of coenzyme B (CoB) in the Archaea domain. The numbers of the sidebar represent the number of genes

Acknowledgments We are indebted to Dr. José Alberto Campillo-Balderas for his help with the manuscript. Financial support of DGAPA-UNAM (PAPIIT-IN223916) is gratefully acknowledged. IM-V is a student from the Posgrado en Ciencias Biológicas, Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM) and received fellowship 415961 from CONACYT. CGF and JP acknowledge financial support from Mineco/FEDER (grant references: BFU2015-64322-C2-1-R and BIO2015-66960-C3-1-R) and the Generalitat Valenciana (grant reference: PROMETEOII/2014/065).

Author's Contribution Authors contributed equally to this manuscript.

Compliance with Ethical Standards

Conflict of Interest The authors declare no conflict of interest.

Publisher's Note Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.

References

- Adam PS, Borrel G, Gribaldo S (2018) Evolutionary history of carbon monoxide dehydrogenase/acetyl-CoA synthase, one of the oldest enzymatic complexes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 201716667:E1166–E1173. <https://doi.org/10.1073/pnas.1716667115>
- Altschul SF, Madden TL, Schäffer AA, Zhang J, Zhang Z, Miller W, Lipman DJ (1997) Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res* 25(17):3389–3402. <https://doi.org/10.1093/nar/25.17.3389>
- Bapteste É, Brochier C, Boucher Y (2005) Higher-level classification of the archaea: evolution of methanogenesis and methanogens. *Archaea* 1(2002):353–363. <https://doi.org/10.1155/2005/859728>
- Becerra A, Delaye L, Islas S, Lazcano A (2007) The very early stages of biological evolution and the nature of the last common ancestor of the three major cell domains. *Annu Rev Ecol Evol Syst* 38(1):361–379. <https://doi.org/10.1146/annurev.ecolsys.38.091206.095825>

- Becerra A, Rivas M, García-Ferris C, Lazcano A, Peretó J (2014) A phylogenetic approach to the early evolution of autotrophy: the case of the reverse TCA and the reductive acetyl-CoA pathways. *Int Microbiol* 17:91–97. <https://doi.org/10.2436/20.1501.01.211>
- Berg I, Kockelkorn D, Ramos-Vera WH, Say RF, Zarzycki J, Hügl M, Alber B, Fuchs G (2010) Autotrophic carbon fixation in archaea. *Nat Rev Microbiol* 8(6):447–460. <https://doi.org/10.1038/nrmicro2365>
- Berger S, Welte C, Deppenmeier U (2012) Acetate activation in *Methanosaeta thermophila*: characterization of the key enzymes pyrophosphatase and acetyl-CoA Synthetase. *Archaea* 2012:1–10. <https://doi.org/10.1155/2012/315153>
- Bonch-Osmolovskaya EA (2010) High-temperature deep-subsurface microbial communities as a possible equivalent of ancient ecosystems. *Paleontol J* 44(7):851–859. <https://doi.org/10.1134/s0031030110070130>
- Borrel G, O'Toole PW, Harris HMB, Peyret P, Brugère J-F, Gribaldo S (2013) Phylogenomic data support a seventh order of methylophilic methanogens and provide insights into the evolution of Methanogenesis. *Genome Biol Evol* 5(10):1769–1780. <https://doi.org/10.1093/gbe/evt128>
- Borrel G, Adam PS, Gribaldo S (2016) Methanogenesis and the wood-Ljungdahl pathway: an ancient, versatile, and fragile association. *Genome Biol Evol* 8(6):1706–1711. <https://doi.org/10.1093/gbe/evw114>
- Capella-Gutiérrez S, Silla-Martínez JM, Gabaldón T (2009) trimAl: a tool for automated alignment trimming in large-scale phylogenetic analyses. *Bioinformatics* 25(15):1972–1973. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btp348>
- Chistoserdova L (2016) Wide distribution of genes for tetrahydromethanopterin/methanofuran-linked C1 transfer reactions argues for their presence in the common ancestor of bacteria and archaea. *Front Microbiol* 7(SEP): 1–5. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.01425>
- Chistoserdova L, Kalyuzhnaya MG (2018) Current Trends in Methylophilicity. *Trends Microbiol* xx:1–12. <https://doi.org/10.1016/j.tim.2018.01.011>
- Chivian D, Brodie EL, Alm EJ, Culley DE, Dehal PS, DeSantis TZ, Gihring TM, Lapidus A, Lin L-H, Lowry SR, Moser DP, Richardson PM, Southam G, Wanger G, Pratt LM, Andersen GL, Hazen TC, Brockman FJ, Arkin AP, Onstott TC (2008) Environmental genomics reveals a single-species ecosystem deep within earth. *Science* 322(5899):275–278. <https://doi.org/10.1126/science.1155495>
- Costa KC, Leigh JA (2014) Metabolic versatility in methanogens. *Curr Opin Biotechnol* 29(1):70–75. <https://doi.org/10.1016/j.copbio.2014.02.012>
- Drake HL, Göbner AS, Daniel SL (2008) Old acetogens, new light. *Ann N Y Acad Sci* 1125:100–128. <https://doi.org/10.1196/annals.1419.016>
- Drevland RM, Jia Y, Palmer DRJ, Graham DE (2008) Methanogen homoacnitase catalyzes both hydrolyase reactions in coenzyme B biosynthesis. *J Biol Chem* 283(43):28888–28896. <https://doi.org/10.1074/jbc.M802159200>
- Edgar RC (2004) MUSCLE: multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput. *Nucleic Acids Res* 32(5):1792–1797. <https://doi.org/10.1093/nar/gkh340>
- Evans PN, Parks DH, Chadwick GL, Robbins SJ, Orphan VJ, Golding SD, Tyson GW (2015) Methane metabolism in the archaeal phylum Bathyarchaeota revealed by genome-centric metagenomics. *Science* 350(6259):434–438. <https://doi.org/10.1126/science.aac7745>
- Ferry JG (1992) Methane from acetate. *J Bacteriol* 174(17):5489–5495. <https://doi.org/10.1128/jb.174.17.5489-5495.1992>
- Ferry JG (1993) Methanogenesis: ecology, physiology, biochemistry and genetics. Springer US, Boston. <https://doi.org/10.1007/978-1-4615-2391-8>
- Ferry JG (1997) Enzymology of the fermentation of acetate to methane by *Methanosarcina thermophila*. *Biofactors* (Oxford, England) 6(1):25–35. <https://doi.org/10.1002/biof.5520060104>
- Ferry JG (1999) Enzymology of one-carbon metabolism in methanogenic pathways. *FEMS Microbiol Rev* 23(1):13–38. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6976.1999.tb00390.x>
- Ferry JG (2010) How to make a living by exhaling methane. *Annu Rev Microbiol* 64:453–473. <https://doi.org/10.1146/annurev.micro.112408.134051>
- Finn RD, Clements J, Eddy SR (2011) HMMER web server: interactive sequence similarity searching. *Nucleic Acids Res* 39(Web Server issue):W29–W37. <https://doi.org/10.1093/nar/gkr367>
- Fischer JD, Holliday GL, Rahman SA, Thornton JM (2010) The structures and physicochemical properties of organic cofactors in biocatalysis. *J Mol Biol* 403(5):803–824. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2010.09.018>
- Fournier GP, Gogarten JP (2008) Evolution of acetoclastic methanogenesis in *Methanosarcina* via horizontal gene transfer from cellulolytic clostridia. *J Bacteriol* 190(3):1124–1127. <https://doi.org/10.1128/JB.01382-07>
- Fuchs G (2011) Alternative pathways of carbon dioxide fixation: insights into the early evolution of life? *Annu Rev Microbiol* 65(1):631–658. <https://doi.org/10.1146/annurev-micro-090110-102801>
- Gao B, Gupta RS (2007) Phylogenomic analysis of proteins that are distinctive of archaea and its main subgroups and the origin of methanogenesis. *BMC Genomics* 8:86. <https://doi.org/10.1186/1471-2164-8-86>
- Graham DE, White RH (2002) Elucidation of methanogenic coenzyme biosyntheses: from spectroscopy to genomics. *Nat Prod Rep* 19(2):133–147. <https://doi.org/10.1039/B103714P>
- Gribaldo S, Brochier-Armanet C (2006) The origin and evolution of archaea: a state of the art. *Philos Trans R Soc Lond Ser B Biol Sci* 361(1470):1007–1022. <https://doi.org/10.1098/rstb.2006.1841>

- He Y, Li M, Perumal V, Feng X, Fang J, Xie J, Sievert SM, Wang F (2016) Genomic and enzymatic evidence for acetogenesis among multiple lineages of the archaeal phylum Bathyarchaeota widespread in marine sediments. *Nat Microbiol* 1(6):16035. <https://doi.org/10.1038/nmicrobiol.2016.35>
- Hug LA, Baker BJ, Anantharaman K, Brown CT, Probst AJ, Castelle CJ, Butterfield CN, Hemsdorf AW, Amano Y, Ise K, Suzuki Y, Dudek N, Relman DA, Finstad KM, Amundson R, Thomas BC, Banfield JF (2016) A new view of the tree of life. *Nat Microbiol* 1(5):16048. <https://doi.org/10.1038/nmicrobiol.2016.48>
- Hügler M, Sievert SM (2011) Beyond the Calvin cycle: autotrophic carbon fixation in the ocean. *Annu Rev Mar Sci* 3:261–289. <https://doi.org/10.1146/annurev-marine-120709-142712>
- Jensen RA (1976) Enzyme recruitment in evolution of new function. *Annu Rev Microbiol* 30(1):409–425. <https://doi.org/10.1146/annurev.mi.30.100176.002205>
- Jetten MS, Stams AJ, Zehnder AJ (1989) Isolation and characterization of acetyl-coenzyme a synthetase from *Methanothrix soehngenii*. *J Bacteriol* 171(10):5430–5435. <https://doi.org/10.1128/jb.171.10.5430-5435.1989>
- Kanehisa M, Goto S, Sato Y, Kawashima M, Furumichi M, Tanabe M (2014) Data, information, knowledge and principle: Back to metabolism in KEGG. *Nucleic Acids Res* 42(D1):199–205. <https://doi.org/10.1093/nar/gkt1076>
- Kobashi N, Nishiyama M, Tanokura M (1999) Aspartate kinase-independent lysine synthesis in an extremely thermophilic bacterium, *Thermus thermophilus*: lysine is synthesized via alpha-amino adipic acid not via diaminopimelic acid. *J Bacteriol* 181(6):1713–1718
- Laso-Pérez R, Wegener G, Knittel K, Widdel F, Harding KJ, Krukenberg V, Meier DV, Richter M, Tegetmeyer HE, Riedel D, Richnow H-H, Adrian L, Reemtsma T, Lechtenfeld OJ, Musat F (2016) Thermophilic archaea activate butane via alkyl-coenzyme M formation. *Nature* 539(7629):396–401. <https://doi.org/10.1038/nature20152>
- Lessner DJ (2009) Methanogenesis biochemistry. In: eLS. John Wiley & Sons Ltd, Chichester. 1:1–11. <https://doi.org/10.1002/9780470015902.a0000573.pub2>
- Letunic I, Bork P (2016) Interactive tree of life (iTOL) v3: an online tool for the display and annotation of phylogenetic and other trees. *Nucleic Acids Res* 44(W1):W242–W245. <https://doi.org/10.1093/nar/gkw290>
- Lindahl PA, Chang B (2001) The evolution of acetyl-CoA synthase. *Orig Life Evol Biosph* 31(4–5):403–434. <https://doi.org/10.1023/A:1011809430237>
- Liu Y, Whitman WB (2008) Metabolic, phylogenetic, and ecological diversity of the methanogenic archaea. *Ann N Y Acad Sci* 1125(1):171–189. <https://doi.org/10.1196/annals.1419.019>
- Mall A, Sobotta J, Huber C, Tschirner C, Kowarschik S, Bačnik K, Mergelsberg M, Boll M, Hügler M, Eisenreich W, Berg IA (2018). Reversibility of citrate synthase allows autotrophic growth of a thermophilic bacterium. *Science* Feb 2;359(6375):563–567. doi: <https://doi.org/10.1126/science.aao2410>
- Markowitz VM, Chen I-MA, Palaniappan K, Chu K, Szeto E, Grechkin Y et al (2012) IMG: the integrated microbial genomes database and comparative analysis system. *Nucleic Acids Res* 40:D115–D122. <https://doi.org/10.1093/nar/gkr1044>
- Martin W, Russell MJ (2007) On the origin of biochemistry at an alkaline hydrothermal vent. *Philos Trans R Soc Lond Ser B Biol Sci* 362(1486):1887–1925. <https://doi.org/10.1098/rstb.2006.1881>
- Matschiavelli N, Oelgeschläger E, Cocchiariaro B, Finke J, Rother M (2012) Function and regulation of isoforms of carbon monoxide dehydrogenase/acetyl coenzyme a synthase in *Methanosarcina acetivorans*. *J Bacteriol* 194(19):5377–5387. <https://doi.org/10.1128/JB.00881-12>
- Minh BQ, Nguyen MAT, Von Haeseler A (2013) Ultrafast approximation for phylogenetic bootstrap. *Mol Biol Evol* 30(5):1188–1195. <https://doi.org/10.1093/molbev/mst024>
- Nguyen LT, Schmidt HA, Von Haeseler A, Minh BQ (2015) IQ-TREE: a fast and effective stochastic algorithm for estimating maximum-likelihood phylogenies. *Mol Biol Evol* 32(1):268–274. <https://doi.org/10.1093/molbev/msu300>
- Nitschke W, Russell MJ (2013) Beating the acetyl coenzyme A-pathway to the origin of life. *Phil Trans R Soc B* 368:20120258. <https://doi.org/10.1098/rstb.2012.0258>
- Nunoura T, Chikaraishi Y, Izaki R, Suwa T, Sato T, Harada T, Mori K, Kato Y, Miyazaki M, Shimamura S, Yanagawa K, Shuto A, Ohkouchi N, Fujita N, Takaki Y, Atomi H, Takai KA (2018). Primordial and reversible TCA cycle in a facultatively chemolithoautotrophic thermophile. *Science* Feb 2;359(6375):559–563. doi: <https://doi.org/10.1126/science.aao3407>
- Peretó J (2012) Out of fuzzy chemistry: from prebiotic chemistry to metabolic networks. *Chem Soc Rev* 41(16):5394–5403. <https://doi.org/10.1039/C2CS35054H>
- Peretó JG, Velasco AM, Becerra A, Lazcano A (1999) Comparative biochemistry of CO₂ fixation and the evolution of autotrophy. *Int Microbiol* 2(1):3–10
- Pruitt KD, Tatusova T, Maglott DR (2007) NCBI reference sequences (RefSeq): a curated non-redundant sequence database of genomes, transcripts and proteins. *Nucleic Acids Res* 35(SUPPL. 1):61–65. <https://doi.org/10.1093/nar/gkl842>
- Shin J, Song Y, Jeong Y, Cho BK (2016) Analysis of the Core genome and pan-genome of autotrophic Acetogenic Bacteria. *Front Microbiol* 7(Sep 28):1531. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.01531>
- Smith KS, Ingram-Smith C (2007) Methanosaeta, the forgotten methanogen? *Trends Microbiol* 15(4):150–155. <https://doi.org/10.1016/j.tim.2007.02.002>

- Sorokin DY, Makarova KS, Abbas B, Ferrer M, Golyshin PN, Galinski EA, Ciordia S, Mena MC, Merkel AY, Wolf YI, van Loosdrecht MCM, Koonin EV (2017) Discovery of extremely halophilic, methyl-reducing euryarchaea provides insights into the evolutionary origin of methanogenesis. *Nat Microbiol* 2:17081. <https://doi.org/10.1038/nmicrobiol.2017.81>
- Sousa FL, Martin WF (2014) Biochemical fossils of the ancient transition from geoenergetics to bioenergetics in prokaryotic one carbon compound metabolism. *BBA Bioenergetics* 1837(7):964–981. <https://doi.org/10.1016/j.bbabi.2014.02.001>
- Sousa FL, Thiergart T, Landan G, Nelson-Sathi S, Pereira I, Allen JF, Lane N, Martin WF (2013) Early bioenergetic evolution. *Philos Trans R Soc Lond Ser B Biol Sci* 368(1622):20130088. <https://doi.org/10.1098/rstb.2013.0088>
- Spang A, Caceres EF, Ettema TJG (2017) Genomic exploration of the diversity, ecology, and evolution of the archaeal domain of life. *Science* 357(6351):eaaf3883. <https://doi.org/10.1126/science.aaf3883>
- Timmers PHA, Welte CU, Koehorst JJ, Plugge CM, Jetten MSM, Stams AJM (2017) Reverse Methanogenesis and respiration in Methanotrophic archaea. *Archaea* 2017:1–22. <https://doi.org/10.1155/2017/1654237>
- Ueno Y, Yamada K, Yoshida N, Maruyama S, Isozaki Y (2006) Evidence from fluid inclusions for microbial methanogenesis in the early Archaean era. *Nature* 440(7083):516–519. <https://doi.org/10.1038/nature04584>
- Vanwonterghem I, Evans PN, Parks DH, Jensen PD, Woodcroft BJ, Hugenholtz P and Tyson GW (2016). Methylophilic methanogenesis discovered in the novel archaeal phylum Verstraetearchaeota. *Nature* (October):1–9. <https://doi.org/10.1038/nmicrobiol.2016.170>
- Weiss MC, Sousa FL, Mújicavac N, Neukirchen S, Roettger M, Nelson-Sathi S, Martin WF (2016) The physiology and habitat of the last universal common ancestor. *Nat Microbiol* 1(9):1–8. <https://doi.org/10.1038/nmicrobiol.2016.116>
- Whitman WB, Bowen TL and Boone DR (2006). The methanogenic Bacteria. In M Dworkin, S Falkow, E Rosenberg, K-H Schleifer and E Stackebrandt (Eds.) *The prokaryotes volume 3: archaea, Bacteria: Firmicutes, Actinomycetes* (pp. 165–207). Springer New York. https://doi.org/10.1007/0-387-30743-5_9
- Williams TA, Szöllösi GJ, Spang A, Foster PG, Heaps SE, Boussau B, Ettema TJG, Embley TM (2017) Integrative modeling of gene and genome evolution roots the archaeal tree of life. *Proc Natl Acad Sci U S A* 114(23):E4602–E4611. <https://doi.org/10.1073/pnas.1618463114>
- Wolfe JM, Fournier GP (2018) Horizontal gene transfer constrains the timing of methanogen evolution. *Nat Ecol Evol* 2(5):897–903. <https://doi.org/10.1038/s41559-018-0513-7>
- Woodcroft BJ, Boyd JA, Tyson GW (2016) OrfM: a fast open reading frame predictor for metagenomic data. *Bioinformatics* 32(17):2702–2703. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btw241>
- Ycas M (1974) On earlier states of the biochemical system. *J Theor Biol* 44(1):145–160. [https://doi.org/10.1016/S0022-5193\(74\)80035-4](https://doi.org/10.1016/S0022-5193(74)80035-4)
- Zheng K, Ngo PD, Owens VL, Yang X, Mansoorabadi SO (2016) The biosynthetic pathway of coenzyme F430 in methanogenic and methanotrophic archaea. *Science* 354(6310):339–342. <https://doi.org/10.1126/science.aag2947>
- Zheng Y, Harris DF, Yu Z, Fu Y, Poudel S, Ledbetter RN, Fixen KR, Yang ZY, Boyd ES, Lidstrom ME, Seefeldt LC, Harwood CS (2018). A pathway for biological methane production using bacterial iron-only nitrogenase. *Nat Microbiol* 3(3):281–286. doi: <https://doi.org/10.1038/s41564-017-0091-5>

Affiliations

Israel Muñoz-Velasco^{1,2} • Carlos García-Ferris^{3,4} • Ricardo Hernandez-Morales¹ • Antonio Lazcano^{1,5} • Juli Peretó^{3,4} • Arturo Becerra¹

¹ Facultad de Ciencias, Universidad Nacional Autónoma de México, Apdo. Postal 70-407 Cd. Universitaria, 04510 Ciudad de México, Mexico

² Posgrado en Ciencias Biológicas, Unidad de Posgrado, Edificio A, 1° Piso, Circuito de Posgrados, Ciudad Universitaria, Coyoacán, C.P., 04510 Ciudad de México, Mexico

³ Departament de Bioquímica i Biologia Molecular, Universitat de València, Apartat Postal 22085, 46071 València, Spain

⁴ Institute for Integrative Systems Biology, (I2SysBio, Universitat de València-CSIC), Apartat Postal 22085, 46071 València, Spain

⁵ Miembro de El Colegio Nacional, El Colegio Nacional, Donceles 104, Centro Histórico, 06020 Ciudad de México, Mexico

VI. Artículos aceptados o publicados y/o manuscritos de artículos donde el alumno es autor o coautor

A la fecha se han enviado al menos tres artículos para su publicación en revistas indexadas y de carácter internacional, en donde se participa de manera directa como coautor, se tienen otros tres artículos en desarrollo y que pronto serán enviados para su publicación. De los artículos ya enviados, uno de ellos tiene que ver directamente con el tema principal del doctorado y se encuentra en la sección de anexos de este documento. Los otros dos tienen que ver con temas relacionados con otra línea de investigación que se manejan en nuestro laboratorio, el de origen y evolución de virus, en estos artículos, se buscan proponer moléculas que pudieran ayudar a la inhibición del virus SARS-Cov2, dichos artículos ya se encuentran disponibles en la web a manera de pre-prints, el primero se titula “SARS-CoV-2 Exoribonuclease (NSP14) As a Potential Therapeutic Target to Treat COVID-19” y se encuentra disponible en la siguiente liga electrónica (https://papers.ssrn.com/sol3/papers.cfm?abstract_id=3632018), el segundo artículo se titula “A Note on the Potential Clinical Use of Sofosbuvir to Treat COVID-19: The Importance of Protease Inhibitors”, éste se encuentra disponible para su lectura en la siguiente liga electrónica https://papers.ssrn.com/sol3/papers.cfm?abstract_id=3653571; Cabe destacar que aunque ambos artículos fueron publicados primero como pre-prints, actualmente se encuentran en carácter de enviados a otras revistas, pendientes de revisión.

VII. Discusión general y Conclusiones

VII.1 ¿Qué se sabe después de nuestro trabajo?

La evolución metabólica desde una perspectiva de origen de la vida es un tema que constantemente tiene nuevas aportaciones, con trabajos publicados en revistas importantes. Específicamente el metabolismo de la metanogénesis es una propuesta muy atractiva para aquellos que piensan que fue uno de los primeros metabolismos en surgir, por lo que los esfuerzos se han concentrado en tratar de demostrar que este metabolismo, único de organismos pertenecientes del dominio Archaea, específicamente al Phylum Euryarchaeota, tiene una distribución más amplia de lo que antes pensábamos. Sin embargo en los párrafos siguientes detallaré los inconvenientes de dichas propuestas, así como sus posibles explicaciones.

Con nuestro trabajo pudimos darnos cuenta que, a pesar de que gran parte de las enzimas que participan en la primer parte de la metanogénesis hidrogenotrófica están compartidas con la llamada rama metilo de la ruta de W-L arqueana, muchas de estas enzimas se encuentran ausentes en la

mayoría de los linajes arqueanos que no tienen habilidades de producción de metano por esta variante de la metanogénesis (Figura 3, del artículo principal). Por lo anterior, nuestro grupo de trabajo no apoya la idea de que el último ancestro en común del dominio Archaea (LACA) fuera metanógeno (Muñoz-Velasco *et al.* 2019), tal como afirman otros autores (Martin y Russell, 2007; Sousa *et al.*, 2013; Weiss *et al.* 2016).

Los resultados sugieren que la metanogénesis debió surgir antes de la divergencia del Phylum Euryarchaeota (Baptiste *et al.* 2005), tal como se detalla en la figura 3A. Si bien hubo pérdidas de este metabolismo, fue en algunos organismos pertenecientes a Euryarchaeota y no en los otros Phyla arqueanos, de los cuales no encontramos toda la maquinaria enzimática necesaria para llevar a cabo ni metanogénesis, ni fijación de carbono por medio de W-L (Muñoz-Velasco *et al.*, 2019). Los descubrimientos de organismos metanógenos estrechamente relacionados con la clase Halobacteriales (Sorokin *et al.*, 2017) apoyan la idea de la pérdida de la metanogénesis en organismos dentro del Phylum Euryarchaeota, una idea que ya se había propuesto para el orden Archaeoglobales (Baptiste *et al.*, 2005) y para el orden Halobacteriales (Nelson-Sathi *et al.*, 2012). También pudimos darnos cuenta que mientras que, los Archaeoglobales retienen casi completamente la rama metilo de WL (Muñoz-Velasco *et al.*, 2019, Borrel *et al.*, 2016). Parece ser que los Halobacteriales tuvieron múltiples pérdidas a lo largo de su historia evolutiva (Nelson-Sathi *et al.*, 2012), y con esto, perdieron casi por completo las enzimas de la ruta de fijación autotrófica de W-L arqueano (Muñoz-Velasco *et al.*, 2019), probablemente debido a la transferencia horizontal de genes de organismos metanógenos hacía los Phyla de reciente descubrimiento y a la posible adquisición de genes para un estilo de vida aerobio heterotrófico (Sorokin *et al.*, 2017). Adicionalmente, aún no se descarta la posibilidad de una transferencia horizontal hacia los nuevos Phyla Bathyarchaeota y Verstraetearchaeota, lo cual explicaría la presencia de enzimas claves de la metanogénesis en estos Phyla (Spang *et al.*, 2017; Evans *et al.*, 2019; Muñoz-Velasco *et al.*, 2019). También se ha observado que homólogos de algunas de las enzimas clave en la producción de metano ó metanogénesis (p. ej. Mcr, número EC 2.8.4.1) pueden estar participando en el aprovechamiento de otros compuestos, como es la oxidación de metano (Hallam *et al.*, 2003; Nauhaus *et al.*, 2005), la oxidación de butano (Laso-Pérez *et al.*, 2016) y la oxidación de etano (Chen *et al.*, 2019).

VII.2 Oxidación de metano

Otra posibilidad es que las enzimas de la metanogénesis que se han encontrado en linajes fuera del Phylum Euryarchaeota hayan pasado por un proceso de neofuncionalización y que ahora sean capaces de llevar a la cabo oxidación de metano o “metanogénesis reversa”. En la oxidación

anaeróbica del metano, se oxidan moléculas de metano y como producto final se obtienen moléculas de CO₂, esto se da mediante una serie de pasos metabólicos que funcionan en sentido contrario a la metanogénesis, de ahí que se le denomine también “metanogénesis reversa” (Timmers *et al.*, 2017). Se conocen al menos tres tipos de metano oxidación anaeróbica, las denominadas oxidación anaeróbica de metano dependiente de nitrato (Nitrate-Dependent Anaerobic Methane Oxidation), la dependiente de sulfato (Sulfate-Dependent Anaerobic Methane Oxidation) y la dependiente de iones metálicos (Metal ion (Mn⁴⁺ y Fe³⁺)-Dependent Methane Oxidation), denominadas también N- S- y M-DAMO respectivamente (Cui *et al.*, 2014). Cabe destacar que la oxidación anaeróbica del metano es un metabolismo exclusivo de organismos pertenecientes al dominio Archaea (Timers *et al.*, 2016), ya que si bien existe la contraparte aeróbica del proceso (oxidación aeróbica de metano AOM, por sus siglas en inglés), ésta se encuentra restringida a organismos pertenecientes al dominio Bacteria (principalmente en Gammaproteobacteria, Alphaproteobacteria y Verrucomicrobia) y es realizada por otro tipo de enzimas no relacionadas con la metanogénesis o con la metano oxidación. Dichas enzimas son de la clase monooxigenasas, de las cuales en el proceso de metano oxidación aeróbica se han descrito dos: la monooxigenasa particulada (pMMO), asociada a la pared celular; y la soluble (sMMO), disponible en el citosol (Ross y Rosenzweig, 2017). También recientemente, se han descrito bacterias “anaerobias” oxidativas de metano o N-DAMO. Sin embargo, estos organismos (Candidatus *Methyloirabilis*) generan O₂ intracelular por la dismutación de dos moléculas de NO, y con ello oxidan en CH₄, empleando enzimas de tipo pMMO (Raghoebarsing *et al.* 2006; Han and Gu, 2013).

Sabemos que los organismos que llevan a cabo la oxidación anaeróbica del metano están estrechamente relacionados con organismos metanógenos y todos sin excepción pertenecen al dominio Archaea. Éstos se han podido clasificar como: ANME (Anaerobic Methane-Oxidizing Archaea) grupo I, relacionados con *Metanomicrobiales* y *Metanosarcinales*; ANME grupo II, relacionados con miembros del orden *Metanomicrobiales* que han sido cultivados y finalmente ANME grupo III, relacionados con *Metanococales* (Timmers *et al.*, 2016; McGlynn, 2017). Por todo lo anterior descrito, no se puede descartar que tanto *Batyarchaeotha* como *Verstraetearchaeota* pudieran estar realizando oxidación de metano en lugar de metanogénesis. Otras evidencias muestran que la presencia de una Metil Coenzima M Reductasa (MCR, enzima clave de la metanogénesis) en una *Archaeoglobi* (*Euryarchaeota*), parece ser muy divergente y también parece que se asemeja más a las Metil Coenzimas M reductasas encontradas en *Batyarchaeota*, en *Ca. Methanomethyliaceae* (antes *Verstraetearchaeota*) y *Syntrophoarchaeum*. Esto aporta un poco más a la idea de que la MCR no solo se ha transferido de manera vertical sino también de manera horizontal (Boyd *et al.*, 2019) y

que pudiera estar participando en procesos metabólicos distintos al de la metanogénesis (Evans *et al.*, 2019). Por esta razón, no podemos descartar que más adelante se encuentren enzimas relacionadas con el proceso de metanogénesis en organismos fuera de Euryarchaeota, mismos que sean capaces de realizar la oxidación de metano o algún otro hidrocarburo (Figura 4).

VII.3 Producción de metano fuera del dominio Archaea

Adicionalmente a lo antes discutido, se han encontrado cada vez más organismos, fuera del dominio Archaea, capaces de sintetizar metano por medio de rutas metabólicas que aún no han sido descritas, rutas metabólicas que pudieran ser distintas a las descritas para la producción de metano (metanogénesis) convencional, también llamadas “rutas clásicas”. Entre los organismos capaces de sintetizar metano por estas formas no convencionales se encuentran plantas, hongos e incluso algunos animales (Liu *et al.*, 2015). En algunos de estos organismos, la producción de metano se da como respuesta a factores de estrés ambiental y en presencia de oxígeno, lo cual sería imposible por medio de las rutas clásicas, debido a la alta sensibilidad al oxígeno por parte de las enzimas clave (Baptiste *et al.*, 2005). En otros organismos la producción de metano parece actuar influenciando diversos efectos citoprotectores (Boros y Keppler, 2019) asociados a la regulación por medio de reacciones de oxidorreducción dentro del ambiente celular; sin embargo falta mucho por estudiar en este sentido. También se ha observado que algunas algas de agua dulce pueden producir cantidades de metano significativas, esto en presencia de oxígeno y en presencia y ausencia de luz, un proceso que puede ser más común de lo que antes pensábamos (Klintzsch *et al.* 2019; Hartmann *et al.* 2020).

Recientemente, se ha descubierto que también algunas cianobacterias pueden producir metano y que probablemente esta producción puede estar relacionada a la desmetilación de metil fosfonatos (Bižić *et al.* 2020). Estos descubrimientos ponen en evidencia que, si bien la producción de metano la asociamos a organismos pertenecientes al dominio Archaea, ésta no es exclusiva de dicho dominio, ni exclusiva de ambientes anoxigénicos. No obstante, los mecanismos por los cuales se produce metano en organismos que no pertenecen a los metanógenos clásicos, no tienen ninguna relación evolutiva con los descritos en nuestro trabajo y parecen ser innovaciones metabólicas muy recientes en un contexto de origen de la vida.

VII.4 Otras rutas autotróficas de fijación de carbono. El caso del ciclo reverso del ácido tricarbóxico o rTCA

Adicionalmente al estudio de la metanogénesis, sus variantes y la ruta reductiva de la Acetil Coenzima A, decidimos estudiar el ciclo reverso del ácido tricarbóxico. Por varias razones y como se

expondrá a continuación, este metabolismo también ha sido propuesto como uno de los primeros metabolismos en surgir (Figura 2b) y probablemente pudo estar dentro de las habilidades metabólicas del último ancestro en común.

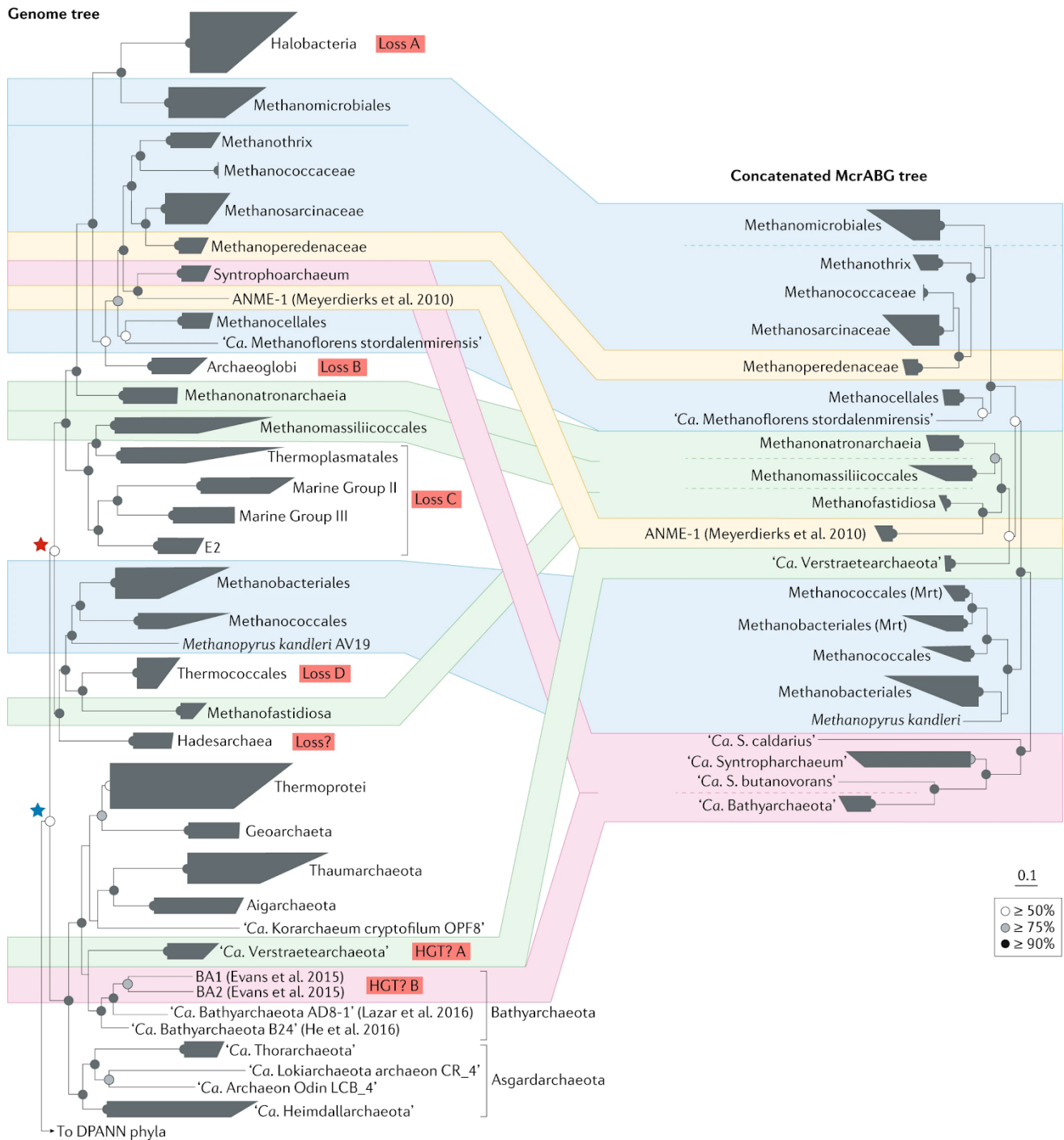


Figura 4. Imagen tomada y modificada de Evans *et al.*, 2019, en donde se muestra la historia evolutiva que pudieron tener las enzimas claves relacionadas al proceso metabólico de la metanogénesis, lo que involucra transferencias verticales, horizontales o incluso pérdidas parciales o totales de dichas enzimas.

El ciclo reverso del ácido tricarbóxico (rTCA, por sus siglas en inglés) o ciclo de Arnon-Buchanan, es uno de los siete metabolismos autotróficos de fijación carbono (Figura 5) descritos a la fecha (Berg *et al.*, 2010, Hügler y Sievert, 2011, Fuch 2011, Sánchez-Andrea *et al.*, 2020). El rTCA fue descrito y caracterizado por primera vez en la bacteria verde sulfurosa *Clorobium limicola* (Evans *et al.*, 1966), y posteriormente fue descrito en otros grupos bacterianos (Shiba *et al.*, 1985; Sehauder *et al.*, 1987). Aunque se propuso que también se encontraba presente en organismos pertenecientes al dominio Archaea (Schäfer *et al.*, 1986), solo se ha corroborado su presencia en miembros pertenecientes al dominio Bacteria, en donde se encuentra distribuido en miembros de los Phyla Chlorobiaceae, Alpha-, Delta- and Epsilonproteobacteria, Nitrospirae y Aquificales pero no en miembros del dominio Archaea (Hügler y Sievert, 2011). Las mayoría de las enzimas que participan en el ciclo reverso del ácido tricarbóxico, también participan en otros metabolismos autotróficos de fijación de carbono (Figura 5), o bien también tienen la capacidad de catalizar reacciones en ambos sentidos, en el sentido oxidativo y en el sentido reductor (Mall *et al.*, 2018; Nunoura *et al.*, 2018). Por lo que también participan en metabolismos no autotróficos. La mayoría de las enzimas del rTCA están compartidas con el ciclo del ácido cítrico que funciona en el sentido oxidativo (Kitadai *et al.*, 2017).

Sabemos que existen dos variantes de este ciclo, denominadas ciclo reverso del ácido tricarbóxico I (<https://metacyc.org/META/NEW-IMAGE?type=PATHWAY&object=P23-PWY>) y la variante II (<https://metacyc.org/META/NEW-IMAGE?type=PATHWAY&object=PWY-5392>). Una de las principales diferencias entre ambas es la conversión de citrato a oxalacetato, en donde se forma también acetil coenzima A, uno de los metabolitos más importantes en una gran mayoría de metabolismos (Shi y Tu, 2015). En una de las variantes del rTCA, la reacción que forma acetil CoA y oxalacetato es llevada a cabo en único paso enzimático por la enzima ATP citrato liasa EC 2.3.3.8 (Figura 6), la cual tiene dos subunidades, denominadas subunidad alfa y subunidad beta. En la segunda variante del rTCA intervienen dos pasos enzimáticos en esta interconversión de citrato a oxalacetato y acetil CoA, las enzimas involucradas son la citril CoA sintetasa E.C.: 6.2.1.18 y la citril CoA liasa EC 4.1.3.34 (Figura 6). Otra diferencia entre las dos variantes del rTCA es la conversión de 2 oxoglutarato a isocitrato, en la primera variante del rTCA interviene solo un paso enzimático, la enzima responsable es la isocitrato deshidrogenasa: mientras que en la segunda variante, la conversión de 2-oxoglutarato a isocitrato es llevada a cabo mediante dos pasos enzimáticos, los cuales están a cargo de las enzimas 2-oxoglutarato carboxilasa EC 6.4.1.7 y la enzima oxalosuccinato reductasa.

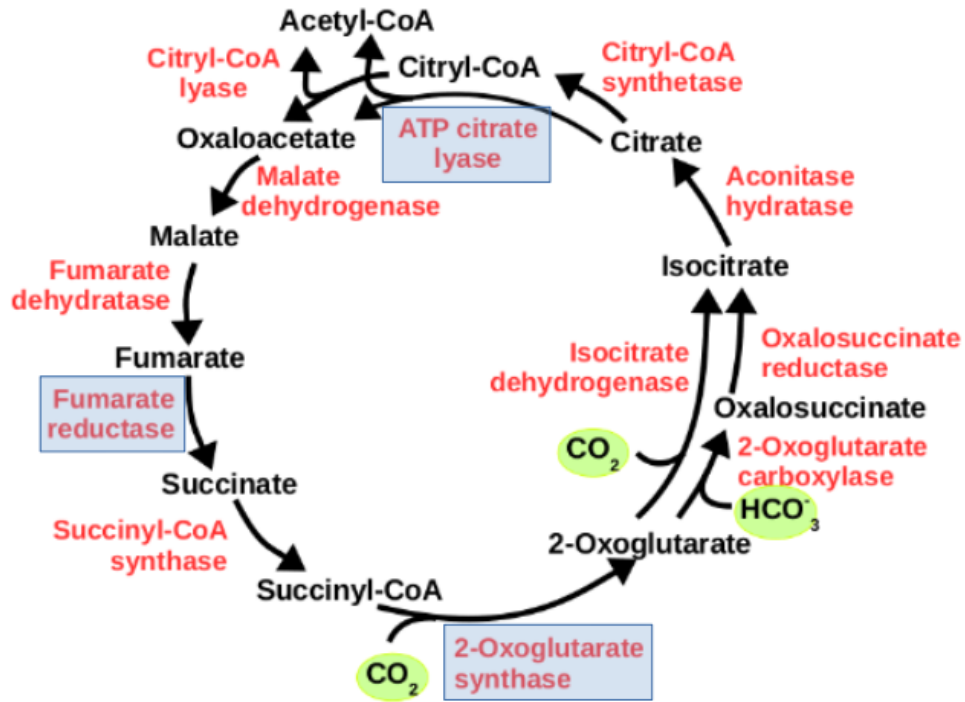


Figura 6. Ciclo reverso del ácido tricarboxílico. En una de las variantes, la interconversión de 2-oxoglutarato a isocitrato y la de citrato a oxaloacetato se lleva a cabo en un paso metabólico cada una, mientras que en la segunda variante cada una de estas interconversiones son llevadas a cabo en dos pasos metabólicos. tomada y modificada de Hügler y Sievert, 2011.

Como ya se mencionó anteriormente, algunos de los argumentos para proponer al ciclo reductor del ácido tricarboxílico (rTCA) como una de las rutas metabólicas más antiguas, son que dicho metabolismo se encuentra presente en linajes de bacterias, estrictamente anaerobias o microaerófilas, de muy temprana divergencia y pertenecientes al Phylum Aquificales (Evans *et al.*, 1966). También se pensaba que estaba presente en algunos miembros, de temprana divergencia, pertenecientes al dominio Archaea (p. ej. *Thermoproteus neutrophilus*; Schäfer *et al.*, 1986). Hasta ahora sabemos que este metabolismo se encuentra en miembros de Chlorobiaceae, Alfa-, Delta- y Epsilonproteobacteria, así como algunos representantes en Nitrospirae (Tabla 2 y Figura 7). Otras aproximaciones que aportan a la idea de que este metabolismo es uno de los más antiguos es la reconstrucción “teórica e hipotética” de un ciclo precursor primitivo que no requiere de enzimas (Keller *et al.*, 2014; 2016; 2017; Messner *et al.*, 2017, Muchowska *et al.*, 2017; 2019; 2019). Ésta es una idea que ha tomado gran relevancia y en la que se han propuesto una serie de metabolismos autotróficos que no requieren la intervención de catalizadores biológicos; en lugar de ellos se ha propuesto que

algunos compuestos como iones metálicos, pudieran estar catalizando las reacciones necesarias (Muchowska *et al.*, 2017; 2019).

Tabla 2. Organismos que se sabe son capaces de llevar a cabo la ruta reductiva del ácido tricarboxílico.

Especie	Phylum	Dominio	Metabolismo de fijación de carbono
<i>Chlorobium limicola</i>	Chlorobi	Bacteria	rTCA
<i>Chlorobaculum tepidum</i>	Chlorobi	Bacteria	rTCA
<i>Hydrogenobacter thermophilus</i>	Aquificales	Bacteria	rTCA
	Chlorobiales	Bacteria	rTCA
	Epsilonproteobacteria	Bacteria	rTCA
<i>Magnetococcus sp. MC-1</i>	Alphaproteobacterium	Bacteria	rTCA
<i>Desulfobacter hydrogenophilus</i>	Deltaproteobacteria	Bacteria	rTCA
<i>Candidatus Endoriftia persephone</i>	Gammaproteobacteria	Bacteria	rTCA
<i>Leptospirillum sp.</i>	Nitrospirae	Bacteria	rTCA
<i>Candidatus Nitrospira defluvii</i>	Nitrospirae	Bacteria	rTCA

Otras ideas argumentan a favor de la combinación del metabolismo de Wood-Ljungdahl y de una versión incompleta del ciclo reverso del ácido tricarboxílico (horseshoe) para la formación de compuestos celulares en los primeros microorganismos, tal vez dándose en un ambiente muy parecido a un sistema hidrotermal actual (Preiner *et al.*, 2019). Sin embargo los trabajos antes mencionados nos muestran un panorama incompleto y desde una perspectiva de la química prebiótica, pero no explican ni la distribución actual, ni la evolución de dichos metabolismos.

Por tanto, no sabemos qué tan antiguos son los metabolismos de fijación de carbono y cómo éstos pudieron haber evolucionado, por lo que si se busca en los genomas de organismos actuales (con una perspectiva **Top Down**), podríamos tener algunas pistas acerca de la evolución de dichos metabolismos. En este sentido, el análisis evolutivo de las enzimas del ciclo reverso del ácido tricarboxílico que no se comparten con otros metabolismos, podría ser clave para tratar de explicar algunas de las habilidades metabólicas presentes en el último ancestro en común de todos los organismos.

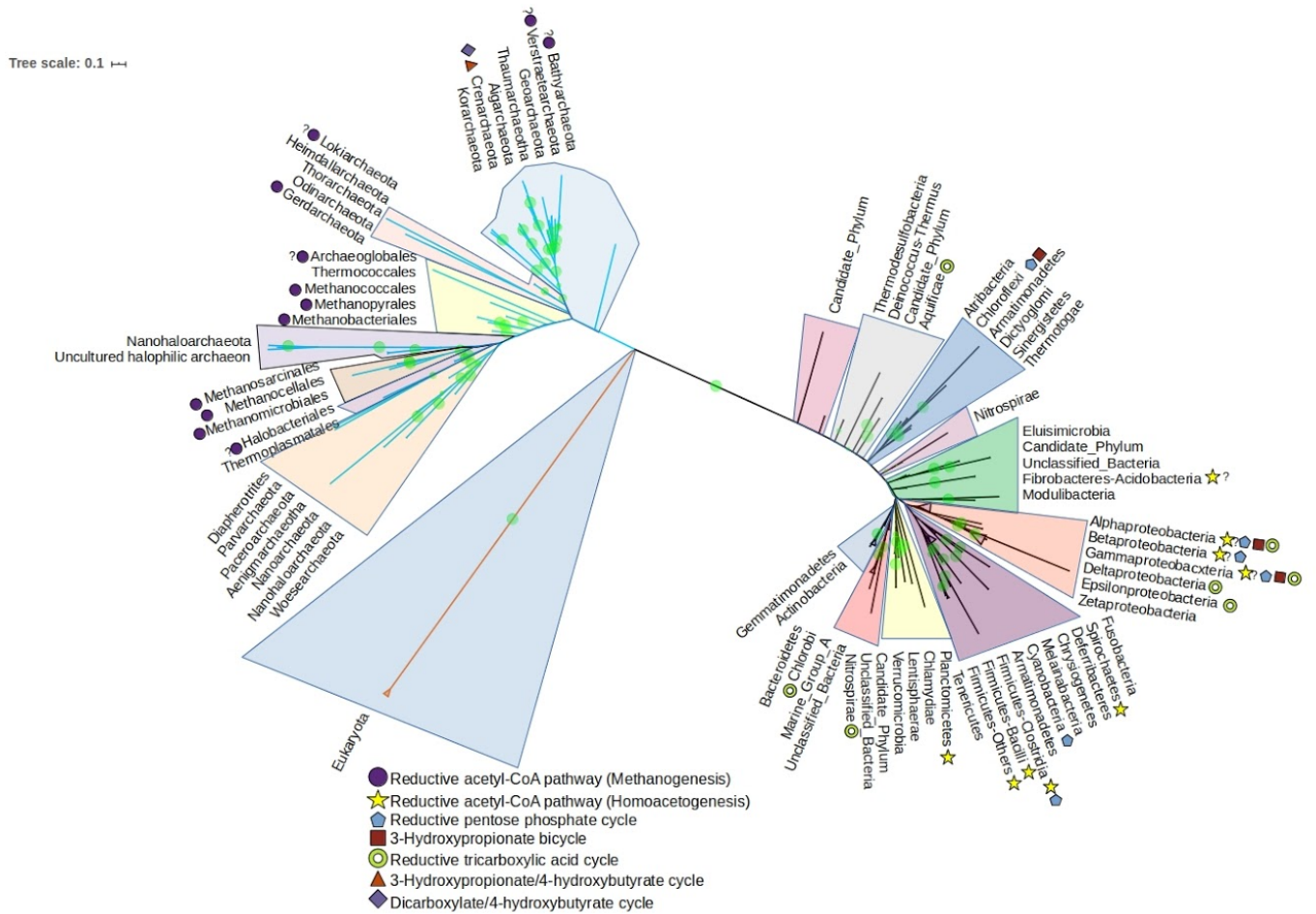


Figura 7. Distribución de los metabolismos autótrofos de fijación de carbono en los distintos grupos arqueanos y bacterianos.

Se han realizado trabajos tratando de explicar la historia evolutiva de algunas enzimas clave de la ruta reductiva del ácido tricarboxílico y su contraparte aerobia, el ciclo de Krebs, en los cuales se ha podido detallar cómo las duplicaciones génicas y procesos de neofuncionalización, pudieron haber dado lugar al ciclo de Krebs a partir del ciclo reductor del ácido tricarboxílico (Aoshima, 2007). Aoshima detalla cómo por medio de la comparación de secuencias homólogas se puede proponer una historia evolutiva hipotética. En dicha hipótesis la enzima citril CoA sintetasa (CCS, por sus siglas en inglés) pudo haber dado origen a la enzima succinil CoA sintetasa (SCS) por medio de una duplicación génica y una posterior neofuncionalización. Mientras que, un segundo evento de duplicación y neofuncionalización pudo haber dado origen a la enzima citril CoA liasa (CCL) a partir de la succinil CoA sintetasa (SCS). A su vez, un nuevo evento de duplicación génica de la citril CoA liasa, pudo haber originado a la citrato sintetasa (CS). Finalmente, bajo este modelo, dos eventos de

fusión génica pudieron haber dado origen a la enzima ATP citrato liasa (ACL) a partir de las enzimas anteriores (Figura 8a). Esta idea también puede ser representada gráficamente como un diagrama de flujo evolutivo (Figura 8b).

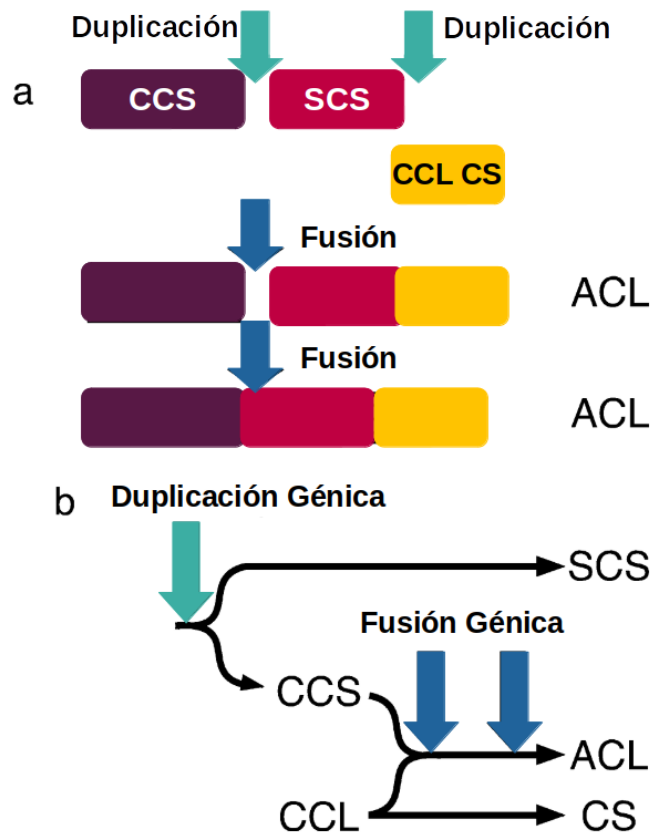


Figura 8. a. Historia evolutiva hipotética de algunas enzimas del ciclo reverso del ácido tricarbóxico y del ciclo de Krebs. b. Diagrama de flujo evolutivo de las mismas enzimas. Tomada y modificada de Aoshima 2007.

Bajo la visión del trabajo de Aoshima de 2007, nos propusimos revisar la historia evolutiva de las mismas enzimas que él analizó. La propuesta se basa en una perspectiva de análisis de redes filogenéticas, que están basadas en relaciones evolutivas, específicamente en relaciones de homología de secuencias, y en distancias y agrupaciones basadas en parámetros como el porcentaje de identidad entre secuencias (Figura 9). Hasta el momento, nuestros resultados preliminares nos permiten proponer, que si bien, se mantienen algunas relaciones evolutivas (reflejadas en la estructura y agrupaciones formadas en las redes filogenéticas) propuestas por Aoshima, otras parecen tener una historia evolutiva distinta a su propuesta reflejada en la Figura 8. Lo anterior podría cambiar la visión del surgimiento del ciclo de Krebs a partir del ciclo reverso del ácido tricarbóxico y nos obliga a revisar nuevamente el esquema evolutivo propuesto y tal vez a reescribir dicho esquema, basados en los nuevos resultados obtenidos. Este trabajo, sobre el análisis evolutivo del

ciclo reverso del ácido tricarboxílico y de algunos componentes del ciclo de Krebs sigue en proceso, como un proyecto derivado del doctorado detallado en este documento.

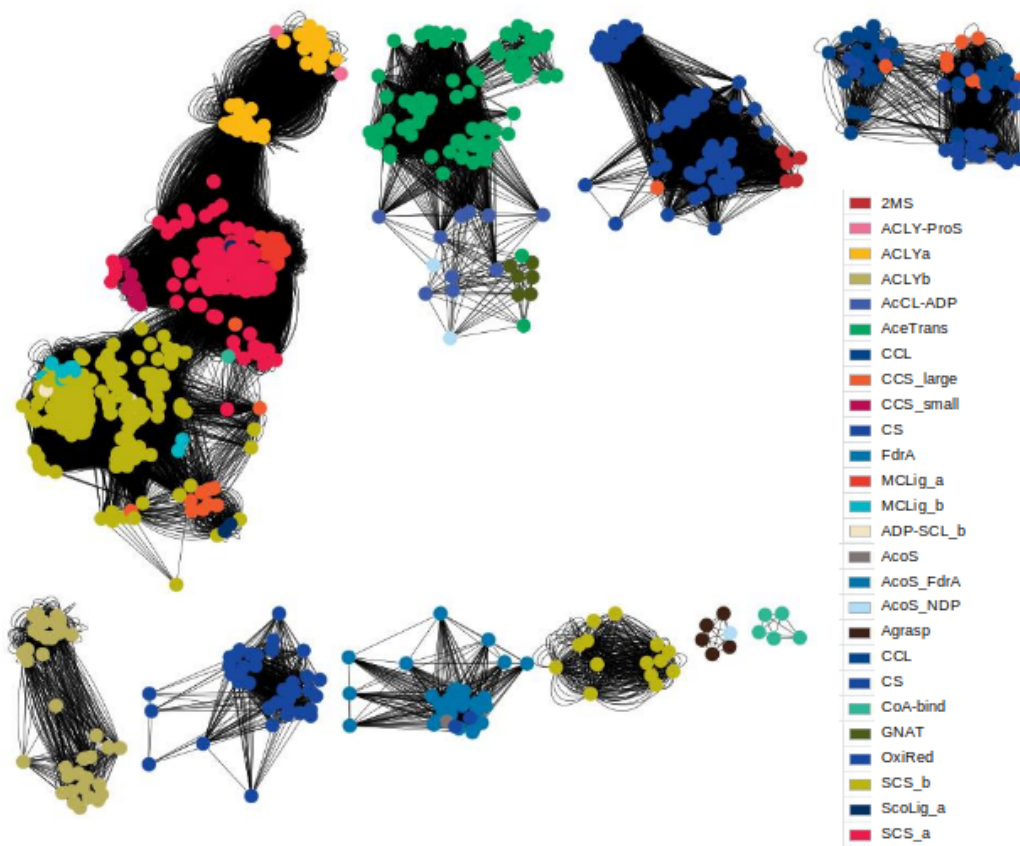


Figura 9. Redes filogenéticas que involucran a las enzimas descritas en Aoshima 2007, a partir de las cuales se pueden inferir las relaciones evolutivas de las enzimas del rTCA, del ciclo de Krebs y de otras enzimas no relacionadas ni con el ciclo de Krebs, ni con el ciclo reverso del ácido tricarboxílico.

Los análisis basados en la superposición de estructuras tridimensionales de las enzimas participantes en el rTCA y el ciclo de Krebs, apoyan algunas de las ideas de duplicación y fusión génica propuestos por Aoshima, en donde pareciera que la ATP citrato liasa surge de la fusión de un módulo tetramérico de citril CoA sintetasas y de otros elementos como hélices alfa y oquillas beta, elementos estructurales colocados en posiciones muy específicas (Verschuere *et al.*, 2019), este trabajo también apoya la hipótesis del surgimiento del ciclo de Krebs a partir del ciclo reverso del ácido tricarboxílico, ya que bajo este esquema evolutivo, pareciera que una de las enzimas principales del ciclo reverso, tiene claramente un origen en uno de los géneros de temprana divergencia del dominio Bacteria, el género Aquificae (Figura 10). Algo que, a nuestro parecer, y a luz de nuestros resultados parece ser difícil de explicar.

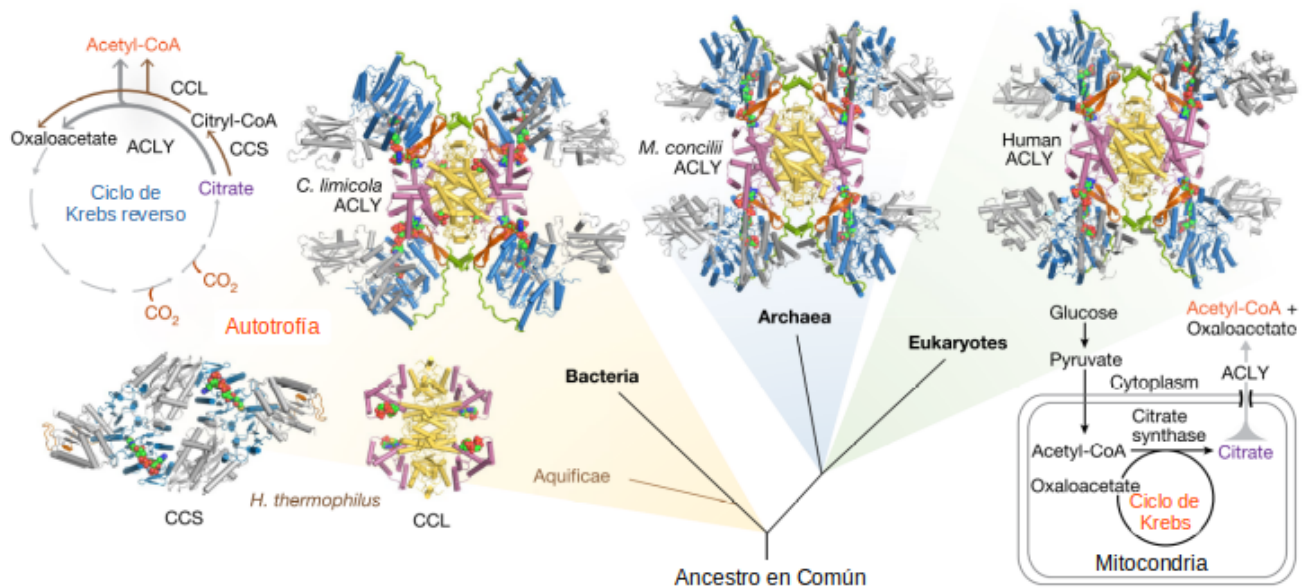


Figura 10. Esquema evolutivo propuesto por Verschueren y colaboradores, en donde se detalla el origen del ciclo de Krebs a partir del ciclo reverso del ácido tricarboxílico. (Imagen tomada y modificada de Verschueren et al., 2019).

VII. 5 LUCA y los metabolismos autotróficos de fijación de carbono

El análisis evolutivo de cada una de las variantes del metabolismos de la metanogénesis, y al parecer también el del ciclo reverso del ácido tricarboxílico, realizados durante este proyecto de doctorado, nos permiten rechazar la idea de que LUCA tuviera habilidades metabólicas de autotrofia, como se ha intentado explicar desde el descubrimiento de ambientes de manantiales hidrotermales, mismos que, según algunos autores, pudieran semejar las características de un ambiente prebiótico (Wächtershäuser, 1988; Sousa et al., 2013; Martin et al., 2016; Weiss et al., 2016). Esto es debido a que no encontramos evidencia de que alguno de los metabolismos estudiados, se encontrara en el repertorio metabólico del último ancestro en común (Muñoz-Velasco et al., 2019; Muñoz-Velasco et al., 2020 in prep).

En el caso del metabolismo de la metanogénesis, si bien parece ser un metabolismo muy antiguo, incluso si nos basamos en evidencia fósil (Ueno et al., 2009), no podemos rastrear su origen hasta el último ancestro en común, sino hasta el último ancestro del Phylum Euryarchaeota, que es el Phylum al cual pertenecen todos los organismos descritos a la fecha capaces de realizar estos metabolismos (Baptiste et al., 2005; Gribaldo y Brochier-Armanet, 2006). A pesar de que algunas de las enzimas que participan en la primer parte de la metanogénesis hidrogenotrófica, están compartidas con la llamada rama metilo de la ruta de Wood-Ljungdahl específica de arqueas (Sousa

et al., 2013), muchas de estas enzimas se encuentran ausentes en la mayoría de los linajes arqueanos que no tienen habilidades de producción de metano, por lo que nuestro grupo de trabajo no apoya la idea de que el último ancestro en común arqueano realizara algún metabolismo de producción de metano metanógeno (Muñoz-Velasco *et al.*, 2019); mucho menos que el último ancestro en común de todos los organismos lo hiciera. Nuestros resultados sugieren que la metanogénesis debió surgir antes de la divergencia del Phylum Euryarchaeota. Si bien hubo pérdidas de este metabolismo, fueron en algunos organismos pertenecientes al Phylum Euryarchaeota y no en los otros Phyla arqueanos, como algunos autores piensan (Borrel *et al.*, 2016). En los otros Phylum pertenecientes al dominio Archaea no encontramos toda la maquinaria enzimática necesaria para llevar a cabo ni metanogénesis, ni fijación de carbono por medio de la ruta de Wood-Ljungdahl (Muñoz-Velasco *et al.*, 2019).

Aunado a lo anterior, y como se detalló anteriormente, los descubrimientos de Sorokin y colaboradores, en donde se encuentran organismos capaces de sintetizar metano y que están relacionados con la clase Halobacteriales (Sorokin *et al.*, 2017) apoyan la idea de que hubo pérdidas de este metabolismo en organismos pertenecientes al Phylum Euryarchaeota, ésta idea ya había sido propuesto para otros dos órdenes, para los Archaeoglobales (Baptiste *et al.*, 2005) y para el orden de los Halobacteriales (Nelson-Sathi *et al.*, 2012). Se observó que los organismos pertenecientes al orden Archaeoglobales tienen en su genoma, casi en su totalidad a la rama metilo de la ruta de Wood-Ljungdahl (Borrel *et al.*, 2016, Muñoz-Velasco *et al.*, 2019), por lo que pareciera que los organismos pertenecientes al orden de los Halobacteriales tuvieron múltiples pérdidas de partes de rutas metabólicas a lo largo de su historia evolutiva (Nelson-Sathi *et al.*, 2012), perdiendo casi por completo las enzimas que participan en la ruta de fijación autotrófica de carbono de Wood-Ljungdahl específica de arqueas (Muñoz-Velasco *et al.*, 2019). Esto podría explicarse, en parte, debido a la posible adquisición de genes que le ayudarían a estos organismos a mantener un estilo de vida aerobio y heterotrófico (Sorokin *et al.*, 2017).

Otro aspecto que no podemos descartar es la posibilidad de transferencia horizontal de genes de organismos metanógenos hacia organismos que pertenecen a los Phyla de reciente descubrimiento Bathyarchaeota y Verstraetearchaeota; esto explicaría la presencia de algunas enzimas de las rutas de metanogénesis en estos organismos (Spang *et al.*, 2017; Evans *et al.*, 2019; Muñoz-Velasco *et al.*, 2019), lo cual podría llevarnos a concluir erróneamente que son capaces de sintetizar metano. También se ha observado que la enzima Metil Coenzima M reductasa puede participar en el aprovechamiento de otros compuestos químicos de la clase de los alcanos, como la oxidación de

metano (Hallam *et al.*, 2003; Nauhaus *et al.*, 2005; Timmers *et al.*, 2016; 2017; McGlynn 2017), la oxidación de butano (Laso-Pérez *et al.*, 2016; Boyd *et al.*, 2019) y la oxidación de etano (Chen *et al.*, 2019), estas dos últimas de muy reciente descubrimiento.

En el caso del ciclo reverso del ácido tricarbóxico, aunque nuestros resultados son preliminares, nos permiten inferir que las relaciones evolutivas de algunas de las enzimas clave de este metabolismo y del ciclo de Krebs, pueden tener explicaciones distintas a las dadas hasta el momento, en donde se cree ampliamente que el ciclo reverso dio origen al ciclo de Krebs (Wächtershäuser 1988; Aoshima 2007; Verschueren *et al.*, 2019). Nuestros resultados pueden cambiar y de alguna manera mejorar el entendimiento de la evolución de estos metabolismos de fijación de carbono autotrófico, si bien aún falta trabajo por realizar y resultados por analizar, ya tenemos un panorama general del cómo pudieron haber evolucionado dichas enzimas, este panorama puede servir como andamio para tratar de explicar el posible origen del rTCA y del ciclo de Krebs y para aportar al conocimiento sobre el entendimiento de las características fisiológicas y metabólicas del último ancestro en común.

VII.6 El futuro de las investigaciones sobre el origen y evolución de metabolismos autotróficos de fijación de carbono

A manera de perspectivas y tal vez como futuros trabajos de investigación sobre el posible origen y evolución de ciertas rutas metabólicas es importante saber qué características metabólicas están compartidas entre todos los organismos de los cuales se sabe (por medio de evidencia experimental), que son capaces de llevar a cabo producción de metano; tales como los metanógenos clase I y los clase II, así como los organismos potencialmente metanógenos pertenecientes a los Phyla candidatos Bathyarchaeota y Verstraetearchaeota, de los cuales solo se cuenta con información recabada de muestras ambientales (muestras metagenómicas).

Para saber las características metabólicas compartidas entre los organismos metanógenos, se podría realizar tal vez un análisis pan-genómico, como el realizado para bacterias homoacetogénicas (Shin *et al.*, 2016). Este análisis ayudaría a esclarecer los rasgos genéticos, y por tanto metabólicos, compartidos entre los organismos de estudio, así como los posibles eventos de transferencia horizontal que pudieron haber ocurrido entre estos linajes.



Los análisis llevados a cabo en este trabajo nos permitieron ver un panorama general sobre la evolución de algunos metabolismos autotróficos de fijación de carbono. Sin embargo, aún quedan otros metabolismos por explorar, como pueden ser los metabolismos del biciclo del 3-hidroxipropionato, el ciclo reductor de las pentosas fosfato (Calvin-Benson-Bassham), el ciclo del





3-hidroxipropionato/4-hidroxibutirato y el ciclo del dicarboxilato-4-hidroxibutirato, que si bien son metabolismos muy restringidos a ciertos grupos de organismos, no dejan de ser interesantes de analizar.


El análisis de los grupos de organismos arqueanos, que pudieran tener estilos de vida parásitos o simbióticos, puede tener un gran impacto en nuestra visión del mundo microbiano. En este sentido es, de especial importancia el análisis evolutivo de los grupos de organismos con genomas reducidos como lo son Woearchaeota, Nanoarchaeota, Aenigmarchaeota, Pacearchaeoyta, Parvarchaeota y Diapherotrites, ya que nos pudieran dar algunas pistas de cómo han evolucionado dichos organismos y el por qué de sus genomas tan reducidos.

VIII. Anexos o material suplementario

VIII.1 Artículos enviados para su publicación, en donde el alumno es coautor

Scientific Reports - Receipt of Manuscript 'Holocene life and...' Recibidos x  

 **Scientific Reports** <srep@nature.com> 17 ago. 2020 19:23   
para mí ▾

 inglés ▾ > español ▾ [Traducir mensaje](#) Desactivar para: inglés x

Ref: Submission ID 208401b1-c1c1-47a0-bfa1-0256bd71b339

Dear Dr Muñoz-Velasco,

Please note that you are listed as a co-author on the manuscript "Holocene life and microbiome profiling in ancient tropical Lake Chalco, Mexico", which was submitted to **Scientific Reports** on 18 August 2020 UTC.

If you have any queries related to this manuscript please contact the corresponding author, who is solely responsible for communicating with the journal.

Kind regards,

Peer Review Advisors
Scientific Reports

****Our flexible approach during the COVID-19 pandemic****

If you need more time at any stage of the peer-review process, please do let us know. While our systems will continue to remind you of the original timelines, we aim to be as flexible as possible during the current pandemic.

1 **Holocene life and microbiome profiling in ancient tropical Lake Chalco, Mexico**

2

3 Bárbara Moguel^{1,2,6}, Liseth Pérez⁷, Luis D. Alcaraz³, Jazmín Blaz³, Margarita Caballero⁴, Israel
4 Muñoz-Velasco³, Arturo Becerra³, Juan P. Lacleste⁵, Beatriz Ortega-Guerrero⁴, Claudia S.
5 Romero-Oliva⁸, Socorro Lozano-García^{1*}, Luis Herrera-Estrella^{9,10*}.

6

7 ¹Instituto de Geología; ²Laboratorio Internacional de Genoma Humano (LIIGH); ³Facultad de
8 Ciencias; ⁴Instituto de Geofísica and ⁵Instituto de Investigaciones Biomédicas, Universidad
9 Nacional Autónoma de México, 04510 Ciudad de México, México.

10 ⁶Tecnológico de Monterrey, Escuela de Ingeniería y Ciencias, Centro de Bioingeniería,
11 Campus Querétaro, Av. Epigmenio González, No. 500, Fracc. San Pablo, 76130, Querétaro,
12 Mexico

13 ⁷Institut für Geosysteme und Bioindikation, Technische Universität Braunschweig, 38106,
14 Braunschweig, Germany.

15 ⁸Centro de Estudios Atitlán, Universidad del Valle de Guatemala. Atitlán-Sololá, 7001,
16 Guatemala

17 ⁹Laboratorio Nacional de Genómica para la Biodiversidad (LANGEBIO)/CINVESTAV, 36821,
18 Irapuato, Guanajuato, México.

19 ¹⁰Institute of Functional Genomics for Abiotic Stress, Texas Tech University, Lubbock, 79410,
20 Texas, USA

21

22 *Corresponding authors:

23 Luis Herrera-Estrella

24 Texas Tech University, Lubbock Texas, and Centro de Investigación y de Estudios Avanzados
25 del Instituto Politécnico Nacional (CINVESTAV), Km 9.6 Libramiento Norte Carretera
26 Irapuato-León, C.P. 36821 Irapuato, Gto México.

27 luis.herrera-estrella@ttu.edu

28 Socorro Lozano-García

1

29 Instituto de Geología, Universidad Nacional Autónoma de México, 04510 CDMX, México.

30 mslozano@unam.mx

31

32 **Summary**

33 Metagenomic and traditional paleolimnological approaches are suitable to infer
34 biological and environmental changes, however they are often applied independently,
35 especially in tropical regions. We combined both approaches to investigate the
36 evolution of Holocene Prokaryote and Eukaryote diversity and microbial metabolic
37 pathways in ancient Lake Chalco, Mexico. Here, we report the diversity among a large
38 number of lineages (36,722 genera) and functional diversity (27,636,243 non-
39 clustered predicted proteins, and 6,144 annotated protein-family genes). The biota
40 was dominated by Bacteria (81%), followed by Archaea (15%), and Eukarya (3%). We
41 also determined the diversity of protein families and their relationship with
42 contemporary and past metabolic pathways. The early Holocene was characterized
43 by a cool freshwater lake (<11,000 cal years BP), which later displayed warm and
44 hyposaline conditions (11,000-6,000 cal years BP). Bacteria and Archaea were mainly
45 anaerobes and extremophiles, which contributed to the S, N, and C cycles. We found
46 evidence that early human activities, landscape modifications and accelerated lake
47 eutrophication began ~6,000 cal years BP. Finally, we identified genera of
48 Proteobacteria that are pathogenic to humans, other mammals and plants, and
49 recently evolved antibiotic resistance genes and protein-family genes linked to
50 contaminated environments.

51

52

53 **Keywords:** Metagenomics, biodiversity, Lake Chalco, protein families, microbial
54 metabolisms, geochemistry, Prokaryote, Eukaryote.

55

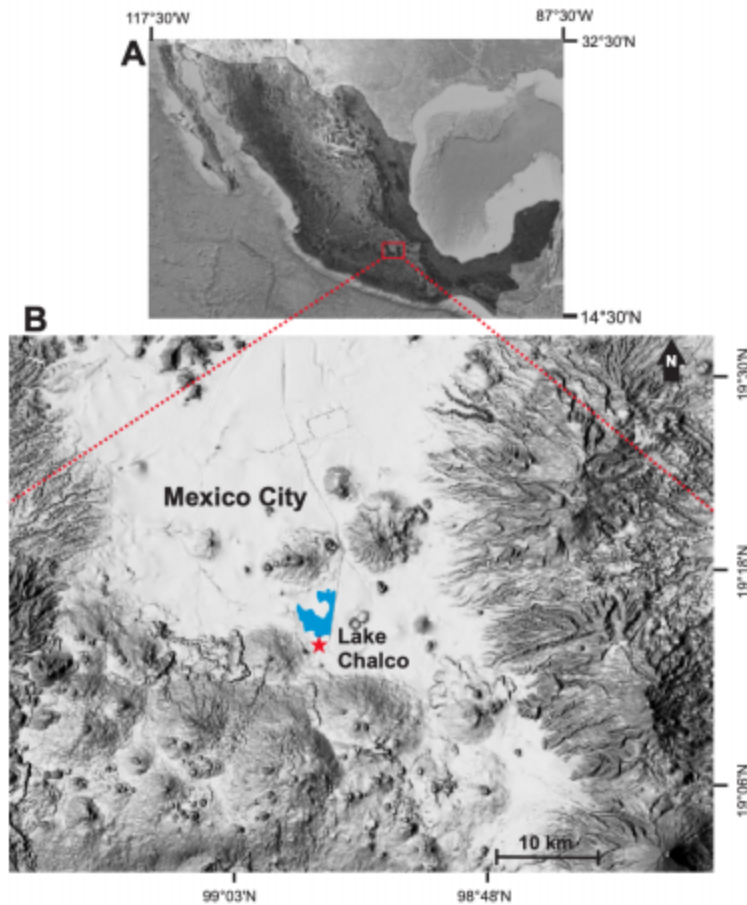
56 **Introduction**

57 The onset of the recent interglacial (11.7 cal years BP) was marked by substantial
58 climate and environmental changes¹. Temperature increase during the early Holocene
59 caused glaciers to retreat, modified landscapes, and reshaped plant and aquatic
60 communities worldwide, even in the tropical latitudes of Mesoamerica^{2,3}. Thermal
61 regimes and hydrological budgets of lakes changed, and aquatic communities were
62 impacted by these shifts^{4,5}. Lake Chalco (Fig. 1) is a high-altitude (2200 m asl) tropical
63 water body in central Mexico and its sediments contain a high-resolution archive of
64 late Quaternary climate and environmental change⁶.

65

66 **Figure 1.** (A) Map of Mexico showing the location southeast of Mexico City (B) of the
67 drill site (red star) in Lake Chalco.

68



69

70 To date, studies of past aquatic and terrestrial communities have focused on the
 71 analysis of fossil diatoms and pollen, respectively⁶. Such traditional paleolimnological
 72 methods are tremendously useful, but do not provide information about organisms that
 73 lack hard parts that become fossilized^{7,8}. Novel genomics approaches, such as
 74 barcoding (simple DNA sequencing), metabarcoding (mass DNA sequencing of
 75 multiple taxa in a single sample), metagenomics and proteomics, enable collection of
 76 information about a large number of lineages, and facilitate reconstruction of complete
 77 genomes and metabolic attributes of the biota. For instance, metagenomic analyses

78 of lake sediments reveal detailed information about diversity and community
79 composition, providing insights into modern and past ecological dynamics⁹⁻¹⁷.
80 Information on contemporary lake inhabitants and conditions is obtained through the
81 analysis of modern environmental DNA (eDNA)¹⁸, which in turn can be used to better
82 understand past environmental conditions and biological communities evaluated
83 through ancient DNA (aDNA)⁹⁻¹² analysis. Past environments, especially those subject
84 to anthropogenic disturbances, are best understood using a combination of
85 conventional micropaleontological techniques and metagenomic approaches, which
86 reveal phylogenetic and biochemical traits¹⁹. Numerous preserved genes yield
87 information about metabolic pathways used by organisms in past communities²⁰,
88 thereby providing insights into the development of adaptation strategies such as
89 antibiotic resistance and ecotoxicological effects of pollutants²¹, as well as
90 evolutionary processes and species replacement.

91 Sediments in the basin of Lake Chalco contain a continuous ~400-ka paleoclimate and
92 paleoenvironment history, representing one of the longest such records in the
93 transition between the Nearctic and Neotropical regions^{6, 22-28}. We retrieved a 250-cm-
94 long sediment core (19°30'N, 99°00'W) from the dry lake bed using a piston corer (Fig.
95 1, Supplementary Fig. S1), to determine changes in biotic diversity related to climate,
96 environmental and human impacts^{29,30}. Our objective was to characterize Holocene
97 environmental phases in the history of Lake Chalco, using metagenomic, fossil diatom
98 and sediment geochemical analyses, well-dated volcanic (tephra) layers and
99 lithological properties of the core³¹, as well as correlate our findings with inferences
100 from other studies in the region^{25,26,32,33}. Our eDNA and aDNA analyses were
101 combined to assess present and past biodiversity and identify related protein families
102 (pfams) preserved in sediments. Our results enhanced knowledge of Holocene

103 biodiversity^{26,32} and environmental conditions in the high-altitude American tropics.
104 Furthermore, identified pfams yielded novel insights into modern (currently active) and
105 past metabolic pathways.

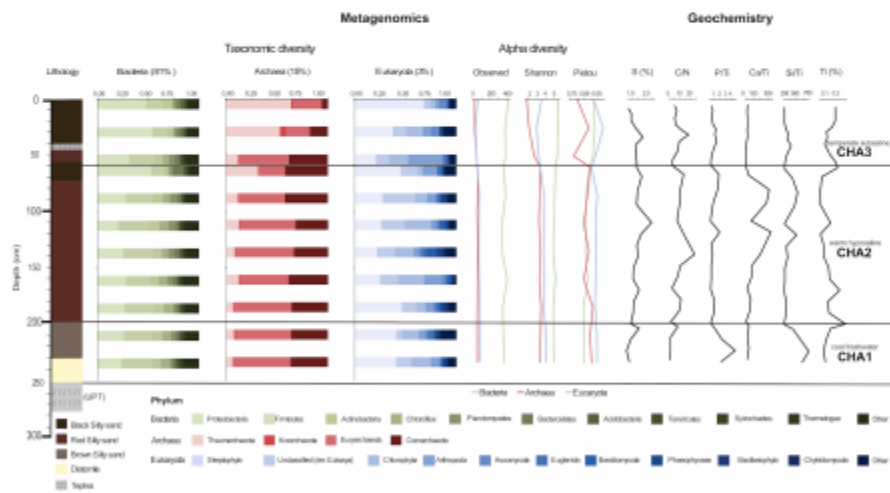
106 **Prokaryote and Eukaryote diversity**

107 Our metagenomic analysis identified 36,722 genera in Holocene sediments of Lake
108 Chalco. Among those genera, 81% corresponded to bacteria (29,818 ± 106 identified
109 genera [ig]), 15% to Archaea (5,710 ± 118 ig), 3% to Eukarya (1,161 ± 6 ig), and < 1%
110 viruses (33 ± 8 ig) (Fig. 2). Some 206 uncertain DNA sequences belonged to
111 unclassified genera. With respect to biodiversity, analysis based on large subunit
112 rRNA (LSU) genes revealed high bacterial lineage diversity (26 phyla) with a high
113 Shannon index (5.21 ± 0.22), but low community evenness (Pielou index: 0.88 ± 0.03).
114 Archaea (4 phyla) displayed Shannon and Pielou indices of 2.92 ± 0.69 and 0.86 ±
115 0.05, respectively, whereas Shannon and Pielou values for Eukarya (24 phyla) were
116 3.65 ± 0.34 and 0.93 ± 0.03, respectively. The most abundant bacterial phyla were
117 Proteobacteria (31%), Firmicutes (26%) and Actinobacteria (9%) (Fig. 2). Dominant
118 Archaea phyla were Euryarchaeota (53%), followed by Crenarchaeota (36%), and
119 their abundances decreased in the uppermost sediments. Finally, the Eukarya domain
120 displayed high abundances of Streptophyta (plants: 37%), Chlorophyta (algae: 16%),
121 and Arthropoda (insects: 10%) (Fig. 2).

122

123 **Figure 2.** Taxonomic diversity revealed by metagenomic analysis and geochemical
124 variables from the Lake Chalco Holocene sediment sequence. Each horizontal bar
125 represents a collected sample, with the exception of the upper row that shows the
126 average of surface samples CHA3-1 (0 cm, i.e. modern) and CHA3-2 (0 cm, i.e.

127 modern) (Supplementary Table S1). Lithology of the 2.5-m sediment sequence is
 128 shown in the first column. The Upper Toluca Pumice is represented as tephra
 129 underneath the first column (from left to right). Taxonomic diversity is depicted as the
 130 relative abundance of phyla Bacteria (green), Archaea (pink), and Eukarya (blue)
 131 (columns 2-4). Percent values correspond to the diversity of peptide sequences
 132 corresponding to each domain. Alpha diversity (columns 5-7) includes Observed,
 133 Shannon, and Pielou indices for the three domains (Bacteria, Archaea and Eukarya).
 134 Geochemical variables related with biological processes and past conditions are
 135 shown in columns 8-13. Dark horizontal lines show the boundaries for each delimited
 136 paleoenvironmental zone (CHA1-3).
 137



138

139 **Analysis of protein families**

140 Analysis of coding gene fragments revealed 27,636,243 non-clustered predicted
 141 proteins in the twelve sediment core samples analyzed, of which only 3,227,398 could
 142 be annotated against the non-redundant protein database. The high number of

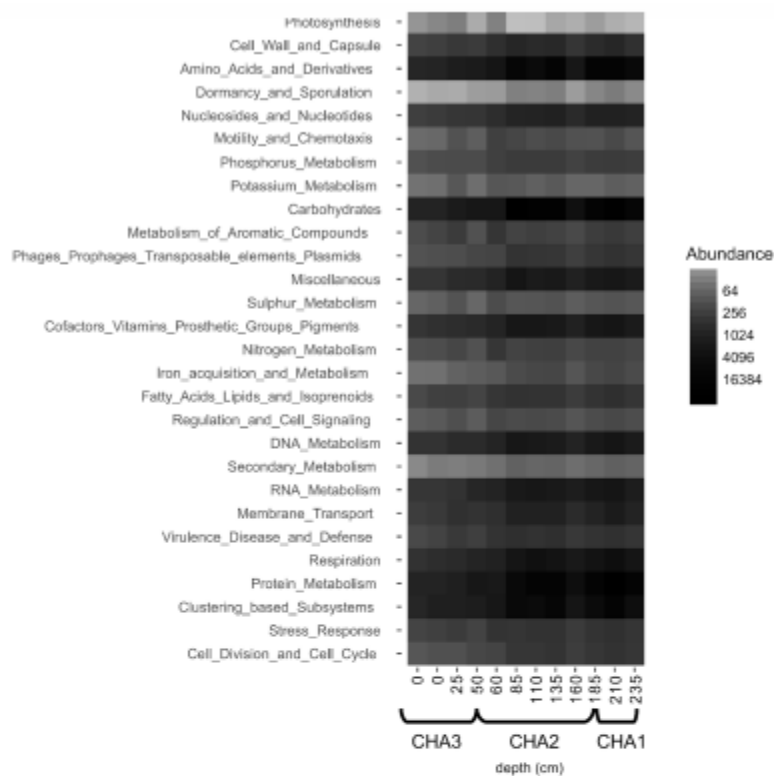
143 predicted proteins in our study is an indication of the enormous metabolic diversity
144 within Lake Chalco sediments. This suggests that Chalco's metagenomes have great
145 potential for exploring biotic processes in detail, and that the lake deposits may
146 possess biotechnological potential, e.g. for investigating enhanced oil recovery or
147 biodegradation of pollutants and toxic compounds.

148 Protein analysis revealed 6,144 annotated pfams in the SEED database (including
149 conserved hypothetical proteins). The most abundant SEED hierarchy corresponded
150 to amino acids and derivatives (42%), followed by carbohydrates (6.2%), cofactors,
151 vitamins, prosthetic groups and pigments (5.5%), and DNA metabolism factors (5.0%)
152 (Fig. 3). The average protein diversity was 3,789 unique pfams per sample, which,
153 according to the Chao1 index, is close to the expected average of 4,316 proteins per
154 sample (Supplementary Fig. S2). The mean Shannon diversity (H') index for unique
155 proteins was 7.05, i.e., higher than for the taxonomic value ($H'=5.21$). The Shannon
156 protein index ($H'<0.7$) was low in zone CHA1 (210-235 cm) but increased in zone
157 CHA2 (60-185 cm) ($H'=0.7$), and even more so in zone CHA3 ($H'=7.1$) (0-50 cm)
158 (Supplementary Fig. S2).

159

160 **Figure 3.** Functional classification of the predicted proteins of the Chalco sediment
161 metagenomes. Samples are ordered from shallowest to deepest samples. Log2
162 normalization of abundance is shown.

163



164

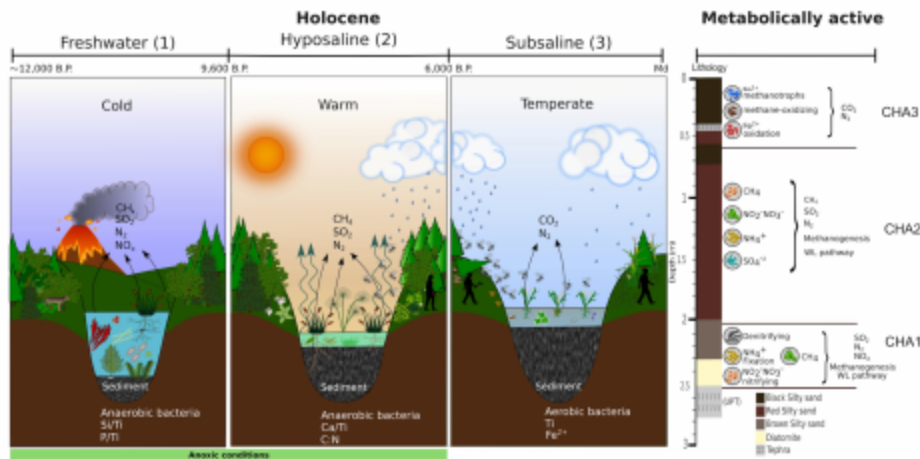
165 Our results revealed that 3,818 pfams were shared by all three zones (Venn diagram),
 166 and were indicative of basic metabolic functions such as DNA replication,
 167 recombination, and repair, responses to environmental conditions such as heat and
 168 cold shock, desiccation, acidity, oxidative stress, and other metabolic pathways such
 169 as phospholipid biosynthesis, siderophores and protein secretion systems
 170 (Supplementary Fig. S3A).

171 **Biological and environmental changes during the Holocene**

172 We identified three zones in the Lake Chalco Holocene sequence that reflected
 173 different environmental conditions: CHA1 - a cool, freshwater lake (235-210 cm),

174 CHA2 - a warm, hyposaline lake (185-60 cm), and CHA3 - a temperate, subsaline lake
175 (50-0 cm) (Fig. 4). Our findings suggest that the biota in and around Lake Chalco
176 during the Holocene responded mainly to changes in temperature and salinity, and
177 human impacts such as landscape modifications and accelerated lake eutrophication.
178

179 **Figure 4.** Landscape reconstruction for the three Holocene zones in Lake Chalco
180 (CHA1: cool, freshwater lake, CHA2: warm, hyposaline lake, and CHA3: temperate,
181 subsaline lake) determined using metagenomic, diatom, and geochemical analyses.
182 The horizontal bar represents the time range of each zone, based on this and previous
183 studies cited in the text. The right bar represents metabolically active microorganisms
184 and enzyme pathways found in each zone (CHA1-3). CHA1 was characterized by cool
185 conditions and a deep, freshwater lake. Sediment geochemical variables Si/Ti and
186 P/Ti in this zone suggest high productivity in the lake. Abundant Bacteria and Archaea
187 were mainly anaerobes and extremophiles, which contributed to the production of S
188 and N. The most abundant Eukarya families (algae) were associated with freshwater
189 conditions. Zone CHA2 (warm, hyposaline lake) was characterized by shallow, high-
190 salinity conditions. Geochemical measures Ca/Ti and C:N suggest periods of intense
191 evaporation and high productivity. Anaerobic and extremophile Bacteria and Archaea
192 contributed to the production of H₂S, NH₃, y CH₄. Characteristics in zones CHA1
193 (freshwater) and CHA2 (hyposaline) indicate anoxic bottom waters in the lake. Zone
194 CHA3 (temperate, subsaline) was characterized by a slight increase in lake depth and
195 decrease in salinity. Geochemical variables Ti and Fe suggest greater rainfall and
196 runoff. Bacteria significantly enriched in this zone are associated with human activities,
197 including perturbations caused by settlement and contamination. In this zone, bacteria
198 were mostly aerobic and contributed mainly to the production of CO₂ and N₂.



199

200 Metagenomic and traditional paleolimnological evidence suggest that during CHA1
 201 Lake Chalco was deep, cool, fresh, and mesotrophic, with anoxic bottom waters.
 202 Microbial activity contributed mainly to the availability of H₂S, NH₃, y CH₄ (Fig. 4).
 203 The early Holocene in Central Mexico was characterized by gradually decreasing
 204 runoff²⁴, which probably influenced the high biological productivity in CHA1, clearly
 205 dominated by bacteria. High biodiversity and mean abundances of cyanobacteria
 206 within this zone, support the inference for mesotrophic conditions. We determined high
 207 biodiversity, but low representation of taxa from Archaea and Eukarya. Analysis of
 208 smear-slides revealed the presence of an araphid fossil diatom assemblage, indicating
 209 cool, fresh waters. Nutrient recycling and moderate lake primary productivity are
 210 indicated by high P/Ti and Si/Ti ratios³⁴, and by the dominance of the phylum
 211 Firmicutes (Fig. 4), including Gram-positive anaerobes, and extremophiles, revealed
 212 by our differential abundance quantitative analyses, using the DeSeq2 test
 213 (Supplementary Table S2). For Archaea, the DeSeq2 test showed five genera with
 214 higher diversity (referred to in the following text as “enriched genera”), two belonging

215 to the phylum Crenarchaeota and three to Euryarchaeota, all of which were involved
216 in methane production and N₂ fixation (Fig. 4, Supplementary Table S2). Although
217 Eukarya displayed no significantly enriched genera, Poaceae (grasses) was the most
218 prominent taxonomic group around the lake. The algae families Zygnemataceae and
219 Pyrenomonadaceae dominated among aquatic eukaryotes (Supplementary Fig. S5C).
220 Zygnemataceae paleo-spores were reported previously from Late Pleistocene
221 (~14,500 – 10,000 years BP) sediments in Lake Chalco²⁶. That study inferred cooler
222 temperatures and increased moisture, which coincided with intense volcanic activity.
223 Cool conditions are supported by the presence of Pyrenomonadaceae. Blooms of
224 some algal species from this family result in red color in the chemocline of cool and
225 meromictic lakes³⁵. Metagenomic analysis revealed 12 unique Eukarya genera,
226 including the algal genus *Trachelomonas*, the mammal *Canis* (wolf), and the primitive
227 tubeworm *Tubulanus* (Supplementary Table S3). Unique protein families found in the
228 CHA1 metagenomes accounted for 166 unique pfams (Supplementary Fig. S3B)
229 associated with dormancy and sporulation, nitrogen metabolism and hydrogenase
230 genes, and seem to be the result of higher concentrations of hydrogen in successively
231 deeper biogeochemical zones³⁶. Representation of all identified metabolisms
232 displayed in the pfam results, highlights the ecological complexity of the system, as
233 suggested by antibiotic resistance genes that indicate interactions among plants, fungi
234 and bacteria³⁷. Finally, identification of genes from the entire methanogenesis pathway
235 provides evidence of biomethanation, suggesting the presence of active
236 microorganisms and high productivity in the environment (Fig. 4).

237 During CHA2, Lake Chalco was shallow, warm, hyposaline, and eutrophic, with anoxic
238 bottom waters. Microbial activity contributed mainly to the availability of H₂S, NH₃, y
239 CH₄ (Fig. 4). High biological productivity in Lake Chalco continued and perhaps

240 increased in this zone, dominated by Bacteria. Abundant cyanobacteria indicated
241 eutrophic conditions. Warm, hyposaline conditions are suggested by the presence of
242 the fossil diatoms *Anomoeoneis costata*, *Craticula elkab* and *Halamphora veneta*.
243 Geochemical variables S, C/N and Ca/Ti ratios were correlated (Supplementary Fig.
244 S4A), suggesting that warmer and hyposaline conditions favored carbonate
245 precipitation³⁸. The most abundant bacterial phyla were Firmicutes and Chloroflexi,
246 when compared to zone CHA3 (Fig.4, Supplementary Table S2). We also identified
247 anaerobic Gram-positive bacteria and *Ammonifex* that are associated with the nitrogen
248 cycle (Supplementary Table S2), and specifically with N₂ fixation, ammonification,
249 nitrification and denitrification¹². In addition, high S concentrations and C/N ratios (Fig.
250 4, Supplementary Fig. S4A) support the inference for hyposaline and anoxic waters,
251 rich in sulfur, carbon, and nitrogen, which favored nitrogen-fixing and sulfur-reducing
252 bacteria. Although Archaea represented only 15% of the total biomass, 21 genera
253 were enriched significantly (Supplementary Table S2), indicating that environmental
254 conditions were optimal for Archaea and extremophile bacteria, which tolerate
255 elevated temperatures, high salinities and anaerobiosis. Higher summer insolation
256 during the early Holocene could have favored the presence of a high-salinity hotspot
257 that was not detected in previous paleoenvironmental studies. Furthermore, 13 genera
258 associated with methane production were determined to have had significant
259 differential abundance (DeSeq2) (Supplementary Table S2), and another
260 methanogenic community, belonging to the phylum Euryarchaeota, was identified.
261 Warmer conditions were suggested by the presence of hyper-thermophilic Archaea,
262 hydrogen sulfide, and related Ni:Fe-hydrogenases, belonging to the phylum
263 Crenarchaeota (families Fervidicoccaceae and Pyrodictiaceae) (Fig. 4;
264 Supplementary Table S2 and Supplementary Fig. S6). Similar observations were

265 associated with early diagenesis in a sediment sequence from an Argentine lake that
266 was subject to high evaporation rates³⁹. Changes in water level, as well as higher
267 temperatures and salinity, promoted eutrophication and favored cyanobacteria^{40,41}.
268 Bacteria and Archaea communities in zones CHA1 and CHA2 indicated anoxic bottom
269 waters in Lake Chalco (Fig. 4). Even though the results of our study did not differentiate
270 between modern and aDNA, results from the deepest sediments suggested the
271 presence of ancient genetic material, by virtue of the presence of strictly aerobic
272 bacteria such as *Sphaerobacter*, photosynthetic bacteria *Chlorobium*, and the
273 photosynthetic-chemoautotroph *Roseiflexus* (Supplementary Table S5). Moreover,
274 the presence of aDNA is also suggested by abundant aerobic, photosynthetic,
275 nitrogen-fixing cyanobacteria in zones CHA1 (25%) and CHA2 (56%).

276 Although Eukarya genera in zone CHA2 were not significantly enriched, 32 unique
277 genera (16 Streptophyta, 5 Chlorophyta and some fungi and nematodes) were
278 identified. The most abundant families were Dictyosteliida (protists, 33%), Culicidae
279 (mosquitoes, 27%), and Poaceae (22%) (Supplementary Fig. S5C, Supplementary
280 Table S5). A total of 527 unique pfams were found in this zone, displaying subsystems
281 like cell signaling, virulence, defense, iron acquisition, and "phages, plasmids and
282 transposable elements" subsystems, and nitrogen metabolism genes. Zones CHA1
283 and CHA2 display similar pfam abundance and over-representation of certain
284 metabolic pathways. Nitrogen-metabolism genes showed a significant differential
285 abundance in both zones, but were not differentially enriched in the subsequent zone
286 CHA3. In zone CHA2, the highest DeSeq2 value was obtained for the archaeosine
287 gene, a derivative of 7-deazaguanosine synthesis found in transfer RNAs exclusive to
288 the archaeal phylogenetic lineage⁴² (Supplementary Table S4). This agrees with the
289 high abundance of the Archaea domain obtained from the taxonomic data. Additional

290 sequences analyzed in this zone indicated the presence of other metabolic pathways,
291 such as aerobic methane oxidation and nitrogen metabolism, specifically nitrogen
292 fixation (Supplementary Figs. 3, S7). Evidence of methanogenesis pathways
293 (including the coenzyme and Wood-Ljungdahl pathway analysis) in zones CHA1 and
294 CHA2 suggest modern and past metabolic activity consistent with high abundances of
295 taxonomic groups involved in nitrogen fixation and the methane cycle (Supplementary
296 Figs. S7, S8). Furthermore, genes encoding antibiotic resistance reached peak
297 abundance in these same zones, before decreasing in subsequent zone CHA3. The
298 high genetic diversity of beta-lactamase genes in deeper sediments supports the idea
299 that beta-lactam antibiotic production is common in microbes and was produced even
300 before human settlement ⁴³. Our data in this zone suggested that recent human
301 occupation and its impact on the environment is related with antibiosis and influenced
302 the establishment and structure of the microbial community (Supplementary Fig. S9)³⁷.

303 The shift between zones CHA2 and CHA3 occurred ~6,000 cal years BP (60 cm
304 depth). The dry climate around Lake Chalco⁴⁴ turned wet, with higher precipitation
305 and increased runoff (Ti and Fe)²⁴, leading to lower lake salinity. High abundances of
306 Eukarya families Poaceae and Culicidae (Supplementary Table S5) during this
307 transitional period indicate modification of the surrounding landscape by humans,
308 which accelerated eutrophication of Lake Chalco (Fig. 4). Our results show that early
309 human activities had a large and rapid impact on aquatic and terrestrial ecosystems
310 in Mesoamerica.

311 Chalco changed to a shallow, temperate, subsaline, eutrophic lake after ca. 6,000
312 cal years BP (CHA3, Fig. 4). Microbial activity contributed mainly to the cycles of
313 CO₂ and N₂. Sub-saline conditions were revealed by the presence of fossil diatoms

314 *Cocconeis placentula* and *Halampora veneta*. The PCA of geochemical variables
315 showed an association with Fe and Ti (Supplementary Fig. S3A). These elements
316 are related to inputs of clastic sediments, mineral particles and/or rock fragments
317 that can be transported to the lake by wind or fluvial process. Previous studies
318 suggested profound changes in Lake Chalco since ~5,000 cal years BP³⁸. Iron is
319 considered a potentially harmful element (PHE), which may be indicative of human-
320 mediated contamination. For instance, high Fe concentrations in sediments are
321 related to inputs of clastic sediments, and often reflect agricultural activities⁴⁵.
322 Furthermore, the most abundant and significantly enriched bacterial phylum was
323 Proteobacteria, with 29 genera (DeSeq2), including several genera that are
324 pathogenic to humans, other mammals and plants, such as *Bordetella*, *Brucella*,
325 *Coxiella*, *Chromobacterium*, *Laribacter*, *Leptothrix*, *Burkholderia* and *Granulibacter*
326 (Supplementary Table S2). Furthermore, we found the Archaea phylum
327 *Thaumarchaeota* (39%), which plays an important role in global nitrification⁴⁶ and
328 has been linked to human-contaminated environments⁴⁷. Venn diagram analysis
329 revealed additional indicators of human presence. We determined 13 plant genera, 5
330 belonging to the family Poaceae (58%), including the genus *Zea* (corn), known to
331 have been cultivated and consumed by early settlers⁴⁸, and *Oryza*, a fast-growing
332 weed that is indicative of human-mediated habitat disturbance. Eight fungal genera
333 were observed as well, including taxa that grow on wheat and rice (*Gibberella* and
334 *Cladochytrium*), and human pathogens (*Giardia*). Interestingly, we found high
335 abundances of the family Culicidae (18%) (Supplementary Fig. S5C, Supplementary
336 Table S5) during the period of human occupation. CHA3 displayed 290 unique
337 pfams and the highest number of representatives of potassium metabolism for the
338 entire Holocene (Supplementary Fig. S3B). Finally, this zone was also characterized

339 by the presence of recently evolved antibiotic resistance genes *mdsC* and VIM-37
340 (Supplementary Fig. S9). The VIM-37 gene has been observed in several clinically
341 relevant bacteria, confirming its relationship with human influence⁴⁹ at Lake Chalco.

342 Our study demonstrated that metagenomics is a powerful complement to traditional
343 paleolimnological approaches and can contribute to better understanding the
344 evolution of aquatic and terrestrial ecosystems and biotic processes in the
345 Neotropical-Nearctic transitional zone. Metagenomics proved suitable to describe
346 Holocene biological diversity, environmental conditions (salinity, temperature, and
347 trophic status) and human activities in high-altitude, tropical Lake Chalco.

348 Challenges for using this novel metagenomic approach for the study of lacustrine
349 systems include acquisition of good-quality DNA, and taxonomic gaps in available
350 genomic databases, especially from high-diversity aquatic ecosystems like Lake
351 Chalco. Our study therefore represents a first step and illustrates how new genomics
352 techniques can shed light on the evolution of biota in and around lake ecosystems,
353 especially in the poorly studied Neotropics.

354 **Acknowledgments**

355 Funding was provided by UNAM-DGAPA PAPIIT IV100215. We thank the
356 DGAPA/UNAM scholarship for the support of the principal author's postdoctoral
357 position. We thank Mark Brenner (University of Florida) for his valuable comments and
358 suggestions that improved the manuscript. María T. González-Cruz and Andrea
359 Pérez-Morales helped with figure editing and Sylvia Rivera-Rodríguez and Mark
360 Brenner did English language editing. This work was supported in part by grants from
361 the CONACyT Fronteras Fund (project 137-2015), the Governor's University
362 Research Initiative program (05-2018) from the State of Texas, and the Howard

363 Hughes Medical Institute (grant 55005946) to LHE and by SEP-Conacyt Ciencia
364 Básica 237387 to LDA

365 **Authors contributions**

366 B.M., S.L., L.P., L.H.E., J.P.L., and L.D.A. conceived the presented idea. B.M., M.C.,
367 L.P., B.O.G., and S.L. collected the samples in the field. M.C. performed diatom
368 analysis. S.L. performed geochemical analyses. L.D.A., J.B., and B.M. performed DNA
369 extraction and amplification. L.D.A., J.B., A.B., I.M.V., and B.M. did computations and
370 ran statistics analyses. L.D.A., L.H.E., S.L., L.P., J.P.L., M.C., C.R.O., and B.M.
371 contributed to the interpretation. B.M., L.P., L.D.A., L.H.E., and J.P.L. Writing –
372 Original Draft Preparation. B.M., L.P. and C.R.O. Writing – Review & Editing with input
373 from all authors. L.H.E. and S.L. supervised the findings of this work. All authors
374 discussed the results and contributed to the final manuscript.

375 **Competing interests**

376 The authors declare no competing interests.

377

378 **Supplementary information**

379 **Table S1.** Metadata for the twelve samples in a Holocene sediment sequence
380 collected from Lake Chalco.

381 **Table S2.** Taxonomy data: enriched genera in the log₂ fold change analysis of the
382 three distinguished zones.

383 **Table S3.** Taxonomy data: unique genera identified by the Venn Diagram analysis.

384 **Table S4.** Proteins: enrichment genes in the log₂ fold change analysis between the
385 three established zones.

386 **Table S5.** Taxonomic annotation of the abundance per domain.

387

388 **Figure S1.** Schematic representation of the field methods, laboratory methods, and

389 bioinformatic analyses performed on the retrieved Holocene sediment sequence from
390 Lake Chalco, Mexico. Numbers 1 to 5 represent the methodological phases and
391 numbers from 5.1 to 5.6 represent the bioinformatics and statistical analyses run on
392 the generated data. "x" represents taxonomy determined to genus level and "*" represents protein families (pfams) from identified genes. Abbreviations include: 1)
393 DNA - Deoxyribonucleic Acid, 2) HiSeq - High-throughput Sequencing, 3) Illumina -
394 Log2 Fold Change, based on DeSeq analysis of R packages, 4) Nextera - sequencing
395 on Illumina, 5) MG-RAST - Metagenomics open service analysis.

397 **Figure S2.** Alpha diversity measures of richness and diversity for the annotated
398 predicted proteins of the metagenomes.

399 **Figure S3.** Heatmap of the pfams shared among all zones, showing the core of the
400 predicted based on L1 classification (A) and unique pfams for only one or another
401 zone, based on L1 classification (B) of the Chalco sediments based on the Venn
402 diagram analysis

403 **Figure S4.** Geochemical and taxonomic analysis of sediment samples based on
404 Euclidean and Bray-Curtis dissimilarities. A) (Geochemical variables). Top: Cluster
405 Analysis for Euclidean distance obtained from six geochemical variables analyzed for
406 each sample, Bottom: Principal Component Analysis (PCA) based on Euclidean
407 distances. B) (Taxa). Top: Cluster Analysis for Bray-Curtis dissimilarities from the taxa
408 in each sample, Bottom: Principal Coordinate Analysis (PCoA) based on the Bray-
409 Curtis dissimilarity. C) (Protein families): Top: Cluster Analysis for Bray-Curtis
410 dissimilarities from protein families of each sample, Bottom: Principal Coordinate
411 Analysis (PCoA) based on the Bray-Curtis dissimilarity. Color pattern was based on
412 the age of each sample (see the scale on the left side) and geometric forms represent
413 each identified paleoenvironmental zone (CHA1-3): circles correspond to CHA1 (cool,

414 freshwater lake); triangles to CHA2 (warm, hyposaline lake) and squares to CHA3
415 (temperate, subsaline lake). Note that Cluster Analysis (top panels) grouped some
416 samples (cm) with other zones (e.g. samples from 60 and 50 cm). We attribute this to
417 variable environmental conditions caused by climate change, human occupation and
418 consequent environmental disturbance.

419 **Figure S5.** Bar graph of the ten most abundant families of Bacteria, Archaea and
420 Eukarya from the twelve samples in the Holocene sediment sequence from Lake
421 Chalco, Mexico.

422 **Figure S6.** Heatmap analysis of the hydrogenases identified throughout the sediment
423 sequence.

424 **Figure S7.** Enzymes associated with different, presumably active metabolic pathways.
425 Heatmap distribution of the enzymes (or subunits of the enzymes) of: (I)
426 hydrogenotrophic methanogenesis (FmdA-MtrH), (II) shared key enzyme for all
427 variants of methanogenesis (McrA-McrG), (III) acetoclastic methanogenesis (Ack-
428 CdhB), (IV) methylotrophic methanogenesis (MtaA-MttB), (V) aerobic methane
429 oxidation (PmoA), (VI) sulphur metabolism (SoxY-AprA), (VII) nitrogen fixation (NifH),
430 (VIII) nitrification (AmoA) and (IX) denitrification (NarG-NosZ), in the different sampled
431 units. The numbers on the sidebar represent the number of sequences.

432 **Figure S8.** Heatmap of methanogenesis co-enzymes and heatmap of
433 homoacetogenesis.

434 **Figure S9.** Heatmap analysis of the resistance antibiotics identified throughout the
435 sediment sequence of sediments.

436

437 **References**

438 1. Ovando-Shelley, E., Ossa, A. & Santoyo, E. Effects of regional subsidence and

- 439 earthquakes on architectural monuments in Mexico City. *Boletín de la Sociedad*
440 *Geológica Mexicana* **65**, 157–167 (2013).
- 441 2. Hillesheim, M. *et al.* Climate change in lowland Central America during the late
442 deglacial and early Holocene. *Journal of Quaternary Science* **20**, 363–376 (2005).
- 443 3. Caballero-Rodríguez, D., Lozano-García, S. & Correa-Metrio, A. Vegetation
444 assemblages of central Mexico through the late Quaternary: modern analogs and
445 compositional turnover. *Journal of Vegetation Science* **28**, 504–514, (2017).
- 446 4. Pérez, L. *et al.* Late Quaternary (24-10 ka BP) environmental history of the
447 Neotropical lowlands inferred from ostracodes in sediments of Lago Petén Itzá,
448 Guatemala. *J Paleolimnol* **46**, 59-74; 10.1007/s10933-011-9514-0 (2011).
- 449 5. Caballero, M., Lozano-García, S., Ortega-Guerrero, B. & Correa-Metrio, A.
450 Quantitative estimates of orbital and millennial scale climatic variability in central
451 Mexico during the last ~40,000 years. *Quaternary Science Reviews* **205**, 62-75;
452 10.1016/j.quascirev.2018.12.002 (2019).
- 453 6. Brown, E. T. *et al.* Scientific drilling of Lake Chalco, Basin of Mexico (MexiDrill).
454 *Sci. Drill.* **26**, (2019).
- 455 7. Handelsman, J. Metagenomics: Application of Genomics to Uncultured
456 Microorganisms. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* vol. 68 669–685
457 (2004).
- 458 8. Pedersen, M. W. *et al.* A comparative study of ancient environmental DNA to
459 pollen and microfossils from lake sediments reveals taxonomic overlap and
460 additional plant taxa. *Quat. Sci. Rev.* **75**, 161–168 (2013).
- 461 9. Der Sarkissian, C. *et al.* Ancient DNA analysis identifies marine mollusc shells
462 as new metagenomic archives of the past. *Mol. Ecol. Resour.* **17**, 835–853
463 (2017).

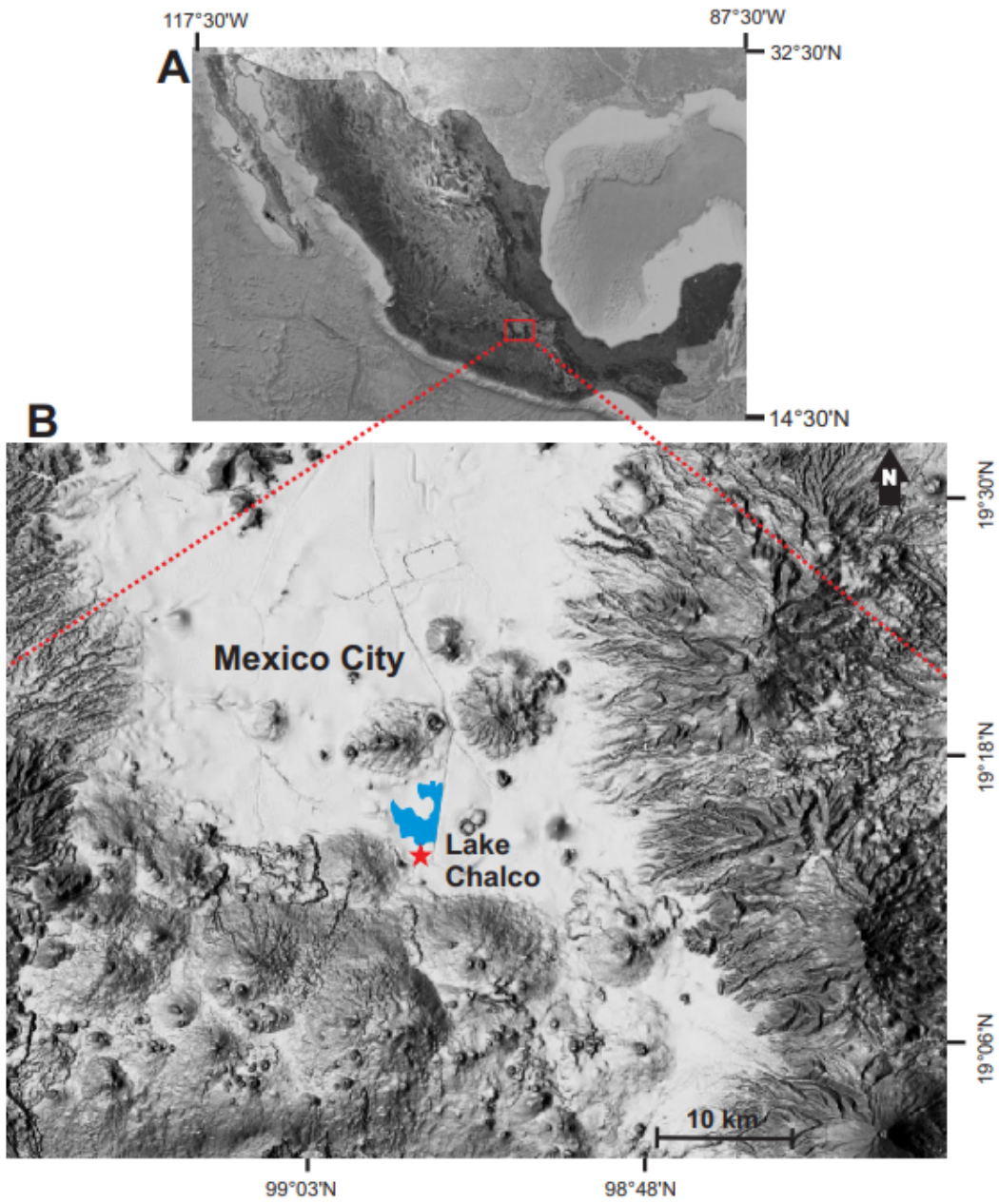
- 464 10. Ahmed, E. *et al.* Archaeal community changes in Late glacial lake sediments:
465 Evidence from ancient DNA. *Quaternary Science Reviews* vol. 181 19–29
466 (2018).
- 467 11. Noonan, J. P. Genomic Sequencing of Pleistocene Cave Bears. *Science* vol.
468 309, 597–599 (2005).
- 469 12. Rivkina, E. *et al.* Metagenomic analyses of the late Pleistocene permafrost –
470 additional tools for reconstruction of environmental conditions. *Biogeosciences*
471 vol. 13, 2207–2219 (2016).
- 472 13. Conrad, R., Klose, M., Claus, P. & Enrich-Prast, A. Methanogenic pathway, ^{13}C
473 isotope fractionation, and archaeal community composition in the sediment of
474 two clear-water lakes of Amazonia. *Limnology and Oceanography* vol. 55 689–
475 702 (2010).
- 476 14. Coolen, M. J. L. *et al.* Evolution of the methane cycle in Ace Lake (Antarctica)
477 during the Holocene: response of methanogens and methanotrophs to
478 environmental change. *Organic Geochemistry* vol. 35 1151–1167 (2004).
- 479 15. Coolen, M. J. L. & Gibson, J. A. E. Ancient DNA in lake sediment records.
480 *PAGES news* 17, 104–106 (2009).
- 481 16. De Anda, V. *et al.* Understanding the Mechanisms Behind the Response to
482 Environmental Perturbation in Microbial Mats: A Metagenomic-Network Based
483 Approach. *Front. Microbiol.* 9, 2606 (2018).
- 484 17. Pontefract, A. *et al.* Microbial Diversity in a Hypersaline Sulfate Lake: A
485 Terrestrial Analog of Ancient Mars. *Front. Microbiol.* 8, 1819 (2017).
- 486 18. Thomsen, P. F. & Willerslev, E. Environmental DNA – An emerging tool in
487 conservation for monitoring past and present biodiversity. *Biological*
488 *Conservation* vol. 183 4–18 (2015).

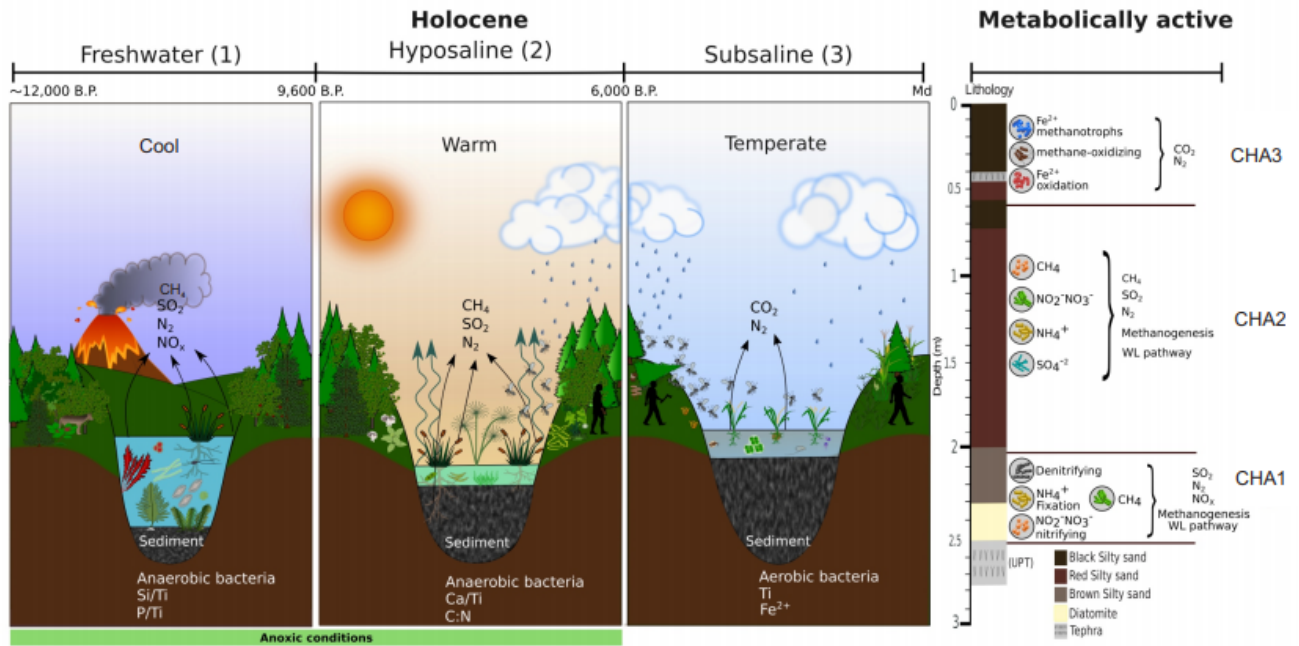
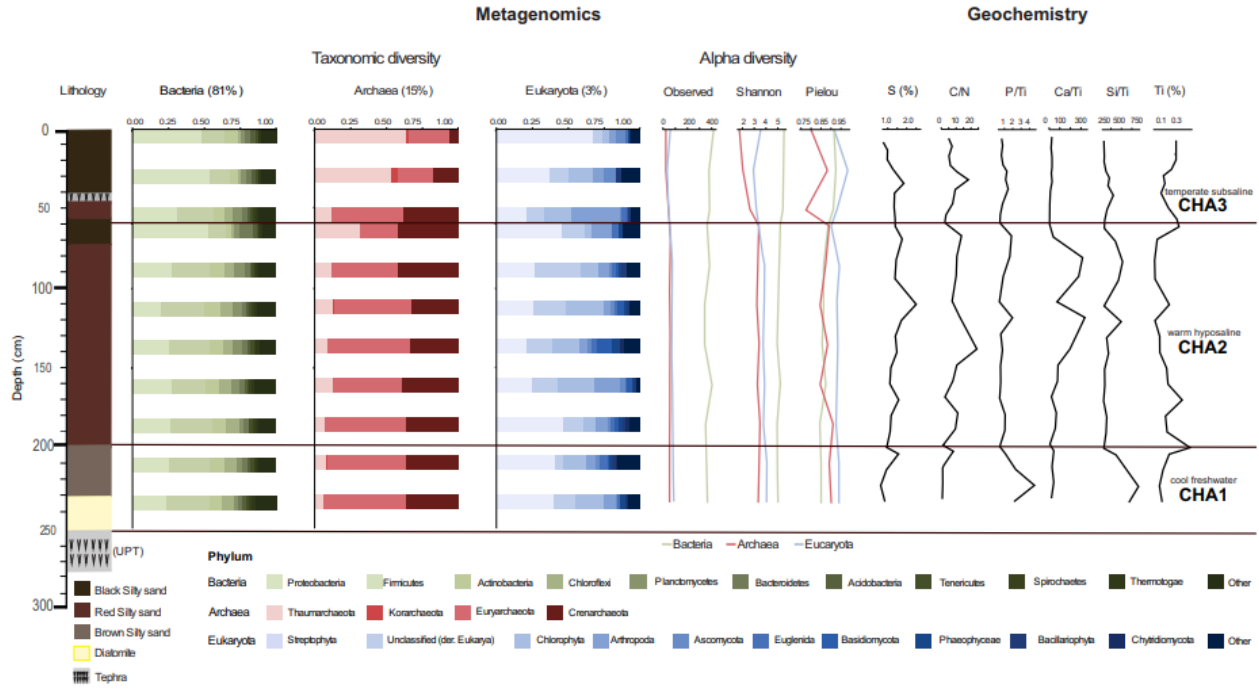
- 489 19. Eyice, Ö. *et al.* SIP metagenomics identifies uncultivated Methylophilaceae as
490 dimethylsulphide degrading bacteria in soil and lake sediment. *ISME J.* **9**, 2336–
491 2348 (2015).
- 492 20. Beck, D. A. C. *et al.* A metagenomic insight into freshwater methane-utilizing
493 communities and evidence for cooperation between the Methylococcaceae and
494 the Methylophilaceae. *PeerJ* **1**, e23 (2013).
- 495 21. Bengtsson-Palme, J., Boulund, F., Fick, J., Kristiansson, E. & Larsson, D. G. J.
496 Shotgun metagenomics reveals a wide array of antibiotic resistance genes and
497 mobile elements in a polluted lake in India. *Front. Microbiol.* **5**, 648 (2014).
- 498 22. Morrone, J. J. Biogeographical regionalisation of the Neotropical region.
499 *Zootaxa* **3782**, 1–110 (2014).
- 500 23. Lozano-García, S. *et al.* Perforación profunda en el lago de Chalco: reporte
501 técnico. *Boletín de la Sociedad Geológica Mexicana* **69**, 299–311 (2017).
- 502 24. Lozano-García, S., Ortega, B., Roy, P. D., Beramendi-Orosco, L. & Caballero,
503 M. Climatic variability in the northern sector of the American tropics since the
504 latest MIS 3. *Quaternary Research* **84**, 262–271 (2015).
- 505 25. Caballero, M. & Guerrero, B. O. Lake Levels since about 40,000 Years Ago at
506 Lake Chalco, near Mexico City. *Quaternary Research* **50**, 69–79 (1998).
- 507 26. Lozano-García, M. S., Ortega-Guerrero, B., Caballero-Miranda, M. & Urrutia-
508 Fucugauchi, J. Late Pleistocene and Holocene Paleoenvironments of Chalco
509 Lake, Central Mexico. *Quaternary Research* vol. 40 332–342 (1993).
- 510 27. Ortega-Guerrero, B. *et al.* Lithostratigraphy and physical properties of lacustrine
511 sediments of the last ca. 150 kyr from Chalco basin, central México. *Journal of*
512 *South American Earth Sciences* vol. 79 507–524 (2017).
- 513 28. Ortega Guerrero, B., Lozano García, M., Caballero, M., Herrera Hernández, D.

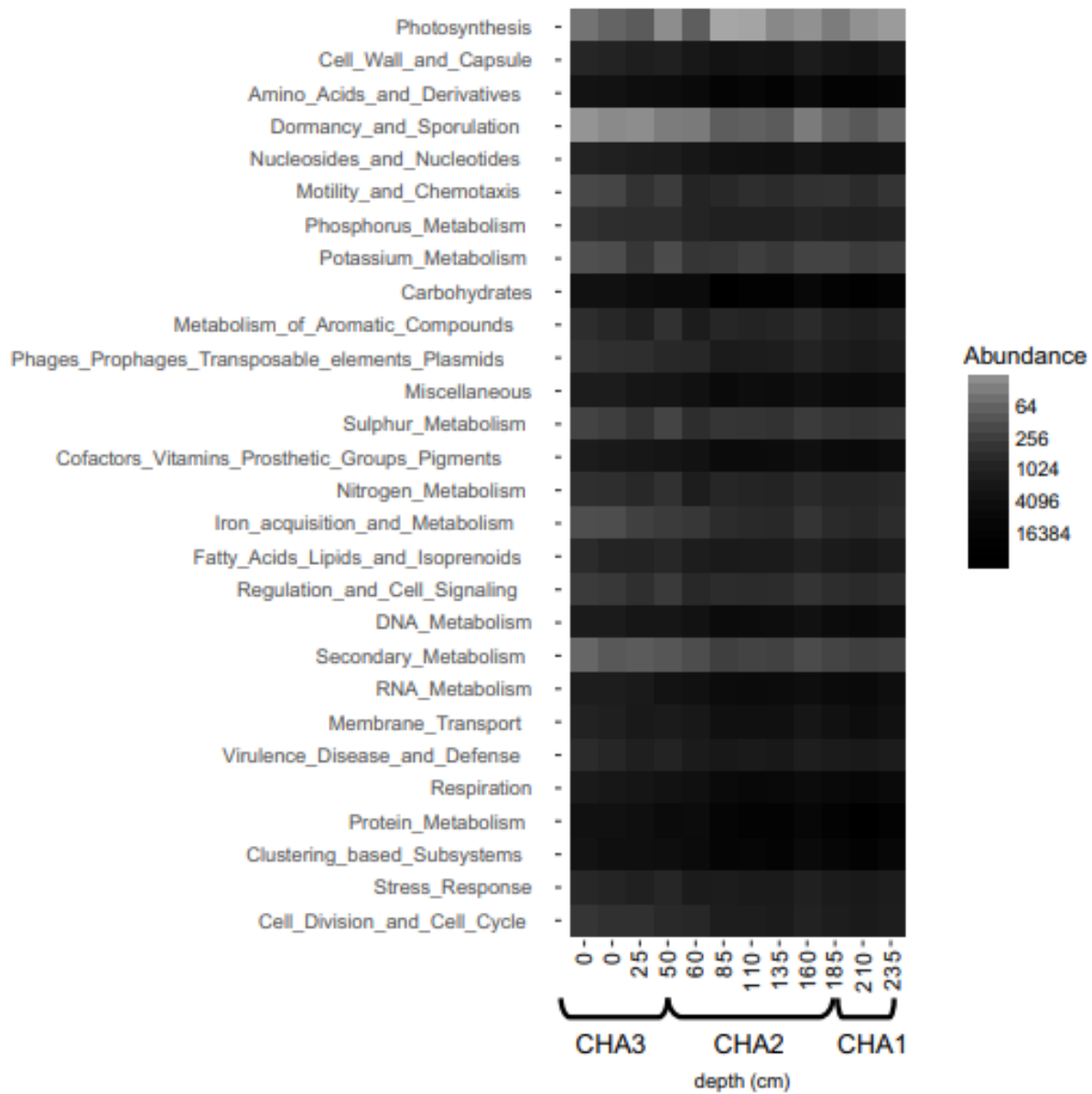
- 514 A. & Others. Historia de la evolución deposicional del lago de Chalco, México,
515 desde el MIS 3. *Boletín de la Sociedad Geológica Mexicana* **67**, 185–201
516 (2015).
- 517 29. Niederberger, C. Early Sedentary Economy in the Basin of Mexico. *Science* vol.
518 203 131–142 (1979).
- 519 30. Sedov, S. *et al.* Tepexpan revisited: A multiple proxy of local environmental
520 changes in relation to human occupation from a paleolake shore section in
521 Central Mexico. *Geomorphology* vol. 122 309–322 (2010).
- 522 31. Ortega-Guerrero, B. & Newton, A. J. Geochemical Characterization of Late
523 Pleistocene and Holocene Tephra Layers from the Basin of Mexico, Central
524 Mexico. *Quaternary Research* vol. 50 90–106 (1998).
- 525 32. Correa-Metrio, A., Bush, M., Lozano-García, S. & Sosa-Nájera, S. Millennial-
526 scale temperature change velocity in the continental northern Neotropics. *PLoS*
527 *One* **8**, e81958 (2013).
- 528 33. Caballero, M., Lozano-García, S., Ortega-Guerrero, B. & Correa-Metrio, A.
529 Quantitative estimates of orbital and millennial scale climatic variability in central
530 Mexico during the last 40,000 years. *Quat. Sci. Rev.* **205**, 62–75 (2019).
- 531 34. Meyers, P. A. Organic geochemical proxies of paleoceanographic,
532 paleolimnologic, and paleoclimatic processes. *Org. Geochem.* **27**, 213–250
533 (1997).
- 534 35. Krasnova, E. D. *et al.* Cryptomonad alga *Rhodomonas* sp. (Cryptophyta,
535 Pyrenomonadaceae) bloom in the redox zone of the basins separating from the
536 White Sea. *Microbiology* vol. 83 270–277 (2014).
- 537 36. Adhikari, R. R. *et al.* Hydrogen Utilization Potential in Subsurface Sediments.
538 *Front. Microbiol.* **7**, 8 (2016).

- 539 37. D'Costa, V. M. *et al.* Antibiotic resistance is ancient. *Nature* **477**, 457–461
540 (2011).
- 541 38. Avendaño-Villeda, D. A., Caballero, M., Ortega-Guerrero, B., Lozano-García, S.
542 & Brown, E. Condiciones ambientales a finales del Estadio Isotópico 6 (EI 6: >
543 130000 años) en el centro de México: caracterización de una sección de
544 sedimentos laminados proveniente del Lago de Chalco. *Revista Mexicana de*
545 *Ciencias Geológicas* vol. 35 168–178 (2018).
- 546 39. Vuillemin, A., Ariztegui, D., Leavitt, P. R., Bunting, L. & the PASADO Science
547 Team. Recording of climate and diagenesis through sedimentary DNA and fossil
548 pigments at Laguna Potrok Aike, Argentina. *Biogeosciences* vol. 13 2475–2492
549 (2016).
- 550 40. Waters, M. N., Schelske, C. L. & Brenner, M. Cyanobacterial dynamics in
551 shallow Lake Apopka (Florida, U.S.A.) before and after the shift from a
552 macrophyte-dominated to a phytoplankton-dominated state. *Freshw. Biol.* **60**,
553 1571–1580 (2015).
- 554 41. Boyle, J. F. Inorganic Geochemical Methods in Palaeolimnology. *Tracking*
555 *Environmental Change Using Lake Sediments* 83–141 doi:10.1007/0-306-
556 47670-3_5.
- 557 42. Watanabe, M. *et al.* Biosynthesis of Archaeosine, a Novel Derivative of 7-
558 Deazaguanosine Specific to Archaeal tRNA, Proceeds via a Pathway Involving
559 Base Replacement on the tRNA Polynucleotide Chain. *Journal of Biological*
560 *Chemistry* vol. 272 20146–20151 (1997).
- 561 43. Wright, G. D. & Poinar, H. Antibiotic resistance is ancient: implications for drug
562 discovery. *Trends Microbiol.* **20**, 157–159 (2012).
- 563 44. Caballero, M., Lozano-García, S., Ortega-Guerrero, B. & Correa-Metrio, A.

- 564 Quantitative estimates of orbital and millennial scale climatic variability in central
565 Mexico during the last ~40,000 years. *Quat. Sci. Rev.* **205**, 62–75 (2019).
- 566 45. Ullah, R., Muhammad, S. & Jadoon, I. A. K. Potentially harmful elements
567 contamination in water and sediment: Evaluation for risk assessment and
568 provenance in the northern Sulaiman fold belt, Baluchistan, Pakistan.
569 *Microchem. J.* **147**, 1155–1162 (2019).
- 570 46. Pester, M., Schleper, C. & Wagner, M. The Thaumarchaeota: an emerging view
571 of their phylogeny and ecophysiology. *Current Opinion in Microbiology* vol. 14
572 300–306 (2011).
- 573 47. Krzmarzick, M. J., Taylor, D. K., Fu, X. & McCutchan, A. L. Diversity and Niche
574 of Archaea in Bioremediation. *Archaea* **2018**, 3194108 (2018).
- 575 48. Pérez-Zamorano, B. *et al.* Organellar Genomes from a ~5,000-Year-Old
576 Archaeological Maize Sample Are Closely Related to NB Genotype. *Genome*
577 *Biology and Evolution* vol. 9 904–915 (2017).
- 578 49. Docquier, J.-D. On functional and structural heterogeneity of VIM-type metallo-
579 beta-lactamases. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* vol. 51 257–266
580 (2003).
- 581 50. Keegan, K. P., Glass, E. M. & Meyer, F. MG-RAST, a Metagenomics Service for
582 Analysis of Microbial Community Structure and Function. *Microbial Environmental*
583 *Genomics (MEG)* 207–233 (2016) doi:10.1007/978-1-4939-3369-3_13.
- 584 51. Wilke, A. *et al.* The M5nr: a novel non-redundant database containing protein
585 sequences and annotations from multiple sources and associated tools. *BMC*
586 *Bioinformatics* vol. 13 141 (2012).







IX Referencias bibliográficas

- Altschul, S. F., Madden, T. L., Schäffer, A. A., Zhang, J., Zhang, Z., Miller, W., & Lipman, D. J. (1997). Gapped BLAST and PSI-BLAST: A new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Research*, *25*(17), 3389–3402.
- Aoshima, M. (2007). Novel enzyme reactions related to the tricarboxylic acid cycle: Phylogenetic/functional implications and biotechnological applications. *Applied Microbiology and Biotechnology*, *75*(2), 249–255. <https://doi.org/10.1007/s00253-007-0893-0>
- Baptiste, É., Brochier, C., & Boucher, Y. (2005). Higher-level classification of the Archaea: evolution of methanogenesis and methanogens. *Archaea*, *1*(2002), 353–363.
- Battistuzzi, F. U., Feijao, A., & Hedges, S. B. (2004). A genomic timescale of prokaryote evolution: insights into the origin of methanogenesis, phototrophy, and the colonization of land. *BMC Evolutionary Biology*, *4*, 44.
- Becerra, A., Rivas, M., García-ferris, C., Lazcano, A., & Peretó, J. (2014). A phylogenetic approach to the early evolution of autotrophy: the case of the reverse TCA and the reductive acetyl-CoA pathways. *International Microbiology*, *17*, 91–97.
- Berg, I. a, Kockelkorn, D., Ramos-Vera, W. H., Say, R. F., Zarzycki, J., Hügler, M., Alber, B. & Fuchs, G. (2010). Autotrophic carbon fixation in archaea. *Nature Reviews. Microbiology*, *8*(6), 447–60.
- Bižić, M., Klintzsch, T., Ionescu, D., Hindiyeh, M. Y., Günthel, M., Muro-Pastor, A. M., Eckert, W., Urich, T., Keppler, F., & Grossart, H. P. (2020). Aquatic and terrestrial cyanobacteria produce methane. *Science Advances*, *6*(3), 1–10. <https://doi.org/10.1126/sciadv.aax5343>
- Boros, M., & Keppler, F. (2019). Methane production and bioactivity-A link to oxido-reductive stress. *Frontiers in Physiology*, *10*(SEP), 1–8. <https://doi.org/10.3389/fphys.2019.01244>
- Borrel, G., O'Toole, P. W., Harris, H. M. B., Peyret, P., Brugère, J.-F., Gribaldo, S. (2013). Phylogenomic Data Support a Seventh Order of Methylophilic Methanogens and Provide Insights into the Evolution of Methanogenesis. *Genome Biology and Evolution*, *5*(10), 1769–1780.
- Borrel, G., Adam, P. S., & Gribaldo, S. (2016). Methanogenesis and the Wood-Ljungdahl pathway: an ancient, versatile, and fragile association. *Genome Biology and Evolution*, *8*(6), 1706–1711.
- Borrel, G., Adam, P. S., McKay, L. J., Chen, L.-X., Sierra-García, I. N., Sieber, C. M. K., Letourneur, Q., Ghazlane, A., Andersen, G. L., Li, W.-J., Hallam, S. J., Muyzer, G., de Oliveira, V. M., Inskeep, W. P., Banfield, J. F., & Gribaldo, S. (2019). Wide diversity of methane and short-chain alkane metabolisms in uncultured archaea. *Nature Microbiology*, *4*(4), 603–613. <https://doi.org/10.1038/s41564-019-0363-3>

- Boyd, J. A., Jungbluth, S. P., Leu, A. O., Evans, P. N., Woodcroft, B. J., Chadwick, G. L., Orphan, V. J., Amend, J. P., Rappé, M. S., & Tyson, G. W. (2019). Divergent methyl-coenzyme M reductase genes in a deep-subseafloor Archaeoglobi. *ISME Journal*, 13(5), 1269–1279. <https://doi.org/10.1038/s41396-018-0343-2>
- Capella-Gutiérrez, S., Silla-Martínez, J. M., & Gabaldón, T. (2009). trimAl: A tool for automated alignment trimming in large-scale phylogenetic analyses. *Bioinformatics*, 25(15), 1972–1973.
- Caspi, R., Altman, T., Billington, R., Dreher, K., Foerster, H., Fulcher, C. A., Holland, T. A., Keseler, I. M., Kothari, A., Kubo, A., Krummenacker, M., Latendresse, M., Mueller, L. A., Ong, Q., Paley, S., Subhraveti, P., Weaver, D. S., Weerasinghe, D., Zhang, P., and Karp, P. D. (2014). The MetaCyc database of metabolic pathways and enzymes and the BioCyc collection of Pathway/Genome databases. *Nucleic acids research*, 42(Database issue):D459-D471.
- Chen, S. C., Musat, N., Lechtenfeld, O. J., Paschke, H., Schmidt, M., Said, N., Popp, D., Calabrese, F., Stryhanyuk, H., Jaekel, U., Zhu, Y. G., Joye, S. B., Richnow, H. H., Widdel, F., & Musat, F. (2019). Anaerobic oxidation of ethane by archaea from a marine hydrocarbon seep. *Nature*, 568(7750), 108–111. <https://doi.org/10.1038/s41586-019-1063-0>
- Costa, K. C., & Leigh, J. a. (2014). Metabolic versatility in methanogens. *Current Opinion in Biotechnology*, 29(1), 70–75.
- Cui, M., Ma, A., Qi, H., Zhuang, X., & Zhuang, G. (2014). Anaerobic oxidation of methane: An “active” microbial process. *MicrobiologyOpen*, 4(1), 1–11. <https://doi.org/10.1002/mbo3.232>
- DeBerardinis, R. J., & Thompson, C. B. (2012). Cellular metabolism and disease: What do metabolic outliers teach us? *Cell*, 148(6), 1132–1144. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2012.02.032>
- Dridi, B., Fardeau, M. L., Ollivier, B., Raoult, D., & Drancourt, M. (2012). *Methanomassiliicoccus luminyensis* gen. nov., sp. nov., a methanogenic archaeon isolated from human faeces. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 62(8), 1902–1907.
- Edgar, R. C. (2004). MUSCLE: multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput. *Nucleic Acids Research*, 32(5), 1792–7.
- Evans, M. C., Buchanan, B. B., & Arnon, D. I. (1966). A new ferredoxin-dependent carbon reduction cycle in a photosynthetic bacterium. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 55(4), 928–934. <https://doi.org/10.1073/pnas.55.4.928>
- Evans, P. N., Parks, D. H., Chadwick, G. L., Robbins, S. J., Orphan, V. J., Golding, S. D., & Tyson, G. W. (2015). Methane metabolism in the archaeal Phylum Bathyarchaeota revealed by genome-centric metagenomics. *Science*, 350(6259), 434–438.

- Evans, P. N., Boyd, J. A., Leu, A. O., Woodcroft, B. J., Parks, D. H., Hugenholtz, P., & Tyson, G. W. (2019). An evolving view of methane metabolism in the Archaea. *Nature Reviews Microbiology*, 17(4), 219–232. <https://doi.org/10.1038/s41579-018-0136-7>
- Fani, R., & Fondi, M. (2009). Origin and evolution of metabolic pathways. *Physics of Life Reviews*, 6(1), 23–52. <https://doi.org/10.1016/j.plrev.2008.12.003>
- Fani, R. (2012). The Origin and Evolution of Metabolic Pathways: Why and How did Primordial Cells Construct Metabolic Routes? *Evolution: Education and Outreach*, 5(3), 367–381. <https://doi.org/10.1007/s12052-012-0439-5>
- Ferry, J. G. (1999). Enzymology of one-carbon metabolism in methanogenic pathways. *FEMS Microbiology Reviews*, 23(1), 13–38.
- Finn, R. D., Clements, J., & Eddy, S. R. (2011). HMMER web server: interactive sequence similarity searching. *Nucleic Acids Research*, 39(Web Server issue), W29-37.
- Fuchs, G. (2011). Alternative Pathways of Carbon Dioxide Fixation: Insights into the Early Evolution of Life? *Annual Review of Microbiology*, 65(1), 631–658.
- Galtier, N., Gouy, M. and Gautier, C. (1996) SeaView and Phylo_win, two graphic tools for sequence alignment and molecular phylogeny. *Comput. Applic. Biosci.*, 12, 543-548..
- Gao, B., & Gupta, R. S. (2007). Phylogenomic analysis of proteins that are distinctive of Archaea and its main subgroups and the origin of methanogenesis. *BMC Genomics*, 8, 86.
- Glueck, S. M., Gümüs, S., Fabian, W. M. F., & Faber, K. (2010). Biocatalytic carboxylation. *Chemical Society Reviews*, 39(1), 313–328. <https://doi.org/10.1039/b807875k>
- Graham, D. E., & White, R. H. (2002). Elucidation of methanogenic coenzyme biosyntheses: from spectroscopy to genomics. *Natural Product Reports*, 19(2), 133–147.
- Granick, S. (1957). Speculations on the Origins and Evolution of Photosynthesis. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 69(2), 292–308. <https://doi.org/10.1111/j.1749-6632.1957.tb49665.x>
- Gribaldo, S., & Brochier-Armanet, C. (2006). The origin and evolution of Archaea: a state of the art. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological Sciences*, 361(1470), 1007–22.
- Guy, L., & Ettema, T. J. G. (2011). The archaeal “TACK” superPhylum and the origin of eukaryotes. *Trends in Microbiology*, 19(12), 580–587.
- Hallam, S. J., Girguis, P. R., Preston, C. M., Richardson, P. M., & DeLong, E. F. (2003). Identification of methyl coenzyme M reductase A (mcrA) genes associated with methane-oxidizing archaea. *Applied and Environmental Microbiology*, 69(9), 5483–5491. <https://doi.org/10.1128/AEM.69.9.5483-5491.2003>
- Han, P., & Gu, J.-D. (2013). A newly designed degenerate PCR primer based on pmoA gene for detection of nitrite-dependent anaerobic methane-oxidizing bacteria from different

ecological niches. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 97(23), 10155–10162. <https://doi.org/10.1007/s00253-013-5260-8>

Hartmann, J. F., Günthel, M., Klintzsch, T., Kirillin, G., Grossart, H. P., Keppler, F., & Isenbeck-Schröter, M. (2020). High Spatiotemporal Dynamics of Methane Production and Emission in Oxic Surface Water. *Environmental Science and Technology*, 54(3), 1451–1463. <https://doi.org/10.1021/acs.est.9b03182>

Horowitz, N. H. (1945). On the Evolution of Biochemical Syntheses. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 31(6), 153–157. <https://doi.org/10.1073/pnas.31.6.153>

Horowitz NH. (1965). The evolution of biochemical syntheses-retrospect and prospect. In: Bryson V, Vogel HJ, editors. *Evolving genes and proteins*. New York: Academic. p. 15–23

Hug, L. A., Baker, B. J., Anantharaman, K., Brown, C. T., Probst, A. J., Castelle, C. J., Butterfield, C. N., HERNSDORF, A. W., AMANO, Y., ISE, K., SUZUKI, Y., DUDEK, N., RELMAN, D. A., FINSTAD, K. M., AMUNDSON, R., THOMAS, B. C & BANFIELD, J. F. (2016). A new view of the tree of life. *Nature Microbiology*, 1(5), 16048.

Hügler, M., & Sievert, S. M. (2011). Beyond the Calvin cycle: autotrophic carbon fixation in the ocean. *Annual Review of Marine Science*, 3, 261–89.

Jensen, R. A. (1976). Enzyme recruitment in evolution of new function. *Annual Review of Microbiology*, 30(1), 409–425. <https://doi.org/10.1146/annurev.mi.30.100176.002205>

Kanehisa, M., & Goto, S. (2000). KEGG: Kyoto encyclopedia of genes and genomes. *Nucleic Acids Research*, 28(1), 27–30.

Kanehisa, M., Goto, S., Sato, Y., Kawashima, M., Furumichi, M., & Tanabe, M. (2014). Data, information, knowledge and principle: Back to metabolism in KEGG. *Nucleic Acids Research*, 42(D1), 199–205.

Kanehisa, M. (2019). Toward understanding the origin and evolution of cellular organisms. *Protein Science*, 28(11), 1947–1951. <https://doi.org/10.1002/pro.3715>

Keller, M. A., Turchyn, A. V., & Ralser, M. (2014). Non-enzymatic glycolysis and pentose phosphate pathway-like reactions in a plausible Archean ocean. *Molecular Systems Biology*, 10(4), 1–12. <https://doi.org/10.1002/msb.20145228>

Keller, M. A., Zylstra, A., Castro, C., Turchyn, A. V., Griffin, J. L., & Ralser, M. (2016). Conditional iron and pH-dependent activity of a non-enzymatic glycolysis and pentose phosphate pathway. *Science Advances*, 2(1). <https://doi.org/10.1126/sciadv.1501235>

Keller, M. A., Kampjut, D., Harrison, S. A., & Ralser, M. (2017). Sulfate radicals enable a non-enzymatic Krebs cycle precursor. *Nature Ecology and Evolution*, 1(4), 1–9. <https://doi.org/10.1038/s41559-017-0083>

Kitadai, N., Kameya, M., & Fujishima, K. (2017). Origin of the Reductive Tricarboxylic Acid (RTCA) Cycle-Type CO₂ Fixation: A Perspective. *Life*, 7(4). <https://doi.org/10.3390/life7040039>

Klitzsch, T., Langer, G., Nehrke, G., Wieland, A., Lenhart, K., & Keppler, F. (2019). Methane production by three widespread marine phytoplankton species: release rates, precursor compounds, and relevance for the environment. *Biogeosciences Discussions*, October 2018, 1–25. <https://doi.org/10.5194/bg-2019-245>

Lazcano, A., & Miller, S. L. (1999). On the origin of metabolic pathways. *Journal of Molecular Evolution*, 49(4), 424–431. <https://doi.org/10.1007/PL00006565>

Laso-Pérez, R., Wegener, G., Knittel, K., Widdel, F., Harding, K. J., Krukenberg, V., Meier, D. V., Richter, M., Tegetmeyer, H. E., Riedel, D., Richnow, H.-H., Adrian, L., Reemtsma, T., Lechtenfeld, O. J., & Musat, F. (2016). Thermophilic archaea activate butane via alkyl-coenzyme M formation. *Nature*, 539(7629), 396–401. <https://doi.org/10.1038/nature20152>

Lessner, D. J. (2009). Methanogenesis Biochemistry. *Encyclopedia of Life Sciences (ELS)*, (1), 1–11.

Letunic, I., & Bork, P. (2007). Interactive Tree Of Life (iTOL): An online tool for phylogenetic tree display and annotation. *Bioinformatics*, 23(1), 127–128.

Liu, Y., & Whitman, W. B. (2008). Metabolic, Phylogenetic, and Ecological Diversity of the Methanogenic Archaea. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1125(1), 171–189.

Liu, J., Chen, H., Zhu, Q., Shen, Y., Wang, X., Wang, M., & Peng, C. (2015). A novel pathway of direct methane production and emission by eukaryotes including plants, animals and fungi: An overview. *Atmospheric Environment*, 115, 26–35. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.atmosenv.2015.05.019>

Mall A, Sobotta J, Huber C, Tschirner C, Kowarschik S, Bačnik K, Mergelsberg M, Boll M, Hügler M, Eisenreich W, Berg IA (2018). Reversibility of citrate synthase allows autotrophic growth of a thermophilic bacterium. *Science* Feb 2;359(6375):563–567. doi: <https://doi.org/10.1126/science.aao2410>

Martin, W., & Russell, M. J. (2007). On the origin of biochemistry at an alkaline hydrothermal vent. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological Sciences*, 362(1486), 1887–1925.

Martin, W., Weiss, M., Neukirchen, S., Nelson-Sathi, S., & Sousa, F. (2016). Physiology, phylogeny, and LUCA. *Microbial Cell*, 3(12), 451–456.

McGlynn, S. E. (2017). Energy metabolism during anaerobic methane oxidation in ANME archaea. *Microbes and Environments*, 32(1), 5–13. <https://doi.org/10.1264/jsme2.ME16166>

Messner, C. B., Driscoll, P. C., Piedrafita, G., De Volder, M. F. L., & Ralser, M. (2017). Nonenzymatic gluconeogenesis-like formation of fructose 1,6-bisphosphate in ice. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 114(28), 7403–7407. <https://doi.org/10.1073/pnas.1702274114>

Minh, B. Q., Nguyen, M. A. T., & Von Haeseler, A. (2013). Ultrafast approximation for phylogenetic bootstrap. *Molecular Biology and Evolution*, 30(5), 1188–1195.

Morowitz, H. J. (1999). A theory of biochemical organization, metabolic pathways, and evolution. *Complexity*, 4(6), 39–53. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1099-0526\(199907/08\)4:6<39::AID-CPLX8>3.0.CO;2-2](https://doi.org/10.1002/(SICI)1099-0526(199907/08)4:6<39::AID-CPLX8>3.0.CO;2-2)

Muchowska, K. B., Varma, S. J., Chevallot-Beroux, E., Lethuillier-Karl, L., Li, G., & Moran, J. (2017). Metals promote sequences of the reverse Krebs cycle. *Nature Ecology and Evolution*, 1(11), 1716–1721. <https://doi.org/10.1038/s41559-017-0311-7>

Muchowska, K. B., Chevallot-Beroux, E., & Moran, J. (2019). Recreating ancient metabolic pathways before enzymes. *Bioorganic and Medicinal Chemistry*, 27(12), 2292–2297. <https://doi.org/10.1016/j.bmc.2019.03.012>

Muchowska, K. B., Varma, S. J., & Moran, J. (2019). Synthesis and breakdown of universal metabolic precursors promoted by iron. *Nature*, 569(7754), 104–107. <https://doi.org/10.1038/s41586-019-1151-1>

Muñoz-Velasco, I. (2017). Evolución temprana del metabolismo de la metanogénesis. Tesis de Maestría. Universidad Nacional Autónoma de México.

Muñoz-Velasco, I., García-Ferris, C., Hernandez-Morales, R., Lazcano, A., Peretó, J., & Becerra, A. (2019). Methanogenesis on Early Stages of Life: Ancient but Not Primordial. *Origins of Life and Evolution of Biospheres*. <https://doi.org/10.1007/s11084-018-9570-9>

Muñoz-Velasco, I., Miranda I., García-Ferris, C., Hernandez-Morales, R., Lazcano, A., Peretó, J., & Becerra, A. (2020). Autotrophy in the early origin of life, a genomic-network based approximation: The case of the rTCA cycle. In prep.

Nauhaus, K., Treude, T., Boetius, A., & Krüger, M. (2005). Environmental regulation of the anaerobic oxidation of methane: A comparison of ANME-I and ANME-II communities. *Environmental Microbiology*, 7(1), 98–106. <https://doi.org/10.1111/j.1462-2920.2004.00669.x>

Nelson-Sathi, S., Dagan, T., Landan, G., Janssen, A., Steel, M., McInerney, J. O., Deppenmeier, U. & Martin, W. F. (2012). Acquisition of 1,000 eubacterial genes physiologically transformed a methanogen at the origin of Haloarchaea. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 109(50), 20537–42.

Nguyen, L. T., Schmidt, H. A., Von Haeseler, A., & Minh, B. Q. (2015). IQ-TREE: A fast and effective stochastic algorithm for estimating maximum-likelihood phylogenies. *Molecular Biology and Evolution*, 32(1), 268–274.

Nunoura T, Chikaraishi Y, Izaki R, Suwa T, Sato T, Harada T, Mori K, Kato Y, Miyazaki M, Shimamura S, Yanagawa K, Shuto A, Ohkouchi N, Fujita N, Takaki Y, Atomi H, Takai KA (2018). Primordial and reversible TCA cycle in a facultatively chemolithoautotrophic thermophile. *Science* Feb 2;359(6375):559–563. [doi:https://doi.org/10.1126/science.aao3407](https://doi.org/10.1126/science.aao3407)

Paul, K., Nonoh, J. O., Mikulski, L., & Brune, A. (2012). “Methanoplasmatales,” thermoplasmatales-related archaea in termite guts and other environments, are the seventh order of methanogens. *Applied and Environmental Microbiology*, 78(23), 8245–8253.

Peretó, J. (2012). Out of fuzzy chemistry: from prebiotic chemistry to metabolic networks. *Chemical Society Reviews*, 41(16), 5394–5403.

Peters, J. W., & Williams, L. D. (2012). The origin of life: Look up and look down. *Astrobiology*, 12(11), 1087–1092. <https://doi.org/10.1089/ast.2012.0818>

Petitjean, C., Deschamps, P., López-García, P., Moreira, D., & Brochier-Armanet, C. (2015). Extending the conserved phylogenetic core of archaea disentangles the evolution of the third domain of life. *Molecular Biology and Evolution*, 32(5), 1242–1254.

Preiner, M., Xavier, J. C., Do Nascimento Vieira, A., Kleinermanns, K., Allen, J. F., & Martin, W. F. (2019). Catalysts, autocatalysis and the origin of metabolism. *Interface Focus*, 9(6), 1–8. <https://doi.org/10.1098/rsfs.2019.0072>

Preiner, M., Igarashi, K., Muchowska, K. B., Yu, M., Varma, S. J., Kleinermanns, K., Nobu, M. K., Kamagata, Y., Tüysüz, H., Moran, J., & Martin, W. F. (2020). A hydrogen-dependent geochemical analogue of primordial carbon and energy metabolism. *Nature Ecology & Evolution*, Umr 7006, 1–9. <https://doi.org/10.1038/s41559-020-1125-6>

Raghoebarsing, A. A., Pol, A., van de Pas-Schoonen, K. T., Smolders, A. J. P., Ettwig, K. F., Rijpstra, W. I. C., Schouten, S., Damsté, J. S. S., Op den Camp, H. J. M., Jetten, M. S. M., & Strous, M. (2006). A microbial consortium couples anaerobic methane oxidation to denitrification. *Nature*, 440(7086), 918–921. <https://doi.org/10.1038/nature04617>

Ross, M. O., & Rosenzweig, A. C. (2017). A tale of two methane monooxygenases. *JBIC Journal of Biological Inorganic Chemistry*, 22(2–3), 307–319. <https://doi.org/10.1007/s00775-016-1419-y>

Russell, M. J., Hall, A. J., & Martin, W. (2010). Serpentinization as a source of energy at the origin of life. *Geobiology*, 8(5), 355–371.

Schäfer, S., Barkowski, C., & Fuchs, G. (1986). Carbon assimilation by the autotrophic thermophilic archaeobacterium *Thermoproteus neutrophilus*. *Archives of Microbiology*, 146(3), 301–308. <https://doi.org/10.1007/BF00403234>

Sánchez-Andrea, I., Guedes, I. A., Hornung, B., Boeren, S., Lawson, C. E., Sousa, D. Z., Bar-Even, A., Claassens, N. J., & Stams, A. J. M. (2020). The reductive glycine pathway allows autotrophic growth of *Desulfovibrio desulfuricans*. *Nature Communications*, 11(1), 5090. <https://doi.org/10.1038/s41467-020-18906-7>

Scossa, F., & Fernie, A. R. (2020). The evolution of metabolism: How to test evolutionary hypotheses at the genomic level. *Computational and Structural Biotechnology Journal*, 18(February), 482–500. <https://doi.org/10.1016/j.csbj.2020.02.009>

Sehauder, R., Widdel, F., & Fuchs, G. (1987). Carbon assimilation pathways in sulfate-reducing bacteria II. Enzymes of a reductive citric acid cycle in the autotrophic *Desulfobacter hydrogenophilus*. *Archives of Microbiology*, 148, 218–225. <https://doi.org/https://doi.org/10.1007/BF00414815>

- Shi, L., & Tu, B. P. (2015). Acetyl-CoA and the regulation of metabolism: Mechanisms and consequences. *Current Opinion in Cell Biology*, 33, 125–131. <https://doi.org/10.1016/j.ceb.2015.02.003>
- Shiba, H., Kawasumi, T., Igarashi, Y., Kodama, T., & Minoda, Y. (1985). The CO₂ assimilation via the reductive tricarboxylic acid cycle in an obligately autotrophic, aerobic hydrogen-oxidizing bacterium, *Hydrogenobacter thermophilus*. *Archives of Microbiology*, 141, 198–203. <https://doi.org/https://doi.org/10.1007/BF00408058>
- Shin, J., Song, Y., Jeong, Y., & Cho, B.-K. (2016). Analysis of the Core Genome and Pan-Genome of Autotrophic Acetogenic Bacteria. *Frontiers in Microbiology*, 7(September).
- Sorokin, D. Y., Makarova, K. S., Abbas, B., Ferrer, M., Golyshin, P. N., Galinski, E. A., Ciordia, S., Mena, M. C., Merkel, A. Y., Wolf, Y. I., van Loosdrecht, M. C. M. & Koonin, E. V. (2017). Discovery of extremely halophilic, methyl-reducing euryarchaea provides insights into the evolutionary origin of methanogenesis. *Nature Microbiology*, 2(May), 17081.
- Sousa, F. L., Thiergart, T., Landan, G., Nelson-Sathi, S., Pereira, I. a C., Allen, J. F., Lane, N, Martin, W. F. (2013). Early bioenergetic evolution. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological Sciences*, 368(1622), 20130088.
- Spang, A., Caceres, E. F., & Ettema, T. J. G. (2017). Genomic exploration of the diversity, ecology, and evolution of the archaeal domain of life. 3883. <https://doi.org/10.1126/science.aaf3883>
- Tang, K. H., & Blankenship, R. E. (2010). Both forward and reverse TCA cycles operate in green sulfur bacteria. *Journal of Biological Chemistry*, 285(46), 35848–35854. <https://doi.org/10.1074/jbc.M110.157834>
- Timmers, P. H. A., Suarez-Zuluaga, D. A., Van Rossem, M., Diender, M., Stams, A. J. M., & M Plugge, C. (2016). Anaerobic oxidation of methane associated with sulfate reduction in a natural freshwater gas source. *ISME Journal*, 10(6), 1400–1412. <https://doi.org/10.1038/ismej.2015.213>
- Timmers, P. H. A., Welte, C. U., Koehorst, J. J., Plugge, C. M., Jetten, M. S. M., & Stams, A. J. M. (2017). Reverse Methanogenesis and Respiration in Methanotrophic Archaea. *Archaea*, 2017(Figure 1). <https://doi.org/10.1155/2017/1654237>
- Ueno, Y., Yamada, K., Yoshida, N., Maruyama, S., & Isozaki, Y. (2006). Evidence from fluid inclusions for microbial methanogenesis in the early Archaean era. *Nature*, 440(7083), 516–519.
- Vanwonterghem, I., Evans, P. N., Parks, D. H., Jensen, P. D., Woodcroft, B. J. 5, Hugenholtz, P., & Tyson, G. W. (2016). Methylophilic methanogenesis discovered in the novel archaeal Phylum Verstraetearchaeota. *Nature*, (October), 1–9.
- Verschuere, K. H. G., Blanchet, C., Felix, J., Dansercoer, A., De Vos, D., Bloch, Y., Van Beeumen, J., Svergun, D., Gutsche, I., Savvides, S. N., & Verstraete, K. (2019). Structure of ATP citrate lyase and the origin of citrate synthase in the Krebs cycle. *Nature*, 568(7753), 571–575. <https://doi.org/10.1038/s41586-019-1095-5>

Weiss, M. C., Sousa, F. L., Mrnjavac, N., Neukirchen, S., Roettger, M., Nelson-sathi, S., & Martin, W. F. (2016). The physiology and habitat of the last universal common ancestor. *Nature Microbiology*, (July), 1–8.

Wächtershäuser, G. (1988). Before Enzymes and Templates: Theory of Surface Metabolism. *Microbiological Reviews*, 52(4), 452–484.

White, L. M., Shibuya, T., Vance, S. D., Christensen, L. E., Bhartia, R., Kidd, R., Hoffmann, A., Stucky, G. D., Kanik, I., & Russell, M. J. (2020). Simulating Serpentinization as It Could Apply to the Emergence of Life Using the JPL Hydrothermal Reactor. *Astrobiology*, 20(3), 307–326. <https://doi.org/10.1089/ast.2018.1949>

Whitman, W. B., Bowen, T. L., & Boone, D. R. (2006). *The Methanogenic Bacteria. Prokaryotes Vol. 3.*

Williams, T. A., Szöllősi, G. J., Spang, A., Foster, P. G., Heaps, S. E., Boussau, B., Ettema, T. J. G. & Embley, T. M. (2017). Integrative modeling of gene and genome evolution roots the archaeal tree of life. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 201618463.

Xavier, J. C., Hordijk, W., Kauffman, S. A., Steel, M., & Martin, W. F. (2020). Autocatalytic chemical networks at the origin of metabolism. *Proceedings of the Royal Society B*, in press. <https://doi.org/10.1098/rspb.2019.2377>

Ycas, M. (1974). On earlier states of the biochemical system. *Journal of Theoretical Biology*, 44(1), 145–160. [https://doi.org/http://dx.doi.org/10.1016/S0022-5193\(74\)80035-4](https://doi.org/http://dx.doi.org/10.1016/S0022-5193(74)80035-4)