



**EDUCACIÓN**  
SECRETARÍA DE EDUCACIÓN PÚBLICA



TECNOLÓGICO  
NACIONAL DE MÉXICO®

Instituto Tecnológico de Tuxtla Gutiérrez

División de Estudios de Posgrado e Investigación

**INSTITUTO TECNOLÓGICO DE TUXTLA GUTIÉRREZ**

**ANÁLISIS DEL MICROBIOMA DEL LAGO CRATÉRICO DEL  
VOLCÁN EL CHICHÓN: UN ENFOQUE MULTIÓMICO**

**COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER EL GRADO DE:**

**DOCTOR EN CIENCIAS DE LOS ALIMENTOS Y  
BIOTECNOLOGÍA**

**PRESENTA:**

**M. en C. Betsy Anaid Peña Ocaña**

**DIRECTOR DE TESIS:**

**Dr. Víctor Manuel Ruíz Valdiviezo**

**TUXTLA GUTIÉRREZ, CHIAPAS.**

**ENERO 2021**



Carretera Panamericana Km. 1080, C. P. 29050, Apartado Postal 599, Tuxtla Gutiérrez, Chiapas.

Tel. (961) 61 5 04 61, 61 5 01 38, 61 5 48 08 Ext. 325 e-mail: [posgrado@itg.edu.mx](mailto:posgrado@itg.edu.mx)

[www.tuxtla.tecnm.mx](http://www.tuxtla.tecnm.mx)



RSGG 942  
Fecha de Inicio: 2015.10.13  
Fecha de Último Ciclo: 2018.10.13  
Fecha de Renovación: 2018.10.13  
Fecha de Terminación: 2021.10.13



APOYAMOS  
EL PACTO GLOBAL



**Instituto Tecnológico de Tuxtla Gutiérrez**

División de Estudios de Posgrado e Investigación

Tuxtla Gutiérrez, Chiapas; a 12 de enero de 2021

Oficio Depi /003/2021

**C. M. EN C. BETSY ANAID PEÑA OCAÑA**

**PASANTE DEL DOCTORADO EN CIENCIAS DE LOS ALIMENTOS Y BIOTECNOLOGÍA  
EGRESADO DEL INSTITUTO TECNOLÓGICO DE TUXTLA GUTIÉRREZ**

**PRESENTE.**

Habiendo recibido la comunicación, por parte de los CC. DR. VÍCTOR MANUEL RUIZ VALDIVIEZO, DR. FEDERICO ANTONIO GUTIERREZ MICELI, DR. REINER RINCON ROSALES, DR. LUIS SERVÍN GARCÍDUEÑAS en el sentido de que se encuentra satisfactorio el contenido de la tesis denominada "ANÁLISIS DEL MICROBIOMA DEL LAGO CRATÉRICO DEL VOLCÁN EL CHICHÓN: UN ENFOQUE MULTIÓMICO", elaborada por usted, como prueba escrita para obtener el Grado de Doctora en Ciencias de los Alimentos y Biotecnología, AUTORIZAMOS a que se proceda a la impresión de la misma.

SIN MAS POR EL MOMENTO ENVIO UN CORDIAL SALUDO.

**ATENTAMENTE.**

Vo. Bo.

*Excelencia en Educación Tecnológica.*

*"Ciencia y Tecnología con Sentido Humano"*

**DR. JUAN JOSÉ VILLALOBOS MALDONADO**  
**JEFE DE LA DIVISION DE POSGRADO E**  
**INVESTIGACION.**



**M. C. JOSÉ MANUEL ROSADO PÉREZ**  
**DIRECTOR.**

ccp. Archivo



Carretera Panamericana Km. 1080, C.P. 29050,

Apartado Postal 599, Tuxtla Gutiérrez, Chiapas.

Tel. (961) 615 0461, 615 0138, 615

4808, ext. 305-306



## **AGRADECIMIENTOS**

A CONACYT por la beca otorgada (455194) para la realización del Doctorado en Ciencias de los alimentos y Biotecnología.

Al CONACyT por el financiamiento del proyecto Ciencia Básica 2015 CONACyT No. 253281: Análisis metagenómico de la estructura de las comunidades microbianas y su expresión genética en el lago del cráter del volcán El Chichón”.

Al Tecnológico Nacional de México por el financiamiento (6603.18-P, 8216.20-P) para el desarrollo del proyecto.

Al Departamento de Bioquímica del Instituto Nacional de Cardiología ‘Ignacio Chávez’ por el apoyo otorgado y al proyecto Infraestructura CONACyT 281428 para el desarrollo de la tesis.

## RESUMEN

Recientemente, estudiar ambientes naturales extremos es de gran interés en la ciencia. En México, un ambiente natural poli-extremo es el volcán activo El Chichón, cuya diversidad microbiana ha sido poco estudiada. El objetivo de este proyecto fue caracterizar la diversidad y funcionalidad microbiana presente en el lago del cráter del volcán, empleando un conjunto de ciencias ómicas como: metagenómica dirigida y no dirigida, metabolómica dirigida, determinación de metabolismo intermediario y enzimología, con la finalidad de caracterizar en ciclo del carbono y azufre, como propuesta de metabolismo energético, así como, los mecanismos de resistencia empleados por el microbioma del volcán El Chichón.

Mediante secuenciación masiva de nueva generación, se analizaron metagenomas de sedimento mesófilo (45°C) y columna de agua hipertermófila (82°C). Los resultados evidenciaron que el incremento en la temperatura, el cambio en el pH y la concentración de metales disminuye la diversidad de los microorganismos en el lago cráter. En condiciones mesófilas (45°C) se identificaron 189 géneros, que corresponden a: 70% bacterias, 10% arqueas, <3% microalgas, y 1 % virus. En las muestras hipertermófilas(82°C), se identificaron 42 géneros, que corresponden a 80% arqueas y 20% bacterias.

Se diseñó una estrategia para el cultivo en laboratorio de microorganismos extremófilos, logrando el cultivo de 13 de los géneros (23% arqueas y 77% bacterias). Con lo cual, se determinó flujos metabólicos en el ciclo del carbono (producción de metano) y en el ciclo del azufre (producción de sulfuro), lográndose determinar una relación sintrófica entre bacterias reductoras de sulfato (Phylum Firmicutes) y arqueas metanogénicas. También, se logró estudiar algunos mecanismos relacionados con la tolerancia a las condiciones poli-extremas, destacando la formación de biopelículas, síntesis y degradación de polifosfatos y presencia de moléculas con grupos tiol.

En este estudio, se logró integrar enfoques culturómicos, metagenómicos y metabolómicos para proporcionar una visión integral del microbioma del lago cratérico del volcán El Chichón. Fue posible describir la composición taxonómica

ambiental la cual está dominada por el arqueón *C. Aramenus* y bacterias de los géneros *Hydrogenobaculum* y *Termotogae*, así como, sus principales rasgos funcionales en la obtención de fuentes de carbono y metabolismo energético mediante datos metagenómicos, los cuales, se validaron empleando cultivos microbianos representativos del ambiente.

**Palabras clave:** extremófilos, metagenómica, metabolismo intermediario, metabolómica, enzimología, metabolismo del carbono, metabolismo del azufre.

## **ABSTRACT**

Recently, studying extreme natural environments is of great interest in science. In Mexico, a poly-extreme natural environment is the active volcano El Chichón, whose microbial diversity has been little studied. The objective of this project was to characterize the diversity and microbial functionality present in the crater lake of the volcano, using a set of omic sciences such as: directed and undirected metagenomics, directed metabolomics, determination of intermediate metabolism and enzymology, in order to characterize in the carbon and sulfur cycle, as a proposal for energy metabolism, as well as the resistance mechanisms used by the El Chichón volcano microbiome.

Using new generation massive sequencing, metagenomes of mesophilic sediment (45 ° C) and hyperthermophilic water column (82 ° C) were analyzed. The results showed that the increase in temperature, the change in pH and the concentration of metals decrease the diversity of microorganisms in the crater lake. Under mesophilic conditions (45 ° C), 189 genera were identified, corresponding to: 70% bacteria, 10% archaea, <3% microalgae, and 1% virus. In the hyperthermophilic samples (82 ° C), 42 genera were identified, corresponding to 80% archaea and 20% bacteria.

A strategy was designed for the laboratory cultivation of Extremophilic microorganisms, achieving the cultivation of 13 of the genera (23% archaea and 77% bacteria). With this, metabolic fluxes in the carbon cycle (methane production) and in the sulfur cycle (sulfur production) were determined, achieving a syntrophic relationship between sulfate-reducing bacteria (Phylum Firmicutes) and methanogenic archaea. Also, some mechanisms related to tolerance to poly-extreme conditions could be studied, highlighting the formation of biofilms, synthesis and degradation of polyphosphates and the presence of molecules with thiol groups.

In this study, it will be possible to integrate cultural, metagenomic and metabolomic approaches to provide a comprehensive view of the microbiome of the crater lake of the El Chichón volcano. It was possible to describe the environmental taxonomic composition which is dominated by the archaeon *C. Aramenus* and bacteria of the *Hydrogenobaculum* and *Termotogae* genera, as well as their main functional traits

in obtaining carbon sources and energy metabolism through metagenomic data, which, they were validated using microbial cultures representative of the environment.

**Keywords:** Extremophiles, Metagenomics, Intermediate Metabolism, Metabolomics, Enzymology, Carbon Metabolism, Sulfur Metabolism.

## GLOSARIO

**Ensambleje en modo co-assembly:** Es un procedimiento de ensamblaje de metagenomas conjuntos junto con mapeo de lectura para la estimación de la abundancia de genes individuales en cada metagenoma.

**Contigs:** Es una serie de secuencias (ADN) superpuestas utilizadas para hacer un mapa físico para reconstruir la secuencia original de ADN de un cromosoma o de una región de un cromosoma.

**Genoespecies:** La sistemática microbiana reconoce dos tipos de especie natural, la especie evolutiva o filo especie y la especie genética o genoespecie. Una filo especie, es en general aquella clasificada en función a un carácter único de hibridación de DNA de secuencias del gen 16S rRNA. Sin embargo, la especie biológica moderna va más allá de esto, pues, una genoespecie, es un microorganismo considerado en función de sus criterios genéticos más profundos.

**Uphill potential gradient:** Transporte de electrones en contra sentido. En esencia, la energía invertida en la bomba de  $\text{Na}^+ - \text{K}^+$  por la hidrólisis de ATP ha creado un gradiente de  $\text{Na}^+$ ,  $\text{H}^+$  o fuerza protón-motriz a través de la membrana que puede desplegarse para energizar el transporte activo secundario de solutos cuya translocación a través de la membrana es acoplado al de  $\text{Na}^+$ .

**Arqueón:** Las arqueas son microorganismos unicelulares que componen el dominio Archaea, El termino arqueón hace referencia a un único representante del grupo Archaea.

**Cinetómica:** Hace referencia al estudio del conjunto de flujos enzimáticos de un proceso o vía metabólica en particular.

**Metabolismo intermediario:** Hace referencia a una serie de vías metabólicas centrales involucradas en la síntesis, degradación y conversión de metabolitos y conversión de energía.



**Bioprospección:** Es el estudio dedicado a la exploración de la biodiversidad y hallazgo de organismos y sustancias con potencial beneficio para el ser humano.

**Homopolímeros:** Secuencias de varios nucleótidos iguales, son considerados errores cometidos por la polimerasa, o por el proceso de secuenciación.

**Metagenómica Shotgun:** Análisis de secuenciación el DNA total de una comunidad microbiana compleja, compuesta por bacterias, hongos, virus o una combinación de ellos. Actualmente es realizado empleando herramientas de secuenciación másiva de segunda y tercera generación.

**Marco de lectura abierto:** Es una porción de DNA que comprende entre el codón de inicio de traducción y el codón de terminación, cuando se traduce a aminoácidos, no contiene codones de terminación.

**KO:** Identificador de genes ortólogos de KEGG, la base de datos KO (KEGG Orthology) es una base de datos moleculares para la caracterización funcional de secuencias de genomas y metagenomas.

# CONTENIDO

## RESUMEN

## ABSTRACT

<b>ÍNDICE DE CUADROS</b>	i
<b>ÍNDICE DE FIGURAS</b>	ii
<b>1 INTRODUCCIÓN</b>	7
<b>2 ANTECEDENTES</b>	9
2.1 Volcanes	9
2.1.1 Volcanes en México	9
2.2 Interacción microorganismos con ambiente	11
2.3 Microorganismos en ambientes extremos volcánicos	12
2.4 Participación de los microorganismos en los procesos geológicos	15
2.5 Ciclos biogeoquímicos en ambientes volcánicos	18
2.5.1 Ciclo del carbono	18
2.5.2 Ciclo del azufre	22
2.6 Estudio de la biodiversidad microbiana en ambientes extremos	26
2.6.1 Técnicas dependientes de cultivo	26
2.6.2 Técnicas independientes del cultivo	27
2.6.3 Ciencias ómicas aplicadas a la elucidación de metabolismo microbiano	27
<b>3 JUSTIFICACIÓN</b>	29
<b>4 OBJETIVOS</b>	30
4.1 Objetivo general	30
4.1.1 Objetivos particulares	30
<b>5 HIPÓTESIS</b>	30
<b>6 METODOLOGÍA</b>	31
6.1 Estrategia experimental	31
6.2 Establecimiento de sistema de cultivo para el crecimiento de microorganismos del volcán El Chichón	31
6.2.1 Caracterización fisicoquímica	32
6.2.2 Análisis de la diversidad microbiana en muestras ambientales	32

6.2.3	Diseño de medio de cultivo para enriquecimiento de microorganismos involucrados en los ciclos biogeoquímicos de carbono y azufre	33
6.2.4	Efectividad del sistema de cultivo microbiano	36
6.3	Evaluación de diversidad microbiana y potencial metabólico del microbioma del volcán El Chichón	38
6.3.1	Diversidad taxonómica	39
6.3.2	Ciclo del carbono	39
6.3.3	Ciclo del azufre	42
6.4	Identificación de los mecanismos de resistencia	45
6.4.1	Potencial genómico de los mecanismos de tolerancia a condiciones poli-extremas	46
6.4.2	Identificación de mecanismos de tolerancia a las condiciones poliextremas en los microorganismos del volcán El Chichón	47
6.5	Descripción de modelo de red	49
6.5.1	Identificación de la interacción microbiana con el ecosistema mediante análisis multiparamétrico	49
6.5.2	Construcción de red metabólica	49
<b>7</b>	<b>RESULTADOS Y DISCUSIÓN</b>	<b>51</b>
7.1	Diseño de la estrategia para la determinación de la diversidad y funcionalidad del microbioma del volcán El Chichón	51
7.2	Eficiencia del sistema de cultivo	52
7.2.1	Fisicoquímica del lago cratérico del volcán El Chichón	52
7.2.2	Diversidad porcarionte en muestras ambientales	55
7.2.3	Formulación de medios de cultivo	56
7.2.4	Cinéticas de crecimiento	57
7.2.5	Dinámica microbiana por metagenómica dirigida (16S rRNA)	61
7.2.6	Predicción metabólica de consorcios Lab-Lake	62
7.3	Evaluación de diversidad y potencial metabólico del microbioma del volcán El Chichón	64
7.3.1	Diversidad taxonómica	64
7.3.2	Ciclo del carbono	70
7.3.3	Ciclo del azufre	75
7.3.4	Identificación de mecanismos de resistencia	83
7.3.5	Potencial genómico	83

7.4	Descripción de modelo de red	92
<b>8</b>	<b>CONCLUSIONES</b>	<b>96</b>
<b>9</b>	<b>PERSPECTIVAS</b>	<b>97</b>
<b>10</b>	<b>BIBLIOGRAFÍA</b>	<b>98</b>
<b>11</b>	<b>ANEXOS</b>	<b>108</b>

Anexo 1. Preparación buffer TME-Na

Anexo 2. Preparación de buffer HKE-Na

Anexo 3. Determinación de sulfuro

Anexo 4. Determinación de polifosfatos intracelular

## INDICE DE CUADROS

<b>Cuadro 1.</b> Ambientes modelo de estudio en extremofilia. _____	12
<b>Cuadro 2.</b> Clasificación de microorganismos en función a los parámetros ambientales de los nichos ecológicos que habitan. _____	14
<b>Cuadro 3.</b> Características fisicoquímicas in situ de sedimentos y aguas del lago cráter del volcán El Chichón. _____	53
<b>Cuadro 4.</b> Concentración elemental en sedimentos y agua del lago del volcán El Chichón _____	54
<b>Cuadro 5.</b> Concentración de iones presentes en columna de agua del lago del volcán El Chichón _____	54
<b>Cuadro 6.</b> Resultados del análisis de secuenciación de gen 16S rRNA _____	55
<b>Cuadro 7.</b> Índices de riqueza y diversidad de microorganismos presentes en el lago cratérico del volcán El Chichón _____	67
<b>Cuadro 8.</b> Balance de carbono de cultivos microbianos _____	75
<b>Cuadro 9.</b> Actividad enzimática de sulfito reductasa _____	80
<b>Cuadro 10.</b> Actividad enzimática de la vía de reducción de sulfato NO asimilatoria _____	81

## INDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1 Diagrama esquematizado de las principales vías del ciclo biogeoquímico del carbono.</b>	<b>19</b>
<b>Figura 2 Diagrama esquematizado de las principales vías metanogénicas</b>	<b>21</b>
<b>Figura 3 Diagrama esquematizado de las principales vías metabólicas del ciclo del azufre.</b>	<b>23</b>
<b>Figura 4 Diagrama esquematizado del proceso de sulfato reducción.</b>	<b>25</b>
<b>Figura 5 Etapas de la estrategia experimental.</b>	<b>31</b>
<b>Figura 6 Ubicación geográfica del volcán El Chichón.</b>	<b>32</b>
<b>Figura 7 Diseño de experimento exposición aguda a condiciones poliextremas.</b>	<b>46</b>
<b>Figura 8 . Flujo de trabajo empleado para el análisis del microbioma del volcán activo El Chichón.</b>	<b>51</b>
<b>Figura 9 Muestras empleadas para el sistema de cultivo ‘Lab-Lake’.</b>	<b>56</b>
<b>Figura 10 Estrategia experimental para la determinación de actividad metabólica en las comunidades microbianas del lago-cráter del volcán El Chichón.</b>	<b>57</b>
<b>Figura 11 Cinéticas de crecimiento de cultivos microbianos del lago cráter del volcán El Chichón.</b>	<b>59</b>
<b>Figura 12 Cinética de crecimiento de cultivo mesófilo Lab-Lake en presencia de FeSO<sub>4</sub> como fuente de azufre.</b>	<b>60</b>
<b>Figura 13 Abundancia relativa de los cultivos microbianos Lab-Lake.</b>	<b>61</b>
<b>Figura 14 Perfil predictivo del potencial metabólico de los cultivos microbianos Lab-Lake.</b>	<b>63</b>
<b>Figura 15 Abundancia relativa de microorganismos presentes en muestras ambientales.</b>	<b>65</b>
<b>Figura 16 Comparación diversidad taxonómica muestras ambientales y cultivos microbianos.</b>	<b>66</b>
<b>Figura 17 Mapa metabólico construido a partir de evidencia genómica recuperada de muestras mesófilas e hipertermófilas de ambiente natural.</b>	<b>71</b>

<b>Figura 18 Electroforesis gen mcr.</b>	<b>73</b>
<b>Figura 19 Dinámica del metabolismo intermediario en cultivos microbianos.</b>	<b>74</b>
<b>Figura 20 Mapa metabólico reducción de sulfato y oxidación del sulfuro construido a partir de evidencia genómica recuperada de muestras mesófilas e hipertermófilas de ambiente natural.</b>	<b>76</b>
<b>Figura 21 . Electroforesis de amplificación del gen aprA.</b>	<b>78</b>
<b>Figura 22 Dinámica de producción de sulfuro en cultivos microbianos.</b>	<b>79</b>
<b>Figura 23 Descripción general del potencial genómico para la respuesta a condiciones poli-extremas en microorganismos del volcán El Chichón.</b>	<b>84</b>
<b>Figura 24 Contenido de fosfatos y polifosfatos intracelular en cultivos microbianos mesófilos e hipertermófilos.</b>	<b>86</b>
<b>Figura 25 Actividad enzimática de la síntesis y degradación de polfosfatos.</b>	<b>88</b>
<b>Figura 26 Contenido tioles totales intracelular en cultivos microbianos mesófilos y hipertermófilos.</b>	<b>90</b>
<b>Figura 27 Red de interacción metabólica del carbono, azufre y mecanismos de respuesta a estrés en el microbioma del lago cratérico del volcán El Chichón.</b>	<b>92</b>
<b>Figura 28 . Red metabólica y taxonómica dirigida del microbioma del volcán El Chichón.</b>	<b>93</b>
<b>Figura 29 Red metabólica comparativa del metabolismo en el ambiente natural extremo El Chichón y los cultivos microbianos Lab-lake.</b>	<b>95</b>

# 1 INTRODUCCIÓN

La tierra primitiva era muy diferente a la que habitamos hoy, la atmosfera estaba constituida por una mezcla de gases tóxicos y temperaturas elevadas, que generaban condiciones extremas poco favorables para la vida, sin embargo, algunos microorganismos desarrollaron capacidades que les permitieron colonizar incluso estos ambientes (Lewin et al., 2013; Ranjan et al., 2018; Roy et al., 2020). Las comunidades microbianas extremófilas han tenido la habilidad de adaptarse a diferentes niveles de estrés, desarrollando diversos mecanismos de tolerancia. Estas características son de gran relevancia debido al interés en la comprensión de la historia evolutiva, así como. Al desarrollo de estrategias para la biorremediación, la producción de extremoenzimas que permiten hacer más eficientes los procesos industriales. En la actualidad, se busca aprovechar los mecanismos de la naturaleza y optimizar estrategias de gran valor como: i) las energías verdes o renovables (biogás), ii) la remoción de metales pesados y tóxicos para el hombre, iii) la descontaminación biológica de efluentes contaminados, entre muchas otras oportunidades de la biotecnología (Fenchel et al., 2012).

Para comprender el efecto y la funcionalidad que los microorganismos ejercen en el ambiente es necesario emplear la denominada “ciencia de precisión”, que es el estudio conjunto de diferentes disciplinas de la era post-genómica (Oliver et al., 2019; Pinu et al., 2019). Pocos estudios de este tipo han sido empleados para la elucidación de procesos y funcionalidad del microbioma de ambientes naturales (Mallan et al., 2018). Esto se debe a que son modelos biológicos dinámicos y complejos. Por esta razón surge la necesidad de generar conocimiento que permita comprender lo que ocurre en ambientes de gran importancia para la investigación científica, como los ambientes extremos.

En este estudio se hace referencia al uso de las ciencias genómicas, la metabolómica, así como, la enzimología aplicadas al estudio del ambiente extremo natural El Chichón, es un volcán activo estratificado con actividad letal (Orme, 1982), constituido principalmente de vapores de ácido sulfúrico y ceniza, en el interior del cráter existe un lago de composición química y volumen variable (Taran et al. 2008;



Ovando-Chacón et al., 2020), con temperaturas que se encuentran en el rango de los 30 a los 95°C y pH ácidos en el rango de 1 hasta 4. Este sitio geotérmico ha sido objeto de investigaciones científicas en áreas de hidroquímica, geología y vulcanología (Tarán et al., 2008; Cuoco et al., 2013). Recientemente, Rincón-Molina et al. (2019) reportaron por vez primera la presencia de bacterias en sedimentos del lago-cráter de este volcán, abriendo así, una ventana de oportunidad para la descripción y aplicación del potencial bioquímico y biotecnológico de estos microorganismos.

Por lo anterior, analizar la diversidad y funcionalidad del lago cráter del volcán El Chichón y estudiar los mecanismos de resistencia de este tipo de microorganismos a condiciones poli-extremas resultaría de mucha utilidad para comprender procesos metabólicos y determinar el potencial biotecnológico para el beneficio humano.

## **2 ANTECEDENTES**

### **2.1 Volcanes**

Los volcanes son estructuras geológicas prominentes, en donde los fluidos y gases del subsuelo profundo se descargan a lo largo de una red de fracturas en regiones tectónicamente activas (Mardanov et al., 2020). Los volcanes han sido considerados como una fuente destructiva, sin embargo, estos podrían tener un papel determinante en la evolución de la tierra. Inclusive, en la actualidad son de gran utilidad, puesto que ayudan a mitigar el calentamiento de la atmósfera, y son una fuente de microorganismos extremófilos útiles en la biotecnología gracias a la producción de extremozimas (McKenzie, 2017). Es por esto que, diversos estudios se han centrado en estos ecosistemas extremos, por ejemplo, el estudio del volcán Isla Barre en India, del cual se han logrado aislar bacterias promotoras de crecimiento vegetal (Amaesan et al., 2013), También se ha estudiado la diversidad de bacterias extremófilas en sedimentos del volcán ojo salado, Argentina-Chile (Aszalos et al., 2016), así como, el estudio metagenómico de biopelículas en el volcán Lago de Diamante, Argentina (Rascovan et al., 2016).

#### **2.1.1 Volcanes en México**

Chiapas es sin duda, uno de los estados con regiones con más variedad de especies animales, hongos y plantas, mismas que se encuentran en regiones llamadas naturales de las cuales el 2.15% está representado por superficie volcánica (Contreras y Salgado, 2012).

Chiapas cuenta con dos volcanes importantes: El Chichón y El Tacaná, que se encuentran en los límites del estado de Chiapas, en el sureste de México. El Chichón es el más joven de los volcanes que forman el arco volcánico Chiapaneco (Scolamacchia y Macías, 2015).

### 2.1.1.1 Volcán activo El Chichón

El volcán El Chichón está cubierto por una región selvática, misma que era casi desconocida hasta en el año de 1982, año en el que el volcán presentó actividad. Durante los meses de marzo y abril de este año tuvo lugar una serie de procesos eruptivos que provocaron el mayor desastre volcánico en la historia moderna de México. Se estima que causó aproximadamente 2,000 muertes, varios pueblos fueron destruidos y muchas familias fueron reubicadas en diversas zonas del estado y país y otras optaron migrar por cuenta propia (Scolamacchia y Macías, 2015).

El volcán el Chichón cuenta con un sistema hidrotermal, un lago cráter formado después de la erupción de 1982, el cual es alimentado por dos depósitos acuíferos, una salmuera hidrotermal de gases magmáticos y una poza salada hidrotermal (Taran y Peiffer., 2009; Peiffer et al., 2011; Cuoco et al., 2013). El lago cratérico del volcán se encuentra compuesto por hervideros, suelo caliente y aberturas con forma irregular que trae como consecuencia la presencia de fumarolas, presenta temperaturas que oscilan de 58 a 96°C y pH de 4 a 8 (Contreras y Salgado, 2012). Después de la erupción, diversos estudios han sido enfocados principalmente a la composición química de los gases y vertidos fumarólicos (Tassi et al., 2003), sismicidad asociada a la erupción (Espíndola, 2006), hidrología, hidroquímica y potencial geotérmico (Jones et al., 2008), monitoreo hidrogeoquímico en el lago del cráter del volcán (Armienta et al., 2014) como estrategia de monitoreo continuo con la finalidad de evitar riesgos. Además, el aislamiento e identificación de bacterias productoras de lipasas del lago-cráter del volcán El Chichón (Ovando Chacón et al., 2020;) y el estudio de las comunidades bacterianas presentes en este ambiente (Rincón-Molina et al., 2019).

A partir del año 2015 a la fecha, diversas investigaciones realizadas en el Instituto Tecnológico de Tuxtla Gutiérrez han dado indicio de una intensa actividad microbiana en el lago-cráter de El Chichón. Entre ellas destacan, la realizada por Ovando-Chacón et al. (2020), quienes identificaron bacterias (*Geobacillus jurassicus* y *Geobacillus steatothermophilus*) productoras de lipasas aisladas a partir del lago-cráter. Por su parte, Rincón-Molina et al. (2019), lograron identificar

molecularmente bacterias del lago cratérico encontrando cuatro géneros diferentes: *Burkholderia*, *Bacillus*, *Pantoea* y *Stenotrophomonas*, ubicándose la mayoría de las especies bacterianas en el género *Pantoea*. En 2018, Velázquez-Ríos y Ruíz-Valdiviezo lograron la identificación molecular de bacterias sulfato reductoras. Por último, en 2019 se logró cultivar bacterias hípertolerantes a arsénico, a partir de sedimentos y columna de agua del lago cratérico (Ovando-Ovando, 2019).

A pesar de estos esfuerzos por caracterizar el microbioma presente en este ambiente natural extremo, poco o nada se conoce sobre cómo se llevan a cabo los procesos involucrados en el metabolismo central de estos extremófilos, aspectos sobre la regulación genética, potencial bioquímico, la forma en la que diversos factores ambientales afectan la estequiometría ecológica del ambiente, así como los mecanismos de tolerancia empleados.

## **2.2 Interacción microorganismos con ambiente**

Las condiciones ambientales influyen en gran medida en la diversidad y la capacidad metabólica microbiana. Es bien sabido que existe una fuerte correlación entre los microorganismos y las condiciones del ambiente que ocupan; dichas condiciones están definidas por numerosas variables entre las que se encuentran temperatura, presión, humedad, radiación, pH, salinidad y cantidad y tipo de nutrientes (Langenheder, y Lindström, 2019). Estos parámetros condicionan las especies que se establecen en un hábitat y, a su vez, estas especies ejercen una evidente influencia sobre el ambiente.

Los diferentes metabolismos que poseen los microorganismos de una comunidad, se integran a los procesos que tienen lugar en un ecosistema, interviniendo de ese modo en los ciclos de los elementos más representativos de cada ambiente. Algunos ejemplos de estas actividades microbianas y sus impactos, son los metabolismos degradativos (celulolíticos, pectinolíticos, proteolíticos) que proveen fuentes de carbono más accesibles para otros miembros del ecosistema (Setyaningsih et al., 2019; Naresh et al., 2019), las acciones nitrificantes,

desnitrificantes o fijadoras de nitrógeno que poseen diversos microorganismos y la capacidad de oxidación o reducción de distintos compuestos y elementos como oxígeno, azufre, hierro para hacerlos accesibles a otras especies(Lai et al., 2019; Pérez-Henández et al., 2020).

### 2.3 Microorganismos en ambientes extremos volcánicos

Los ambientes extremos se definen como aquellos en los que una o más características fisicoquímicas se encuentran fuera de los parámetros normales para la vida humana (Kristjansson y Hreggvidsson, 1995; Stetter 2008). Es necesario aclarar, que la definición así planteada hace referencia a los parámetros normales para la vida humana; obviamente para las especies que se desarrollan en ambientes extremos, dichas condiciones son las normales.

Las variables más importantes que pueden afectar las funciones y estructuras de componentes celulares (como membranas, ácidos nucleicos y proteínas) y, por lo tanto, las que permiten definir un ambiente como extremo, son temperatura, pH, presión, disponibilidad de O<sub>2</sub>, salinidad y exposición a la radiación. El cuadro 1 muestra algunos ejemplos de ambientes extremos estudiados en los cuales se ha encontrado vida.

Cuadro 1 Ambientes modelo de estudio en extremofilia.

Parámetro fisicoquímico	Ejemplo de ambiente
<b>Temperatura</b>	
alta	Zonas geotermales: Parque Nacional de Yellowstone (USA), Los azufres (México), Paricutín (México), El Chichón (México).
baja	Zonas polares: Antártica
<b>pH</b>	
alto	Natural: Desierto Atacama (Chile). Antropogénico:
bajo	Natural: Río Tinto (España). Antropogénico: Drenajes ácidos de minas (España)

Las especies capaces de desarrollarse óptimamente en ambientes extremos son denominadas extremófilos. En los ambientes extremos se han encontrado organismos pertenecientes a los 3 dominios, *Bacteria*, *Archaea* y *Eukarya*, aunque en la mayoría de los casos, las especies procariotas son las más diversificadas y mejor adaptadas, siendo capaces de sobrevivir en condiciones más adversas que los eucariotas (Rothschild y Mancinelli, 2001).

Es común que los microorganismos, debido al ambiente en el cual se desarrollan, posean características particulares. Por ejemplo, los microorganismos que habitan en el fondo de los océanos deben lidiar con bajas temperaturas además de las altas presiones y, en algunos casos, con condiciones de hipersalinidad y falta de O<sub>2</sub>. En el otro extremo, los microorganismos que viven en zonas geotermales soportan altas temperaturas y, en ciertos casos, bajos valores de pH y/o altas concentraciones de metales.

Si bien para estos microorganismos es normal vivir en ambientes extremos, su supervivencia bajo esas condiciones es el resultado de haber desarrollado diferentes estrategias para poder mantener las funciones y estructuras celulares activas; estas estrategias les permiten no sólo sobrevivir en estado latente, sino crecer y colonizar los diversos nichos.

Los ambientes volcánicos activos, debido a su capacidad geotérmica se caracterizan por presentar manifestaciones termales y condiciones ácidas, además de alto contenido de metales, los microorganismos típicos identificados en este ambiente se pueden clasificar de acuerdo al cuadro 2.

Cuadro 2 Clasificación de microorganismos en función a los parámetros ambientales de los nichos ecológicos que habitan.

<b>Condición extrema</b>	<b>Tipo de extremófilo</b>
<b>Temperatura</b>	
> 60°C	Hipertermófilos
45 - 60°C	Termófilos
20 – 45 °C	Mesófilos
10 - 0°C	Psicrófilos
< 0°C	Psicrófilos extremos
<b>pH</b>	
> 8	Alcalófilos
5 - 3	Acidófilos
2 - 0	Acidófilos extremos

Los microorganismos que se encuentran en los sitios volcánicos desarrollan sistemas de especialización a diferentes niveles, como pueden ser, modificaciones a nivel proteico, DNA, ribosomas y membranas (Morozkina et al, 2010; Martinez-Alonso et al., 2019).

Algunas de las estrategias empleadas por estos microorganismos son:

- ⊖ **Microorganismos termófilos e hipertermófilos:** El incremento de la temperatura afecta principalmente a las proteínas, no solo en estructura, si no también, en sus interacciones intramoleculares. Por esto, el mecanismo empleado por los termófilos es aumentar la estabilidad proteica mediante: i) el incremento de la carga superficial, aumento de la hidrofobicidad en el centro de la proteína, reemplazo de residuos termolábiles expuestos en la superficie (cisteína, asparagina, aspartato), ii) aumento de interacciones iónicas y de redes de interacciones iónicas en las estructuras secundarias, terciarias y

cuaternarias (las interacciones electrostáticas son más fuertes a altas temperaturas debido a la disminución de la constante dieléctrica), aumento del volumen de los residuos de aminoácidos que permite un mejor empaquetamiento y disminuye la entropía de rotación en la forma desplegada de las proteínas (Achazi et al., 2020).

- ⊖ **Acidófilos:** La principal estrategia consiste en mantener el pH intracelular cerca de la neutralidad (Baker y Dopson, 2007). Para ello, poseen membranas celulares más impermeables que las de los neutrófilos debido a la sustitución de enlaces tipo éster por éter, recambio de lípidos de bajo punto de ebullición, por lípidos de cadena larga con grupos acilo saturados, así como, alta adaptación a la homeoviscosidad para mantener la membrana en fase líquido-cristalina (Driessen et al., 1996; Tornel et al., 1997). Además, poseen gran cantidad de transportadores y bombas de protones. Así como, síntesis de chaperonas para enfrentar los posibles daños que la acidez pueda provocar sobre su material genético (Suzuki et al., 2019).
- ⊖ **Microorganismos metalotolerantes:** Los mecanismos de resistencia hasta ahora reportados, son extrusión por facilitadores de difusión de cationes o bombas dependientes de ATP específicas de metales pesados; unión externa por sustancias poliméricas extracelulares; biotransformación o inactivación por reducción química; e inactivación intracelular por agentes quelantes (Jasso-Chávez et al., 2019; Diaconu et al., 2020; Zhao et al., 2020).

## 2.4 Participación de los microorganismos en los procesos geológicos

Muchos microorganismos, tanto eucariotas como procariotas, tienen una participación activa en distintos procesos geoquímicos. Dentro de los últimos, bacterias y arqueas están igualmente involucradas. Algunos ejemplos de procariotas geológicamente importantes son los que metabolizan hidrógeno (aeróbica o anaeróbicamente), los oxidantes o reductoras de hierro, azufre y



manganeso, los nitrificantes y desnitrificantes, las bacterias sulfato reductoras, las anaeróbicas fotosintéticas y las cianobacterias productoras de oxígeno. Los procariotas pueden dividirse en grupos de acuerdo a sus características fisiológicas, lo que determina la función que cumplen dentro de la geoquímica del ambiente en el cual se desarrollan. Una forma de clasificar los microorganismos de acuerdo a la fuente de carbono y energía que utilizan es la siguiente:

- ⊖ Quimiolitótrofos (autótrofos quimiosintéticos): obtienen energía a partir de la oxidación de compuestos inorgánicos. Utilizan  $\text{CO}_2$ ,  $\text{HCO}_3^-$  o  $\text{CO}_3^{=}$  como fuente de carbono, incluyen bacterias y arqueas
- ⊖ Fotolitótrofos (autótrofos fotosintéticos): obtienen energía a partir de la conversión de energía lumínica en energía química. Utilizan  $\text{CO}_2$ ,  $\text{HCO}_3^-$  o  $\text{CO}_3^{=}$  como fuente de carbono, pueden generar  $\text{O}_2$  como parte su proceso metabólico (oxigénicos) o no (anoxigénicos), incluyen varias especies de bacterias, pero no se han encontrado arqueas con estas características metabólicas
- ⊖ Mixótrofos: obtienen energía a partir de la oxidación de compuestos orgánicos o inorgánicos, pueden utilizar como fuente de carbono compuestos orgánicos o  $\text{CO}_2$ ,  $\text{HCO}_3^-$  o  $\text{CO}_3^{=}$ , incluyen bacterias y arqueas
- ⊖ Fotoheterótrofos (heterótrofos fotosintéticos): obtienen energía, total o parcialmente, a partir de la conversión de energía lumínica en energía química, utilizan compuestos orgánicos como fuente de carbono principalmente incluyen bacterias, aunque también se conocen algunos ejemplos de arqueas (halófilos extremos)
- ⊖ Quimioheterótrofos: obtienen energía de la oxidación de compuestos orgánicos, utilizan compuestos orgánicos como fuente de carbono, incluyen bacterias y arqueas. A su vez, los microorganismos pueden tener metabolismo aeróbico (utilizan  $\text{O}_2$  como último aceptor de electrones en la cadena respiratoria) o anaeróbico (utilizan otra sustancia, orgánica o

inorgánica, como aceptor final de electrones); además, pueden tener cierta tolerancia a las condiciones de aerobiosis o anaerobiosis lo que les permite desarrollarse, o al menos subsistir, en una mayor variedad de ambientes. Estas características fisiológicas condicionan el hábitat donde se desarrollarán los microorganismos y el impacto que producirán en el mismo. Muchos microorganismos pueden ser considerados como agentes geológicos al realizar alguna acción específica sobre el ambiente. Según Ehrlich y Newman, (2008), algunos ejemplos de estas actividades pueden ser:

- Agentes de concentración: producen una acumulación localizada de sustancias inorgánicas mediante depósito de productos del metabolismo dentro de la célula, acumulación pasiva por adsorción sobre la superficie o por intercambio iónico o promoviendo la precipitación de compuestos insolubles fuera de la célula.
- Agentes de dispersión: promueven la disolución de compuestos insolubles, generalmente por reacciones de óxido-reducción.
- Agentes de fraccionamiento: algunos microorganismos pueden actuar selectivamente sobre compuestos particulares de una mezcla, cambiar su estado y separarlos de la misma. Algunos, incluso, pueden distinguir y actuar selectivamente sobre determinados isótopos de un mismo elemento favoreciendo la separación.
- Agentes de litificación: son microorganismos que producen sustancias que unen sedimentos inorgánicos para formar las rocas sedimentarias. Estas pueden ser carbonatos de calcio, óxidos de aluminio o hierro, silicatos, etcétera. Un proceso geoquímico muy importante en el que los microorganismos tienen un rol fundamental es la mineralización de la materia orgánica. La disponibilidad de carbono y otros elementos fundamentales para el desarrollo de vida en la biosfera es limitada y por eso deben ser reciclados y reintroducidos en los ciclos naturales. Este proceso requiere la

completa degradación de la materia orgánica proveniente de los restos de organismos muertos o de sus productos metabólicos. Los microorganismos poseen rutas metabólicas y enzimas extracelulares particulares que les permiten llevar a cabo estas tareas, ya sea individualmente o en comunidades. La mineralización puede ser aeróbica y, en ese caso, la materia orgánica es completamente degradada a  $\text{CO}_2$ ,  $\text{H}_2\text{O}$ ,  $\text{NO}_3^-$ ,  $\text{PO}_4^{3-}$  y  $\text{SO}_4^{2-}$ . Si la mineralización es anaeróbica, los productos finales serán  $\text{CH}_4$ ,  $\text{H}_2$ ,  $\text{NH}_3$ ,  $\text{H}_2\text{S}$  y  $\text{PO}_4^{3-}$  (Ehrlich y Newman, 2008). Otros ejemplos de interacciones en procesos geoquímicos mediadas por metabolitos, son la producción de ligandos específicos como los sideróforos, o de fuertes agentes reductores u oxidantes como  $\text{Fe(II)}$ ,  $\text{H}_2\text{S}$  o  $\text{Fe(III)}$  capaces de reaccionar con algunos minerales y favorecer su lixiviación (Ehrlich y Newman, 2008).

## **2.5 Ciclos biogeoquímicos en ambientes volcánicos**

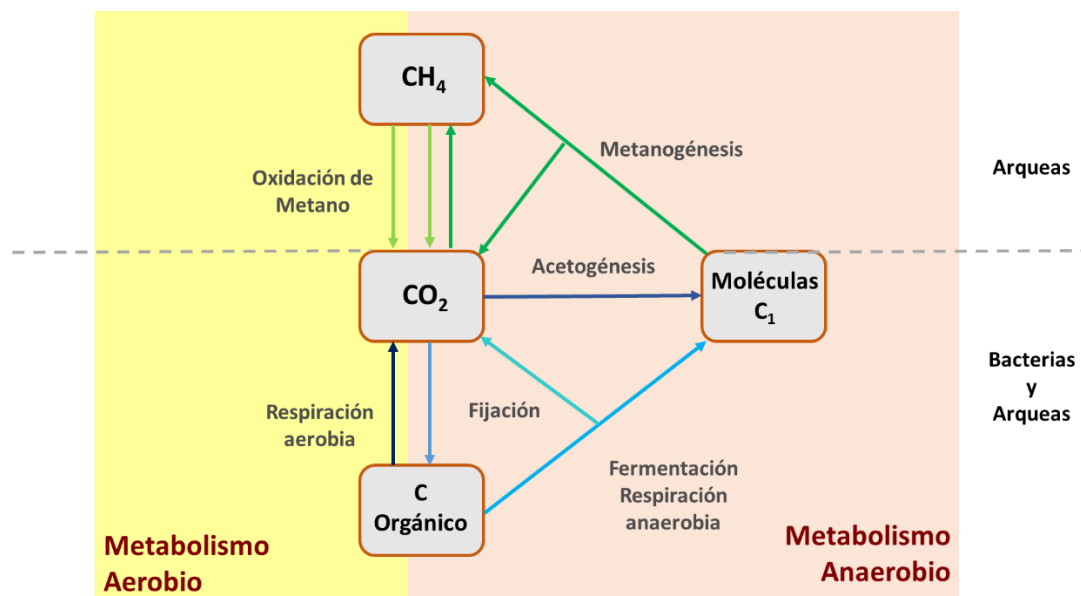
Entre los ciclos cruciales para la vida en la tierra, los ciclos del carbono y el azufre tienen gran relevancia en ambientes volcánicos. La contribución de los microorganismos a escala global en el intercambio entre formas de carbono y azufre es significativa, y por esto es posible asumir que podrían jugar roles relevantes catalizando reacciones.

En consecuencia, el papel de los microorganismos extremos puede ser aún más significativo en el futuro cercano a medida que estos ecosistemas extremos aumenten en extensión y prevalencia (Martinez-Espinosa, 2020).

### **2.5.1 Ciclo del carbono**

El carbono (C) es un elemento esencial para todos los seres vivos, además posee gran importancia económica debido a los combustibles fósiles y biocombustibles (Sigman & Boyle, 2000).

El ciclo biogeoquímico del carbono (C) en microbiología es el proceso mediante el cual, los microorganismos mineralizan o producen la materia orgánica (Figura 1) (Pierre-Offre et al., 2013). En función a la forma de obtención de este nutriente, los microorganismos pueden clasificarse de tres maneras: autótrofos, que son capaces de asimilar el C a partir de compuestos inorgánicos parcial o totalmente oxidados como el CO, CO<sub>2</sub>, y el HCO<sub>3</sub><sup>-</sup>, reduciendo estos sustratos para formar moléculas orgánicas simples (Berg et al., 2010), heterótrofos, que toman su fuente de C de su entorno y son incapaces de sintetizarla por sí solos, y mixotróficos, que poseen un estilo de vida autótrofo y heterótrofo ya que son capaces de co-asimilar pequeñas moléculas orgánicas (Berg et al., 2010).



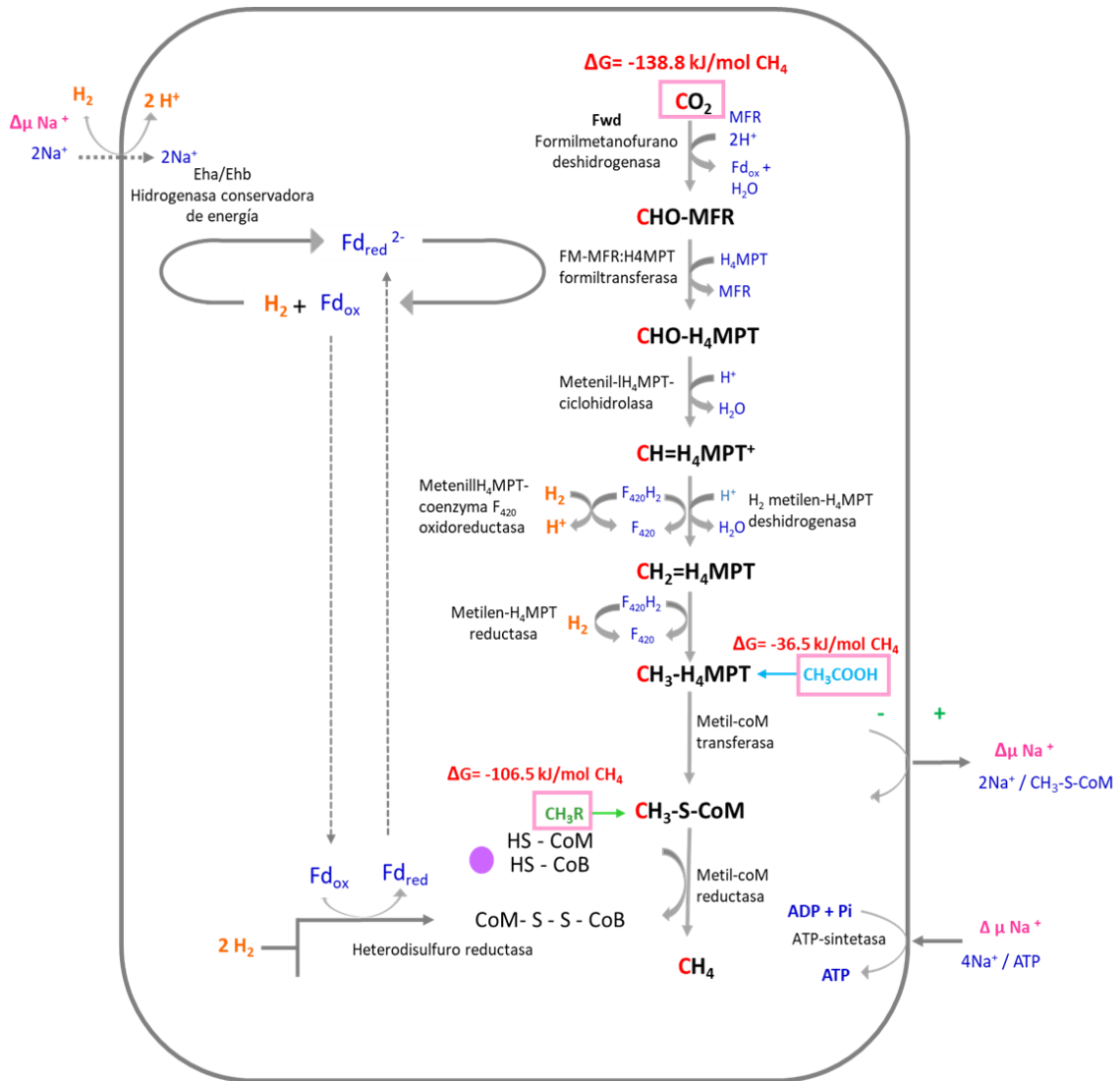
**Figura 1 Diagrama esquematizado de las principales vías del ciclo biogeoquímico del carbono.** Modificado de Ferry & Lessner, 2008 y Pierre-Offre et al., 2013.

En condiciones aerobias, el CO<sub>2</sub> se incorpora a la materia orgánica a través de microorganismos o de las plantas, quienes llevan a cabo la fotosíntesis para generar carbohidratos, biomasa y energía. La materia orgánica producida es degradada mediante diversos procesos metabólicos como la respiración, para regresar al ambiente en forma de CO<sub>2</sub>. En condiciones anaerobias, la materia orgánica es degradada por diferentes microorganismos que producen moléculas pequeñas como acetato, metanol, CO<sub>2</sub> + H<sub>2</sub>; estas moléculas son consumidas por

los metanogénicos quienes producen metano ( $\text{CH}_4$ ) y  $\text{CO}_2$ . Una fracción de metano producido es liberado al ambiente, y el resto es oxidado a  $\text{CO}_2$  por microorganismos metanotróficos.

Los metanogénicos tienen un papel muy importante en el ciclo del C, porque a través de la metanogénesis, una parte del carbono proveniente de la materia orgánica retorna al ambiente en forma de  $\text{CH}_4$ ; aproximadamente el 43% del metano producido ha sido de origen biológico (EPA, 2010). Por la actual creciente necesidad de energías renovables, el metano es de gran relevancia debido a su uso como biogás (SIESA, 2017).

La metanogénesis representa el último paso en la degradación de la materia orgánica en condiciones anaerobias, y es realizada por arqueas metanogénicas (Liu & Whitman, 2008). En estos microorganismos, el ATP se sintetiza principalmente por medio de un mecanismo quimiosmótico a través de la metanogénesis. Esta vía es clave ya que es una cadena transportadora de electrones, en la cual se genera un gradiente electroquímico simultáneo de  $\text{Na}^+ / \text{H}^+$  que es utilizado para la síntesis de ATP y el gas  $\text{CH}_4$  se genera como un producto secundario (Welte & Deppenmeier, 2013; Welte & Deppenmeier, 2014). Se han descrito tres vías principales para la metanogénesis (Figura 2): metilotrófica, acetotrófica e hidrogenotrófica, además de algunas variaciones de estas vías, dependiendo del microorganismo metanogénico en cuestión.



**Figura 2 Diagrama esquematizado de las principales vías metanogénicas.** La vía metilotrónica y acetoclástica son las mayores productoras de  $CH_4$  biótico. Modificado de Rouvière & Wolfe, 1988; Bapteste et al., 2005 y Thauer et al., 2012.

Los metanogénicos, se encuentran extendidos en diferentes entornos y condiciones ambientales, inclusive en ambientes naturales extremos con actividad geotérmica se ha demostrado la presencia de microorganismos metanogénicos con actividad entre los  $70$  y  $80^\circ C$ , tal es el caso del Parque Nacional de Yellowstone, USA (Zeikus, et al., 1980).

### 2.5.2 Ciclo del azufre

El azufre es, sin duda alguna, uno de los elementos más abundantes en los sistemas geotermales y volcánicos; estos sistemas almacenan pozas azufradas, terrenos geológicos donde se desprende, por las fisuras, vapor de agua con alto contenido de ácido sulfhídrico, las cuales reciben el nombre de solfataras. En estos ambientes, el azufre se puede encontrar en todos los estados de oxidación posibles, -2, 0, +4, +6 (Staunton-Sykes et al. 2020; Peng et al., 2020).

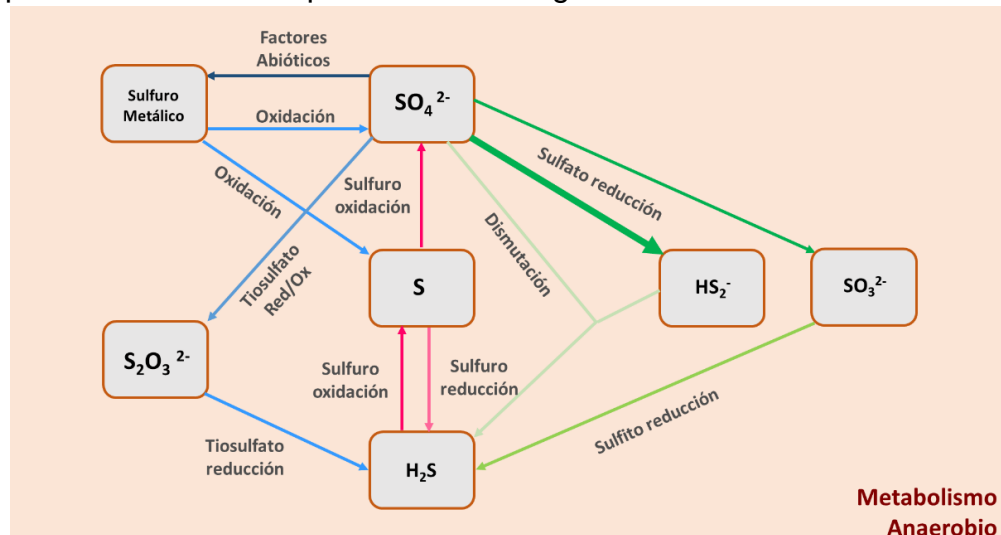
Los microorganismos volcánicos, acidófilos y/o termófilos tienen un papel clave en la interconversión de estos estados de oxidación (Dopson y Johnson, 2012). Dentro de los microorganismos capaces de oxidar compuestos reducidos de azufre, existen quimiolitotrofos, fotoautótrofos, mixótrofos y heterótrofos. La gran mayoría utiliza  $O_2$  como aceptor final de electrones, pero en su ausencia, algunos pueden utilizar  $Fe(III)$  o  $NO_3^-$ .

Microorganismos quimiolitotrofos, utilizan la energía obtenida a partir de la oxidación de compuestos reducidos del azufre para fijar  $CO_2$  por medio del ciclo reverso de los ácidos tricarboxílicos o del ciclo de Calvin-Benson, uniendo así, los ciclos de azufre y del carbono en los ambientes geotermales (Ehrlich y Newman, 2008).

Los compuestos oxidados del azufre pueden ser reducidos bajo condiciones anaeróbicas por distintas especies microbianas. La reducción de  $SO_4^{2-}$  a  $S_2^-$  es catalizada por microorganismos sulfato-reductores; se sabe que también existen arqueas con esta capacidad metabólica (Thauer y Kunow, 1995). Este proceso es de gran importancia geoquímica ya que prácticamente no puede ocurrir abióticamente en las condiciones de temperatura y presión de la superficie terrestre, debido a la gran energía de activación que requiere.

El azufre es un elemento esencial para el desarrollo de todos los organismos. El metabolismo asimilatorio del azufre está distribuido en diversos microorganismos, plantas y animales para la síntesis de biomoléculas como aminoácidos (cisteína y metionina), coenzimas y co-sustratos, así también, forma parte de componentes

inorgánicos de biomoléculas como los centros de hierro y azufre (Fe-S), involucrados en las reacciones redox en el transporte enzimático de electrones (Fike et al., 2015). El ciclo biogeoquímico del azufre es complejo, y se lleva a cabo en condiciones anaerobias estrictas y/o facultativas, las principales reacciones del ciclo biogeoquímico del azufre se presentan en la figura 3.



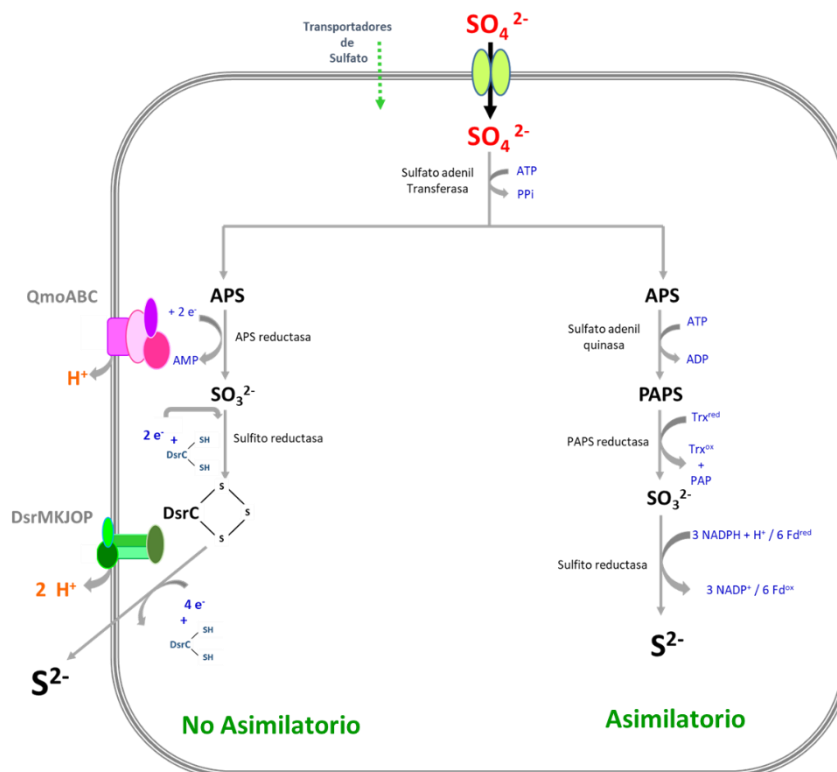
**Figura 3 Diagrama esquematizado de las principales vías metabólicas del ciclo del azufre.** El metabolismo microbiano transforma los estados de oxidación del azufre para la generación de biomoléculas y energía acoplada al metabolismo en condiciones anaerobias y aerobias facultativas. Modificado de Pierre-Offre et al., 2013; Fike et al., 2015.

Diversos microorganismos distribuidos polifiléticamente cuentan con metabolismos no asimilatorios de azufre (Fike et al., 2015); sin embargo, las tres reacciones no asimilatorias que presentan contribuciones significantes al ciclo biogeoquímico del azufre son: i) la sulfato reducción, ii) la sulfuro oxidación y iii) la desproporción de azufre (Fike et al., 2015). Los compuestos reducidos del azufre como sulfuro de hidrógeno, azufre y tiosulfato pueden ser utilizados como donadores de electrones en procesos fotosintéticos, así como en la fijación de carbono (Bryant & Frigaard, 2006).

La reducción de sulfato es uno de los mecanismos microbianos más antiguos de la Tierra (Knoll & Canfield, 1998). Durante las primeras etapas de evolución biogeoquímica de la Tierra antes del origen de la fotosíntesis oxigénica, los procesos microbianos anaeróbicos como la metanogénesis hidrogenotrófica y



reducción de sulfato fueron las vías metabólicas predominantes (Knoll & Canfield, 1998; Canfield & Raiswell, 1999). La sulfato reducción es de gran relevancia biogeoquímica y se ha asociado principalmente con los ambientes marinos y volcánicos, debido a altos niveles de sulfatos. Además, este proceso es de vital importancia debido a que determina los fraccionamientos de isótopos de azufre conservados en los registros geológicos, mismos que proporcionan información sobre el estado de la atmósfera de la Tierra. Por estas razones los microorganismos reductores de sulfato juegan un papel clave en los ciclos biogeoquímicos de azufre y carbono (Fike et al., 2015). Este proceso se lleva mediante dos vías: la asimilatoria y la no asimilatoria (figura 4). El proceso asimilatorio se lleva a cabo para la síntesis de biomoléculas, principalmente aminoácidos como cisteína o metionina, y centros de hierro y azufre [Fe-S]. El sulfuro obtenido por reducción es transformado e incorporado a las moléculas orgánicas. Este proceso es altamente regulado, por lo que el exceso de sulfuro es excretado de la célula (Wang et al., 2000).



**Figura 4 Diagrama esquematizado del proceso de sulfato reducción.** Este proceso consta de dos vías: asimilatoria en la que el sulfato es transformado a sulfuro para la generación de moléculas orgánicas, y la no asimilatoria, en la que el sulfato se utiliza como aceptor final de electrones, este proceso es realizado por microorganismos sulfato reductores anaerobios. Modificado de Rücket, 2016.

El proceso de reducción no asimilatorio de sulfato (figura 4), se lleva a cabo por grupos de microorganismos denominados bacterias sulfato reductoras (BSR), y las arqueas sulfato reductoras (ASR). Todos estos organismos son anaeróbicos y tienen la capacidad de respirar sulfato, es decir, utilizar sulfato como aceptor terminal de electrones para la oxidación de compuestos orgánicos, principalmente; aunque también se ha reportado acoplado a la oxidación de compuestos inorgánicos, como el  $H_2$ . Este proceso conduce a la producción de altos niveles de sulfuro, el cual, en su mayoría es re-oxidado por bacterias de azufre bajo condiciones óxicas o bien por bacterias fototróficas de azufre en condiciones anóxicas, formando la base del ciclo biológico del azufre (Rabus et al., 2015; Rücket, 2016). La reducción no asimilatoria de sulfato es un proceso intracelular que involucra la transferencia de ocho electrones del  $SO_4^{2-}$  al  $H_2S$ , teniendo al bisulfito como intermediario. Debido a la estabilidad del anión  $SO_4^{2-}$ , la reducción a bisulfito es una reacción con bajo potencial redox, por lo que el sulfato tiene que ser activado por una reacción con Adenosín Trifosfato (ATP) para formar Adenosina Fosfosulfato (APS). Esta reacción es catalizada por la enzima sulfato adenilil transferasa (SAT) e impulsada por la hidrólisis de pirofosfato inorgánico (PPi), por la acción de una pirofosfatasa. La reacción de APS a bisulfito tiene un potencial redox medio, por lo que esta reacción lleva consigo la reducción de dos electrones; esta reacción es llevada a cabo por la enzima APS reductasa. Por último, el bisulfito es reducido a sulfuro por la enzima sulfito reductasa desasimilatoria (DsrAB), participando también la proteína DsrC y el complejo de membrana DsrMKJOP (Rücket, 2016). Diversas secuencias de genomas de microorganismos termófilos reductores de azufre contienen el conjunto de genes necesarios para la reducción de sulfato: sat, aprBA, dsrABCMK, los cuales han sido estudiados debido a su participación en este proceso, además de inferir en los mecanismos de evolución de las BSR (Rabus et al., 2015).

La sulfato reducción o vía asimilatoria, es la clave del ciclo moderno del azufre, y un actor indispensable en el ciclo del carbono en ambientes geotermales. Recientemente se ha dado luz a que las arqueas también pueden contener en su genoma la maquinaria para realizar procesos de sulfato reducción (Chernyh et al., 2020). Hasta el momento, únicamente se conocen dos géneros de arqueas (*Candidatus Vulcanisaeta moutnovskia*; y *Archaeoglobus*) capaces de emplear  $\text{SO}_4^{2-}$  como aceptor final de electrones (Chernyh et al., 2020).

Es indispensable profundizar en el estudio de microorganismos extremófilos para mejorar la comprensión del metabolismo y potencial que estos microorganismos pueden ofrecer.

## **2.6 Estudio de la biodiversidad microbiana en ambientes extremos**

La diversidad microbiana, en particular, la procariota (bacterias y arqueas), es superior a la diversidad de especies multicelulares. Por esto, es de gran interés conocer la diversidad microbiana de cualquier ambiente, en particular el identificar los límites de la vida para el crecimiento y la supervivencia de los microorganismos, así como la comprensión de los mecanismos moleculares que definen estos límites es un tema de gran relevancia (González-Toril & Ángeles-Aguilera).

### **2.6.1 Técnicas dependientes de cultivo**

¿Qué fracción de células bacterianas y arqueas de la Tierra se han cultivado? Esta simple pregunta tiene una respuesta compleja. Se ha demostrado que cultivar en laboratorio a los microorganismos produce estimaciones mucho más pequeñas de la abundancia celular evidenciada en los recuentos microscópicos de muestras ambientales. Recientemente, ha quedado claro que muchos taxones microbianos están relacionados tan lejanamente con cepas de laboratorio que pertenecen a familias, órdenes o incluso phyla completamente nuevos sin representantes cultivados (Dick et al., 2013; Hug et al., 2016). La mayoría de los filos bacterianos carecen de representantes cultivados (Hug et al., 2016).

Es importante destacar que, generar colecciones de cultivos microbianos sigue siendo un desafío conceptual y analítico, sobre todo cuando de microorganismos extremófilos se trata, pero es una actividad esencial, dado que la fisiología microbiana es una propiedad emergente que no se infiere fácilmente solo a partir de datos de secuenciación (Steen et al., 2019). Además, las similitudes de las secuencias no se pueden utilizar para inferir las "capacidades metabólicas de cultivo" porque no se puede inferir la fisiología a partir de las secuencias del gen 16S rRNA. Para realizar estudios más confiables, la evidencia apoya el uso conjunto de metodologías que engloben estudios a diferentes niveles de regulación del dogma central de la biología molecular, por ejemplo, emplear información genómica para el aislamiento y cultivo de microorganismos.

### **2.6.2 Técnicas independientes del cultivo**

El rápido avance en las tecnologías de secuenciación de alto rendimiento ha permitido analizar la diversidad microbiana de manera más profunda y amplia. Brinda nuevas oportunidades para examinar de manera integral la distribución microbiana con un mayor número de muestras ecológicas.

En la última década se han realizado un gran número de investigaciones empleando la secuenciación de alto rendimiento del ARNr 16S y las metodologías genómicas y posgenómicas de comunidades microbianas, avanzando significativamente en nuestra comprensión de la diversidad microbiana, la función comunitaria y la evolución en ambientes extremos.

### **2.6.3 Ciencias ómicas aplicadas a la elucidación de metabolismo microbiano**

En la última década, tras el evidente éxito de proyectos de secuenciación masiva, han surgido varias otras disciplinas "ómicas", con el objetivo de analizar los componentes de un organismo vivo en su totalidad. La proteómica (el conjunto completo de proteínas producidas en una célula), fenómica (el conjunto completo de fenotipos mutacionales), epigenómica (el conjunto completo de alteraciones de metilación en el genoma), metabolómica (el conjunto de metabolitos producidos/consumidos por la célula), la ezimología (caracterización cinética de

enzimas de una vía metabólica), etcétera, cada uno se ha centrado en la acumulación de la totalidad de la información biológica (Evans et al., 2000; González-Toril & Angeles Aguilera, 2020).

A medida que avanza la estrategia ómica, nuevos campos adicionales se convierten en parte del léxico biológico, con volúmenes crecientes de datos moleculares agregados a bases de datos cada vez mayores.

Este enfoque se ha generalizado tanto que el término "ómico" se ha tomado como un término general de referencia para los estudios de entidades en conjunto (Evans et al., 2000; González-Toril & Ángeles Aguilera, 2019).

El uso sistemático de metodologías ómicas contribuye a una mejor comprensión del papel del microbioma en ambientes extremos, es evidente que estamos ante una revolución en este campo, en el que la confluencia de las ciencias básicas y la biotecnología debería reportar grandes beneficios en un futuro próximo.

La integración de tecnologías ómicas enfocadas a la comprensión de la biología de sistemas continuará desafiando paradigmas científicos sobre la ecología de extremófilos para lograr una mejor comprensión de la versatilidad metabólica, redes de interacción microbiana, mecanismos de resistencia a condiciones poli-extremas.

Cuando se aplican en combinación, estos enfoques proporcionan una base sólida para la caracterización tanto de la parte cultivable como no cultivable del microbioma.

### 3 JUSTIFICACIÓN

Los ambientes extremos se caracterizan por poseer condiciones que dificultan la supervivencia de distintas formas de vida (Jorquera et al., 2019), un claro ejemplo son los volcanes. (Gómez et al., 2019). Tal es el caso de el volcán activo El Chichón ubicado en el sureste de México, en el cinturón volcánico de Chiapas. El cráter de este volcán es altamente dinámico y presenta alto contenido de metales, pH extremo ácido, elevada salinidad, así como altas temperaturas, que en algunos sitios que llegan a los 100°C (Casadevall et al., 1984; Taran et al., 2008; Armienta et al., 2008; Cuoco et al., 2013; Peiffer et al., 2015; Casas et al., 2016; Velázquez-Ríos, 2018; Rincón-Molina et al., 2019; Ovando-Ovando, 2019).

Se ha reportado la presencia de bacterias en sedimentos del lago-cráter (Rincón-Molina et al., 2019), así como, algunos reportes que sugieren que estos microorganismos pueden tener actividad metabólica de interés biotecnológico (Meza-Flores, 2016; Velázquez-Ríos, 2018; Pérez-Gómez, 2019; Ovando-Ovando, 2019; Ovando-Chacón et al., 2020), sin embargo, aún falta explorar sobre los mecanismos bioquímicos y genéticos que permiten el sostenimiento de la vida en estas condiciones extremas.

Los avances en las tecnologías ómicas empleadas a la comprensión de la biología de sistemas han permitido mejor entendimiento de los mecanismos empleados por extremófilos, revelando su importancia en múltiples disciplinas en la ciencia (Hug et al., 2016; Jorquera et al., 2019).

Por esto, es necesario realizar una bioprospección en el volcán activo El Chichón combinando ciencias ómicas de precisión tales como, metagenómica, el análisis de los flujos metabólicos, y enzimología para identificar cómo se llevan a cabo el metabolismo microbiano, la obtención de energía y mecanismos de tolerancia a condiciones poli-extremas a diferentes niveles de regulación.

## **4 OBJETIVOS**

### **4.1 Objetivo general**

Analizar la diversidad, funcionalidad y los mecanismos de resistencia microbiana en el ecosistema extremo lago cratérico del volcán El Chichón mediante un enfoque multi-ómico.

#### **4.1.1 Objetivos particulares**

- Establecer un sistema de cultivo en laboratorio para el crecimiento de microorganismos extremófilos involucrados en los ciclos biogeoquímicos del carbono y azufre del lago cráter del volcán El Chichón.
- Evaluar la diversidad microbiana y potencial metabólico del microbioma en los ciclos biogeoquímicos del carbono y azufre mediante análisis metagenómico y metabolómico dirigido.
- Identificar mecanismos de resistencia a condiciones poli-extremas de los consorcios microbianos aislados del lago cratérico del volcán El Chichón.
- Describir mediante una red de metabólica de la interacción trófica del microbioma en lago cratérico del volcán El Chichón.

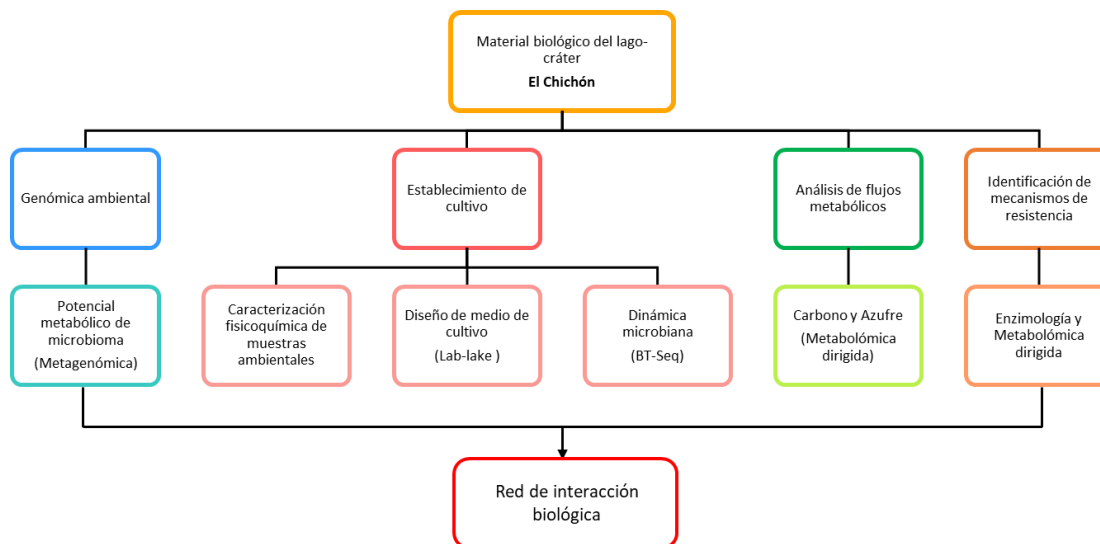
## **5 HIPÓTESIS**

Los microorganismos del lago cratérico del volcán El Chichón son extremófilos que emplean mecanismos de obtención de energía poco convencionales y han desarrollado mecanismos de adaptación a las condiciones poli-extremas, lo que les permiten colonizar y prosperar en el sistema volcánico.

## 6 METODOLOGÍA

### 6.1 Estrategia experimental

En el siguiente esquema se muestran las cuatro etapas de la estrategia experimental general de este proyecto. Los métodos empleados se detallan más adelante.



**Figura 5 Etapas de la estrategia experimental.** Actividades realizadas para la identificación del potencial y funcionalidad metabólica del microbioma del volcán El Chichón. En azul, Estudio metagenómico (Whole Genome Sequencing). En rosa, Diseño y establecimiento de sistema de cultivo de microorganismos extremófilos del volcán El Chichón, empleando análisis fisicoquímico de muestras, y secuenciación de regiones del gen 16S rRNA (Barcode-Targeted Sequencing). En verde, análisis del metabolismo intermediario de los cultivos microbianos anaerobios, empleando metabolómica dirigida y enzimología. En naranja, identificación de los mecanismos de resistencia empleados a condiciones poli-extremas (metales pesados, temperatura, pH y disponibilidad de  $\text{PO}_4^-$ ).

### 6.2 Establecimiento de sistema de cultivo para el crecimiento de microorganismos del volcán El Chichón

Se desarrolló un sistema para el cultivo de microorganismos a partir de muestras obtenidas en el volcán El Chichón, el cual está ubicado en la región montañosa noroeste del estado de Chiapas, México ( $17^\circ 21'31.0''$  Latitud Norte y  $93^\circ 13'39.9''$  Latitud Oeste), entre los municipios de Chapultenango y Francisco León (Figura 6). Este sistema forma parte del cinturón volcánico chiapaneco. El



material biológico fue colectado en el lago cratérico del volcán según lo reportado por Rincón-Molina et al. (2019) y Peña-Ocaña et al. (2020) durante el año 2018.

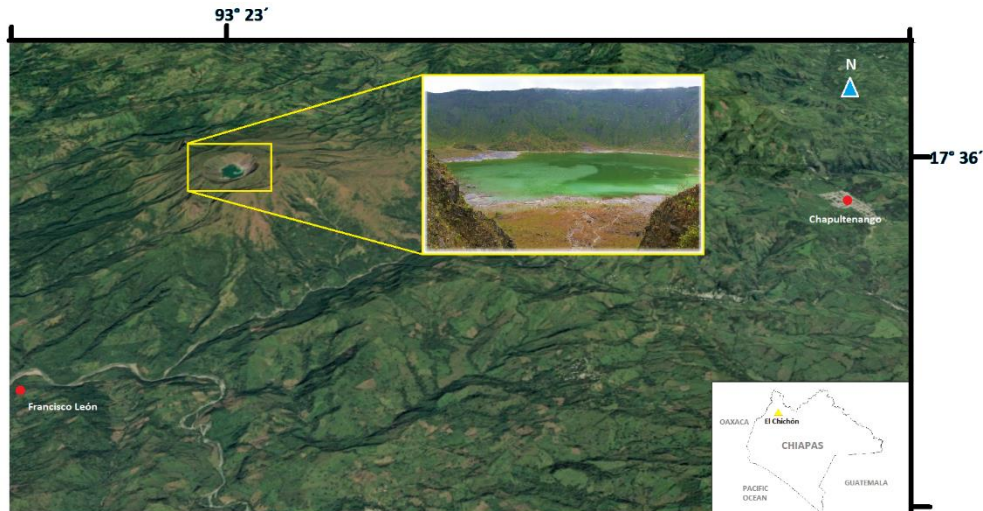


Figura 6 Ubicación geográfica del volcán El Chichón.

### 6.2.1 Caracterización fisicoquímica

El contenido de carbono y nitrógeno se determinó de acuerdo a lo descrito por Ruíz-Valdiviezo et al. (2010). En el caso de los metales totales se cuantificaron por espectrometría de emisión óptica de plasma (ICP-OES) acoplado inductivamente (Peña-Ocaña et al., 2020). La concentración de los iones y cationes fue determinada por cromatografía iónica (Zamora-Martínez et al., 2016). Todas las determinaciones fueron realizadas por triplicado. La diferencia estadística significativa entre los parámetros fisicoquímicos se determinó mediante un análisis de varianza con un nivel de significancia  $\alpha = 0.05$ . El análisis estadístico se realizó con ayuda del software Origin Lab v8.

### 6.2.2 Análisis de la diversidad microbiana en muestras ambientales

Para identificar la diversidad y abundancia de microorganismos procariotes que constituyen el ambiente natural se realizó un análisis de metagenómica dirigida por la técnica Barcode Sequencing (BTSeq), para esto, se extrajo DNA metagenómico de muestras ambientales de columna de agua, y se amplificaron por

PCR las regiones variables V4-V5 (Fw: GTGYCAGCMGCCGCGGTAA, Rev: CCGYCAATTYMTTTRAGTTT) y V6-V8 (Fw: TYAATYGGANTCAACRCC, Rev: CRGTGWGTRCAAGGRGCA) de los genes de 16S rRNA (Parada et al. 2015; Walters et al., 2015; Comeau et al., 2011).

El secuenciamiento de las bibliotecas de DNA se realizaron empleando la plataforma Illumina MiSeq 2x300. Las lecturas obtenidas se procesaron utilizando MiSeq SOP Mothur (Kozich et al., 2013), durante el análisis las lecturas de secuencias con <50 nucleótidos,> 1% de ambigüedades o 7% de homopolímeros y aquellas con orígenes mitocondriales o cloroplasto se descartaron. Las secuencias quiméricas se eliminaron utilizando parámetros predeterminados en UCHIME (Edgar et al. 2011). Las secuencias resultantes se alinearon con la base de datos de referencia SILVA versión 132 con un umbral de confianza del 80% (Lukhele et al., 2019). Los conjuntos de datos alineados se agruparon en unidades taxonómicas operativas (OTU) con una similitud de secuencia del 98% utilizando una matriz de distancias por pares.

La abundancia relativa de taxas se expresó como porcentaje del número de secuencias afiliadas al taxón específico frente al número total de secuencias obtenidas para esa muestra.

### **6.2.3 Diseño de medio de cultivo para enriquecimiento de microorganismos involucrados en los ciclos biogeoquímicos de carbono y azufre**

La caracterización fisicoquímica y la diversidad microbiana identificada en el lago cratérico del volcán El Chichón fue tomada en cuenta para el diseño de un medio de cultivo análogo a las condiciones del sitio geotérmico. En particular, se tomaron en cuenta los siguientes criterios para la selección y optimización del medio de cultivo a emplear:

- ⊖ **La diversidad taxonómica**, y su potencial metabólico
- ⊖ **La asimilación de fuentes de carbono**, considerando que son microorganismos cosmopolitas con gran versatilidad metabólica, sin embargo, presentan preferencia por la asimilación de esqueletos

carbonados sencillos, como monosacáridos y esqueletos de 1-3 carbonos (Ching y Kesen et al., 2016).

- ⊖ **Disponibilidad de O<sub>2</sub>**, la mayoría de estos microorganismos tiene óptimo desarrollo en condiciones de anaerobiosis y anaerobiosis facultativa.
- ⊖ **Contenido de azufre**, mucha de la proporción microbiana presente en el estudio ambiental, pertenece al grupo de los microorganismos metabolizadores de azufre (DSMZ, 2020).
- ⊖ **Contenido de minerales y metales traza**, debido a las características fisicoquímicas del volcán, el uso de solución con minerales y metales traza es indispensable para el crecimiento microbiano.

Esta estrategia fue denominada Lab-Lake, la cual fue desarrollada en el laboratorio de Fisiología microbiana - Departamento de bioquímica del Instituto Nacional de Cardiología “Ignacio Chávez” (INC), en la Ciudad de México.

El material biológico empleado consistió en muestras de columna de agua del lago cratérico, que presentaron temperaturas en el rango mesófilo (30 °C) hasta hipertermófilo (82 °C). Cada muestra fue colectada con ayuda de jeringas estériles, se tomaron 20 mL, sin perturbar la columna de agua. Las muestras fueron inoculadas en viales anaerobios estériles.

Los medios de cultivo empleados en esta etapa fueron: medio High Salt (HS) pH 6.8 (Sowers et al., 1984; Lira-Silva et al., 2012), medio HS pH 4.5, medio HS con solución de minerales traza para enriquecimiento de microorganismos sulfato reductores, y frascos anaerobios vacíos en donde se adicionó agua del lago cratérico. Los viales anaerobios inoculados fueron transportados a 75°C desde el sitio geotérmico hasta el laboratorio de Fisiología microbiana con ayuda de una incubadora portátil.

Para el enriquecimiento microbiano, se estableció un sistema anaerobio con volumen de operación de 50 mL, empleando como medio base dos muestras de

agua del lago cráter, la primera colectada a una temperatura de 82 °C, mientras que la segunda se encontraba cercana a los 100 °C; ambas muestras de agua fueron tratadas para desplazar el oxígeno presente. Posteriormente, se esterilizaron por calor húmedo en autoclave a 121 °C, 15 lb·plg<sup>-2</sup> durante 40 min y se suplementó con una mezcla de fuentes de carbono empleadas en medios para cultivo de microorganismos extremófilos, tales como 10 mM de maltosa, 10 mM de glucosa, 20 mM de piruvato de sodio, 10 mM de glicerol, 20 mM de triacilglicerol y 25 mM de acetato de sodio (Bräsen et al., 2014; German Collection of Microorganisms and Cell Cultures GmbH “DSMZ”), 8.2mM de cisteína, resazurina de sodio 0.001% (p/v) y solución vitamínica 2% (v/v).

El material biológico recolectado *in situ*, fue sembrado e incubado a temperatura ambiente durante 60 días. Una vez enriquecidas las comunidades microbianas se procedió a la propagación y evaluación de crecimiento en medios de cultivos definidos, para lo cual, se empleó el medio salino HS (High Salt) (Sowers et al., 1984; Lira-Silva et al., 2012) modificado para el cultivo de microorganismos del volcán El Chichón. El medio estuvo compuesto por glucosa, 1.8 g·L<sup>-1</sup>; maltosa, 3.6 g·L<sup>-1</sup>; piruvato de sodio, 2.2 g·L<sup>-1</sup>; glicerol, 125% (v/v); metanol 0.04% (v/v); triacilglicerol, 0.037% (v/v); NaCl, 25.4 g·L<sup>-1</sup>; NaHCO<sub>3</sub>, 3.8 g·L<sup>-1</sup>; KCl, 1.8 g·L<sup>-1</sup>; MgCl<sub>2</sub>, 11 g·L<sup>-1</sup>; CaCl<sub>2</sub>, 0.2 g·L<sup>-1</sup>; NH<sub>4</sub>Cl; 1.0 g·L<sup>-1</sup>, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 0.27 g·L<sup>-1</sup>; NaCH<sub>3</sub>CO<sub>2</sub>, 13.6 g·L<sup>-1</sup>; resazurina de sodio, 0.001% (p/v); FeSO<sub>4</sub>, 0.028 g·L<sup>-1</sup>; Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 0.025 (p/v), más la adición de vitaminas 2% (v/v) y minerales trazas al 10% (v/v). En la preparación del medio de cultivos se empleó como disolvente agua mili-Q, la cual se mantuvo en agitación en una cámara anaeróbica (COY Laboratory products, Grass Lake, Michigan, USA) permitiendo el desplazamiento del O<sub>2</sub> disuelto en el agua. La cámara anaeróbica se saturó con 80% de N<sub>2</sub>, 15% de CO<sub>2</sub> y 5% de H<sub>2</sub>. Finalmente, se adicionó al medio de cultivo 1 g·L<sup>-1</sup> de cisteína, 0.025% (v/v) Na<sub>2</sub>S·9H<sub>2</sub>O y se ajustó el pH a 6.5.

## **6.2.4 Efectividad del sistema de cultivo microbiano**

Para evaluar la eficiencia de la estrategia de cultivo Lab-Lake se tomaron en cuenta factores como: el comportamiento de crecimiento, la dinámica de las comunidades microbianas evaluado mediante el estudio del gen 16S rRNA (BTSeq), y la predicción metabólica por métodos bioinformáticos con particular énfasis en las vías de asimilación de carbono y azufre.

### **6.2.4.1 Cinéticas de crecimiento**

La caracterización del crecimiento de las comunidades microbianas en los cultivos lab-lake, se realizó mediante la evaluación de las cinéticas de crecimiento empleando el medio de cultivo HS-modificado (descrito anteriormente). Se emplearon viales anaerobios de 100 mL con 50 mL de medio de cultivo y 10 mL de inóculo. Las condiciones de crecimiento de las cinéticas fueron temperaturas de 39°C y 70°C, con una duración de 21 a 30 días.

Las variables de respuesta para evidenciar el crecimiento celular, se determinaron cada 48 horas, durante 600 horas.

Estas variables fueron, el contenido de proteína, empleando los métodos Lowry y Biuret siguiendo lo descrito por Lira-Silva et al. (2012), la producción de metabolitos como CO<sub>2</sub>, y CH<sub>4</sub>, para esto, se empleó un cromatógrafo de gases (Shimatzu GC2010, Japón) con un detector de ionización de flama con una columna HP-Plot/U (30m, 0.320mm, 10.0µm marca Agilent) a 70°C, empleando helio como gas acarreador a un flujo de 30 mL·min<sup>-1</sup>, inyectando 5 µL de 'headspace' de cada vial anaerobio. La concentración de cada metabolito se calculó usando la ley de los gases ideales ( $PV=nRT$ ). Sustituyendo 'P' como la presión (KPa) que presentó cada vial anaerobio, y 'n' corresponde a los mL de metabolito obtenidos por interpolación en una curva estándar para cada metabolito. Previo a la determinación los cultivos se llevaron a temperatura de 37°C, para la correcta aplicación de los gases ideales.

También, el consumo de las fuentes de carbono (sustratos), tales como, metanol, piruvato de sodio, glicerol, TAG y acetato de sodio se determinaron mediante cromatografía de gases. Brevemente, 10 $\mu$ L de medio de cultivo libre de células acidificadas con 2 $\mu$ L de HCl; posteriormente 2 $\mu$ L se inyectaron al cromatógrafo de gases, empleando una columna DB-1701 (30m, 250mm, 0.25 $\mu$  m. Agilent-Crawford), empleando helio como gas acarreador a un flujo de 4 mL $\cdot$ min<sup>-1</sup>, y un gradiente de temperatura. La concentración de carbohidratos (glucosa y maltosa) fue determinado con el método de fenol-sulfúrico reportado por Jasso-Chávez et al. (2010).

#### **6.2.4.2 Dinámica microbiana**

La dinámica de las comunidades microbianas fue realizada en cultivos “Lab-lake” considerando diferentes temperaturas detectadas *in situ*, un consorcio mesófilo y otro hipertermófilo.

La dinámica de las comunidades microbianas fue evaluada los días 0, 8, 15 y 22. Brevemente, se aisló el DNA metagenómico, y se amplificaron las regiones variables V4-V5 (Fw: GTGYCAGCMGCCGCGGTAA, Rev: CCGYCAATTYMTTTRAGTTT) y V6-V8 (Fw: TYAATYGGANTCAACRCC, Rev: CRGTGWGTRCAAGGRGCA) del gen 16S rRNA (Parada et al. 2015; Walters et al., 2015; Comeau et al., 2011) en cada punto de monitoreo.

Los amplicones se secuenciaron a través de la plataforma Illumina MiSeq 2x300. Las lecturas obtenidas se procesaron con el procedimiento operativo MiSeq SOP Mothur (Kozich et al., 2013), durante el análisis las lecturas de secuencias con <50 nucleótidos, > 1% de ambigüedades o 7% de homopolímeros y aquellas con orígenes mitocondriales o cloroplasto se descartaron. Las secuencias quiméricas se eliminaron utilizando parámetros predeterminados en UCHIME (Edgar et al. 2011). Las secuencias se alinearon con la base de datos de referencia SILVA 16S (versión 132) con un umbral de confianza del 80% (Lukhele et al., 2019).

Los conjuntos de datos alineados se agruparon en OTUs con una similitud de secuencia del 98% utilizando una matriz de distancias por pares. La abundancia

relativa de taxones se expresó como porcentaje del número de secuencias afiliadas al taxón específico frente al número total de secuencias obtenidas para esa muestra.

#### **6.2.4.3 Predicción metabólica**

Mediante herramientas bioinformáticas, se realizó la predicción del perfil funcional de los consorcios procarióticos a partir de las secuencias del gen ARNr 16S utilizando el programa PICRUSst (Investigación filogenética de comunidades por reconstrucción de estados no observados) (Langille et al. 2013).

### **6.3 Evaluación de diversidad microbiana y potencial metabólico del microbioma del volcán El Chichón**

Esta etapa de la investigación se realizó siguiendo un diseño experimental descriptivo comparativo simple, con la finalidad de evaluar la diversidad taxonómica de todos los dominios de la vida presentes en el lago cratérico del volcán El Chichón, y el potencial funcional y metabólico que poseen. Para esto, se empleó la técnica Whole Genome Sequencing, conocida como metagenómica shotgun.

Se analizaron muestras de sedimentos (44°C) y columna de agua (82°C), cada muestra con tres replicas. Brevemente, las muestras se colocaron en tubos estériles, y se conservaron inmediatamente mediante congelación en N<sub>2</sub> líquido, posteriormente se almacenaron a -80 ° C en ultracongelador hasta que se extrajo el DNA (Rincón-Molina et al. 2019).

El DNA metagenómico se extrajo por triplicado usando el kit comercial DNeasy Power Soil Kit (QIAGEN), siguiendo las instrucciones del fabricante. La concentración y la calidad del DNA total extraído se determinó por nanoespectrofotometría mediante un NanoDrop ND-1000 (Thermo Fisher Scientific Inc, Wilmington, USA). Posteriormente, el análisis metagenómico fue realizado mediante un enfoque no dirigido utilizando la técnica “Whole Genome Sequencing”, en donde el DNA total fue secuenciado por la plataforma Illumina NextSeq 2x150 en la Central Analítica IMR (Integrated Microbiome Research), Delhouise, (Halifax, NS, Canadá).

El análisis funcional y taxonómico de los metagenomas se realizó utilizando el flujo de trabajo del software SqueezeMeta v1.0.0 (Tamames & Puente-Sanchez, 2019) en modo co-assembly. La predicción y la anotación de ORF (marco de lectura abierto) se realizó mediante la búsqueda de homología en contigs usando KEGG (Kanehisa y Goto 2000). Posteriormente, se estimó la abundancia de genes mapeando lecturas individuales a la anotación de contigs (serie de secuencias superpuestas de DNA utilizadas para hacer un mapa físico que reconstruye la secuencia original de DNA) con el ensamble de referencia. Los resultados de SqueezeMeta se procesaron utilizando el software estadístico R (R Development Core Team).

### **6.3.1 Diversidad taxonómica**

Se realizó la asignación taxonómica mediante el análisis de genes marcadores moleculares como el 16S y 28S rRNA, recuperados del ensamble metagenómico. Para esto, se empleó el algoritmo LCA que busca el ultimo ancestro común y lo compara con la base de datos GenBank nr, empleando un criterio de asignación superior a 80% y menor al 10% en el porcentaje de identidad. Se emplearon valores de corte con un nivel mínimo de identidad de 85, 60, 55, 50, 46, 42 y 40% para los rangos de especie, género, familia, orden, clase, filo y superreino, respectivamente (Luo et al., 2014). Los hits que se encontraron por debajo de este nivel de identidad fueron considerados lecturas no clasificadas. Esto garantiza que no se realicen asignaciones basadas en aciertos débiles y no concluyentes.

### **6.3.2 Ciclo del carbono**

En los microorganismos, el ciclo biogeoquímico del carbono puede llevarse a cabo de forma aeróbica y anaeróbica, en los procesos aerobios, se lleva a cabo la degradación de materia orgánica, también se realiza la metanotrófia, que es la oxidación de CH<sub>4</sub>, ambos casos dan como resultado la producción de CO<sub>2</sub>. En condiciones de anaerobiosis, se llevan a cabo una serie de procesos complejos, que van desde la conversión de carbono orgánico, fijación de CO<sub>2</sub>, hasta la producción de CH<sub>4</sub> (figura 2).



Para evaluar el papel ecológico de los microorganismos del volcán en el ciclo biogeoquímico del carbono, se empleó metagenómica no dirigida para identificar el potencial genómico del microbioma, y para su validación se realizó estudios metabolómicos dirigidos para la determinación de los flujos del metabolismo intermediario en cultivos microbianos.

### **6.3.2.1 Potencial genómico del metabolismo del carbono**

Posterior al ensamble de secuencias del metagenoma shotgun (descrito en el apartado 5.3), se seleccionaron los Clusters of Orthologous Groups of proteins (COGs) y se emplearon para generar ortólogos de KEGG (KO). De los cuales, se seleccionaron los KOs involucrados en el metabolismo primario del carbono, con la finalidad de reconstruir y generar una propuesta integrativa del flujo metabólico considerando la diversidad taxonómica del microbioma del lago cratérico

### **6.3.2.2 Determinación del metabolismo intermediario en cultivos microbianos**

Se evaluó el ciclo del carbono mediante estudio del potencial metabólico analizando los genes involucrados en este proceso por medio de metagenómica ambiental, además, en condiciones anaerobias se analizó el metabolismo intermediario y con particular énfasis la metanogénesis por ser el último paso en la degradación total de la materia orgánica. Para esto, se determinaron los metabolitos intermediarios en este ciclo, tal como se describe a continuación.

Para el estudio del ciclo del carbono en condiciones anaerobias, se realizaron cinéticas de crecimiento en medio HS modificado (Sowers et al., 1984; Lira-Silva et al., 2012), empleando como fuentes de carbono el metanol, glicerol, triacilglicerol, piruvato de sodio, acetato de sodio, glucosa y maltosa. Las cinéticas se realizaron a 39 y 70°C y tuvieron duración de 3 a 4 semanas.

- ⊖ **Determinación del consumo de las fuentes de carbono.** Se realizó mediante la evaluación del contenido de carbohidratos (maltosa y glucosa) empleando el método espectrofotométrico de fenol-sulfúrico (Jasso-Chávez et al., 2010). El contenido de metanol, glicerol, TAG,

piruvato de sodio y acetato de sodio, en el medio de cultivo libre de células acidificando a pH0, se evaluó mediante la inyección de 2  $\mu$ L de la muestra en un cromatógrafo de gases marca Shimadzu, empleando la columna DB-1701 (30m, 0.250mm, 0.25 $\mu$  m. Agilent-Crawford) empleando He<sub>2</sub> como gas acarreador a un flujo de 4 mL·min<sup>-1</sup>, y un gradiente de temperatura.

La concentración de cada fuente de carbono se obtuvo mediante la interpolación en una curva estándar de cada sustrato.

- ⊖ **Determinación de producción de metabolitos.** Para la determinación de CO<sub>2</sub> y gas CH<sub>4</sub>, en los cultivos microbianos se empleó un cromatógrafo de gases marca Shimadzu modelo 2010 con un detector de ionización de flama, y empleando la columna HP-Plot/U (30m, 0.320mm, 10.0 $\mu$ m Agilent) a 70°C, empleando He<sub>2</sub> como gas acarreador a un flujo de 30 mLmin<sup>-1</sup>, empleando 5  $\mu$ L de 'headspace' de cada vial anaerobio.

La concentración de cada metabolito se obtuvo mediante el uso de la ley de los gases ideales (PV=nRT). Sustituyendo 'P' como la presión (KPa) que presentó cada vial anaerobio, y 'n' corresponde a la interpolación en una curva estándar para cada metabolito. Previo a la determinación en los cultivos se llevaron a temperatura de 37°C, para la correcta aplicación de los gases ideales

- ⊖ **Identificación molecular de la vía metanogénica.** Existen algunas enzimas esenciales y conservadas en todos los metanogénicos como la enzima metil CoM reductasa, (Hedderich & Whitman, 2006), la cual cataliza la desmetilación reductiva de la metil-S-CoM (CH<sub>3</sub>-S-CoM), el cual es el paso convergente en las tres vías metanogénicas (descritas en la figura 2).

La confirmación molecular de presencia de microorganismos metanogénicos en los consorcios microbianos del volcán El Chichón se realizó mediante la amplificación por PCR del gen *Mcr*, que codifica para la enzima CoM reductasa, empleando los primers ME1 y ME2, siguiendo lo descrito por Hales et al. (1996).

### **6.3.3 Ciclo del azufre**

Por medio de estudios metagenómicos de muestras ambientales, se analizó el potencial funcional del microbioma del lago cratérico relacionado con el metabolismo del azufre, además, debido a la relevancia biogeoquímica del proceso de sulfato reducción. Se evaluó la vía no asimilatoria, y se determinó la producción de sulfuro como metabolito final de la vía, así como la actividad específica de la enzima sulfito reductasa, y el flujo de la vía sulfato reducción no asimilatoria.

#### **6.3.3.1 Potencial genómico del metabolismo del azufre**

Los KOs relacionados con el metabolismo del azufre, fueron analizados y seleccionados para la construcción de una propuesta de cómo se lleva a cabo el metabolismo microbiano en particular, la oxidación de sulfuro y la reducción de sulfato, a su vez, fue correlacionado con la aportación taxonómica presente en las muestras ambientales evaluadas y cultivos lab-lake.

#### **6.3.3.2 Identificación molecular de la vía sulfato reducción no asimilatoria.**

Existen algunas enzimas esenciales y conservadas en todos los microorganismos sulfato reductores (bacterias y arqueas), alguna de estas enzimas son la APS reductasa que cataliza la reacción de APS a sulfito, así como, la enzima sulfito reductasa (DSR) que cataliza la conversión de sulfito a sulfuro (figura 4), etapa central de la conservación de energía (Wagner et al., 1998; Rabus et al., 2015; Rückert, 2016).

Para la confirmación molecular de presencia de microorganismos sulfato reductores en los consorcios microbianos del volcán El Chichón se evaluó la presencia del gen *dsrAB*, el cual codifica a la unidad  $\alpha$  y  $\beta$  de la enzima sulfito reductasa desasimilatoria (Dhillon et al., 2005), empleando los oligonucleótidos DSR1F y DSR4R siguiendo lo descrito por Wagner et al. (1998).

También, se determinó la presencia del gen *aprA*, el cual codifica para la unidad  $\alpha$  de la enzima adenosina 5'-fosfosulfato involucrada en el proceso bioquímico de reducción de sulfato a sulfito. Usando los oligonucleótidos AprA-1FW y AprA-5-RV (Watanabe et al., 2013). La mezcla se llevó a cabo usando 2.5  $\mu$ L de buffer 10X, 4.5  $\mu$ L MgCl<sub>2</sub> 25mM, 0.5  $\mu$ L de cada primer, 1  $\mu$ L dNTPs 2.5 mM c/u, 5  $\mu$ L de BSA (10mg/mL), 0.125  $\mu$ L de DreamTaq polimerasa (Thermo Fisher Scientific Inc, USA), 10 ng de DNA en un volumen final de 25  $\mu$ L. La reacción de PCR se llevó a cabo bajo un protocolo 'Touchdown' con las siguientes condiciones: 94°C por 2 min, 94°C por 30 s, 60°C por 45 s, 72°C por 45s, esto por 20 ciclos, seguido de, 94°C por 30s, 50°C por 45S, 72°C por 45s (10 ciclos) (Velázquez-Ríos, 2017).

### **6.3.3.3 Validación del potencial funcional del microbioma del lago cratérico mediante cultivos microbianos lab-lake y su relación con el metabolismo del azufre**

Los microorganismos sulfato reductores presentes en los consorcios microbianos lab-lake fueron estudiados en cinéticas de crecimiento en medio HS modificado (sin Na<sub>2</sub>S) (Sowers et al., 1984; Lira-Silva et al., 2012), modificado (sin Na<sub>2</sub>S) y suplementado con 100mM FeSO<sub>4</sub>, empleando como fuentes de carbono metanol, glicerol, triacilglicerol, piruvato de sodio, acetato de sodio, glucosa y maltosa. Las cinéticas se realizaron a 39 y 70°C y tuvieron duración de 3 a 4 semanas. Durante esta cinética de crecimiento se evaluó:

- ⊖ **Producción de sulfuro** por los consorcios microbianos, empleando la técnica de la formación de azul de metileno (Lira-Silva et al., 2013). El contenido de sulfuro se determinó intra y extra celularmente.

⊖ **Determinación de actividad específica de la enzima sulfito reductasa.** La enzima sulfito reductasa, cataliza la conversión de  $\text{SO}_3^{2-}$  a  $\text{H}_2\text{S}$ , es la última reacción en la vía sulfato reductora no asimilatoria. Para evaluar la actividad específica de esta enzima, se emplearon los extractos celulares mencionados en el apartado anterior, y se determinó la proteína total en cada fracción celular (enriquecimiento de fracción citosólica y membranal, anexo 5). Se realizó una incubación de 5, 10, 15, 50 y 100  $\mu\text{g}$  de proteína de cada extracto celular, 1760  $\mu\text{L}$  de buffer HKE-Na (anexo 2) y 0.1mM de  $\text{NaHSO}_3$  para determinar la actividad específica de esta enzima.

La concentración de sulfuro fue determinada a los 0, 5, 15, 30 y 60 min después de iniciar la reacción (ver método de cuantificación de sulfuro por la formación de azul de metileno en el anexo 3).

⊖ **Determinación enzimática de la vía de sulfato reducción.** Se evaluó la vía sulfato reductora no asimilatoria (figura 4), que tiene como sustrato al  $\text{SO}_4^{2-}$  y como producto final el  $\text{S}^2$  (Reyes-Alvarado et al., 2018). Brevemente, la presencia de esta vía metabólica, fue evaluada mediante una cinética de crecimiento en la cual los microorganismos sulfato reductores fueron enriquecidos (descrito en el apartado 5.9.1), en el día 15 de la curva de crecimiento, se cosecharon las células en condiciones anaerobias, por medio de centrifugación fueron separadas del caldo de cultivo, las células fueron lavadas con buffer anaerobio TME-Na pH 7.2 (anexo 1), después, el pellet celular fue resuspendido en 5mM de DTT, 1mM de PMSF y 10% de glicerol. La suspensión celular fue lisada por 5 intervalos de sonicación por 20 segundos, con un lapso de reposo de 1 min, la anaerobiosis se mantuvo mediante un flujo constante de  $\text{N}_2$  (10mLm<sup>-1</sup>in). Los extractos celulares lisados, fueron separados en fracciones

citoplásmicas y membranales (anexo 5), y posteriormente se almacenaron en viales anaerobios estériles a  $-80^{\circ}\text{C}$  hasta su uso.

Se determinó la proteína total en cada fracción celular empleando el método de Biuret, la concentración se obtuvo mediante interpolación en una curva estándar de BSA.

La determinación enzimática de la vía sulfato reducción, se realizó mediante la incubación de 0.1mg de proteína de cada extracto celular, 5mM ATP, 1mM de glutatión, 100 $\mu\text{M}$  NADPH, la reacción fue iniciada con la adición de 50 o 500  $\mu\text{M}$  de  $\text{FeSO}_4$ . El ensayo realizó a  $37^{\circ}\text{C}$  durante 30 min (la reacción fue lineal hasta 60min) en un volumen final de 1mL usando buffer HKE-Na (anexo 2). El sulfuro producido se determinó mediante el método espectrofotométrico de azul de metileno (anexo 3).

#### **6.4 Identificación de los mecanismos de resistencia**

Se establecieron cultivos microbianos anaerobios en medio salino HS modificado para el cultivo de microorganismos del volcán El Chichón cultivados a  $37^{\circ}\text{C}$  por 8 días, con la finalidad de generar suficiente biomasa. Transcurrido este tiempo, los microorganismos fueron sometidos a una exposición aguda por 12 horas a diferentes factores de estrés, como se muestra en el diseño experimental figura 7.

	Temperatura (°C)		pH		Cd (μM)		PO <sub>4</sub> <sup>-</sup> (mM)	
	37	70	3	6.8	0	100	0.05	5
<b>Consortrios mesófilos</b>								
Tratamiento 1	●	○	○	●	●	○	○	●
Tratamiento 2	○	●	○	●	●	○	○	●
Tratamiento 3	●	○	●	○	●	○	○	●
Tratamiento 4	●	○	○	●	○	●	○	●
Tratamiento 5	●	○	○	●	●	○	○	●
Tratamiento 6	○	●	●	○	○	●	○	●
<b>Consortrios hipertermófilos</b>								
Tratamiento 1	●	○	○	●	●	○	○	●
Tratamiento 2	○	●	○	●	●	○	○	●
Tratamiento 3	●	○	●	○	●	○	○	●
Tratamiento 4	●	○	○	●	○	●	○	●
Tratamiento 5	●	○	○	●	●	○	○	●
Tratamiento 6	○	●	●	○	○	●	○	●

**Figura 7 Diseño de experimento exposición aguda a condiciones poliextremas.** Los microorganismos con 8 días de crecimiento, fueron expuestos por 12 horas a los factores estresantes indicados en círculos negros. El tratamiento 5 fue cultivado por 8 días en 0.05mM de KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> y posteriormente se incrementó la concentración a 5mM.

Las células fueron separadas del medio de cultivo mediante centrifugación (8 000 rpm por 15min), y lavadas con buffer anaerobio TME-Na pH 7.2 (anexo 1), el pellet celular fue resuspendido en 5mM de DTT, 1mM de PMSF y 10% de glicerol y almacenadas a -70°C, hasta su posterior análisis.

#### 6.4.1 Potencial genómico de los mecanismos de tolerancia a condiciones poli-extremas

Los ortólogos de KEGG (KOs) relacionados con algunos de los mecanismos de respuesta a estrés como: la síntesis y consumo de polifosfatos, grupos tioles, transportadores de metales, estrés oxidante, entre otros, se emplearon para la construcción de un modelo integrativo que permitió conocer el potencial genómico de los microorganismos para enfrentar las condiciones poli-extremas que presenta su nicho ecológico el volcán El Chichón.

Alguno de los procesos identificados por estudios metagenómicos, fueron evaluados en los consorcios microbianos lab-lake, empleando diversos enfoques como se detallan a continuación.

## **6.4.2 Identificación de mecanismos de tolerancia a las condiciones poliextremas en los microorganismos del volcán El Chichón**

### **6.4.2.1 Identificación de moléculas con grupos tiol**

Las células fueron cosechadas, lavadas y posteriormente lisadas con ácido perclórico frío (PCA) al 30% (v/v) para obtener extractos ácidos. Posteriormente, se determinó en la fracción ácida soluble la cantidad de tioles totales mediante la incubación por 1 minuto de cada extracto en buffer 0.1 M de  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  pH8, y 0.1 mM de ácido 5, 5'-ditio-bis (2-nitrobenzoico) DNTB (Lira-Silva et al., 2013), y se determinó por espectrofotometría a 412nm. El contenido de estas moléculas se determinó empleando el coeficiente de extinción molar ( $\epsilon_{\text{DNTB}} = 13.6\text{mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$ ).

### **6.4.2.2 Identificación de polifosfatos**

El contenido intracelular de polifosfato (polyP) fue evaluado empleando el método de azul de molibdeno (anexo 4), reportado para cuantificar Pi. Las suspensiones celulares previamente lavadas con buffer TME-Na (anexo 1) y lisadas mediante una incubación con PCA por 2 horas a 90°C, se incubaron en una mezcla de reacción a pH4, conteniendo 2.5 mM de  $\text{CuSO}_4$ , 84 mM de  $\text{CH}_3\text{COONa}$  y 0.5 M de  $\text{CH}_3\text{COOH}$ ; a esta mezcla se le adicionó 5mM  $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24}$ , 14.5 mM de metol, y 60mM de  $\text{NaHSO}_3$ . La reacción se incubó durante 10 minutos para favorecer la formación del compuesto colorido, el cual se determinó mediante espectrofotometría a 880nm. La concentración se obtuvo por interpolación en una curva estándar de fosfato comercial (Sigma, México).



### 6.4.2.3 Determinación de actividades enzimáticas

Se determinó la actividad de enzimas claves en la respuesta a estrés inducido por metales como el  $\text{Cd}^{2+}$ , tales como, la enzima polifosfato quinasa (PPK), y exopolifosfatasa (PPX). Para esto, se utilizaron fracciones citosólicas enriquecidas (preparación de fracciones citosólicas y membranales anexo 5) obtenidas a partir de células recolectadas después de 24 horas de exposición aguda a factores extremos.

Las actividades de PPK y PPX fueron evaluadas usando trimetilsilil polifosfato comercial (Sigma, St Louis MO, USA). La síntesis o degradación de polyP se determinó mezclando la reacción con una solución de tinción (azul de toluidina al 0,001% en ácido acético 40 mM) y midiendo la absorbancia a 530 y 630 nm (Skorko, 1989; Mullan et al., 2002; Jasso-Chávez et al., 2019).

Para determinar la actividad de la PPK, la reacción se inició agregando la fracción citosólica enriquecida (10 - 50  $\mu\text{g}$  de proteína). La mezcla de reacción que contenía 10mM  $\text{MgCl}_2$ , 10mM  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 15% (v / v) glicerol, 2.5mM ATP, 0.35 mg trimetilsilil polyP / mL, 0.2% (v / v) Triton X-100, 5 mM PEP y 1 U Piruvato quinasa (PYK), en buffer HKE-Na (Jasso-Chávez et al., 2019), la reacción se incubó durante 60 min a 37°C bajo agitación orbital de 150 rpm. La formación de azul de molibdeno fue terminada mediante el registro de absorbancia a 530/630 nm y analizando el  $\Delta\text{Abs}$ . La síntesis/degradación de polyP, fue obtenida mediante interpolación en una curva estándar.

La actividad de PPX se determinó en un buffer de reacción HKE-Na que contenía la proteína (extracto citosólico enriquecido 10 - 80  $\mu\text{g}$  de proteína) y 0.2% (v/v) Tween-20. La reacción se inició añadiendo 1.4 mg polifosfato de trimetilsilil/mL. Después de 15 min de incubación a 37° C y 150 rpm de agitación orbital, se determinó la hidrólisis de la polyP mediante  $\Delta\text{Abs}$  a 530/630 nm como se describió anteriormente.

## **6.5 Descripción de modelo de red**

### **6.5.1 Identificación de la interacción microbiana con el ecosistema mediante análisis multiparamétrico**

La interacción de los factores ambientales y la microbiología del lago cratérico se estableció a través de técnicas de reescalamiento multidimensional. Empleando un análisis de correspondencia sin tendencia (DCA, por sus siglas en inglés) se determinó el modelo que mejor se ajusta a la interpretación del sistema biológico, el cual puede ajustarse a un sistema lineal o multimodal. Se empleó un análisis de componentes principales (PCA) y un análisis canónico de correspondencia (CCA) para evaluar las correlaciones existentes entre los parámetros ambientales y la diversidad microbiana presente en el sistema geotérmico, para esto se empleó el software CANOCO versión 4.5 (Microcomputer Power, Ithaca, NY, USA) (Ter Braak et al., 2002). Se realizó una selección de variables que se identificaron fuertemente correlacionadas y que permitieron la mejor explicación del sistema. La intensidad de la correlación entre especies y muestras se determina por la distancia lineal entre sus símbolos. La significancia fue determinada utilizando el test de permutaciones Monte Carlo (Urbieta, 2013).

### **6.5.2 Construcción de red metabólica**

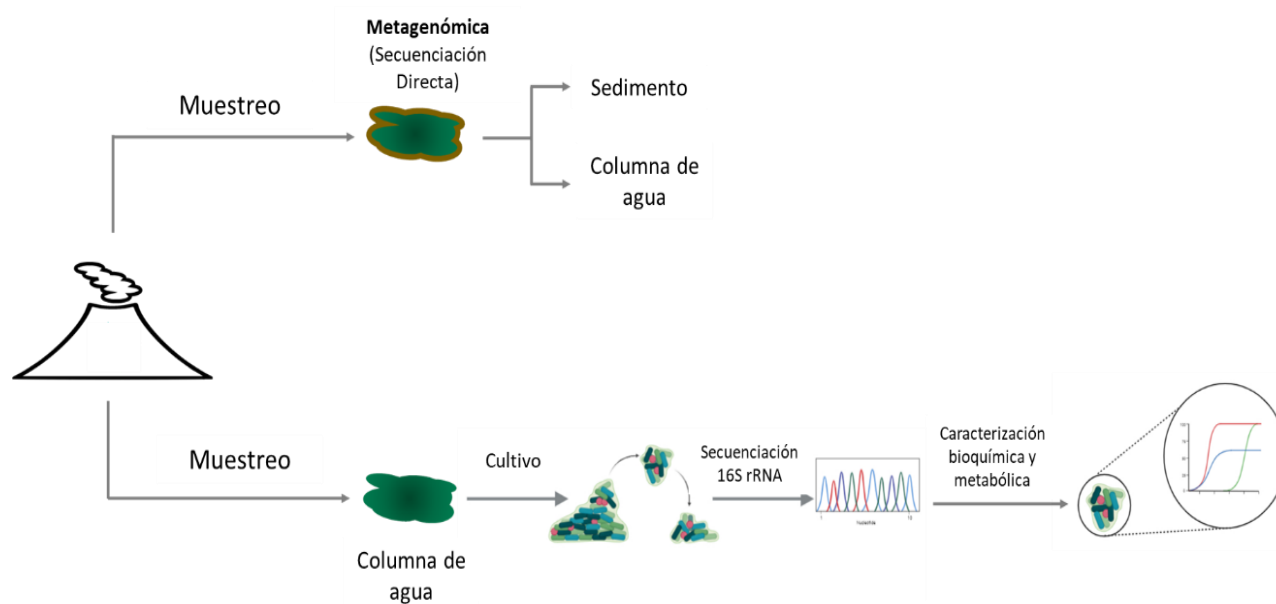
Empleando la teoría de redes (ciencias de la complejidad) se estudiaron las relaciones existentes entre los procesos metabólicos del microbioma del volcán El Chichón. Se realizó una representación gráfica empleando una red de interacción y co-interacción dirigida a los procesos metabólicos de respuesta y tolerancia a diferentes tipos de estrés, metabolismo del metano y del azufre. Se empleó el software bioinformático Cytoscape, en el cual se construyeron tres redes anidadas (Nested style) que emplea jerarquías y modelos de nodos circulares. La primera red explica el potencial genómico para realizar todos los procesos metabólicos en muestras ambientales. Los parámetros de esta red fueron: nodos representados por la vía metabólica, con valor numérico asignado por la abundancia del proceso Transcritos Per Millon (TPM) y la interacción (edge) dada por el tipo de muestra

(hipertermófilas y mesófilas). Para la segunda red, en la que se describen los metabolismos del ciclo del azufre, la metanogénesis y los mecanismos de tolerancia a estrés en muestras ambientales, se consideraron como nodos el proceso metabólico dado, considerando la abundancia de TMP, y como interacción el tipo de muestra. La última red fue construida considerando como nodos la capacidad genómica de las muestras ambientales y el potencial metabólico predictivo de cultivos microbianos, sin peso (valor) en TPM, y como interacción la característica de temperatura o tipo de muestra (hipertermófila y mesófila). Las matrices de datos empleadas para estos análisis se describen en el apartado 5.3 para datos metagenómicos de muestras ambientales y en el apartado 5.2.4.3 para los datos predictivos de cultivos microbianos.

## 7 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 7.1 Diseño de la estrategia para la determinación de la diversidad y funcionalidad del microbioma del volcán El Chichón

Se diseñó una estrategia dual (Figura 8) que integra un enfoque metagenómico de muestras ambientales de la columna de agua y sedimentos del lago cratérico, simultánea a un enfoque de culturómica anaerobia y la caracterización bioquímica del metabolismo microbiano en estos cultivos, con esta estrategia fue posible determinar los principales rasgos funcionales de las comunidades poli-extremófilas del microbioma presente en el lago cratérico del volcán El Chichón.



**Figura 8 . Flujo de trabajo empleado para el análisis del microbioma del volcán activo El Chichón.** En el diagrama se muestra la estrategia de estudio del microbioma del volcán El Chichón a diferentes niveles de regulación y empleando ciencias ómicas. **A)** Análisis in situ empleando un diseño descriptivo comparativo simple que constó de dos muestras ambientales, sedimento termófilo y columna de agua hipertermófila. **B)** Etapas del cultivo microbiano, iniciando en el establecimiento del cultivo en condiciones de laboratorio, la secuenciación dirigida a regiones del gen 16S rRNA para determinar la dinámica microbiana, el análisis de los flujos metabólicos y caracterización enzimática de vías y mecanismos claves en este proyecto de investigación.

## 7.2 Eficiencia del sistema de cultivo

Se diseñó un sistema de cultivo microbiano “Lab-Lake”, cuya finalidad fue reproducir en condiciones de laboratorio a microorganismos involucrados en los ciclos biogeoquímicos del carbono y el azufre en el volcán El Chichón, para estudiar los mecanismos empleados para resistir condiciones poli-extremas de temperatura, pH ácido, salinidad y presencia de metales pesados. Para el desarrollo de este sistema Lab-Lake se tomaron en consideración las características ambientales y la diversidad microbiana halladas en el sitio de estudio tal como se describe en los apartados siguientes.

### 7.2.1 Fisicoquímica del lago cratérico del volcán El Chichón

La exploración perimetrica *a priori* en el lago-cráter del volcán “El Chichón” permitió seleccionar muestras de sedimento y columna de agua a diferentes temperaturas, tres muestras mesófilas (45°C) de sedimento, y tres muestras hipertermófilas (82°C) de columna de agua, con la finalidad de comparar el efecto de la temperatura sobre las características fisicoquímicas y microbiológicas en este ambiente natural extremo. En este sentido, los parámetros fisicoquímicos determinados *in situ* se muestran en el cuadro 3. Es notable la diferencia estadística significativa ( $p \leq 0.05$ ) que existe en la temperatura entre tipo de muestra, debido a un  $\Delta 33^\circ\text{C}$ . Para la variable pH no tuvo diferencia estadística significativa. Los valores de las características fisicoquímicas de sedimentos y aguas fueron similares a lo reportado por Armienta et al. (2008) y Rincón-Molina et al. (2019), quienes evidenciaron que el lago cráter del volcán El Chichón es un ambiente natural extremo de tipo ácido-térmico.

Cuadro 3 Características fisicoquímicas in situ de sedimentos y aguas del lago cráter del volcán El Chichón.

Tipo de muestra	Temperatura (°C)	pH	CE (µS/cm)	OD (mg/L)
<b>Sedimento</b>	44.6 ± 0.33 <b>a</b>	4.43 ± 0.54 <b>a</b>		
<b>Agua</b>	82.3 ± 0.33 <b>b</b>	3.16 ± 0.81 <b>a</b>	1736 ± 39	5.89 ± 0.98

\* Letras iguales no existe diferencia mínima significativa

\*\*Los resultados están basados en las medias de los tratamientos, donde n=3

El carbono y nitrógeno orgánico total presente en las muestras de sedimento se muestra en el cuadro 4. Un parámetro importante para determinar la fertilidad de un sistema es la relación que existe de C/N, si esta es cercana a 10 puede favorecer el desarrollo de la vida microbiana en ambientes naturales (Zheng et al., 2020). Sin embargo, en las muestras del lago cráter del volcán El Chichón la relación de carbono y nitrógeno fue cercana a 8, que es similar a lo reportado por Grossat et al. (2011) quienes estudiaron lagos oligotróficos hostiles para la vida. Estos resultados indicaron que la baja disponibilidad de nutrimentos fácilmente metabolizables como la glucosa, el amonio, y O<sub>2</sub>, permite clasificar el lago volcánico El Chichón como un ambiente oligotrófico.

Por otro lado, se analizó el contenido de metales (Cuadro 4). Los elementos más abundantes fueron el Al, Fe, Ca, K y Na los cuales se encuentran estrechamente relacionados con algunas características fisicoquímicas en este nicho ecológico, tal como la conductividad eléctrica (CE) (Armienta et al., 2008). Y por su relevancia toxicológica, el contenido de Cd (6.75ppm) y As (140 ppm) (Peña-Ocaña et al., 2020) los cuales superaron el límite máximo permisible por más de 3 y 7 veces, respectivamente (WHO, 2020; FAO 2020).

Cuadro 4 . Concentración elemental en sedimentos y agua del lago del volcán El Chichón

Metal	Sedimento	Columna de agua	Metal	Sedimento	Columna de agua
<b>As</b>	147.9 ± 4.6	3.7 ± 1.2	<b>Sb</b>	9.0 ± 1.9	0.6 ± 0.2
<b>Be</b>	2.5 ± 0.0	3.9 ± 0.0	<b>Se</b>	11.8 ± 3.9	2.3 ± 0.5
<b>Ca</b>	2234 ± 66.7	655 ± 51.5	<b>Sr</b>	0 ± 0.0	6.8 ± 0.4
<b>Cd</b>	7.1 ± 0.2	2.9 ± 0.0	<b>Ti</b>	409 ± 9.6	2.4 ± 0.9
<b>Co</b>	5.5 ± 0.1	3.1 ± 0.0	<b>Tl</b>	0.4 ± 0.2	0.3 ± 0.1
<b>Cr</b>	6.1 ± 0.1	1.9 ± 0.1	<b>V</b>	33.9 ± 1.0	1.9 ± 0.0
<b>Cu</b>	71.6 ± 2.5	0.7 ± 0.1	<b>Zn</b>	20.7 ± 0.7	7.9 ± 0.4
<b>Fe</b>	5300 ± 185.6	43.3 ± 8.5	<b>K</b>	657.7 ± 35.9	450.3 ± 56.7
<b>Li</b>	8.8 ± 0.3	1.3 ± 0.3	<b>Si</b>	276.5 ± 3.9	1059 ± 164.4
<b>Mg</b>	494.8 ± 14.3	424.5 ± 52.1	<b>Al</b>	4818 ± 111.3	59.2 ± 23.9
<b>Mn</b>	125.1 ± 4.3	0.7 ± 0.3	<b>B</b>	0 ± 0.0	24.2 ± 2.1
<b>Mo</b>	9.9 ± 0.4	5.1 ± 0.3	<b>Ba</b>	93.2 ± 2.9	2.2 ± 0.2
<b>Ni</b>	4.2 ± 0.1	2.8 ± 0.0	<b>Na</b>	817.8 ± 240.7	3125 ± 295.9
<b>Pb</b>	6.3 ± 0.5	2.3 ± 0.3	<b>Ag</b>	2.1 ± 0.0	2.3 ± 0.0

\*Resultados presentados en ppm ( $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$  para agua y  $\text{mg}\cdot\text{Kg}^{-1}$  para sedimento)

\*\*Los resultados están basados en las medias de los tratamientos, donde  $n=3$

Además, se identificaron dos aniones y cinco cationes (cuadro 5), siendo el anión  $\text{Cl}^-$  y catión  $\text{Na}^+$  los iones más abundantes, similar a lo reportado por Rincón-Molina et al. (2019). El  $\text{SO}_4^{2-}$ , se encontró en menores cantidades, esto puede ser debido a la actividad microbiana sulfato reductora, o bien, a que el azufre presente en este volcán se encuentra en otras formas de S, diferentes al  $\text{SO}_4$ . Por otro lado, el  $\text{NO}_3^-$  y el  $\text{PO}_4^{3-}$ , se encontraron por debajo del límite de detección de esta técnica que es 1.5 y 2.2 mg/L respectivamente, lo que sugiere que existe poca disponibilidad de fuentes de N y P para el mantenimiento microbiano.

Cuadro 5 . Concentración de iones presentes en columna de agua del lago del volcán El Chichón

<b><math>\text{Cl}^-</math></b>	<b><math>\text{Na}^+</math></b>	<b><math>\text{NH}_4^+</math></b>	<b><math>\text{K}^+</math></b>	<b><math>\text{Mg}^{2+}</math></b>
4484 ± 1.1	2372.0 ± 7.9	85.5 ± 2.5	64.4 ± 2.5	23.66 ± 1.1
<b><math>\text{Ca}^{2+}</math></b>	<b><math>\text{SO}_4^{2-}</math></b>	<b><math>\text{HCO}_3^-</math></b>	<b><math>\text{NO}_3^-</math></b>	<b><math>\text{PO}_4^{3-}</math></b>
10.9 ± 0.8	15.2 ± 0.2	<LD*	<LD*	<LD*

\*<LD, Por debajo del límite de detección

\*\* Expresado en mg·L ( $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$  para agua y  $\text{mg}\cdot\text{Kg}^{-1}$  para sedimento)

\*\*\*Los resultados están basados en las medias de  $n=3$ .

## 7.2.2 Diversidad porcarionte en muestras ambientales

Se identificaron bacterias y arqueas, en muestras de columna de agua hipertermófila y sedimentos termófilos. En el cuadro 6 se muestra el rendimiento de secuenciación masiva por Illumina Miseq 2x300 (Lecturas crudas totales), y las lecturas filtradas, las cuales superaron los intervalos de calidad seleccionados para el análisis bioinformático y su posterior asignación taxonómica. También se puede apreciar la cantidad de unidades operacionales taxonómicas (OTUs) identificadas en cada muestra ambiental.

Cuadro 6 . Resultados del análisis de secuenciación de gen 16S rRNA

Tipo de muestra	Lecturas crudas totales	Lectura filtradas	OTUs
Bacterias	1 295 945	969 018	119
Arqueas	192 289	169 576	100

Se realizó un análisis riguroso de control de calidad, que llevó a la eliminación de 25% de lecturas para bacterias y cerca del 12% para arqueas; sin embargo, la cantidad de lecturas filtradas fue suficiente para analizar la abundancia relativa y la diversidad microbiana presente en el sistema natural, esto se puede aseverar debido a que existe una correlación entre el número de OTUs y el análisis de rarefacción realizado. Cabe destacar, que solo poca de la diversidad procariota corresponde a microorganismos no clasificados (<5%).

En cuanto a las OTUs identificadas podemos destacar por abundancia la presencia de Bacteroidetes, Proteobacteria y Crenarchaeota. Dentro de estos, domina la participación de los géneros *Sphingobacteriia*, *Flavobacteria*, *Thiobacillus*, *Acidithiobacillus*, *Hydrogenophyllus* y *Sulfolobales*, los cuales, han sido reportados en ambientes termófilos, o termófilos moderados, así como en ambientes ácidos (Li et al., 2020; Blöchl et al., 1995; Zhang et al., 2018).



### 7.2.3 Formulación de medios de cultivo

Con base en la taxonomía de las muestras ambientales, y de las características fisicoquímicas del ambiente, se decidió emplear el medio de cultivo High Salt (HS) reportado por Sowers et al. (1984; 1995), cuya composición fue modificada para incrementar el contenido de fuentes de carbono, sales y minerales. Para la preparación de este medio de cultivo definido en este estudio se empleó como disolvente agua ultrapura (mili-Q, Millipore) la cual se mantuvo en agitación en una cámara anaeróbica (COY Laboratory products, Grass Lake, Michigan, USA) permitiendo el desplazamiento del O<sub>2</sub> disuelto en el agua. La cámara anaeróbica se saturó con 80% de N<sub>2</sub>, 15% de CO<sub>2</sub> y 5% de H<sub>2</sub>. Finalmente, se adicionó al medio de cultivo 1 g·L<sup>-1</sup> de cisteína, Na<sub>2</sub>S·9H<sub>2</sub>O 0.025 % (v/v) y se ajustó el pH a 6.5.

Una vez definido el medio de cultivo, se procedió a evaluar el crecimiento de los microorganismos del volcán El Chichón, para lo cual, se colectaron muestras de columna de agua en los sitios indicados en la figura 9.



Muestra	pH	T (°C)	Ubicación Geográfica	Altitud
1	3.3	35	17° 21'35'' N 93° 13'41'' W	888 msnm
2	3.7	40	17° 21'33'' N 93° 13'41'' W	888 msnm
3	3.5	45	17° 21'39'' N 93° 13'41'' W	886 msnm
4	3.1	82	17° 21'40'' N 93° 13'41'' W	885 msnm
5	ND	ND	17° 21'37'' N 93° 13'44'' W	883 msnm

**Figura 9** Muestras empleadas para el sistema de cultivo 'Lab-Lake'. Muestras de columna de agua.

Las muestras fueron colectadas e inoculadas en 57 viales anaerobios que contenían el medio de cultivo antes descrito.

#### 7.2.4 Cinéticas de crecimiento

Para evaluar la eficiencia del medio de cultivo definido para el estudio de los microorganismos del volcán El Chichón, se realizaron cinéticas de crecimiento para lo cual, 8 días después de inocular las muestras ambientales, fueron resembraron en medios frescos, dando un total de 190 cultivos microbianos, los cuales se incubaron a temperatura ambiente.

Los primeros indicios de actividad microbiana en laboratorio fueron evidentes después de 60 días de incubación. Las características consideradas para determinar la actividad microbiana fueron los flujos de producción de gas metano y dióxido de carbono, mismos que se consideraron variables de respuesta para la selección de cultivos viables con crecimiento, tal como se muestra en la figura 10. Este fue el primer criterio de selección para la realización de cinéticas de crecimiento microbiano.



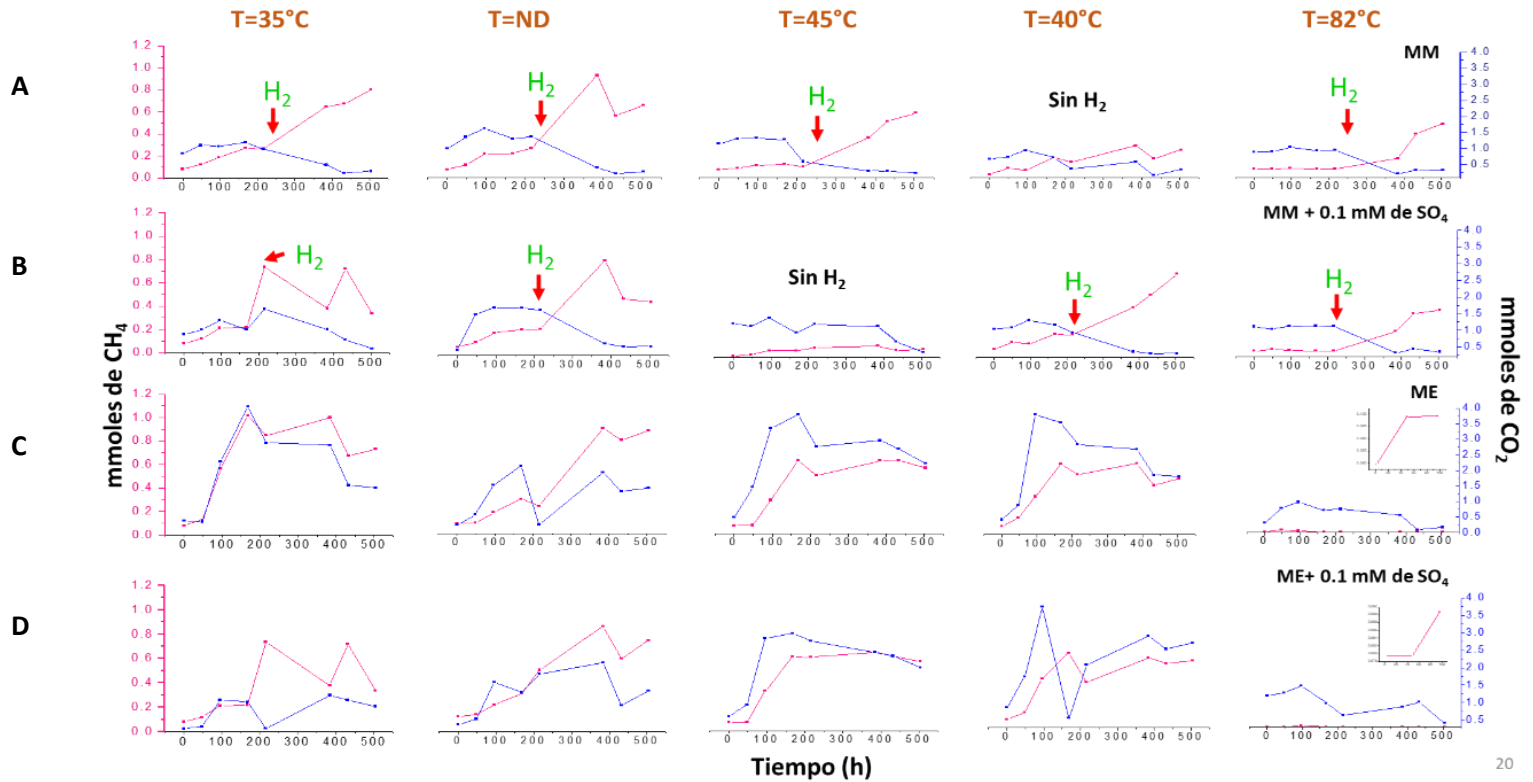
**Figura 10 Estrategia experimental para la determinación de actividad metabólica en las comunidades microbianas del lago-cráter del volcán El Chichón.** Se tomaron 57 muestras in situ de columna de agua en diferentes temperaturas (30-105°C), estas fueron resembradas e incubadas a diferentes temperaturas (39 y 70°C), transcurridos 60 días, fue adicionado a cada vial anaerobio de cultivo una mezcla de fuentes de carbono, y se incubaron nuevamente por 120 horas. Después de esto, fue analizado mediante cromatografía de gases la producción de CO<sub>2</sub> y CH<sub>4</sub>, como

variables de respuesta de crecimiento celular. 22 viales de cultivo fueron seleccionados y agrupados en función a la temperatura del sitio de colecta. Y de esta manera se logró enriquecer y agrupar a la comunidad microbiana en 5 muestras representativas del lago-cráter del volcán El Chichón para realizar la caracterización metabólica mediante cinéticas de crecimiento.

Los cultivos más activos fueron agrupados en cinco consorcios y se caracterizó el comportamiento de crecimiento (Figura 11), para lo cual, se realizaron cinéticas de crecimiento de las cinco muestras seleccionadas, con dos propósitos, el primero, enriquecer a la mayor cantidad de microorganismos presentes en las muestras, y el segundo, para enriquecer a la fracción microbiana involucrada en ciclos biogeoquímicos de interés como el ciclo del carbono y el ciclo del azufre, para lo cual, se buscó el cultivo de arqueas metanogénicas de las muestras, debido a su participación en el último paso de la degradación completa de la materia orgánica (Ferry y Lessner, 2008) y también su relevante potencial biotecnológico como fuente de energía verde. Simultáneamente, se buscó el enriquecimiento de microorganismos sulfato reductores, los cuales son característicos de los ambientes volcánicos y tienen gran relevancia en la función azufre en estos ecosistemas, además de su gran potencial en la biotecnología (Rückert, 2016).

Se diseñaron dos medios de cultivo, los cuales recibieron el nombre de metanogénicos, que es medio HS con fuente de carbono 100 mM de metanol anaerobio y 100 mM de acetato de sodio; el segundo medio empleado fue, denominado medio enriquecido, cuya formulación es medio HS suplementado con una mezcla de fuentes de carbono previamente descrito.

Los resultados del experimento en presencia de 100  $\mu\text{M}$  de  $\text{FeSO}_4$  y en ausencia de  $\text{FeSO}_4$  se pueden observar en la figura 11. El medio de cultivo de enriquecimiento, tuvo la mayor actividad microbiana en función de la mayor producción de  $\text{CO}_2$  y  $\text{CH}_4$ , en todos los cultivos mesófilos, independiente de la ausencia o presencia de  $\text{SO}_4$ , por el contrario, en el cultivo obtenido de 82°C (hipertermófilo), no se observó crecimiento celular en este medio de cultivo.



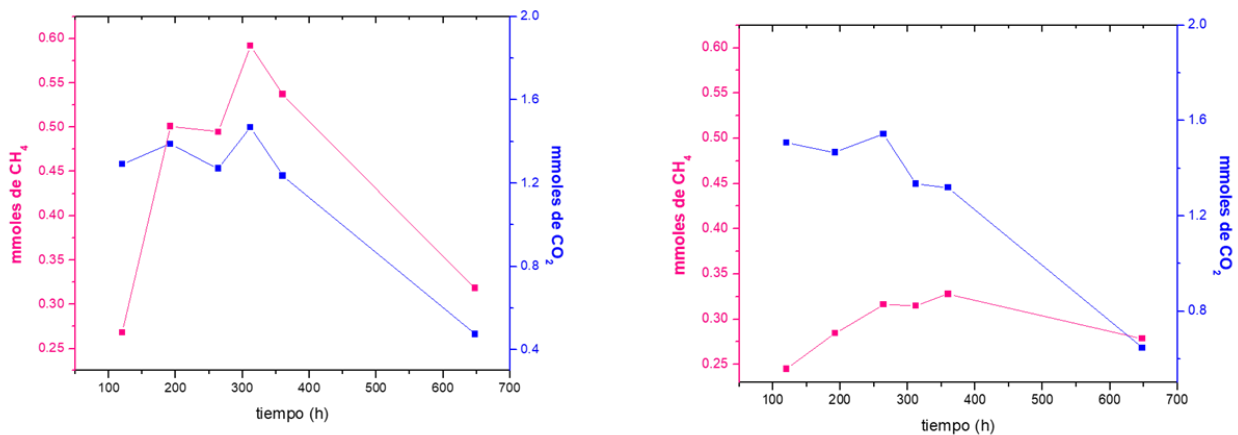
**Figura 11** Cinéticas de crecimiento de cultivos microbianos del lago cráter del volcán El Chichón. En la parte superior del gráfico, temperatura y pH medidos in situ de cada cultivo microbiano; A) Medio metanogénico; B) Medio metanogénico +  $\text{SO}_4^-$ ; C) Medio de enriquecimiento; D) Medio de enriquecimiento +  $\text{SO}_4^-$ . El eje Y1 muestra a producción de gas  $\text{CH}_4$  (mM), el eje Y2, muestra la producción de  $\text{CO}_2$  (mM). Las flechas rojas (200 horas) indican la adición de hidrógeno para favorecer a microorganismos metanogénicos hidrogenotróficos, los recuadros verdes señalan los cultivos control (sin adición de hidrógeno).

Los microorganismos del medio de cultivo metanogénico no presentaron crecimiento, a pesar de la adición de  $\text{SO}_4$ . Esto puede deberse a que existen tres vías metanogénicas (Berghuis et al., 2019), la acetoclástica, que conlleva a la formación de  $\text{CH}_4$  a partir de acetato, la vía metilotrófica que permite la formación de  $\text{CH}_4$  a partir de metanol y metilaminas, y la vía hidrogenotrófica, que permite la formación de metano a partir de  $\text{CO}_2$  y  $\text{H}_2$ . En el medio de cultivo metanogénico se encuentran presentes como fuente de carbono, acetato de sodio y metanol, y a pesar de esto, no hubo formación de metano, lo que sugiere que la vía metabólica empleada por los microorganismos del volcán El Chichón podrían ser la vía hidrogenotrófica, por esto, cercano a las 200 horas de crecimiento celular, se adicionó  $\text{H}_2$  a los frascos de cultivo, y la producción de  $\text{CH}_4$  inició las 24 h siguientes

evidenciando así que es posible enriquecer a los microorganismos productores de metano de los consorcios microbianos de El Chichón en un medio definido para metanogénicos hidrogenotróficos.

El consumo de las fuentes de carbono, mostró que en los medios de cultivo enriquecidos los inóculos mesófilos consumieron cerca del 80% de los sustratos, mientras que, el cultivo de 82°C consumió únicamente el 20% de estos sustratos, esto es congruente con lo observado en la formación de proteínas durante la cinética de crecimiento, pues, los microorganismos mesófilos lograron formar 6 mg de proteína total, mientras que, los hipertermófilos, únicamente fueron capaces de generar 2 mg.

Con la finalidad de determinar la concentración de sulfato para el crecimiento óptimo de microorganismos presentes en este lago cratérico se realizó una cinética de crecimiento a 39°C, variando concentraciones de  $\text{FeSO}_4$  de 0 a 1mM (Figura 12), este experimento se mantuvo durante 650 horas y se evaluaron la producción de  $\text{CO}_2$ ,  $\text{CH}_4$ , y la síntesis de proteínas como indicador de crecimiento celular. La figura 12 muestra los resultados más representativos de este experimento.

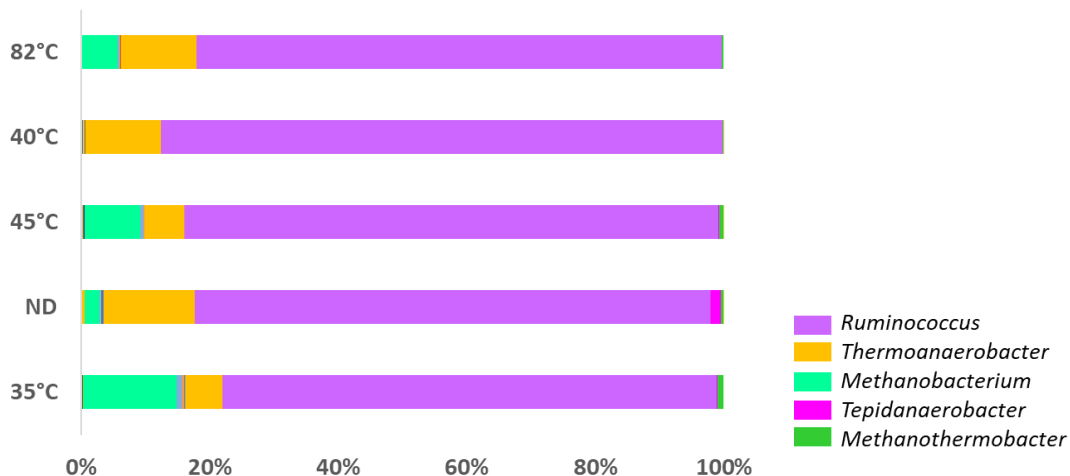


**Figura 12** Cinética de crecimiento de cultivo mesófilo Lab-Lake en presencia de  $\text{FeSO}_4$  como fuente de azufre. **A)** 0.1mM de  $\text{FeSO}_4$  y **B)** 1mM de  $\text{FeSO}_4$ . En el eje Y' se muestran los mmoles de  $\text{CH}_4$  producidos y en el eje Y'' los mmoles de  $\text{CO}_2$ .

Los resultados mostraron que la concentración óptima para el crecimiento de microorganismos del lago-cráter del volcán El Chichón fue 100  $\mu\text{M}$  de  $\text{FeSO}_4$ , la cual se empleó en posteriores experimentos. En el ecosistema natural la concentración de  $\text{SO}_4^{2-}$  fue 162  $\mu\text{M}$ , lo que sugiere que los microorganismos presentes en las muestras ambientales tienen mayor capacidad para metabolizar el sulfato ferroso, que los microorganismos presentes en el cultivo Lab-Lake, por esta razón, se realizó una dinámica microbiana a partir de cinéticas de crecimiento en laboratorio, con la finalidad de identificar a los microorganismos presentes en los cultivos de laboratorio, y el papel que representan en estos consorcios.

### 7.2.5 Dinámica microbiana por metagenómica dirigida (16S rRNA)

De las cinéticas de crecimiento analizadas, se extrajo material genético (DNA total) y se secuenció por la tecnología Illumina MiSeq 2x300, después de realizar el correspondiente análisis bioinformático, se pudo identificar que los cultivos microbianos se encuentran fuertemente dominados por bacterias del phylum Firmicutes y arqueas de tipo Euryarchaeotas, tal como se muestra en la Figura 13.



**Figura 13 Abundancia relativa de los cultivos microbianos Lab-Lake.** Nivel taxonómico: Género. Se muestra la diversidad a tiempo final de la cinética de crecimiento, se pudo identificar que la abundancia relativa de cada taxón no se ve influenciada por el tiempo de cinética, sin embargo, esto puede ser distinto a nivel metabólico.

En cuanto a la microbiología, El Chichón es un sistema poco diverso representado por pocos taxones microbianos de los cuales mediante cultivos Lab-Lake, únicamente se lograron enriquecer 14 géneros, de los casi 70 géneros microbianos presentes en el ecosistema natural, este fenómeno se encuentra muy bien documentado (Smith et al., 2018; Wu et al., 2020; Durvasula et al., 2020), puesto que hasta el momento, menos del 10% de la biodiversidad microbiana ha sido cultivada en laboratorio, este porcentaje es aún menor cuando de extremófilos se habla (Merino et al., 2019).

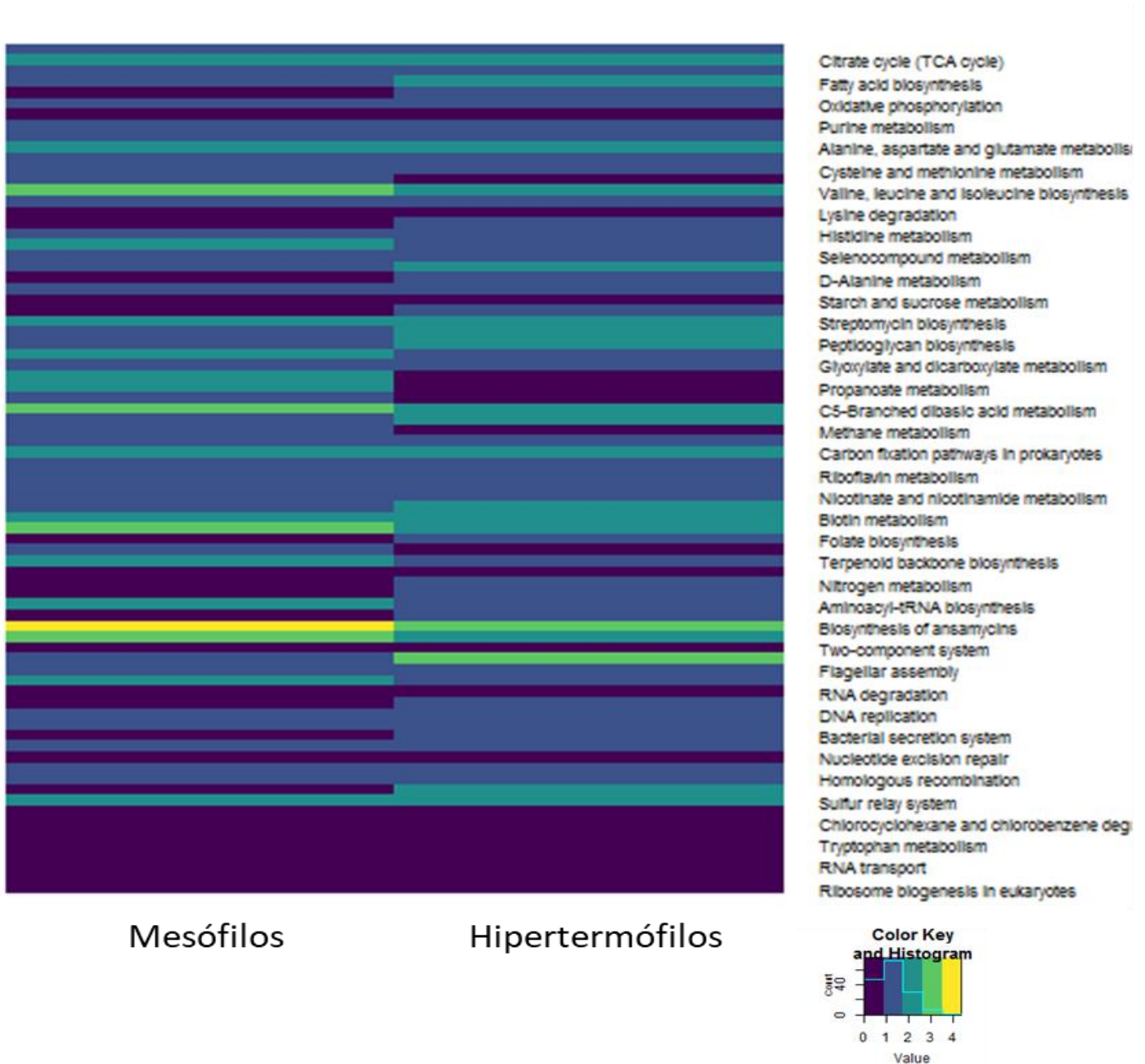
Por estas razones, el cultivo microbiano Lab-Lake puede ser considerada una estrategia de éxito para el cultivo de microorganismos volcánicos. Para evaluar su eficiencia en este proyecto de investigación, se determinó el posible potencial metabólico y la participación de los consorcios en los ciclos biogeoquímicos de interés, carbono y azufre.

#### **7.2.6 Predicción metabólica de consorcios Lab-Lake**

Con base en las secuencias obtenidas del análisis del gen 16S rRNA, fue posible determinar que la diversidad microbiana en las muestras de cultivos analizados, es muy similar entre sí, únicamente variando en los porcentajes de abundancia, por esta razón y para facilitar la puesta en marcha de experimentos futuros, se decidió agrupar los cultivos en función a la temperatura que presentaron en el micro ambiente del que fueron aislados. Dando lugar al mantenimiento de solo dos tipos de cultivo microbiano, el cultivo mesófilo (30-45°C) y el hipertermófilo (82°C).

Además, usando herramientas bioinformáticas (PICRUSt), se pudo realizar un análisis predictivo de la funcionalidad microbiana (Langille et al., 2013), con lo que fue posible identificar que los microorganismos presentes en los consorcios evaluados podrían estar desarrollando roles de vital importancia en la preservación del equilibrio biogeoquímico del azufre y carbono, además de presentar respuesta a estrés nutrimental y otros factores ambientales, tales como, resistencia a elevadas

temperaturas, producción de antimicrobianos, exposición a metales pesados, entre otros, tal como se muestra en la figura 14.



**Figura 14 Perfil predictivo del potencial metabólico de los cultivos microbianos Lab-Lake.** Amarillo corresponde a las funciones más abundantes, en gradiente a azul marino que corresponde a las funciones menos representadas. Los procesos más abundantes fueron biosíntesis de ansamicina (familia de metabolito antimicrobiano, antiviral y antineoplásicos). Metabolismo de folato, motilidad flagelar y metabolismo del metano. También, se identificó la presencia de sistema metabólico del azufre (ciclismo).



Como se observa el potencial funcional es ligeramente distinto dependiendo del tipo de cultivo, esto se debe a que las pequeñas poblaciones diferenciales entre un cultivo y otro desarrollan procesos metabólicos diversos, y genera un cambio a la dinámica metabólica de las muestras. Sin embargo, en ambos casos se puede apreciar la presencia de procesos como metabolismo de almidón y azúcares, fijación de CO<sub>2</sub>, metabolismo del metano y dinámica de azufre.

Por lo anterior, es posible emplear los consorcios microbianos Lab-Lake con la finalidad de comprender la participación de los microorganismos en los ciclos biogeoquímicos del carbono y azufre en el sistema volcánico El Chichón.

### **7.3 Evaluación de diversidad y potencial metabólico del microbioma del volcán El Chichón**

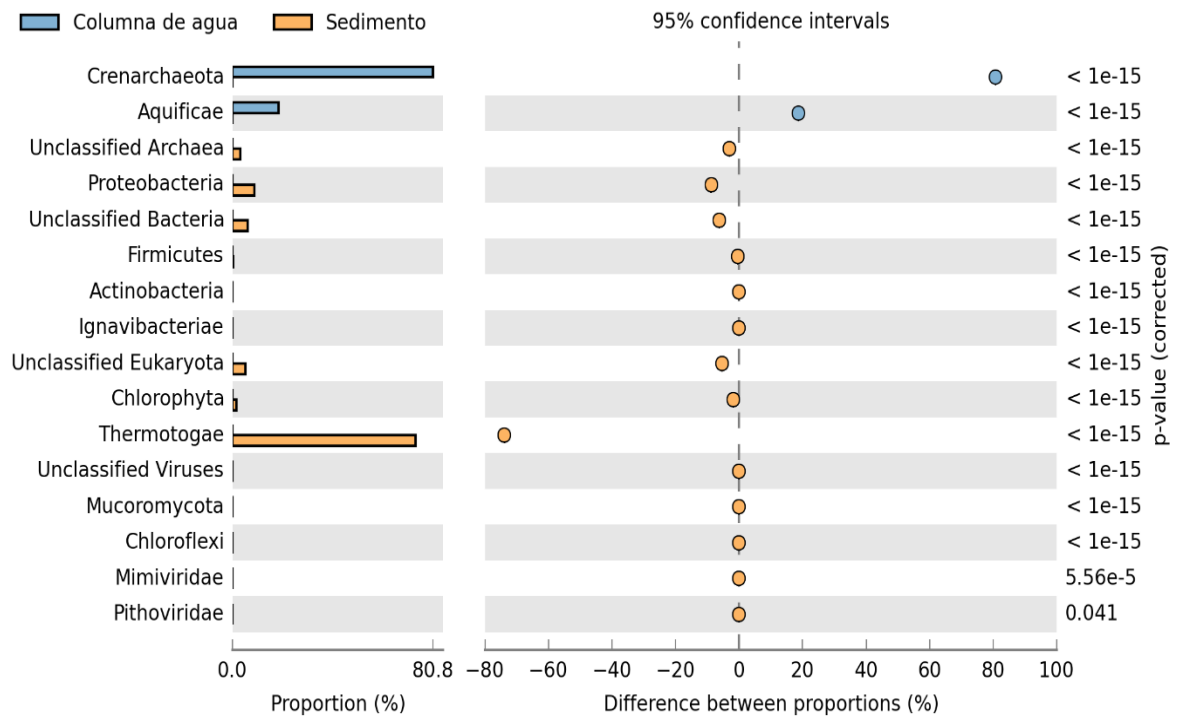
Se estima que la gran mayoría de las genoespecies procariotas permanecen aún sin cultivar (Sleator et al., 2008) y los genomas de microorganismos no cultivados son un reservorio de nuevos metabolitos y procesos metabólicos sin explorar (Simon & Daniel, 2011). En consecuencia, la metagenómica se ha desarrollado rápida y eficazmente, acompañada de la obvia necesidad de aislar y cultivar microorganismos para identificar con precisión la composición funcional (Simon & Daniel, 2011; Thomas et al., 2012). Ese importante logro ha permitido una comparación y exploración a profundidad de la ecología microbiana (Biddle et al., 2008; Cotruvo et al., 2017), incluido el perfil metabólico de ecosistemas microbianos complejos (Tringe et al., 2005; DeLong et al., 2016).

Es importante correlacionar herramientas metagenómicas y cultivos microbianos para poder hacer una correcta interpretación del potencial genético y la capacidad metabólica de las genoespecies estudiadas.

#### **7.3.1 Diversidad taxonómica**

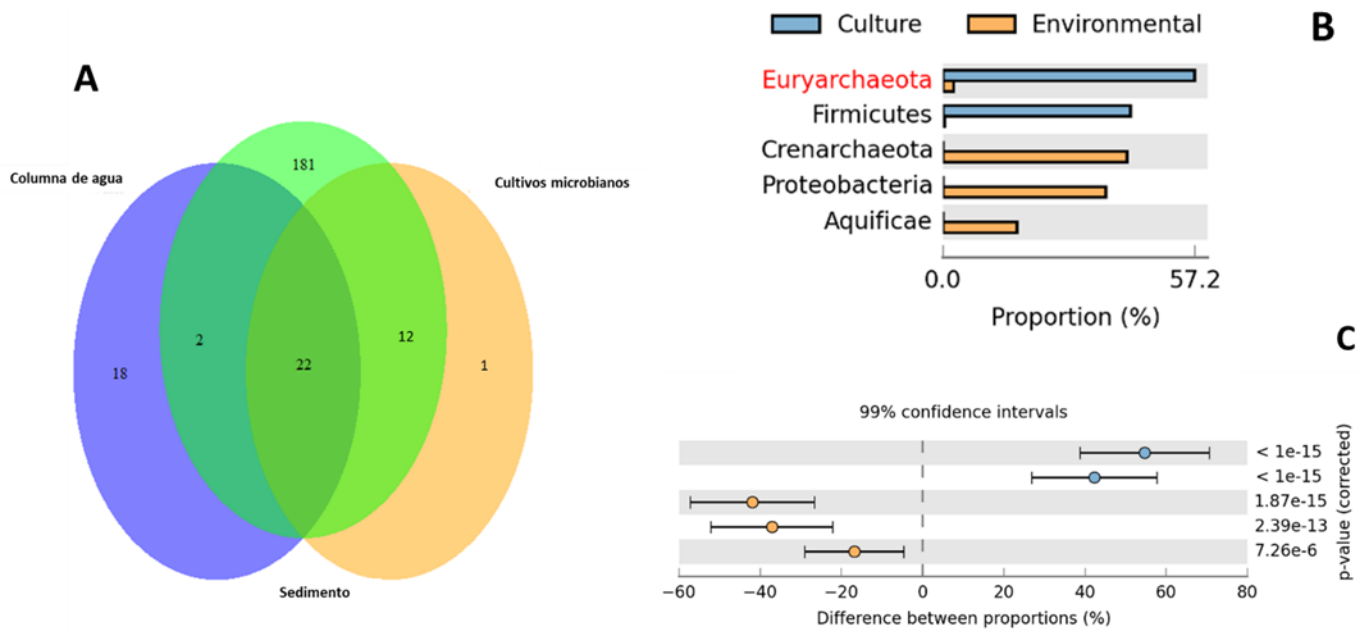
El análisis del metagenoma completo (shotgun) permitió identificar miembros de los tres dominios de la vida (Woese et al., 1977), esta información es un precedente de la rápida evolución que ha tenido este ambiente extremo desde su

última erupción en 1982, y la información contrastante con los estudios realizados pocos años después de este evento geológico en los cuales se reportó la ausencia de vida (Casadevall et al., 1984). A diferencia de estos reportes, en este estudio, se empleó un conjunto de metodologías con enfoque multi-ómico. Comenzando con estudio metagenómico hasta la caracterización en cultivos microbianos. En la figura 15 se muestran los Phyla dominantes en las muestras analizadas por metagenómica no dirigida, la cual, a diferencia del estudio del gen 16S rRNA permite la identificación simultanea de todos los dominios taxonómicos, en este caso, se identificaron bacterias, arqueas, virus, microalgas y hongos.



**Figura 15 Abundancia relativa de microorganismos presentes en muestras ambientales.** Nivel taxonómico: Phylum. Se identificó arqueas del phylum Crenarchaeota. Bacterias de los phylas Aquificae, Proteobacteria, Firmicutes, Actinobacteria Termotogae, e Ignavibacteria. Eucariotas del phylum Chlorophyta y Mucoromycota, así como, virus de los phyla Mimiviridae y Phitoviridae (virus asociados a microalgas y arqueas).

Al comparar esta diversidad microbiana ambiental con los cultivos establecidos en condiciones de laboratorio (Figura 16) se puede observar que no se logró cultivar la totalidad de la diversidad de las comunidades presentes en este ambiente; sin embargo, los phyla cultivados se emplearon como modelo de estudio para explicar la dinámica microbiana del ambiente natural extremo.



**Figura 16 Comparación diversidad taxonómica muestras ambientales y cultivos microbianos. A)** Diagrama de Venn de la diversidad taxonómica presente en muestras de columna de agua hipertermófila, sedimento mesófilos, y cultivos microbianos Lab-lake (Nivel taxonómico: Género). **B)** Composición de abundancia relativa presente en el ambiente natural y el cultivo microbiano (Nivel taxonómico: Phylum). **C)** Análisis estadístico de la diversidad microbiana presente entre muestras ambientales y cultivos microbianos Lab-Lake panel B (P= 0.01).

Empleando la teoría de conjuntos aplicada en el diagrama de Venn (Figura 16A) se observa que la columna de agua hipertermófila presentó 42 géneros, de los cuales 80% corresponden al dominio arquea y 20% dominio bacteria, mientras que en sedimento mesófilo se identificaron 189 géneros (70% bacterias, 10% arqueas,

3% microalgas y 1% virus), y en los cultivos microbianos de laboratorio fue posible identificar la presencia de 13 géneros microbianos (23% arqueas y 77% bacterias).

El cultivar y enriquecer fracciones de una comunidad microbiana es un fenómeno ampliamente reportado (Whenlan et al., 2020) y más cuando a microorganismos extremófilos se refiere, puesto que en muchos casos requieren la confluencia de condiciones ambientales y microorganismos con los que hacen simbiosis o mutualismo (Boutin et al., 2014).

Es de gran interés profundizar en el estudio de la diversidad microbiana en este ambiente, sin embargo, abordarlo presenta algunas características que lo vuelven particularmente complejo, por ejemplo, la incapacidad de detectar y clasificar a los microorganismos presentes, así como, la efectividad del esfuerzo de muestreo (Amaral-Zettler et al., 2011; Bouskill et al., 2012, Farías et al., 2013).

Al medir la biodiversidad alfa, se hace referencia a la diversidad de un sitio o muestra, esto se mide a través de la riqueza de especies. Para corregir el sesgo que existe debido al esfuerzo del muestreo se emplean diferentes índices de diversidad. El estimador Chao-1, permite evaluar la riqueza de especies, este método se basa en la abundancia de individuos poco representados pertenecientes a un grupo taxonómico en la muestra. Como se observa en el cuadro 7, el lago cratérico es un sistema con poca riqueza de especies, y la diversidad representada depende del tipo de muestra, esto puede estar relacionado también a la temperatura presente en cada microambiente. Es evidente que la riqueza microbiana es inversamente proporcional a la temperatura.

Cuadro 7 Índices de riqueza y diversidad de microorganismos presentes en el lago cratérico del volcán El Chichón

<b>Tipo de muestra</b>	<b>Chao-1</b>	<b>Shannon (H)</b>	<b>Simpson (1-D)</b>
<b>Sedimento</b>	61	1.41	0.6014
<b>Agua</b>	17	0.5782	0.3292

Para evaluar la dominancia de especies presentes en las muestras ambientales se empleó el índice de diversidad de Simpson (cuadro 6), el cual representa la probabilidad que dos individuos, que se encuentran en un ambiente pertenezcan a la misma especie (Simpson, 1949). Cuanto más cercano es este índice a la unidad existe una mayor probabilidad de que el sistema se encuentre dominado por una especie, y cuanto más cercano es a cero se intuye que la diversidad de ecosistema es mayor. El sedimento se encuentra dominado por microorganismos del phylum Thermotogae, mientras que la columna de agua no se encuentra dominada por una sola especie, pues la mayor abundancia relativa se distribuye entre los phyla Crenarchaeota y Aquificae (figura 15).

Por último, la biodiversidad específica representada por el índice de Shannon-Weaver (H), indica que ambas muestras son poco diversas, comparadas con sistemas ambientales no extremos, sin embargo, estos valores de diversidad son similares a los reportados en sitios extremos homólogos, tal es el caso de hot springs en el volcán Yellowstone (Bowen de León et al., 2013), en donde evalúan índice H en muestras colectadas en distintas temperaturas y observan el mismo fenómeno, la diversidad microbiana es mayor en los sitios moderadamente termófilos, y esta disminuye en los sitios hipertermófilos.

Como se muestra en la Figura 10, los phyla identificados en la columna de agua hipertermófila fueron arqueas Crenarchaeota y bacteria Aquificae, los cuales se encuentran representados por un solo género cada uno, *Candidatus Aramenus* e *Hydrogenobaculum*, respectivamente, ambos microorganismos son característicos de sitios termales y ricos en azufre. *C. Aramenus* es un género candidato que ha sido únicamente identificado en el sitio geotérmico Los azufres, Michoacán (Servin-Garcidueñas & Martínez-Romero (2014), tiene participación en el metabolismo del azufre, es termóacidófilo. Por otro lado, *Hydrogenobaculum* es una bacteria quimiolitotrofa, que ha sido identificada en pozas solfataras y ambientes volcánicos, se caracteriza por obtener ATP empleando H<sub>2</sub> como donador de electrones en presencia de una fuente de azufre reducido (Hedrich & Johnson, 2013).

Las muestras de sedimentos, presentan mayor diversidad microbiana ( $H=1.41$ ), encontrando presencia de los phylums bacterianos Proteobacteria representado mayoritariamente por *Acidithiobacillus* y *Desulfurella*, el primero, microorganismo comúnmente encontrados en ambientes ácidos tales como, Rio Tinto (Gonzalez-Toril et al., 2014; Abramov et al., 2020) volcán Copahue (Lopez-Bedogni et al., 2020) y Rio Agrío (Massello et al., 2020); en donde se encuentra realizando un papel crucial en la fijación de  $CO_2$ , y producción de  $H_2SO_4$ , además obtiene la energía de la oxidación de  $Fe^{+2}$  mediante “uphill potential gradient” (Johnson et al., 2008; Zhang et al., 2020). Por otro lado, *Desulfurella* se ha encontrado en residuos ácidos de minas (Sun et al., 2020), sedimentos de Rio Tinto (Florentino et al., 2016), entre otros ambientes termófilos y ácidos, en estos sitios ecológicos son de gran importancia debido a su papel en la desproporción del azufre, puede usar sulfuro o tiosulfato como aceptor de electrones, y como donador acetato, piruvato, propionato, entre otros, producto de la oxidación de estos sustratos se presenta  $CO_2 / H_2$ . Otro phylum identificado en estas muestras es Firmicutes, destacando la presencia de los géneros *Thermoanaerobacterium*, *Ruminococcus*, e *Ignavibacterium*. El taxón bacteriano dominante en esta muestra es *Thermotogae*, que se encuentra representado por *Athalassotoga*, anaerobio, heterotrófico, acidófilo y moderadamente termófilo, identificado en un hot-spring en Japón (Ithon et al., 2016); y en mayor abundancia *Mesoaciditoga*, este microorganismo también ha sido reportado en el sistema volcánico Copahue-Caviahue, Argentina (Willis et al., 2019).

Respecto a la diversidad de arqueas identificada, se destaca la presencia del phylum Euryarchaeota, representado por *Candidatus Methanofastidiosa*, y los Thermoplasmatales: *Ferroplasma*, *Thermoplasma*, *Cuniculiplasma* y *Acidiplasma*. El orden Thermoplasmatales ha sido identificado en otros sitios volcánicos, como el volcán Tenorio, Costa Rica. En donde su principal aporte metabólico es la oxidación de compuestos reducidos de azufre (por ejemplo, el  $H_2S$ ) a sulfato (Arce-Rodríguez et al., 2019).

También se logró identificar la presencia del phylum Chlorophyta compuesto por algas verdes, este phylum se encuentra dominado por *Trebouxiophyceae*, algunas microalgas pertenecientes a este grupo han sido identificadas en condiciones extremas, por ejemplo, *Endolithella mcmurdoensis* en los valles de McMurdo, desierto en Antártida (Martins et al., 2020).

Otro aspecto de gran relevancia, es el estudio de virus extremófilos. En este estudio fue posible la identificación de *Mimiviridae* y *Pithoviridae*; el primero, corresponde a una familia de virus de DNA bicatenario, el cual se encuentra asociado a protozoos, estos virus se destacan por su participación en teorías del origen de la vida (Forterre, 2006). Por otro lado, *Pithoviridae* es un virus de RNA monocatenario, el cual también juega un papel importante en la comprensión de la teoría evolutiva (Yong et al., 2014).

Además de la clasificación taxonómica, la información generada a partir del análisis metagenómico permitió identificar el potencial metabólico y funcional del microbioma del lago cratérico del volcán El Chichón, y con esta información se desarrollaron estrategias de cultivo microbiano y análisis metabólicos y cinéticos para evaluar la participación de los microorganismos en procesos biogeoquímicos claves tales como, el carbono y el azufre, así como, la descripción de algunos mecanismos de resistencia. Para comprender con mayor precisión estos procesos se desarrolló una etapa culturómica, la cual se denominó “Lab-Lake”.

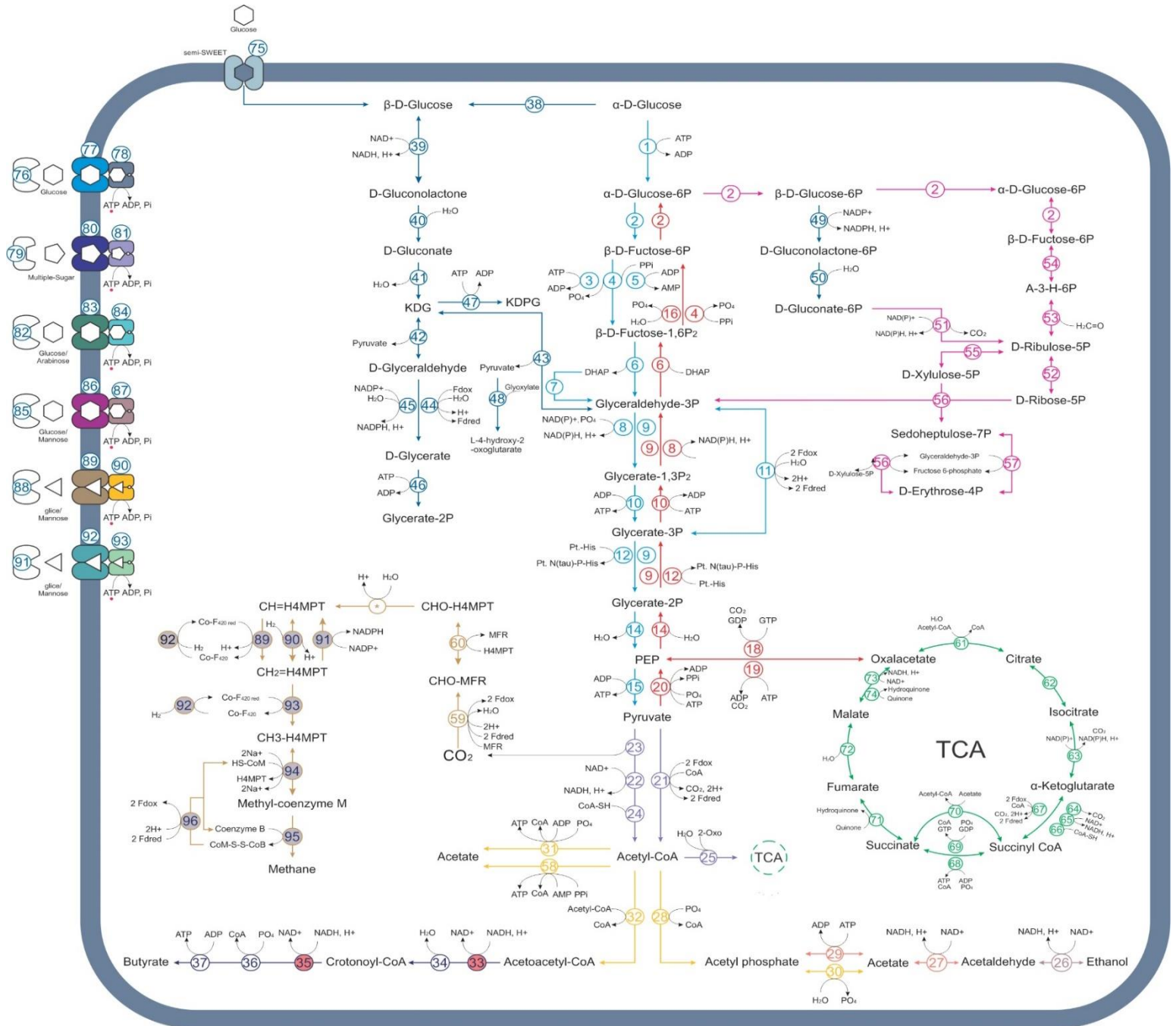
### **7.3.2 Ciclo del carbono**

Los microorganismos extremófilos son un grupo muy interesante, polifilético, y con gran versatilidad metabólica, por esto, conocer el metabolismo intermediario del carbono ayuda la comprensión del potencial y aplicación en procesos ecológicos y biotecnológicos.

#### **7.3.2.1 Potencial genómico**

Con base al potencial genómico recopilado del análisis metagenómico fue posible construir un mapa metabólico del ciclo del carbono (Figura 17). En el que se

propone un modelo para la adquisición y metabolismo intermediario del carbono en el ambiente natural extremo El Chichón.



**Figura 17 Mapa metabólico construido a partir de evidencia genómica recuperada de muestras mesófilas e hipertermófilas de ambiente natural.** En color celeste, vía glucólisis. En rosa, la vía Entner-Doudoroff. En rojo, la gluconeogénesis. En verde, el ciclo de los ácidos tricarbónicos (Krebs). En amarillo la acetogénesis. En morado y rosa la fermentación alcohólica y butírica. En naranja, la metanogénesis. Cada enzima se encuentra representado por un número, el cual se puede consultar en el anexo 6).



Como es evidente en la Figura 17, el microbioma del volcán El Chichón posee características genómicas que le permiten realizar la mayoría de las vías metabólicas descritas para la obtención de fuente de carbono. Es importante destacar la presencia de diversos transportadores, como el sistema semi-SWEET que permiten la internalización de azúcares y moléculas que pueden ser empleadas como fuentes de carbono por los microorganismos extremófilos.

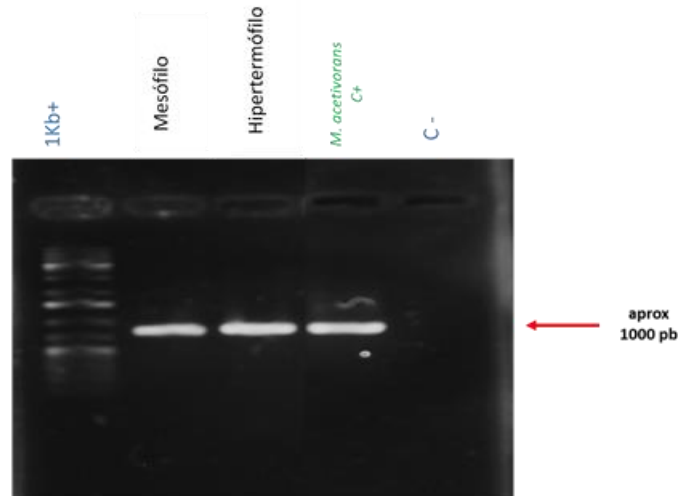
Pese a que muchos de los microorganismos identificados en este ambiente son de tipo quimiótrofos, se pudo identificar también la presencia de genes involucrados en el metabolismo de carbohidratos simples y complejos. Este tipo de versatilidad metabólica ha sido antes descrita en microorganismos extremófilos, tales como *Sulfolobus* (Fernández et al., 2007), *Thermotoga* (Rinquey et al., 2017), entre otros.

También es importante hacer énfasis en las vías metabólicas de la fijación de CO<sub>2</sub>, puesto que es uno de los procesos más abundantes en este ambiente extremo. Algunas vías identificadas son: la vía de Wood-Ljungdahl, el ciclo de los ácidos tricarbónicos inverso (reductor) y la metanogénesis. Este tipo de metabolismo ha sido reportado en ambientes homólogos al volcán El Chichón, tal es el caso del Parque Nacional de Yellowstone, en donde se ha reportado la presencia de arqueas de los phyla Euryarcheota y Crenarchaeota, las cuales se encuentran a elevadas temperaturas realizando procesos de metanogénesis e incluso se ha reportado la cooperación metabólica de estos microorganismos con bacterias para facilitar la obtención de CO y CO<sub>2</sub>, el cual emplean como donador de electrones y fuente de carbono (Zeikus et al., 1989).

### **7.3.2.2 Identificación molecular de la degradación de la materia orgánica**

La enzima metil-coenzima M reductasa, codificada por el gen *mcr*, es una enzima clave en el metabolismo del metano. Esta enzima se encuentra involucrada en la metanogénesis, última etapa en la degradación total de la materia orgánica, y en la metanotrófia, oxidación del metano a dióxido de carbono, el cual es el proceso

de reincorporación del carbono al sistema geológico (Boyd et al., 2019). Este gen ha sido empleado como marcador molecular para la identificación y asignación taxonómica de microorganismos. La amplificación por PCR de este gen a partir de muestras de cultivos microbianos mesófilos e hipertermófilos permitió identificar que existe potencial genético para llevar a cabo procesos de metanogénesis y metanotrófia, tal como se muestra en la Figura 18.



**Figura 18 Electroforesis gen *mcr*.** Agarosa 1%, carril 1. 1Kb+, carril 2. Cultivo mesófilo, carril 3. Cultivo hipertermófilo, carril 4. *Methanosarcina acetivorans* (control positivo).

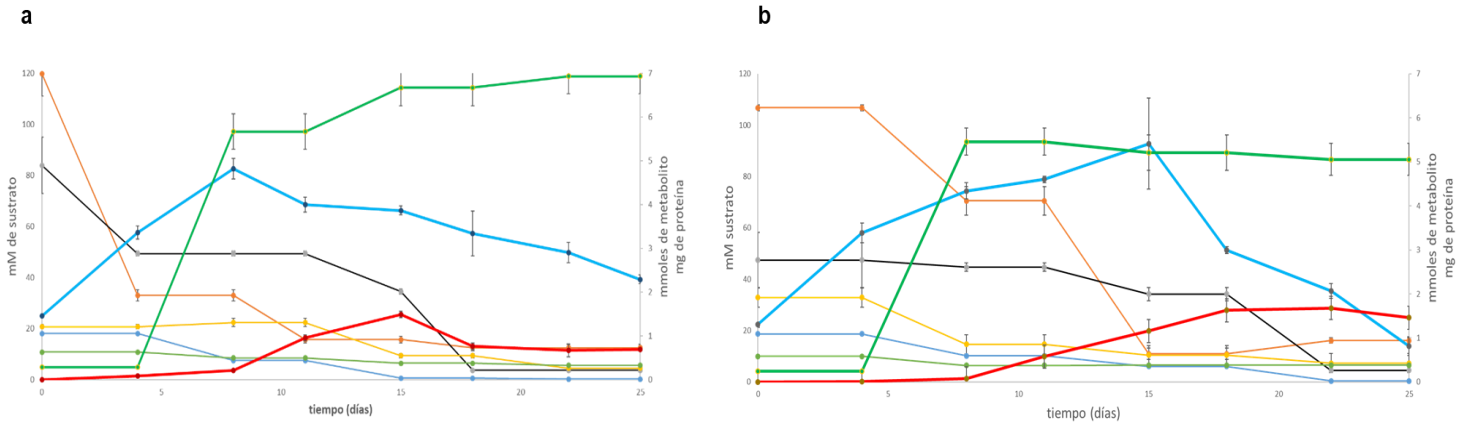
Identificado el potencial genético de los consorcios microbianos, se procedió a realizar la evaluación del metabolismo del carbono, desde el consumo de azúcares hasta el último paso para su degradación.

### 7.3.2.3 Determinación de flujos metabólicos en cultivos microbianos

Se emplearon los cultivos microbianos para analizar el metabolismo del carbono mediado por la actividad microbiana. Para ello, se evaluó el metabolismo intermediario, que es el flujo de una serie de vías metabólicas centrales, las cuales sirven para la síntesis de metabolitos importantes y producción de energía (Bräsen et al., 2014).

La dinámica de asimilación de fuentes de carbono en los medios de cultivo mostró que los microorganismos mesófilos consumieron 54% de los sustratos,

mientras que, el cultivo hipertermófilo consumió únicamente el 41% de estos sustratos (Cuadro 8), esto es congruente con lo observado en la formación de proteínas durante la cinética de crecimiento, en lo que se muestra que los microorganismos mesófilos lograron formar 6 mg de proteína total, mientras que, los hipertermófilos, únicamente fueron capaces de generar 2 mg (Figura 19).



**Figura 19 Dinámica del metabolismo intermediario en cultivos microbianos. a) Cultivos mesófilos, b) Cultivos hipertermófilos.** En el eje Y1 se muestra el consumo de las fuentes de carbono en concentración mM. En color azul, azúcares totales (glucosa y maltosa). En naranja, metanol. En negro, acetato de sodio. En amarillo, piruvato de sodio. En celeste, glicerol. En el eje Y2, se muestra la producción de metabolitos (en mmoles) y biomasa (mg de proteína total) microbiana. En turquesa, CO<sub>2</sub>. En rojo, CH<sub>4</sub>. En verde, proteína formada.

Como se observa en la Figura 18, los microorganismos mesófilos presentan mayor velocidad en el consumo de sustratos y producción de proteínas, sin embargo, los cultivos hipertermófilos muestran mayor actividad metanogénica. Anteriormente se describió que la diversidad taxonómica es similar en ambas muestras, la abundancia de *Methanobacterium* y *Methanothermobacter* es mayor en las muestras hipertermófilas (Figura 13), esto conlleva a una distinta actividad metabólica (Figura 14 y 18). Mochimaru et al. (2007) reportaron la capacidad de estas arqueas nos (*Methanobacterium* y *Methanothermobacter*) para producir metano en ambientes termófilos.

Además de la determinación de los flujos metabólicos, se realizó un balance de carbono (Cuadro 8), el cual confirmó que existe mayor consumo de sustratos y producción de biomasa (gramos de peso seco) en los cultivos mesófilos que, en los hipertermófilos; de la misma manera, se observa que, al extrapolar la cantidad de biomasa microbiana y la producción de gas metano de los cultivos hipertermófilos, la cantidad de gas metano producido es 76% mayor que los microorganismos mesófilos.

Cuadro 8 Balance de carbono de cultivos microbianos

	Inicial	Final mesófilos	Final hipertermófilos
Mezcla fuentes de carbono	<b>0.72</b>	<b>0.341</b>	<b>0.4115</b>
CO <sub>2</sub>	0.03	0.002	0.03
CH <sub>4</sub>	0.0016	<b>0.136</b>	<b>0.08</b>
Biomasa	0.0015	0.18	0.065
Total	<b>0.7531</b>	<b>0.659</b>	<b>0.5865</b>

\* Expresado en gramos

Estos resultados proporcionan evidencia basada en datos metabólicos la diferencia que existe entre los cultivos mesófilos e hipertermófilos, las cuales, se deben a la variación en la abundancia de los géneros microbianos presentes en las muestras y no a la diversidad. Además, permite hacer una inferencia de la dinámica metabólica que se lleva a cabo en este ambiente natural extremo.

### 7.3.3 Ciclo del azufre

El azufre, es uno de los elementos más abundantes en el volcán activo El Chichón, este elemento es de gran relevancia biogeoquímica y representa uno de los ciclos de mayor interés al estudiar sitios volcánicos. Por esto, se decidió estudiar la dinámica metabólica de este elemento en muestras ambientales y cultivos microbianos mesófilos e hipertermófilos.



que tienen la capacidad de realizar procesos de sulfato reducción en estas condiciones, por ejemplo: *Desulfurella*, *Thermodesulfobium*, *Desulfurococcus*, *Desulfosarcinacetonica* (Sánchez-Andrea et al., 2011; Brito et al., 2014; Inskip et al., 2015). En cuanto al volcán El Chichón existe presencia de *Desulfurella* bacteria sulfato reductora y *Candidatus Aramenus*, un arqueón oxidador de azufre (Figura 15).

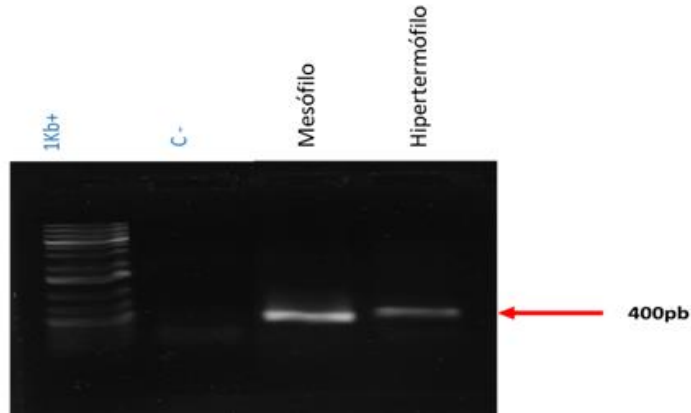
El proceso de sulfato reducción es un proceso de relevancia biogeoquímica asociado a los ambientes volcánicos, este metabolismo puede seguir dos vías: i) asimilatoria que es realizada principalmente para la síntesis de biomoléculas (Wang et al., 2000) y ii) no asimilatoria que es el proceso anaeróbico en el que se emplea el sulfato como aceptor terminal de electrones permitiendo la oxidación de compuestos orgánicos e inorgánicos, en este proceso se produce gran cantidad de sulfuro, el cual, es re-oxidado a sulfato por actividad microbiana (Rabus et al., 2015; Rückert, 2016). Estos procesos se encuentran distribuidos abundantemente en el microbioma del volcán El Chichón.

Diversos microorganismos extremófilos reductores de azufre contienen en su genoma un conjunto de genes involucrados en la reducción de sulfato: *sat*, *aprBA*, *dsrABCMK* (Rabus et al., 2015). Estos genes fueron identificados en el metagenoma de muestras ambientales mesófilas e hipertermófilas del volcán El Chichón.

### **7.3.3.2 Proceso metabólico de sulfato reducción no asimilatoria**

La enzima adenosin-5-fosfosulfato reductasa (APS), codificada por los genes *aprA* y *aprB*, es una enzima clave en el proceso de sulfato reducción no asimilatoria que cataliza la reacción de adenosin-fosfo-sulfato (APS) a sulfito (Rabus et al., 2015; Rückert, 2016). Este gen ha sido empleado como marcador molecular para la identificación y asignación taxonómica de microorganismos sulfato reductores, así como, oxidadores de azufre, ya que se ha descrito que también puede catalizar la reacción en sentido inverso en el proceso de oxidación desasimilatoria de azufre (Meyer & Kuever, 2007; Watanabe et al., 2013). La amplificación por PCR de este

gen a partir de muestras de cultivos microbianos mesófilos e hipertermófilos permitió identificar que existe potencial genético para llevar a cabo procesos de sulfato reducción y oxidación de azufre, tal como se muestra en la Figura 21.

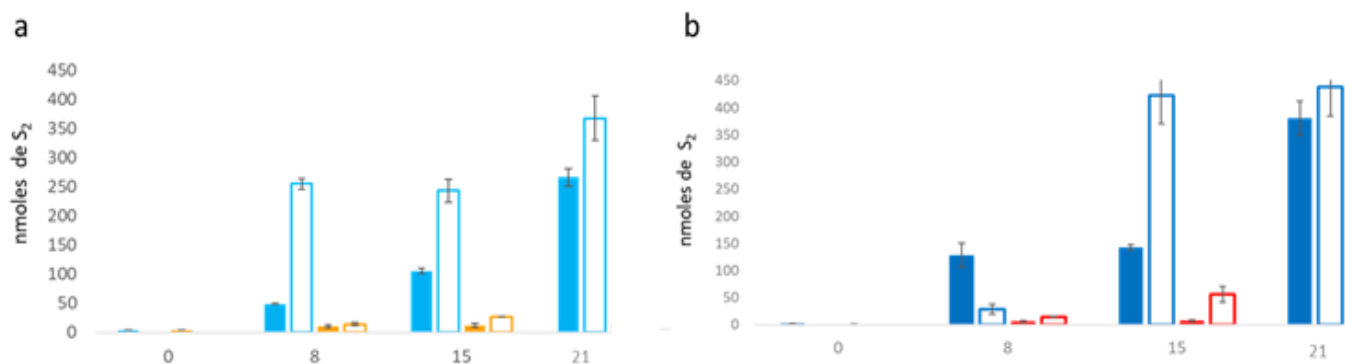


**Figura 21 . Electroforesis de amplificación del gen aprA.** Agarosa 1%, carril 1. 1Kb+, carril 2. Control negativo, carril 3. Cultivo mesófilo, carril 4. Cultivo hipertermófilo,

Una vez, identificado el potencial genético de los consorcios microbianos, se procedió a realizar la evaluación de la vía de la sulfato reducción no asimilatoria.

### 7.3.3.3 Flujo metabólico de la vía de reducción de sulfato no asimilatoria en cultivos microbianos

Se emplearon cultivos microbianos hipertermófilos y mesófilos para analizar el proceso de sulfato reducción por actividad microbiana. Para ello, se evaluó la producción de sulfuro intra y extracelular durante 21 días en una cinética de crecimiento a diferentes temperaturas (39 y 70 °C) (Figura 22).



**Figura 22 Dinámica de producción de sulfuro en cultivos microbianos. a)** Cultivos mesófilos. En celeste crecimiento a 39°C, en naranja crecimiento a 70°C, barras rellenas contenido intracelular, barras contorneadas contenido extracelular. **b)** Cultivos hipertermófilos. En azul crecimiento a 39°C, en rojo crecimiento a 70°C, barras rellenas contenido intracelular, barras contorneadas contenido extracelular.

Los consorcios microbianos tienen la capacidad de producir sulfuro desde de los primeros 8 días de crecimiento, el cual, incrementa en función al tiempo. A partir del día 15, los microorganismos mesófilos presentaron menor contenido de sulfuro. La temperatura también es un factor que influye en la actividad sulfato reductora, esto puede deberse a que a mayor temperatura existe menor actividad metabólica microbiana en todos los procesos evaluados (asimilación de fuentes de carbono, producción de gas metano y síntesis de proteínas) y la sulfato reducción no es la excepción. En todos los casos se determinó que los cultivos hipertermófilos mantenían mayor cantidad de sulfuro en formas intra y extracelular.

Estos resultados muestran la diferencia que existe entre los cultivos mesófilos e hipertermófilos, las cuales, se deben a la variación en la abundancia de los géneros microbianos presentes en las muestras, en particular a la bacteria *Ruminococcus*, un clostridial sulfato reductor, del cual se conoce su participación en la producción de sulfuro en hospederos, principalmente rumiantes y humanos, sin embargo, y en muy pocos casos se ha descrito su actividad metabólica en ambientes naturales en donde se encuentra sin asociación a un hospedero (Kushkevych et al., 2020; Sato et al., 2019).



### 7.3.3.4 Actividad de la enzima sulfito reductasa

Se determinó la velocidad de acción de la enzima sulfito reductasa, la cual tiene la capacidad de reducir sulfito a sulfuro sin la formación de intermediarios metabólicos. Corresponde a la catálisis del último paso en el proceso de sulfato reducción no asimilatoria (Kushkevych et al., 2020). En el cuadro 9 se observa las actividades enzimáticas determinadas en los extractos citosólicos y membranales enriquecidos obtenidos a partir de cultivos mesófilos e hipertermófilos.

Cuadro 9 Actividad enzimática de sulfito reductasa

Actividad en	Microorganismos mesófilos (nmoles de H <sub>2</sub> S/min mg de proteína)	Microorganismos hipertermófilos (nmoles de H <sub>2</sub> S/min mg de proteína)
Citosol	22± 0.3	27± 1.5
Membrana	101± 6	187± 7.2

\*Los resultados están basados en las medias de n=3

La enzima sulfito reductasa puede encontrarse en el citosol o en las membranas celulares, esto dependiendo del microorganismo en cuestión (BRENDA database, 2020), por lo que, la determinación de la actividad enzimática se realizó en ambas fracciones celulares. Se observa que la mayor actividad enzimática se presentó en los extractos de enriquecimiento de membranas para ambos cultivos, sin embargo, la actividad catalítica fue mayor en los consorcios hipertermófilos en donde la tasa aumento 80 %, en comparación con los consorcios mesófilos. Kushkevych et al. (2020) determinaron la actividad máxima de esta enzima en organismos modelo como *Desulfovibrio* documentando una actividad de 230 – 516 nmoles / min mg de proteína, así mismo, se ha documentado que en microorganismos volcánicos la actividad de esta enzima puede llegar a ser hasta 2 µmoles / min mg de proteína (Duarte et al., 2018). La actividad identificada en los cultivos microbianos fue realizada en condiciones nativas / fisiológicas (sin adición

de co-sustratos enzimáticos), a diferencia de los valores reportados por los autores antes mencionados, por esta razón es posible exista una sub-estimación de esta actividad enzimática.

### 7.3.3.5 Actividad de la vía sulfato reducción no asimilatoria

Los microorganismos anaerobios reductores de sulfato tienen la capacidad de usar el sulfato como aceptor de electrones para el metabolismo energético. A pesar de su importancia global, aún no está claro cómo los microorganismos pueden conservar energía a partir de la reducción de sulfato.

Se analizó el flujo de la vía metabólica de reducción de sulfato en los consorcios microbianos mesófilos e hipertermófilos en sus fracciones citosólicas y membranales. En el cuadro 10 se muestra la actividad de la vía metabólica determinada con y sin adición de co-sustratos enzimáticos, para identificar los flujos metabólicos óptimos.

Cuadro 10 Actividad enzimática de la vía de reducción de sulfato NO asimilatoria

Actividad en	Microorganismos mesófilos	Microorganismos hipertermófilos
	nmoles de H <sub>2</sub> S/min mg de proteína	nmoles de H <sub>2</sub> S/min mg de proteína
Fracción citosólica enriquecida (ATP + GSH + NADPH)	20 ± 1.8	400 ± 32
Fracción membranal enriquecida (ATP + GSH + NADPH)	164 ± 32	890 ± 30
Fracción citosólica enriquecida (-ATP - GSH - NADPH)	10 ± 1	<1
Fracción membranal enriquecida (-ATP - GSH - NADPH)	144 ± 14	<1

\*Los resultados están basados en las medias de n=3

Los resultados mostraron que existe mayor actividad metabólica en la vía cuando los sustratos enzimáticos son adicionados, debido a que se encuentran en cantidad suficiente para no ser un factor limitante en la reacción, sin embargo, en el extracto membranal enriquecido de los consorcios mesófilos no existió diferencia estadística significativa con la suplementación de sustratos (Cuadro 10). Los resultados sugieren que la mayor actividad de la vía sulfato reducción no asimilatoria en los consorcios microbianos del volcán El Chichón se encuentra en la fracción membranal, para el caso de los consorcios mesófilos existe 8.2 veces más que en la fracción citosólica. Similar a lo determinado en los cultivos hipertermófilos en donde existe 2.2 veces más actividad en las membranas que en el citosol, lo cual indica que los consorcios hipertermófilos emplean la vía no asimilatoria para la reducción de sulfato como un mecanismo de obtención de energía.

Es necesario considerar que, energéticamente, el sulfato es un pobre aceptor de electrones para los microorganismos ya que el par redox sulfato-sulfito es  $E^0$  - 516 mV, que es demasiado negativo para permitir la reducción por NADH o ferredoxina, que son los principales mediadores electrónicos intracelulares. Para superar este problema, el sulfato se convierte primero en APS mediante la enzima ATP sulfurilasa (Sat), a costa de una sola molécula de ATP. El par redox APS-sulfito tiene un  $E^0$  de -60 mV, lo que permite que el APS sea reducido por NADH o ferredoxina reducida utilizando la enzima adenilil-sulfato reductasa (Apr), que requiere la entrada de 2 electrones. En el paso final, el sulfito es reducido por la sulfato reductasa disimilatoria (Dsr) para formar sulfuro, requiriendo la entrada de 6 electrones. Sin embargo, recientemente se ha demostrado que la conservación de la energía mediante los procesos de sulfato reducción se deben a la transferencia de protones del citocromo c3 al grupo de menaquinona, a través del complejo Qrc (Figura 4). Además, se ha informado la presencia de este sistema respiratorio en la membrana procariota (Duarte et al., 2018).

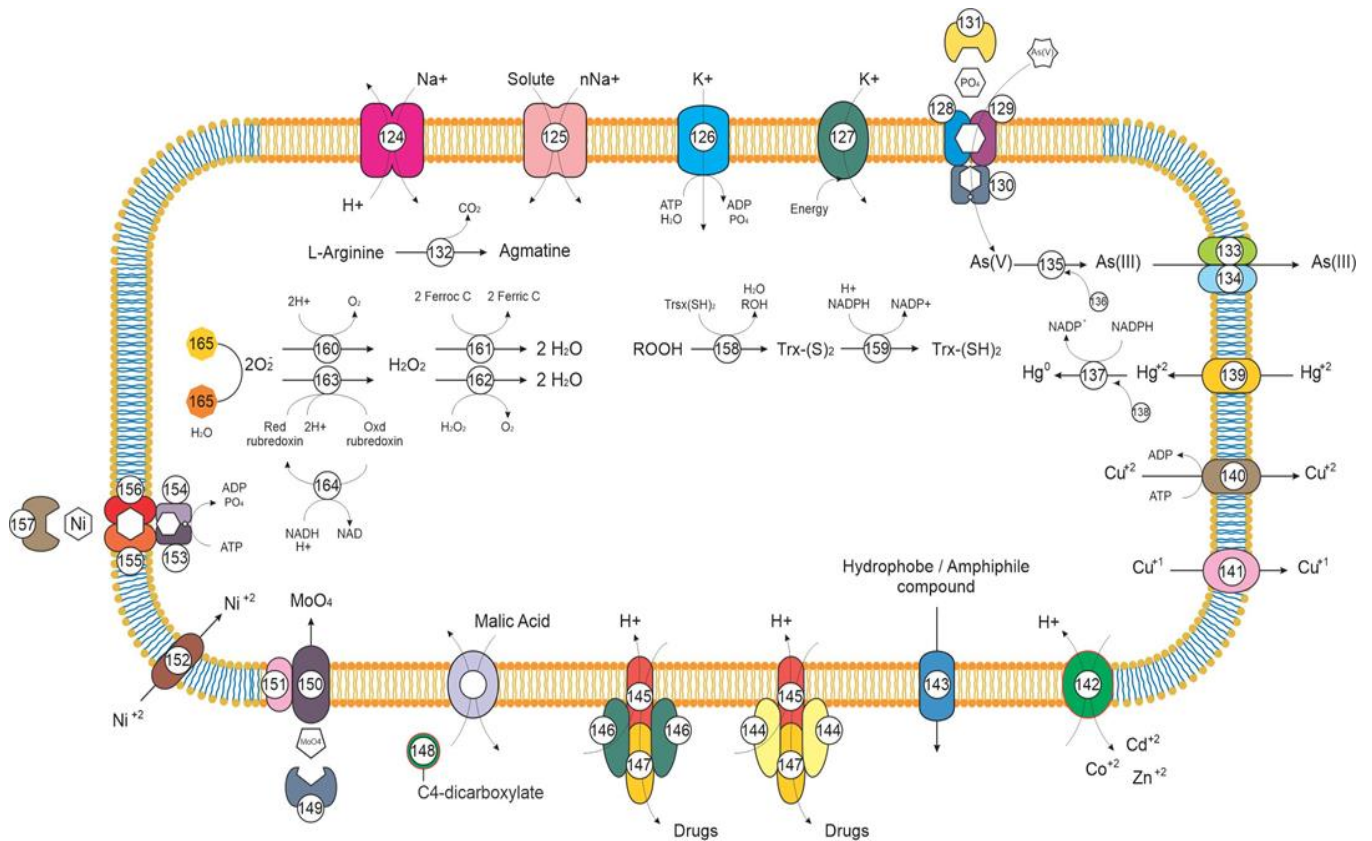
De la misma forma que lo antes descrito para la enzima sulfito reductasa (Cuadro 9) y la producción de sulfuro en las dinámicas de crecimiento microbiano (Figura 21), existe mayor actividad sulfato reductora en los consorcios hipertermófilos. Esto es una marcada diferencia en el metabolismo de los consorcios estudiados.

#### **7.3.4 Identificación de mecanismos de resistencia**

La vida en la tierra está limitada por factores físicos y químicos que definen el "espacio habitable", mucho se ha estudiado sobre los límites de la vida, sin embargo, los mecanismos que regulan la respuesta a diversos tipos de estrés y a condiciones poli-extremófilas en el microbioma del volcán El Chichón no han sido estudiados, por esto, en este estudio se evaluaron diferentes de los mecanismos más reportados en microorganismos (Harrison et al., 2013; Filippidou et al., 2019; Jasso-Chávez et al., 2019).

#### **7.3.5 Potencial genómico**

Con base en el análisis metagenómico de muestras ambientales, se construyó un esquema integrativo de los principales mecanismos empleados por microorganismos para hacer frente a condiciones extremas en particular a acidez, metales pesados, estrés oxidante y temperatura (Figura 22).



**Figura 23 Descripción general del potencial genómico para la respuesta a condiciones poli-extremas en microorganismos del volcán El Chichón.**

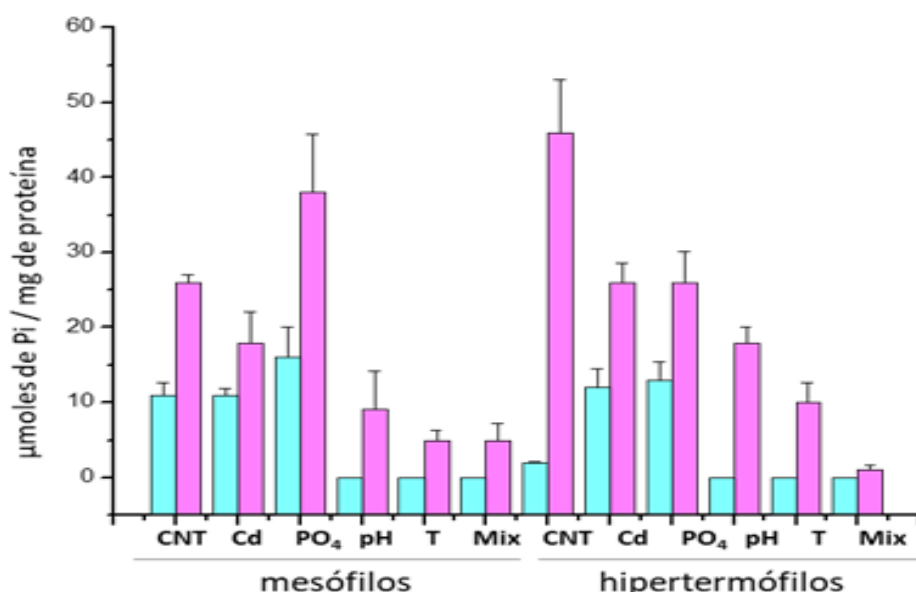
Las características genómicas del volcán El Chichón involucran procesos como extrusión por facilitadores de difusión de cationes o bombas dependientes de ATP específicas a metales pesados; unión externa por sustancias poliméricas extracelulares; biotransformación / inactivación por reducción química; e inactivación intracelular por agentes quelantes (Spada et al., 2002; Alvarez y Jerez, 2004; Baker-Austin et al., 2005; Harris et al., 2005; Remonsellez et al., 2006; Focardi et al., 2012; Mangold et al., 2013; Das et al., 2014; Singh et al., 2015), acoplamiento con moléculas que contienen grupos tiol (Lira-Silva et al., 2012), así como, la síntesis y degradación de polifosfatos (Jasso-Chávez et al., 2019). Y la formación de biopelícula (Jasso-Chávez et al., 2015) y la expresión de complejos proteicos en respuesta a estrés por temperatura, como las familias de proteínas de choque térmico (Trent, 1996).

Estos mecanismos han sido identificados en bacterias y arqueas extremófilas pertenecientes a los phyla Firmicutes (Ventura et al., 2007), Euryarchaeota (Lira-Silva et al., 2012; Lira-Silva et al., 2013; Jasso-Chávez et al., 2015; 2019 2019) Crenarchaeota (Baes et al., 2020), Thermotogae, entre otros, confirmando mediante el análisis de los metagenomas su presencia en el lago cratérico del volcán El Chichón, y en los cultivos microbianos Lab-lake.

Por otro lado, se determinó la participación de los polifosfatos, moléculas con grupos tiol y la formación de biopelícula en el metabolismo de los cultivos microbianos expuestos por 12 horas a diferentes insultos, tales como, adición de 100  $\mu\text{M}$  de  $\text{Cd}^{2+}$ , acidificación del medio de cultivo a pH 3, incubación a 70°C, y la mezcla de estos factores, con la finalidad de evaluar los mecanismos que siguen estos microorganismos en respuesta a las condiciones poli-extremas del volcán El Chichón.

### 7.3.5.1 Efecto del papel de las polifosfatos en respuesta a estrés

El contenido de fosfatos y polifosfatos (polyP) en los cultivos microbianos hipertermófilos y mesófilos se muestran en la Figura 23.



**Figura 24 Contenido de fosfatos y polifosfatos intracelular en cultivos microbianos mesófilos e hipertermófilos.** En turquesa contenido de fosfato, en rosa contenido de polyP. los valores mostrados son el promedio  $\pm$  SD de 3 experimentos. CNT: tratamiento control; Cd: tratamiento expuesto a 100 μM de CdCl<sub>2</sub>; PO<sub>4</sub>: tratamiento suplementado con 5 mM de K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>; pH: tratamiento con exposición a pH 3; T: tratamiento expuesto a 70°C; Mix: tratamiento combinación 100 μM CdCl<sub>2</sub>, pH 3 y 70°C.

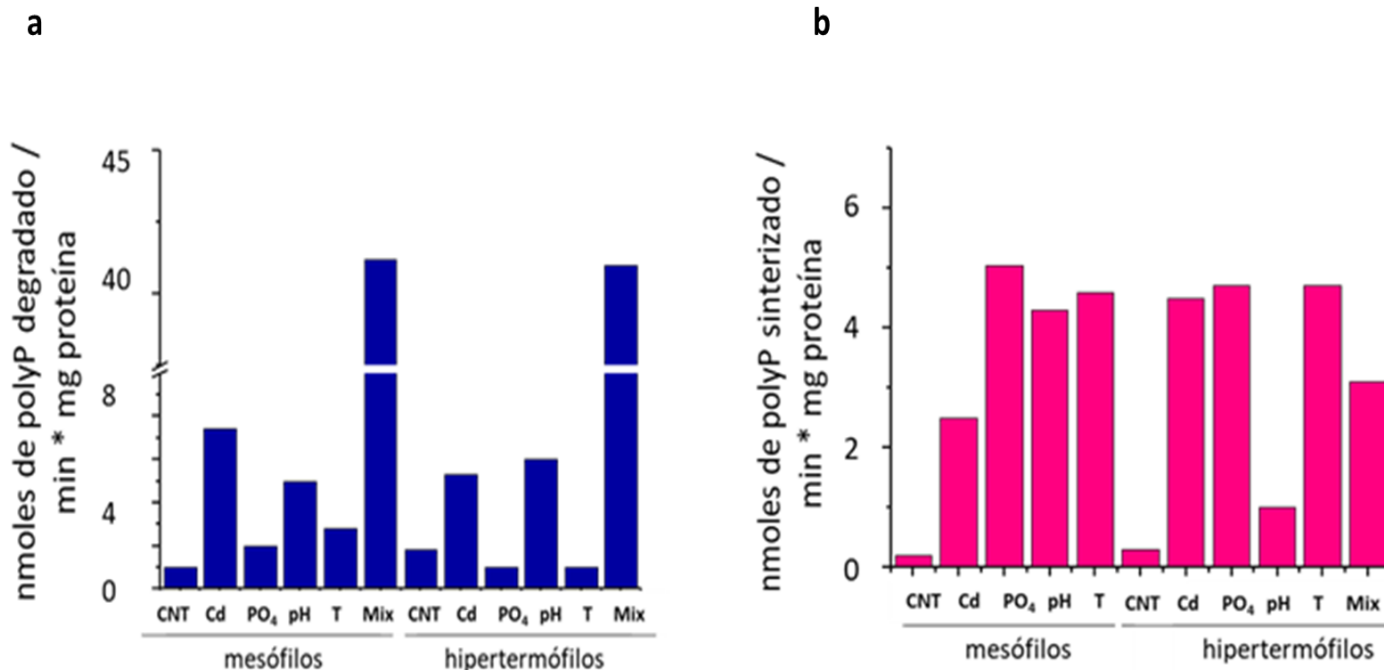
El contenido de fosfato libre en las células control y suplementadas con fosfato es significativamente mayor que el presente en los tratamientos expuestos a insultos por metal pH, temperatura y la mezcla de estos factores (Mix), siendo el tratamiento de pH, T y mix los que menor contenido de fosfato libre y polyP presentaron. Recientemente se ha reportado que en arqueas expuestas a Cd<sup>2+</sup> por largos periodos de tiempo se induce el mecanismo de síntesis de polyP (Jasso-Chávez et al., 2019), sin embargo, en la Figura 23 se observa que en el tratamiento expuesto a 100 μM de CdCl<sub>2</sub> el contenido de Pi y polyP disminuyó; esto puede deberse a que el tiempo de exposición fue tan solo 12 horas, contrario a los reportado por Jasso-Chávez et al. (2019). La exposición aguda a tiempos cortos

puede explicar el uso del polyP y Pi presentes en las células (composición basal o fisiológica) como mecanismo de quelación para acomplejar el metal y disminuir su toxicidad. 100  $\mu\text{M}$  de  $\text{CdCl}_2$  corresponde a 5.93  $\mu\text{moles}$  de  $\text{Cd}^{2+}$ , el cambio en la concentración de  $\text{PO}_4^{2-}$  y polyP puede ser suficiente para inactivar el  $\text{Cd}^{2+}$  presente, considerando que debe haber una relación de dos cargas negativas ( $\text{PO}_4^{2-}$ ) por un ion de  $\text{Cd}^{2+}$ .

Respecto al cambio en la concentración de  $\text{PO}_4^{2-}$  y polyP en el resto de los insultos, se puede explicar debido a que se ha sugerido que el polyP representa un papel importante en la regulación de diversos procesos metabólicos, debido a que su hidrólisis puede proveer Pi para la producción de ATP (Brown et al., 2008) y con ello satisfacer los requerimientos energéticos que demandan algunos mecanismos de respuesta a estrés como: transportadores y antiportadores para contrarrestar la acidez (Prabhakaran et al., 2016), síntesis de chaperonas y familias de proteínas de choque térmico para menguar el estrés por temperatura (Matarredona et al., 2020), así como, la expulsión, metilación, transporte activo de iones metálicos (Prabhakaran et al., 2016) y actividad catalítica de enzimas involucradas en la síntesis y degradación de polyP (Jasso-Chávez et al., 2019).

Debido a la importancia en la participación de los polyP en la respuesta a diversos tipos de estrés, se determinó la actividad enzimática de exopolifosfatasa (Figura 24a) y polifosfato cinasa (Figura 24b), en los extractos celulares sujetos a los insultos.





**Figura 25 Actividad enzimática de la síntesis y degradación de polifosfatos.** a) Actividad de la enzima exopolifosfatasa, b) Actividad enzimática de polifosfato cinasa.

La enzima exopolifosfatasa (PPK) participa en la degradación de polyP a Pi, en las células control y con PO<sub>4</sub><sup>2-</sup> añadido la actividad se encontró entre 1 y 2 nmoles de Pi liberado / min \* mg proteína para los dos tipos de cultivo (hipertermófilos y mesófilos), mientras que, en el caso de los tratamientos con Cd<sup>2+</sup> y pH se presentó un incremento en la actividad entre 6 y 8 nmoles de Pi / min \* mg proteína, que representa un incremento entre 3 y 4 veces la actividad. La temperatura influyó en la actividad de la PPK únicamente en los consorcios mesófilos, en los que se determinó el doble de la actividad, respecto a su control. Por último, la mezcla de los factores estresantes influyó dramáticamente (20-40 veces) la inducción de la actividad de la enzimática, esto puede deberse a que, es la degradación de polyP a Pi, es un mecanismo empleado por los microorganismos para satisfacer la síntesis de ATP necesario para llevar a cabo diferentes mecanismos en la respuesta a los insultos analizados.

Por otro lado, la enzima polifosfato cinasa (PPK) es la responsable de la síntesis de polyP, este proceso es dependiente de la concentración de ATP y Pi disponible. Las células control no presentaron actividad (<1), la adición de Pi a los

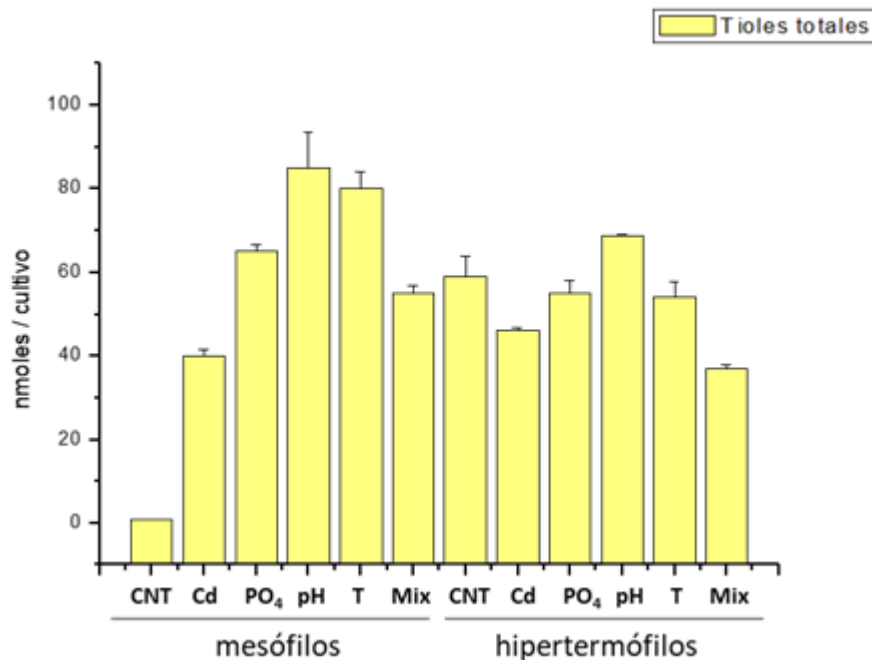
cultivos indujo fuertemente la activación de la PPK (5 nmoles / min\*mg proteína), esto se debe a la gran cantidad de Pi disponible se comienza a sintetizar polyP como mecanismo de reserva energética, el resto de los tratamientos presentó diferencias entre el tipo de muestra, puesto que, los microorganismos mesófilos manifestaron una actividad de PPK en respuesta a Cd<sup>2+</sup> de 2 nmoles / min \* mg proteína y en respuesta a pH y T la actividad fue el doble. Para el caso de los microorganismos hipertermófilos, la inducción en la actividad fue de 4 nmoles / min \* mg proteína en respuesta a Cd<sup>2+</sup> y T, mientras que, para los tratamientos de pH y mezcla de factores estresantes fue de 1 y 3 nmoles / min \*mg proteína, respectivamente. La actividad de la PPK fue muy baja en todos los tratamientos, comparada con la expresada por la enzima PPX, pese a que, en organismos modelo como *E. coli*, estas enzimas se encuentran codificadas en el mismo operón (Akimaya et al., 1993). Esto podría hacer pensar que deberían tener el mismo nivel de expresión transcripcional y actividad, sin embargo, se ha demostrado que la enzima PPK está sujeta a regulación postraduccional por mecanismos covalentes y también, a nivel metabólico por subproductos de inhibición (Jasso-Chávez et al., 2019), por esto, esta enzima se encuentra más regulada, además al depender de gasto energético (ATP) su actividad, aunque baja, resulta ser significativa para promover la síntesis de polyP como mecanismo de respuesta a estrés en los cultivos microbianos del volcán El Chichón.

#### **7.3.5.2 Efecto de moléculas con grupo tiol en respuesta a estrés**

Las moléculas con grupos tiol, tales como, cisteína, sulfuro, coenzima M, coenzima A, entre otras (Malaki et al., 2009; Harris et al., 2005; Ferry y Lessner et al., 2008), contienen en su estructura un grupo sulfhidrilo (-SH), esto les permite tener la capacidad de participar como mecanismo de inactivación de iones metálicos, además de participar activamente en el metabolismo antioxidante y también participan como cofactores enzimáticos (Rawat y Maupin-Furrow, 2020)

Se cuantificó el contenido tioles reducidos intracelular, el cuál incrementó significativamente en los cultivos mesófilos expuestos a todos los insultos evaluados, respecto al control, lo que indicó que estas moléculas tienen un papel

importante, no solo en la inactivación de metales intracelular, también en respuesta al estrés oxidante producido por el cambio de pH, T y el conjunto de los insultos. (Figura 25).



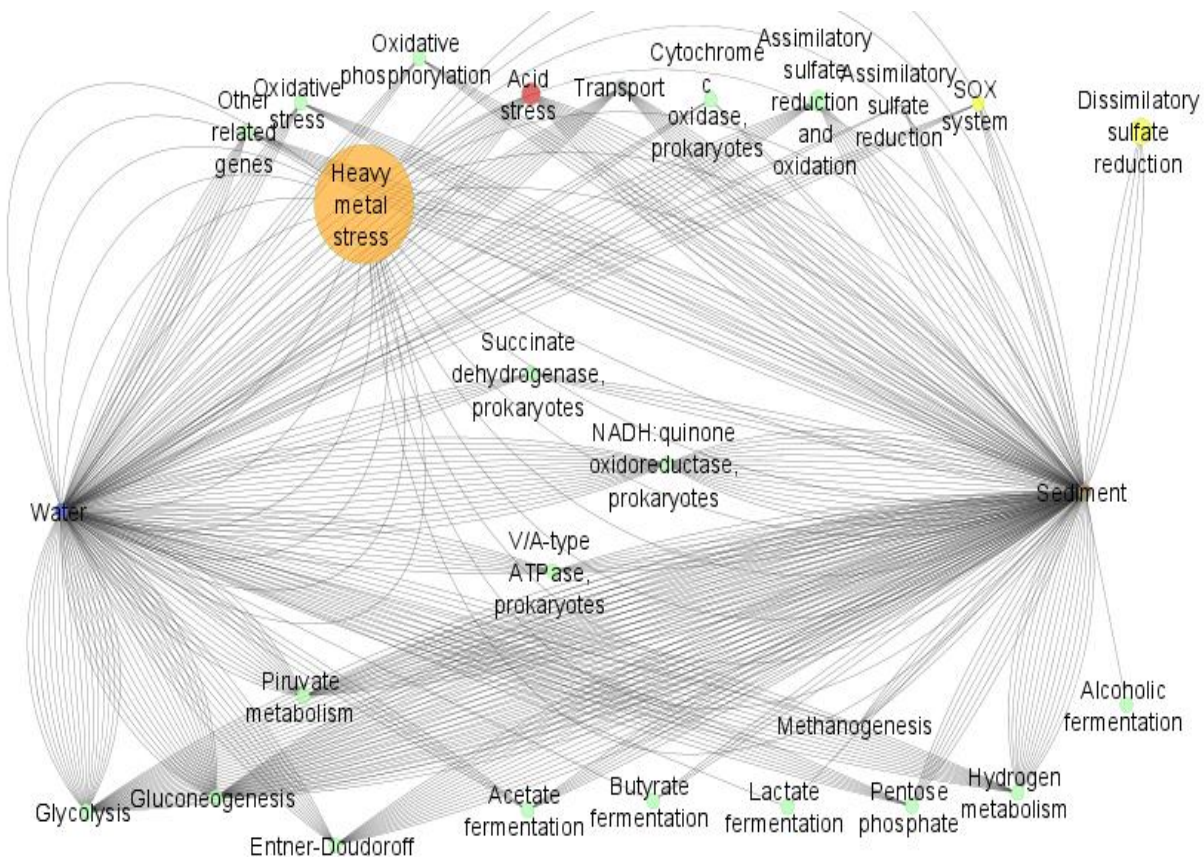
**Figura 26 Contenido tioles totales intracelular en cultivos microbianos mesófilos y hipertermófilos.** CNT: tratamiento control; Cd: tratamiento expuesto a 100µM de CdCl<sub>2</sub>; PO<sub>4</sub>: tratamiento suplementado con 5mM de K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>; pH: tratamiento con exposición a pH 3; T: tratamiento expuesto a 70°C; Mix: tratamiento combinación 100µM CdCl<sub>2</sub>, pH 3 y 70°C.

Respecto al contenido de tioles presente en los cultivos hipertermófilos, no se identificó marcada diferencia entre los tratamientos evaluados, incluido el control, esto es de gran interés, pues, existen pocos reportes sobre la presencia de moléculas con grupo tiol en microorganismos del dominio arquea. La diversidad taxonómica presente en los cultivos hipertermófilos muestra que se encuentra fuertemente dominada por metanogénicos de los géneros *Methanobacterium* y *Methanothermobacter* (Figura 16). Lira-Silva et al. (2013) han reportado la presencia de moléculas con grupo tiol en el arqueon *Methanosarcina acetivorans*, y recientemente Rawat y Maupin-Furlow (2020) informaron la presencia de coenzima

A en arqueas hipertermófilas, además, sugieren fuertemente la presencia de nuevas moléculas con grupos tiol que aún no han sido descritas, debido al poco conocimiento en el dominio arquea, las moléculas con grupos tiol pueden aportar conocimiento de mecanismos de adaptación a ambientes extremos, estos reportes explican la presencia de forma constitutiva de moléculas con grupos tioles en las muestras hipertermófilas.

## 7.4 Descripción de modelo de red

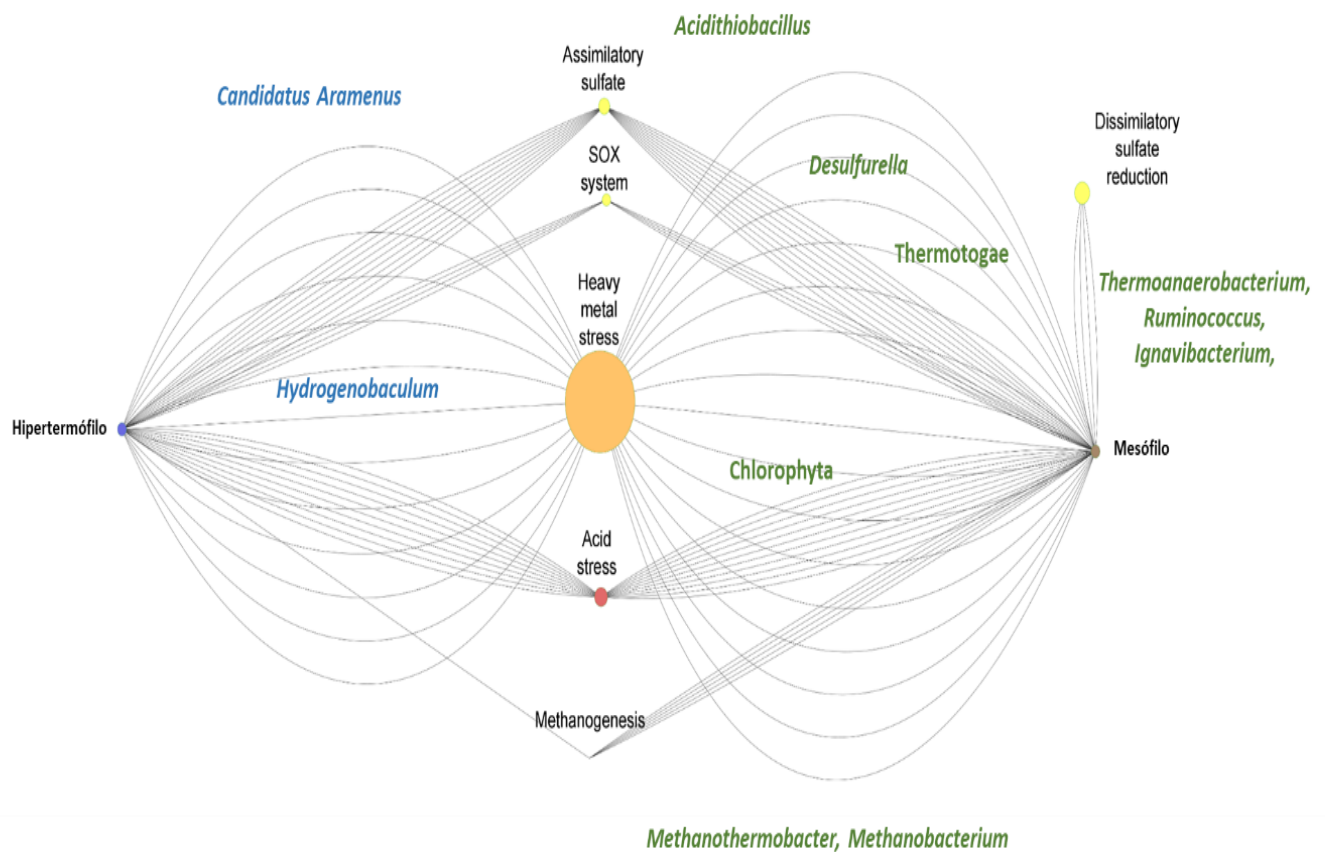
Se realizó una red metabólica comparativa de muestras ambientales de sedimentos mesófilos y columna de agua hipertermófila (Figura 26). La topología de esta red permitió visualizar las interacciones que existen en el metabolismo del carbono, azufre y mecanismos de respuesta a estrés en todos los microorganismos identificados en el ambiente natural.



**Figura 27 Red de interacción metabólica del carbono, azufre y mecanismos de respuesta a estrés en el microbioma del lago cratérico del volcán El Chichón.** El nodo azul, procesos metabólicos identificados en columna de agua hipertermófila. Nodo café, procesos metabólicos identificados en muestras de sedimento mesófilo. En verde, metabolismo del carbono. En amarillo, metabolismo del azufre. En naranja y rojo, mecanismos de respuesta a estrés. Los procesos unidos por líneas corresponden a metabolismos compartidos entre los microbiomas, y la cantidad de líneas es proporcional a la cantidad de genes involucrados en el proceso o vía metabólica. El tamaño de cada nodo es proporcional a la abundancia del proceso metabólico.

A pesar de las características poli-extremófilas del volcán, los microorganismos poseen la maquinaria genética para ser metabólicamente versátiles en la asimilación de carbono y mecanismos de tolerancia a condiciones hostiles. Esta capacidad metabólica ya ha sido descrita en microorganismos extremófilos (Sorokin et al., 2006).

Este amplio potencial para desarrollar procesos metabólicos se agrupó de acuerdo a su función, así mismo, se consideró la taxonomía del microbioma y se analizaron en una red metabólica con topología más compacta (Figura 27).

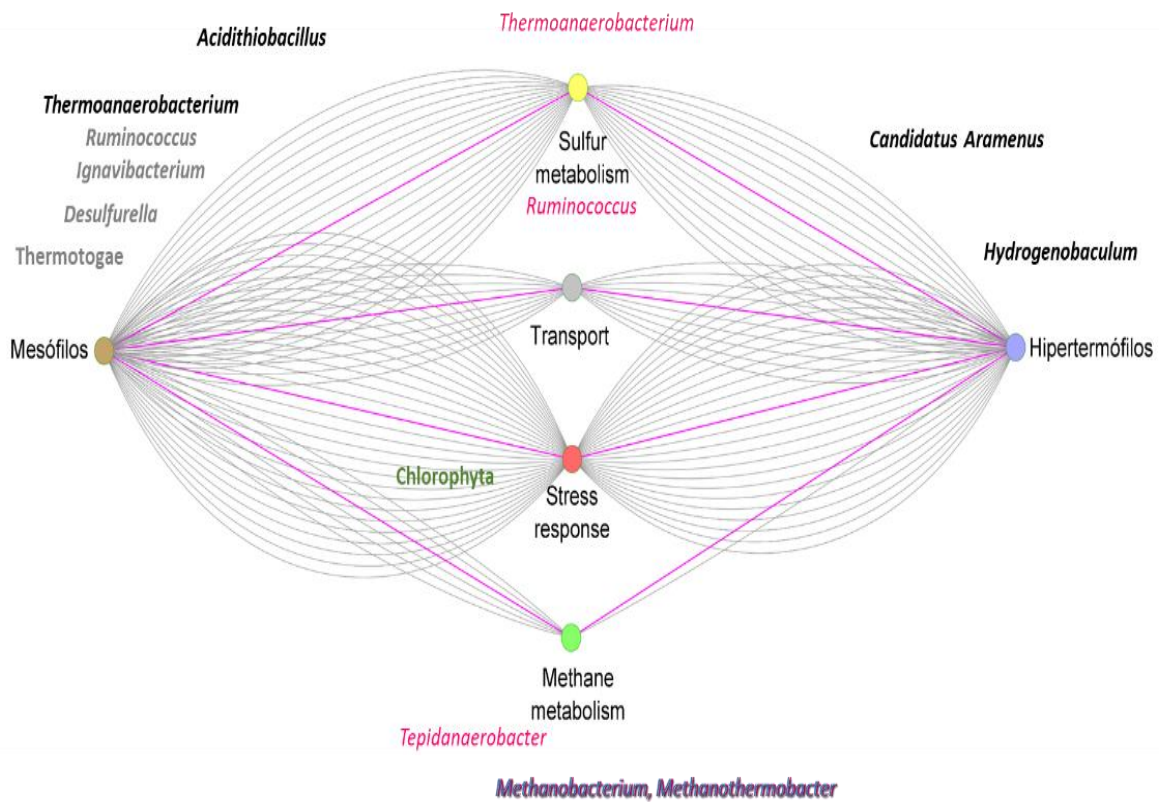


**Figura 28 . Red metabólica y taxonómica dirigida del microbioma del volcán El Chichón.** El nodo azul y café corresponden al tipo de muestra hipertermófila y mesófila (respectivamente). Los objetivos son los procesos metabólicos identificados y su tamaño es proporcional a la abundancia de KOs. Los microorganismos anotados en color azul corresponden a la muestra de columna de agua hipertermófila y los anotados en verde corresponden a la taxonomía presentes en sedimentos mesófilos.

La integración de la taxonomía ambiental con la capacidad genómica para realizar procesos metabólicos de obtención de fuentes de carbono, asimilación de azufre, así como, tolerancia a estrés ambiental (Figura 27), describe que el tipo de muestra y temperatura son un factor determinante en la diversidad microbiana, esto puede explicar por qué las muestras mesófilas de sedimento tienen el potencial genómico para desarrollar más procesos metabólicos que la muestra hipertermófila de columna de agua, que se encuentra dominada únicamente por dos géneros microbianos.

Para evaluar si los resultados obtenidos de los cultivos microbianos pueden ser extrapolados al ambiente natural se realizó la secuenciación de regiones del gen 16S rRNA de los consorcios Lab-lake, y la predicción de la funcionalidad microbiana. De la información generada por el software PICRUSt. Se logró evidenciar que la una fracción considerable de los procesos predichos por el software bioinformático es congruente con los resultados obtenidos del ensamble y análisis de las muestras ambientales.

En la Figura 28 se muestran los predichos para las vías metabólicas analizadas en los cultivos Lab-lake.



**Figura 29 Red metabólica comparativa del metabolismo en el ambiente natural extremo El Chichón y los cultivos microbianos Lab-lake.** Nodos café y azul corresponden a la característica térmica de la muestra (café, mesófila; azul, hipertermófila). Nodo amarillo, metabolismo del azufre, Nodo gris, sistema de transporte. Nodo rosa, mecanismos de respuesta a estrés. Nodo verde, metabolismo del metano. Los géneros microbianos en gris, y negro corresponden a los identificados en las muestras ambientales. Los géneros microbianos en rosa, son los identificados en cultivos lab-lake, mientras que, los géneros Metanogénicos (azul+rosa) se encontraron presentes en todas las muestras analizadas.

Esta red de interacción biológica (taxonómica y metabólica) sugiere que los análisis realizados en los cultivos microbianos empleando metodologías genómicas (metagenómica dirigida y no dirigida), bioinformáticas, bioquímicas (diseño y establecimiento de cultivos microbianos, determinación de flujos metabólicos), metabólicas (determinación de metabolitos e intermediarios) y enzimología (determinación de fitness metabólico), pueden ser extrapoladas para ampliar el conocimiento científico y la comprensión del microbioma del volcán El Chichón.



## 8 CONCLUSIONES

1. El sistema de cultivo “Lab-lake” permitió determinar el potencial metabólico y genómico de microorganismos sulfato reductores (*Ruminococcus*) y Metanogénicos (*Methanobacterium* y *Methanothermobacter*) del microbioma del volcán. La diversidad taxonómica fue similar en todos los cultivos, sin embargo, la abundancia fue significativamente diferente en los tipos de cultivo.
2. El análisis metagenómico indicó que existe potencial genético para realizar procesos metabólicos para la obtención de carbono y energía como metanogénesis y sulfato reducción, así como amplia capacidad genética involucrada en mecanismos de tolerancia a estrés. El cultivo hipertermófilo presentó diferencias metabólicas (mayor actividad sulfato reductora) comparado con los microorganismos mesófilos (mayor actividad metanogénica), lo cual indica el proceso de obtención de energía.
3. Los polifosfatos, moléculas con grupo tiol y la formación de biopelículas son mecanismos involucrados en la tolerancia a estrés del microbioma del lago cráter del Volcán El Chichón.
4. El diseño de la red de interacción metabólica validó que los procesos evaluados en los cultivos microbianos pueden ser extrapolados al microbioma ambiental y los procesos bioquímicos y metabólicos que ahí se realizan.

## 9 PERSPECTIVAS

El estudio metagenómico ambiental mostró dominancia de pocos microorganismos, esto sugiere la viabilidad de recuperar genomas a partir de metagenomas (MAGs), y a partir de estos poder realizar estudios evolutivos, taxonómicos y filogenómicos.

Por otro lado, la identificación taxonómica de los cultivos microbianos permitió detectar la presencia de un arqueón Metanogénico, el cual es de gran interés científico y biotecnológico, puesto que existen pocos cultivos axénicos de este tipo de microorganismos, por lo cual es recomendable realizar un aislamiento y posterior secuenciación de su genoma.

Otro aspecto de sumo interés a ser retomado para futuras investigaciones, es la caracterización de mecanismos de resistencia y adaptación a condiciones poli-extremas, en este proyecto, se identificaron los mecanismos de inducción a tiempos cortos en condiciones de estrés, sin embargo, los resultados sugieren que son mecanismos de tolerancia y no de resistencia, por lo que se recomienda realizar experimentos de exposición a condiciones más severas y por tiempos más prolongados para conocer los mecanismos resistencia, además de analizar estos mecanismos a diferentes niveles de regulación y con mayor sensibilidad, empleando técnicas como qRT-PCR, HPLC-MS y FPLC-MS.

## 10 BIBLIOGRAFÍA

- Achazi, K., Haag, R., Ballauff, M., Dervedde, J., Kizhakkedathu, J. N., Maysinger, D., & Multhaup, G. (2020). Understanding the interaction of polyelectrolyte architectures with proteins and biosystems. *Angewandte Chemie International Edition*.
- Akiyama, M., Crooke, E., and Kornberg, A. (1993). An exopolyphosphatase of *Escherichia coli*. The enzyme and its ppx gene in a polyphosphate operon. *J. Biol. Chem.* 268, 633–639.
- Akiyama, M., Crooke, E., and Kornberg, A. (1993). An exopolyphosphatase of *Escherichia coli*. The enzyme and its ppx gene in a polyphosphate operon. *J. Biol. Chem.* 268, 633–639.
- Alvarez, S., and Jerez, C. A. (2004). Copper ions stimulate polyphosphate degradation and phosphate efflux in *Acidithiobacillus ferrooxidans*. *Appl. Environ. Microbiol.* 70, 5177–5182. doi: 10.1128/aem.70.9.5177-5182.2004
- Baes, R., Lemmens, L., Mignon, K., Carlier, M., & Peeters, E. (2020). Defining heat shock response for the thermoacidophilic model crenarchaeon *Sulfolobus acidocaldarius*. *Extremophiles*, 24(5), 681-692.
- Baker-Austin, C., Dopson, M., Wexler, M., Sawers, R. G., and Bond, P. L. (2005). Molecular insight into extreme copper resistance in the extremophilic archaeon *Ferroplasma acidarmanus* Fer1. *Microbiology* 151, 2637–2646. doi: 10.1099/mic.0.28076-28070
- Bartelme, R. P., McLellan, S. L., & Newton, R. J. (2017). Freshwater recirculating aquaculture system operations drive biofilter bacterial community shifts around a stable nitrifying consortium of ammonia-oxidizing archaea and comammox Nitrospira. *Frontiers in microbiology*, 8, 101.
- Berg IA, Kockelkorn D, Ramos-Vera WH, Say RF, Zarzycki J, et al. 2010. Autotrophic carbon fixation in archaea. *Nat. Rev. Microbiol.* 8:447–60.
- Blöchl, E., Burggraf, S., Fiala, G., Lauerer, G., Huber, G., Huber, R., ... & Völkl, P. (1995). Isolation, taxonomy and phylogeny of hyperthermophilic microorganisms. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 11(1), 9-16.
- Boussau, Bastien et al 2008. Accounting for horizontal gene transfers explains conflicting hypotheses regarding the position of aquificales in the phylogeny of Bacteria. *BMC Evolutionary Biology*, 8:272 doi:10.1186/1471-2148-8-272.
- Boyd, J. A., Jungbluth, S. P., Leu, A. O., Evans, P. N., Woodcroft, B. J., Chadwick, G. L., ... & Tyson, G. W. (2019). Divergent methyl-coenzyme M reductase genes in a deep-subseafloor *Archaeoglobi*. *The ISME journal*, 13(5), 1269-1279.
- Brito, E.M.S., Villegas-Negrete, N., Sotelo-González, I.A., Caretta, C.A., Goñi-Urriza, M., Gassie, C., Hakil, F., Colin, Y., Duran, R., Gutiérrez-Corona, F., Piñón-Castillo, H.A., Cuevas-Rodríguez, G., Malm. O., Torres, J.P.M., Fahy, A., Reyna-López, G.E., Guyoneaud, R. (2014) Microbial diversity in Los

Azufres geothermal field (Michoacán, Mexico) and isolation of representative sulfate and sulfur reducers. *Extremophiles* 18:385–398.

- Brown, C. T., Hug, L. A., Thomas, B. C., Sharon, I., Castelle, C. J., Singh, A., ... & Banfield, J. F. (2015). Unusual biology across a group comprising more than 15% of domain Bacteria. *Nature*, 523(7559), 208-211.
- Bryant, D. A., & Frigaard, N. U. (2006). Prokaryotic photosynthesis and phototrophy illuminated. *Trends in microbiology*, 14(11), 488-496.
- Cabello P, Roldán MD, Moreno-Vivián C. 2004. Nitrate reduction and the nitrogen cycle in archaea. *Microbiology* 150:3527–46.
- Canfield, D.E. & Raiswell, R. (1999) The evolution of the sulfur cycle. *Am. J. Sci.* 299, 697– 723.
- Canfield, D.E. (2001). Biogeochemistry of sulfur isotopes. *Reviews in Mineralogy and Geochemistry*. 43:607–36.
- Canfield, D.E. (2001). Biogeochemistry of sulfur isotopes. *Reviews in Mineralogy and Geochemistry*. 43:607–36.
- Castelle, C. J., Wrighton, K. C., Thomas, B. C., Hug, L. A., Brown, C. T., Wilkins, M. J., ... & Taylor, R. C. (2015). Genomic expansion of domain archaea highlights roles for organisms from new phyla in anaerobic carbon cycling. *Current biology*, 25(6), 690-701.
- Cavalier-Smith (2006). The 10 phyla of the kingdom Bacteria *Biology Direct* 2006 1:19 doi:10.1186/1745-6150-1-19.
- Cavalier-Smith T (2006). Cell evolution and Earth history: stasis and revolution. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 361 (1470): 969-1006.
- Cavalier-Smith T (2006). Rooting the tree of life by transition analyses. *Biology Direct* 2006, 1:19 doi:10.1186/1745-6150-1-19.
- Cavalier-Smith Thomas (2006), Rooting the tree of life by transition analyses, *Biol Direct*. 1: 19. doi: 10.1186/1745-6150 de enero de 19.
- Cheryl P. Andam & J. Peter Gogarten 2011. Biased gene transfer in microbial evolution. Phylogenetic analysis of bacterial tyrosyl-tRNA synthetase amino acid sequences and the corresponding concatenated 16S–23S ribosomal RNA phylogeny. *Nature Reviews Microbiology* 9, 543-555 doi:10.1038/nrmicro2593.
- Cho, K.-S., & Jung, H. (2017). Methane mitigation technology using methanotrophs: A review. *Microbiology and Biotechnology Letters* (Vol. 45). <https://doi.org/10.4014/mbl.1707.07005>.
- Christian Rinke et al 2013. Insights into the phylogeny and coding potential of microbial dark matter. *Nature*, Vol 499, pp. 431-437. 25 de julio de 2013 doi:10.1038/nature12352.
- Costa, K. C., Navarro, J. B., Shock, E. L., Zhang, C. L., Soukup, D., & Hedlund, B. P. (2009). Microbiology and geochemistry of great boiling and mud hot springs in the United States.
- Daniel Sigman y Edward A. Boyle, "Glacial/Interglacial Variations in Atmospheric Carbon Dioxide" (Variaciones glaciales e interglaciales en el dióxido de carbono atmosférico). *Nature* 407 (2000): 859, <http://dx.doi.org/10.1038/35038000>.

- Das, D., Salgaonkar, B. B., Mani, K., and Braganca, J. M. (2014). Cadmium resistance in extremely halophilic archaeon Haloferax strain BBK2. *Chemosphere* 112, 385–392. doi: 10.1016/j.chemosphere.2014.04.058
- Dekas AE, Poretsky RS, Orphan VJ. 2009. Deep-sea archaea fix and share nitrogen in methaneconsuming microbial consortia. *Science* 326:422–26.
- Diaconu, M., Pavel, L. V., Hlihor, R. M., Rosca, M., Fertu, D. I., Lenz, M., ... & Gavrilescu, M. (2020). Characterization of heavy metal toxicity in some plants and microorganisms—A preliminary approach for environmental bioremediation. *New Biotechnology*, 56, 130-139.
- Dick GJ, Baker BJ. Omic Approaches in Microbial Ecology: Charting the Unknown: analysis of whole-community sequence data is unveiling the diversity and function of specific microbial groups within uncultured phyla and across entire microbial ecosystems. *Microbe Mag.* 2013;8:353–60.
- Dillon, J. G., Fishbain, S., Miller, S. R., Bebout, B. M., Habicht, K. S., Webb, S. M., & Stahl, D. A. (2007). High Rates of Sulfate Reduction in a Low-Sulfate Hot Spring Microbial Mat Are Driven by a Low Level of Diversity of Sulfate-Respiring Microorganisms. *Applied and Environmental Microbiology*, 73(16), 5218–5226. <https://doi.org/10.1128/AEM.00357-07>.
- Dodsworth, J. A., Hungate, B. A., & Hedlund, B. P. (2011). Ammonia oxidation, denitrification and dissimilatory nitrate reduction to ammonium in two US Great Basin hot springs with abundant ammonia-oxidizing archaea. *Environmental Microbiology*, 13(8), 2371–2386. <https://doi.org/10.1111/j.1462-2920.2011.02508.x>.
- Driessen, A. J. M., van de Vossenberg, J. L. C. M., Konings, W. N. (1996), “Membrane composition and ion- permeability in extremophiles”, *FEMS Microbiology Reviews*, 18, 139-148.
- Duarte, A. G., Catarino, T., White, G. F., Lousa, D., Neukirchen, S., Soares, C. M., ... & Pereira, I. A. (2018). An electrogenic redox loop in sulfate reduction reveals a likely widespread mechanism of energy conservation. *Nature communications*, 9(1), 1-11.
- Dunfield, P. F., Yuryev, A., Senin, P., Smirnova, A. V, Stott, M. B., Hou, S., ... Alam, M. (2007). Methane oxidation by an extremely acidophilic bacterium of the phylum Verrucomicrobia. *Nature*, 450, 879. <https://doi.org/doi:10.1038/nature06411>.
- EPA. (2010). Methane and Nitrous oxide Emissions from Natural Sources. In Environmental Protection Agency, Whashington, DC, USA.
- Fenchel, T., King, G. M., & Blackburn, T. H. (2012a). Bacterial Metabolism. In *Bacterial Biogeochemistry* (pp. 1–34). <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-415836-8.00001-3>
- Fenchel, T., King, G. M., & Blackburn, T. H. (2012b). Microbial Biogeochemistry and Extreme Environments. In *Bacterial Biogeochemistry* (pp. 143–161). <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-415836-8.00008-6>
- Fike, D., Bradley, A. S., Rose, C.V. (2015). Rethinking thencient sulfur cycle. *Annual Review of Earth and Planetary Sciences*, 43, 593-622.
- Fike, D., Bradley, A. S., Rose, C.V. (2015). Rethinking thencient sulfur cycle. *Annual Review of Earth and Planetary Sciences*, 43, 593-622.

- Focardi, S., Pepi, M., Landi, G., Gasperini, S., Ruta, M., and Di Biasio, P. (2012). Hexavalent chromium reduction by whole cells and cell free extract of the moderate halophilic bacterial strain Halomonas sp TA-04. *Int. Biodeter. Biodegr.* 66, 63–70. doi: 10.1016/j.ibiod.2011.11.003
- Foley, R. A., & Lewin, R. (2013). *Principles of human evolution*. John Wiley & Sons.
- Friedrich, M.W. Phylogenetic analysis reveals multiple lateral transfers of adenosine-5'-phosphosulfate reductase genes among sulfate-reducing microorganisms. *J. Bacteriol.* 2002, 184, 278–289.
- Fritz, G.; Büchert, T.; Huber, H.; Stetter, K.O.; Kroneck, P.M. Adenylylsulfate reductases from archaea and bacteria are 1:1 alpha beta-heterodimeric iron-sulfur flavoenzymes high similarity of molecular properties emphasizes their central role in sulfur metabolism. *FEBS Lett.* 2000, 473, 63–66.
- Gadd, GM (2010). «Metals, minerals and microbes: geomicrobiology and bioremediation». *Microbiology* 156 (3): 609-43. PMID 20019082. doi:10.1099/mic.0.037143-0
- Gómez, F., Cavalazzi, B., Rodríguez, N., Amils, R., Ori, G. G., Olsson-Francis, K., ... & Miruts, H. (2019). Ultra-small microorganisms in the polyextreme conditions of the Dallol volcano, Northern Afar, Ethiopia. *Scientific reports*, 9(1), 7907.
- Gupta, R. S. (2005). Molecular Sequences and the Early History of Life. In "Microbial Phylogeny and Evolution: Concepts and Controversies" (J. Sapp, Ed.), Oxford University Press, New York. Web: Branching Order of Bacterial Phyla.
- Harris, D. R., Ward, D. E., Feasel, J. M., Lancaster, K. M., Murphy, R. D., Mallet, T. C., et al. (2005). Discovery and characterization of a coenzyme A disulfide reductase from *Pyrococcus horikoshii*. Implications for this disulfide metabolism of anaerobic hyper-thermophiles. *FEBS J.* 272, 1189–1200. doi: 10.1111/j.1742-4658.2005.04555.x
- Herrera, A., & Cockell, C. S. (2007, July 1). Exploring microbial diversity in volcanic environments: A review of methods in DNA extraction. *Journal of Microbiological Methods*. Elsevier. <https://doi.org/10.1016/j.mimet.2007.04.005>.
- Hoefl, S. E., Blum, J. S., Stolz, J. F., Tabita, F. R., Witte, B., King, G. M., ... Oremland, R. S. (2007). *Alkalilimnicola ehrlichii* sp. nov., a novel, arsenite-oxidizing haloalkaliphilic gammaproteobacterium capable of chemoautotrophic or heterotrophic growth with nitrate or oxygen as the electron acceptor. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 57(3), 504–512. <https://doi.org/10.1099/ijs.0.64576-0>.
- Hug, L. A., Baker, B. J., Anantharaman, K., Brown, C. T., Probst, A. J., Castelle, C. J., ... & Suzuki, Y. (2016). A new view of the tree of life. *Nature Microbiology*, 1, 16048.
- Inskeep, W.P., Jay, Z.J., Macur, R.E., Clingenpeel, S., Tenney, A., Lovalvo, D., Beam, J., Kozubal, M.A., Shanks, W.C., Morgan, L.A., Kan, J., Gorby, Y., Yooseph, S., Nealson, K. (2015). Geomicrobiology of sublacustrine thermal

vents in Yellowstone Lake: geochemical controls on microbial community structure and function. *Frontiers in Microbiology*, 1(6), 1-16.

- Jiang, D., Armour, C. R., Hu, C., Mei, M., Tian, C., Sharpton, T. J., & Jiang, Y. (2019). Microbiome multi-omics network analysis: statistical considerations, limitations, and opportunities. *Frontiers in genetics*, 10.
- Jorquera, M. A., Graether, S. P., & Maruyama, F. (2019). Bioprospecting and Biotechnology of Extremophiles. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, 7, 204.
- Knoll, A.H. & Canfield, D.E. (1998) Isotopic inferences on early ecosystems. In *Isotope Paleobiology and Paleoecology*, edited by W.L. Manger and L.K. Meeks, The Palaeontological Society, Pittsburgh, pp. 212–243.
- Kochetkova, T. V., Rusanov, I. I., Pimenov, N. V., Kolganova, T. V., Lebedinsky, A. V., Bonch-Osmolovskaya, E. A., & Sokolova, T. G. (2011). Anaerobic transformation of carbon monoxide by microbial communities of Kamchatka hot springs. *Extremophiles*, 15(3), 319–325. <https://doi.org/10.1007/s00792-011-0362-7>.
- Kozich JJ, Westcott SL, Baxter NT, Highlander SK, Schloss PD. (2013): Development of a dual-index sequencing strategy and curation pipeline for analyzing amplicon sequence data on the MiSeq Illumina sequencing platform. *Applied and Environmental Microbiology*. 79(17):5112-20.
- Kushkevych, I., Castro Sangrador, J., Dordević, D., Rozehnalová, M., Černý, M., Fafula, R., ... & Rittmann, S. K. M. (2020). Evaluation of physiological parameters of intestinal sulfate-reducing bacteria isolated from patients suffering from IBD and healthy people. *Journal of Clinical Medicine*, 9(6), 1920.
- Kushkevych, I.; Abdulina, D.; Kováč, J.; Dordević, D.; Vítězová, M.; Lutynska, G.; Rittmann, S. -M. Adenosine-5'-Phosphosulfate- and Sulfite Reductases Activities of Sulfate-Reducing Bacteria from Various Environments. *Biomolecules* 2020, 10, 921
- Lai, T. V., Farquharson, R., & Denton, M. D. (2019). High soil temperatures alter the rates of nitrification, denitrification and associated N<sub>2</sub>O emissions. *Journal of Soils and Sediments*, 19(5), 2176-2189.
- Langenheder, S., & Lindström, E. S. (2019). Factors influencing aquatic and terrestrial bacterial community assembly. *Environmental microbiology reports*, 11(3), 306-315.
- LeighJA. (2000). Nitrogen fixation in methanogens: thearchaealperspective.Curr.IssuesMol.Biol.2:125– 31.
- Lewin, K. (2013). *A dynamic theory of personality-selected papers*. Read Books Ltd.
- Lewin, K. (2013). *Principles of topological psychology*. Read Books Ltd.
- Li, Y., Wang, Y., Wan, D., Li, B., Zhang, P., & Wang, H. (2020). Pilot-scale application of sulfur-limestone autotrophic denitrification biofilter for municipal tailwater treatment: Performance and microbial community structure. *Bioresource Technology*, 300, 122682.
- Lira-Silva, E., Santiago-Martínez, M. G., García-Contreras, R., Zepeda-Rodríguez, A., Marín-Hernández, A., Moreno-Sánchez, R., & Jasso-Chávez,

- R. (2013). C d2+ resistance mechanisms in *Methanosarcina acetivorans* involve the increase in the coenzyme M content and induction of biofilm synthesis. *Environmental microbiology reports*, 5(6), 799-808.
- Lira-Silva, E., Santiago-Martínez, M. G., Hernández-Juárez, V., García-Contreras, R., Moreno-Sánchez, R., & Jasso-Chávez, R. (2012). Activation of methanogenesis by cadmium in the marine archaeon *Methanosarcina acetivorans*. *PLoS one*, 7(11), e48779.
  - 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.
  - Löhr, A.J., Laverman, A.M., Braster, M., van Straalen, N.M., Röling, W.F.M. (2006). Microbial communities in the world's largest acidic volcanic lake, Kawah Ijen in Indonesia, and in the Banyupahit river originating from it. *Microbial Ecology*, 52, 60-618.
  - Löhr, A.J., Sluik, R., Olaveson, M.M., Ivorra, N., Van Gestel, C.A.M., Van Straalen, N.M. (2006b). Macroinvertebrate and algal communities in an extremely acidic river and the Kawah Ijen crater lake Indonesia. *Archiv für Hydrobiologie*, 165, 1-21
  - Mackelprang R, Waldrop MP, DeAngelis KM, David MM, Chavarria KL, et al. 2011. Metagenomic analysis of a permafrost microbial community reveals a rapid response to thaw. *Nature* 480:368–71.
  - Mangold, S., Potrykus, J., Björn, E., Lövgren, L., and Dopson, M. (2013). Extreme zinc tolerance in acidophilic microorganisms from the bacterial and archaeal domains. *Extremophiles* 17, 75–85. doi: 10.1007/s00792-012-0495-3
  - Martínez-Alonso, E., Peña-Pérez, S., Serrano, S., García-López, E., Alcazar, A., & Cid, C. (2019). Taxonomic and functional characterization of a microbial community from a volcanic englacial ecosystem in Deception Island, Antarctica. *Scientific reports*, 9(1), 1-14.
  - Matarredona, L., Camacho, M., Zafrilla, B., Bonete, M. J., & Esclapez, J. (2020). The Role of Stress Proteins in Haloarchaea and Their Adaptive Response to Environmental Shifts. *Biomolecules*, 10(10), 1390.
  - Medrano-Santillana, M., Souza-Brito, E. M., Duran, R., Gutierrez-Corona, F., & Reyna-López, G. E. (2017). Bacterial diversity in fumarole environments of the Parícutín volcano, Michoacán (Mexico). *Extremophiles*, 21(3), 499–511. <https://doi.org/10.1007/s00792-017-0920-8>.
  - Mehta MP, Baross JA. 2006. Nitrogen fixation at 92°C by a hydrothermal vent archaeon. *Science* 314:1783–86.
  - Meyer, B. & Kuever, J. (2007) Molecular analysis of the distribution and phylogeny of dissimilatory adenosine-5-phosphosulfate reductase-encoding (*aprBA*) among sulfur oxidizing prokaryotes. *Microbiology* 153, 3478–3498.
  - Mochimaru, H., Yoshioka, H., Tamaki, H., Nakamura, K., Kaneko, N., Sakata, S., ... & Kamagata, Y. (2007). Microbial diversity and methanogenic potential in a high temperature natural gas field in Japan. *Extremophiles*, 11(3), 453-461.



- Murray, A. E., Freudenstein, J., Gribaldo, S., Hatzenpichler, R., Hugenholtz, P., Kämpfer, P., ... & Rossello-Mora, R. (2020). Roadmap for naming uncultivated Archaea and Bacteria. *Nature Microbiology*, 1-7.
- Naresh, S., Kunasundari, B., Gunny, A. A. N., Teoh, Y. P., Shuit, S. H., Ng, Q. H., & Hoo, P. Y. (2019). Isolation and partial characterisation of thermophilic cellulolytic bacteria from north Malaysian tropical mangrove soil. *Tropical Life Sciences Research*, 30(1), 123.
- Nguyen, N.-L., Yu, W.-J., Yang, H.-Y., Kim, J.-G., Jung, M.-Y., Park, S.-J., ... Rhee, S.-K. (2017). A novel methanotroph in the genus *Methylomonas* that contains a distinct clade of soluble methane monooxygenase. *Journal of Microbiology*, 55(10), 775–782. <https://doi.org/10.1007/s12275-017-7317-3>.
- Olivier, M., Asmis, R., Hawkins, G. A., Howard, T. D., & Cox, L. A. (2019). The need for multi-omics biomarker signatures in precision medicine. *International Journal of Molecular Sciences*, 20(19), 4781.
- Peng, L., Wei, Z., Wan, C., Li, J., Chen, Z., Zhu, D., ... & Kirkland, A. I. (2020). A fundamental look at electrocatalytic sulfur reduction reaction. *Nature Catalysis*, 3(9), 762-770.
- Pérez-Hernández, V., Hernández-Guzmán, M., Serrano-Silva, N., Luna-Guido, M., Navarro-Noya, Y. E., Montes-Molina, J. A., & Dendooven, L. (2020). Diversity of *amoA* and *pmoA* Genes in Extremely Saline Alkaline Soils of the Former Lake Texcoco. *Geomicrobiology Journal*, 37(9), 785-797.
- Pham, V. H., & Kim, J. (2012). Cultivation of unculturable soil bacteria. *Trends in biotechnology*, 30(9), 475-484.
- Pinu, F. R., Beale, D. J., Paten, A. M., Kouremenos, K., Swarup, S., Schirra, H. J., & Wishart, D. (2019). Systems biology and multi-omics integration: Viewpoints from the metabolomics research community. *Metabolites*, 9(4), 76.
- Prabhakaran, P., Ashraf, M. A., & Aqma, W. S. (2016). Microbial stress response to heavy metals in the environment. *Rsc Advances*, 6(111), 109862-109877.
- Quemener, M., Mara, P., Schubotz, F., Beaudoin, D., Li, W., Pachiadaki, M., ... & Edgcomb, V. (2020). Meta-omics highlights the diversity, activity and adaptations of fungi in deep oceanic crust. *Environmental Microbiology*.
- Rabus, R., Venceslau, S., Wöhlbrand, L., Voordouw, G., Wall, J. & Pereira, I. (2015). A Post-Genomic view of the ecophysiology, catabolism and biotechnological relevance of sulphate-reducing prokaryotes. *Advances in Microb Physiology*, 2015; 66:55-321.
- Rabus, R., Venceslau, S., Wöhlbrand, L., Voordouw, G., Wall, J. & Pereira, I. (2015). A Post-Genomic view of the ecophysiology, catabolism and biotechnological relevance of sulphate-reducing prokaryotes. *Advances in Microb Physiology*, 2015; 66:55-321.
- Raven, Peter H., George B. Johnson, Kenneth A. Mason, Jonathan B. Losos, y Susan R. Singer. "Biogeochemical Cycles". (Ciclos biogeoquímicos). En *Biology*, 1209-1214. 10a ed., AP ed. New York: McGraw-Hill, 2014.
- Remonsellez, F., Orell, A., and Jerez, C. A. (2006). Copper tolerance of the thermoacidophilic archaeon *Sulfolobus metallicus*: possible role of

polyphosphate metabolism. *Microbiology* 152, 59–66. doi: 10.1099/mic.0.28241-0

- Rincón-Molina, C. I., Hernández-García, J. A., Rincón-Rosales, R., Gutiérrez-Miceli, F. A., Ramírez-Villanueva, D. A., González-Terrerros, E., ... Ruíz-Valdiviezo, V. M. (2019). Structure and Diversity of the Bacterial Communities in the Acid and Thermophilic Crater-Lake of the Volcano “El Chichón”, Mexico. *Geomicrobiology Journal*, 36(2), 97–109. <https://doi.org/10.1080/01490451.2018.1509158>.
- Rückert, C. (2016). Sulfate reduction in microorganisms recent advances and biotechnological applications. *Current Opinion in Microbiology*, 33:140–146.
- Ruggiero, M. A., Gordon, D. P., Orrell, T. M., Bailly, N., Bourgoin, T., Brusca, R. C., ... & Kirk, P. M. (2015). A higher level classification of all living organisms. *PloS one*, 10(4), e0119248.
- Ruggiero, MA; Gordon, DP; Orrell, TM; Bailly, N; Bourgoin, T; Brusca, RC; Cavalier-Smith, T; Guiry, MD et al. (2015). «A higher level classification of all living organisms». *PLoS ONE*, 10 (6): e0130114. OCLC 5822602522. PMID 25923521. doi:10.1371/journal.pone.0130114.
- Rusch, A., Walpersdorf, E., DeBeer, D., Gurrieri, S., & Amend, J. P. (2005). Microbial communities near the oxic/anoxic interface in the hydrothermal system of Vulcano Island, Italy. *Chemical Geology*, 224(1–3), 169–182. <https://doi.org/10.1016/j.chemgeo.2005.07.026>
- Sanchez-Andrea, I., Rodriguez N., Amils, R., Sanz, J.L. (2011). Microbial diversity in anaerobic sediments at rio Tinto, a naturally acidic environment with a high heavy metal content. *Applied And Environmental Microbiology*, 6085–6093.
- Santiago-Martínez, M. G., Encalada, R., Lira-Silva, E., Pineda, E., Gallardo-Pérez, J. C., Reyes-García, M. A., ... & Jasso-Chávez, R. (2016). The nutritional status of *Methanosarcina acetivorans* regulates glycogen metabolism and gluconeogenesis and glycolysis fluxes. *The FEBS journal*, 283(10), 1979-1999.
- Sato, Y., Hamai, T., Hori, T., Aoyagi, T., Inaba, T., Kobayashi, M., ... & Sakata, T. (2019). *Desulfosporosinus* spp. were the most predominant sulfate-reducing bacteria in pilot-and laboratory-scale passive bioreactors for acid mine drainage treatment. *Applied microbiology and biotechnology*, 103(18), 7783-7793.
- Setyaningsih, P. P., Ningsih, F., Rachmania, M. K., Syafitri, W. A., Sari, D. C. A. F., Yabe, S., ... & Sjamsuridzal, W. (2019). Cellulolytic enzyme-producing thermophilic Actinobacteria isolated from the soil of Cisolok Geysers, West Java, Indonesia. *Biodiversitas Journal of Biological Diversity*, 20(11).
- SIESA. (2017). [Siesa.com.mx](http://Siesa.com.mx). 24 de Abril 2017.
- Singh, R., Dong, H., Liu, D., Zhao, L., Marts, A. R., Farquhar, E., et al. (2015). Reduction of hexavalent chromium by the thermophilic methanogen *Methanothermobacter thermautotrophicus*. *Geochim. Cosmochim. Acta* 148, 442–456. doi: 10.1016/j.gca.2014.10.012
- Sorokin, D. Y., Zhilina, T. N., Lysenko, A. M., Tourova, T. P., & Spiridonova, E. M. (2006). Metabolic versatility of haloalkaliphilic bacteria from soda lakes

belonging to the Alkalispirillum–Alkalilimnicola group. *Extremophiles*, 10(3), 213-220.

- Spada, S., Pembroke, T. J., and Wall, G. J. (2002). Isolation of a novel *Thermus thermophilus* metal efflux protein that improves *Escherichia coli* growth under stress conditions. *Extremophiles* 6, 301–308. doi: 10.1007/s00792-001-0257-0
- Staunton-Sykes, J., Aubry, T. J., Shin, Y. M., Weber, J., Marshall, L. R., Abraham, N. L., ... & Archibald, A. (2020). Co-emission of volcanic sulfur and halogens amplifies volcanic effective radiative forcing. *Atmospheric Chemistry and Physics Discussions*, 1-30.
- Straka, L. L., Meinhardt, K. A., Bollmann, A., Stahl, D. A., & Winkler, M. K. (2019). Affinity informs environmental cooperation between ammonia-oxidizing archaea (AOA) and anaerobic ammonia-oxidizing (Anammox) bacteria. *The ISME journal*, 1.
- Suzuki, S., & Kurosawa, N. (2019). Participation of UV-regulated Genes in the Response to Helix-distorting DNA Damage in the Thermoacidophilic Crenarchaeon *Sulfolobus acidocaldarius*. *Microbes and environments*, ME19055.
- Tolner, B., Poolman, B. y Konings, W. (1997), “Adaptation of microorganisms and their transport systems to high temperatures”, *Comparative Biochemistry and Physiology*, 118A, 423-428
- Trent, J. D. (1996). A review of acquired thermotolerance, heat-shock proteins, and molecular chaperones in archaea. *FEMS Microbiology Reviews*, 18(2-3), 249-258.
- Van Kranendonk, M., & Pirajno, F. (2004). Geochemistry of metabasalts and hydrothermal alteration zones associated with c. 3.45 Ga chert and barite deposits: implications for the geological setting of the Warrawoona Group, Pilbara Craton, Australia. *Geochemistry-exploration Environment Analysis - GEOCHEM-EXPLOR ENVIRON ANAL (Vol. 4)*. <https://doi.org/10.1144/1467-7873/04-205>.
- Ventura, M., Canchaya, C., Zhang, Z., Fitzgerald, G. F., & van Sinderen, D. (2007). Molecular characterization of hsp20, encoding a small heat shock protein of *Bifidobacterium breve* UCC2003. *Applied and environmental microbiology*, 73(14), 4695-4703.
- Wan, Y., Ruan, X., Zhang, Y., Li, R. (2016). Illumina sequencing-based analysis of sediment bacteria community in different trophic status freshwater lakes. *MicrobiologyOpen*, 450, 1-15.
- Ward, L., Taylor, M. W., Power, J.F., Scott, B.J., McDonald, I.R., Stott, M.B. (2017). Microbial community dynamics in Inferno Crater Lake, a thermally fluctuating geothermal spring. *The ISME Journal* 11, 1158–1167.
- Watanabe, M., Higashioka, Y., Kojima, H., Fukui, M. (2017). *Desulfosarcina widdelii* sp. nov. and *Desulfosarcina alkanivorans* sp. nov., hydrocarbon-degrading sulfate-reducing bacteria isolated from marine sediment and emended description of the genus *Desulfosarcina*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 67: 2994-2997.

- Welte, C., & Deppenmeier, U. (2014). Bioenergetics and anaerobic respiratory chains of acetoclastic methanogens. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Bioenergetics*, 1837(7), 1130-1147.
- Woese, C. R., & Fox, G. E. (1977). Phylogenetic structure of the prokaryotic domain: the primary kingdoms. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 74(11), 5088-5090.
- Woese, C. R., Kandler, O. & Wheelis, M. L. Towards a natural system of organisms: proposal for the domains Archaea, Bacteria, and Eucarya. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 87, 4576–4579 (1990).
- Yarza, P. et al. Uniting the classification of cultured and uncultured bacteria and archaea using 16S rRNA gene sequences. *Nature Rev. Microbiol.* 12, 635–645 (2014).
- Zaremba-Niedzwiedzka, K., Caceres, E. F., Saw, J. H., Bäckström, D., Juzokaite, L., Vancaester, E., ... & Stott, M. B. (2017). Asgard archaea illuminate the origin of eukaryotic cellular complexity. *Nature*, 541(7637), 353.
- Zeikus, J. G., Ben-Bassat, A., & Hegge, P. W. (1980). Microbiology of methanogenesis in thermal, volcanic environments. *Journal of bacteriology*, 143(1), 432-440.
- Zhang, C. L., Ye, Q., Huang, Z., Li, W., Chen, J., Song, Z., ... Hedlund, B. P. (2008). Global occurrence of archaeal amoA genes in terrestrial hot springs. *Applied and Environmental Microbiology*, 74(20), 6417–6426. <https://doi.org/10.1128/AEM.00843-08>.
- Zhang, X., Liu, Z., Wei, G., Yang, F., & Liu, X. (2018). In silico genome-wide analysis reveals the potential links between core genome of *Acidithiobacillus thiooxidans* and its autotrophic lifestyle. *Frontiers in microbiology*, 9, 1255.
- Zhao, W., Ma, X., Liu, X., Jian, H., Zhang, Y., & Xiao, X. (2020). Cross-stress adaptation in a piezophilic and hyperthermophilic archaeon from deep sea hydrothermal vent. *Frontiers in Microbiology*, 11, 2081.
- Zheng, Z., Cai, Y., Zhang, Y., Zhao, Y., Gao, Y., Cui, Z., ... & Wang, X. (2020). The effects of C/N (10–25) on the relationship of substrates, metabolites, and microorganisms in “inhibited steady-state” of anaerobic digestion. *Water Research*, 188, 116466.

## **11 ANEXOS**

### **Anexo 1. Preparación buffer TME-Na**

El Buffer TMA-Na está compuesto por 50 mM de Tris (6 g / L), 20 mM MgCl<sub>2</sub> (4 g / L), 2 mM EGTA (0.76 g / L), 400 mM NaCl (23.3 g / L). Disolver ingredientes en agua Mili-Q, Ajustar pH a 7.2 con HCl. Almacenar a 4 °C. Mantener de 2 – 3 h en cámara de anaerobiosis con atmosfera de 80 % N<sub>2</sub>, 15 % CO<sub>2</sub> y 5 % H<sub>2</sub> (v/v).

Nota: No es recomendable emplear NaOH o KOH para ajustar pH, por el contenido de Na<sup>+</sup> y K<sup>+</sup>, pueden afectar reacciones siguientes o determinaciones de iones.

### **Anexo 2. Preparación de buffer HKE-Na**

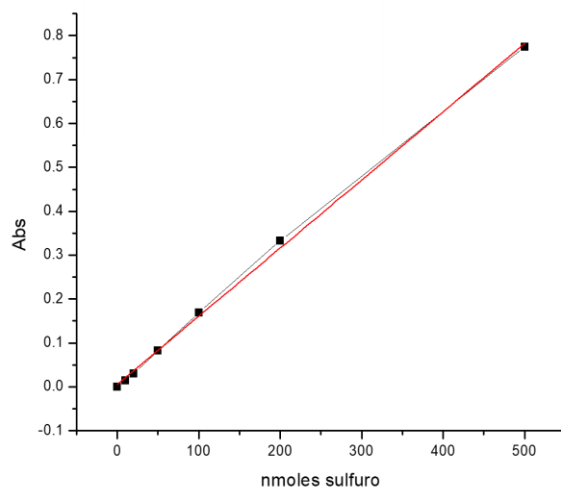
Está compuesto por 50 mM de HEPES (6 g / L), 30 mM KCl (4 g / L), 1 mM EGTA (0.76 g / L), 500 mM NaCl (23.3 g / L). Disolver ingredientes en agua Mili-Q, Ajustar pH a 7.0 con HCl. Almacenar a 4 °C. Mantener de 2 – 3 h en cámara de anaerobiosis con atmosfera de 80 % N<sub>2</sub>, 15 % CO<sub>2</sub> y 5 % H<sub>2</sub> (v/v).

### **Anexo 3. Determinación de sulfuro**

Para evaluar el contenido de sulfuro intra y extracelular, así como para ensayos enzimáticos, se llevó a cabo con la metodología de azul de metileno (Lira-Silva et al., 2012). Que se fundamenta en la capacidad del sulfuro de hidrógeno y sulfuros metálicos solubles en ácidos para convertir el N,N dimetil-p-fenilendiamina a azul de metileno, esto en presencia de un agente oxidante suave (FeCl<sub>3</sub> acidificado). La intensidad del desarrollo de color de azul de metileno es directamente proporcional a la cantidad de sulfuro presente en la muestra. Esta metodología es sensible a oxígeno, por lo que debe realizarse dentro de cámara de anaerobiosis.

Las determinaciones se realizaron en frascos anaerobios de 10 mL sellados para evitar la pérdida de sulfuro (en condiciones ácidas se forma sulfuro de hidrogeno<sub>(g)</sub>). Por lo que la adición de los componentes de la mezcla de reacción (2.5 mL) se realizó con ayuda de jeringas. El procedimiento es el siguiente: a cada vial anaerobio se adicionan 0.5 mL de Acetato de Zinc anaerobio al 26 %, 0.1 mL de NaOH anaerobio al 6 %, 0.7 mL de muestra problema, agitación en vórtex por 1 min a máxima velocidad, seguido de adición de 0.25 mL de NN DMPD al 1 % disuelto en 5N de HCl anaerobio, agitación en vórtex por 1 min, adición de 0.4 mL de FeCl<sub>3</sub> 11.5 μM en 0.6N de HCl anaerobio y agitación en vórtex por 1 minuto a máxima velocidad. Se incuba por 30 min en completa oscuridad y a temperatura ambiente para lograr desarrollo de color, transcurrido este tiempo se adicionan 0.85 mL de agua Mili-Q anaerobia, y por medio de espectroscopía UV a 670nm en condiciones anaerobias se determina la concentración de azul de metileno. La incubación para el desarrollo de color no debe ser mayor a 30 min para evitar la degradación del compuesto cromóforo.

La concentración de sulfuro se determina mediante interpolación en una curva estándar, la cual es lineal hasta 500 nmoles. Como se observa a continuación

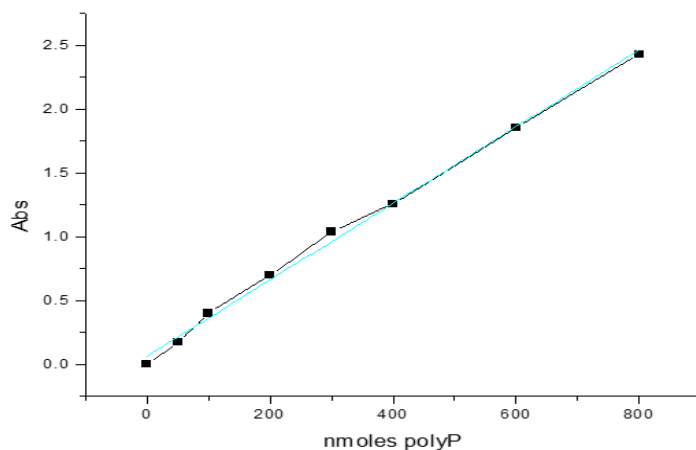


**Figura S1.** Curva de calibración para cuantificación de sulfuro empleando el método de azul de metileno a 670nm.

#### Anexo 4. Determinación de polifosfatos intracelular

Para evaluar el contenido de fosfatos se llevó a cabo la técnica de azul de molibdeno (modificado de LeBel et al., 1978), que se fundamenta en la reacción del complejo fosfato con molibdato ( $\text{MoO}_4^{2-}$ ) por  $(\text{C}_7\text{H}_{10}\text{NO})_2\text{SO}_4$  (Elon) en buffer de acetato de cobre. Esta reacción da paso a la formación de azul de molibdeno, que es un compuesto colorido detectable por espectroscopía UV a 870nm.

Células libres de medio de cultivo (50  $\mu\text{L}$ ) fueron incubadas en una mezcla de reacción (5 mL) que contiene 2.5 mM  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ , 84 mM  $\text{CH}_3\text{COONa} \cdot 3\text{H}_2\text{O}$  y 0.5 M  $\text{CH}_3\text{COOH}$ , a pH4. Esta mezcla fue homogenizada y se adicionó 5 mM  $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24} \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ , 14.5 mM  $(\text{C}_7\text{H}_{10}\text{NO})_2\text{SO}_4$  y 60 mM  $\text{NaHSO}_3$ . Se adicionan 25  $\mu\text{L}$  de muestra, se agitan en vórtex y se procede al desarrollo de color por incubación durante 10 min. Simultáneamente los 25  $\mu\text{L}$  de muestra restantes se incuban con PCA al 30% a 90°C durante 2 h. Transcurrido el tiempo se les adiciona la mezcla de reacción y nuevamente se lleva a cabo el desarrollo de color. La diferencia de absorbancia del extracto ácido y el extracto sin acidificar, resulta en el contenido de polifosfato (fosfato acomplejado). La concentración de polifosfatos se determinó mediante interpolación con una curva estándar, la cual es lineal hasta 800 nmoles. Como se observa a continuación



**Figura S2.** Curva de calibración para cuantificación de fosfato y polifosfato empleando el método de azul de molibdeno a 870nm.

## **Anexo 5. Enriquecimiento de fracciones citosólicas y membranales**

Las células de cultivos microbianos se separan del medio por centrifugación a 5000 g por 10 min a 4 °C. El paquete celular es lavado con ayuda de un pincel y buffer TME-Na. Se repite el proceso de centrifugación, posterior a esto, el paquete celular es resuspendido en buffer HKE-Na, y suplementado con 5 mM DTT, 1 mM PMSF y 10 % glicerol. Se procede a la lisis celular, la cual se realiza por sonicación empleando una punta de 2 mm de diámetro, y amplitud de 60 % (sonicador Branson), se realizan 5 pulsos de 15 s, con descansos de 1 min. Es importante considerar el tipo de enzimas que se desean determinar actividades enzimáticas anaerobias, el procedimiento antes descrito debe realizarse burbujeando nitrógeno a las muestras, para eliminar el O<sub>2</sub>. Una vez lisadas las células, se procede a centrifugar los homogenados celulares a 3500 g durante 10 min a 4 °C. El sobrenadante es recuperado y nuevamente centrifugado a 163 000 g por 45 min a 4 °C. El nuevo sobrenadante corresponde a la fracción citosólica, y lo restante es la fracción membranal enriquecida. Los extractos celulares deben ser empleados inmediatamente.



## Anexo 6. Tabla genes

Pathway	Gene	Product	EC number	KO	Water	Sediment	
Glycolysis	glk	glucokinase	EC:2.7.1.2	K00845	135.982	2243.281	
	pfkC	ADP-dependent phosphofructokinase/glucokinase	EC:2.7.1.146 2.7.1.147	K00918	0.000	249.248	
	pgi	glucose-6-phosphate isomerase	EC:5.3.1.9	K01810	3.329	323.542	
	pgi-pmi	glucose/mannose-6-phosphate isomerase	EC:5.3.1.9 5.3.1.8	K15916	585.488	56.090	
	pfkA	6-phosphofructokinase 1	EC:2.7.1.11	K00850	0.000	303.055	
	pfkB	6-phosphofructokinase 2	EC:2.7.1.11	K16370	102.846	471.600	
	pfk, pfp	ATP-dependent phosphofructokinase / diphosphate-dependent phosphofructokinase	EC:2.7.1.11 2.7.1.90	K21071	2.734	533.276	
	pfkC	ADP-dependent phosphofructokinase/glucokinase	EC:2.7.1.146 2.7.1.147	K00918	0.000	249.248	
	ALDO	fructose-bisphosphate aldolase, class I	EC:4.1.2.13	K01623	0.000	10.789	
	fbaA	fructose-bisphosphate aldolase, class II	EC:4.1.2.13	K01624	0.000	293.875	
	fbaB	fructose-bisphosphate aldolase, class I	EC:4.1.2.13	K11645	409.866	270.658	
		fructose-bisphosphate aldolase / 6-deoxy-5-ketofructose 1-phosphate synthase	EC:4.1.2.13 2.2.1.11	K16305	0.000	259.608	
	tpiA	triosephosphate isomerase (TIM)	EC:5.3.1.1	K01803	503.131	266.375	
	gapA	glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase	EC:1.2.1.12	K00134	134.059	499.591	
	gap2	glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	EC:1.2.1.59	K00150	413.492	24.590	
	pgk	phosphoglycerate kinase	EC:2.7.2.3	K00927	654.840	137.614	
	gapor	glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (ferredoxin)	EC:1.2.7.6	K11389	3.687	0.000	
	gpmA	2,3-bisphosphoglycerate-dependent phosphoglycerate mutase	EC:5.4.2.11	K01834	81.591	352.991	
	gpmI	2,3-bisphosphoglycerate-independent phosphoglycerate mutase	EC:5.4.2.12	K15633	2.991	59.924	
	gpmB	2,3-bisphosphoglycerate-dependent phosphoglycerate mutase	EC:5.4.2.11	K15634	317.414	50.251	
	apgM	2,3-bisphosphoglycerate-independent phosphoglycerate mutase	EC:5.4.2.12	K15635	478.956	567.930	
	eno	enolase	EC:4.2.1.11	K01689	676.758	537.350	
	pyk	pyruvate kinase	EC:2.7.1.40	K00873	386.793	606.580	
	Gluconeogenesis	pgi	glucose-6-phosphate isomerase	EC:5.3.1.9	K01810	3.329	323.542
		glpX	fructose-1,6-bisphosphatase II	EC:3.1.3.11	K02446	1.858	7.282
		fbaA	fructose-bisphosphate aldolase, class II	EC:4.1.2.13	K01624	0.000	293.875
		tpiA	triosephosphate isomerase (TIM)	EC:5.3.1.1	K01803	503.131	266.375
gapA		glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase	EC:1.2.1.12	K00134	134.059	499.591	
pgk		phosphoglycerate kinase	EC:2.7.2.3	K00927	654.840	137.614	
gpmI		2,3-bisphosphoglycerate-independent phosphoglycerate mutase	EC:5.4.2.12	K15633	2.991	59.924	
gpmB		probable phosphoglycerate mutase	EC:5.4.2.12	K15634	317.414	50.251	
apgM		2,3-bisphosphoglycerate-independent phosphoglycerate mutase	EC:5.4.2.12	K15635	478.956	567.930	
eno		enolase	EC:4.2.1.11	K01689	676.758	537.350	
pycA		pyruvate carboxylase subunit A	EC:6.4.1.1	K01959	69.940	0.000	
pycB		pyruvate carboxylase subunit B	EC:6.4.1.1	K01960	78.643	45.342	
pckA		phosphoenolpyruvate carboxykinase (GTP)	EC:4.1.1.32	K01596	0.000	19.524	
pckA		phosphoenolpyruvate carboxykinase (ATP)	EC:4.1.1.49	K01610	1.210	425.071	
ppdK		pyruvate, orthophosphate dikinase	EC:2.7.9.1	K01006	5.841	784.610	
fbp		fructose-1,6-bisphosphatase I	EC:3.1.3.11	K03841	0.000	50.580	
pfp		diphosphate-dependent phosphofructokinase	EC:2.7.1.90	K00895	0.000	3.830	
gpmA		2,3-bisphosphoglycerate-dependent phosphoglycerate mutase	EC:5.4.2.11	K01834	81.591	352.991	
gap2		glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (NAD(P))	EC:1.2.1.59	K00150	413.492	24.590	
ALDO		fructose-bisphosphate aldolase, class I	EC:4.1.2.13	K01623	0.000	10.789	
fbaB		fructose-bisphosphate aldolase, class I	EC:4.1.2.13	K11645	409.866	270.658	
		fructose 1,6-bisphosphate aldolase/phosphatase	EC:4.1.2.13 3.1.3.11	K01622	425.796	97.335	
Pyruvate metabolism		porA	pyruvate ferredoxin oxidoreductase alpha subunit	EC:1.2.7.1	K00169	571.486	104.235
		porB	pyruvate ferredoxin oxidoreductase beta subunit	EC:1.2.7.1	K00170	450.671	62.216
		porD	pyruvate ferredoxin oxidoreductase delta subunit	EC:1.2.7.1	K00171	319.127	127.540
		porG	pyruvate ferredoxin oxidoreductase gamma subunit	EC:1.2.7.1	K00172	432.024	127.605
		ppdK	pyruvate, orthophosphate dikinase	EC:2.7.9.1	K01006	5.841	784.610
	pycA	pyruvate carboxylase subunit A	EC:6.4.1.1	K01959	69.940	0.000	
	pycB	pyruvate carboxylase subunit B	EC:6.4.1.1	K01960	78.643	45.342	
	lpd, pdhD	dihydroliipoamide dehydrogenase	EC:1.8.1.4	K00382	1727.671	1263.953	
	pdhA	pyruvate dehydrogenase E1 component alpha subunit	EC:1.2.4.1	K00161	3.736	39.890	
	pdhB	pyruvate dehydrogenase E1 component beta subunit	EC:1.2.4.1	K00162	2.402	50.594	
	aceF	pyruvate dehydrogenase E2 component (dihydroliipoamide acetyltransferase)	EC:2.3.1.12	K00627	1.259	84.542	
	glfA	citrate synthase	EC:2.3.3.1	K01647	394.476	227.177	
	por, nifJ	pyruvate-ferredoxin/ flavodoxin oxidoreductase	EC:1.2.7.1 1.2.7.-	K03737	0.000	632.625	
	Fermentation	Acetate fermentation	adhP	alcohol dehydrogenase, propanol-preferring	EC:1.1.1.1	K13953	64.714
ALDH			aldehyde dehydrogenase (NAD+)	EC:1.2.1.3	K00128	0.000	48.018
pta			phosphate acetyltransferase	EC:2.3.1.8	K00625	0.000	25.066
ackA			acetate kinase	EC:2.7.2.1	K00925	0.000	295.434
acyP			acetylphosphatase	EC:3.6.1.7	K01512	246.659	394.483
acs			acetyl-CoA synthetase	EC:6.2.1.1	K01895	1310.426	281.918
Butyrate fermentation		acdA	acetate--CoA ligase (ADP-forming) subunit alpha	EC:6.2.1.13	K01905	3.328	101.374
		atoB	acetyl-CoA C-acetyltransferase	EC:2.3.1.9	K00626	1431.081	883.954
			enoyl-CoA hydratase	EC:4.2.1.17	K01692	348.558	38.473
		ptb	phosphate butyryltransferase	EC:2.3.1.19	K00634	0.000	501.192
		buk	butyrate kinase	EC:2.7.2.7	K00929	0.000	517.427

Pathway	Gene	Product	EC number	KO	Water	Sediment	
Entner-Doudoroff	galM	aldose 1-epimera	EC:5.1.3.3	K01785	377.699	22.030	
	gdh	glucose 1-dehydr	EC:1.1.1.47	K00034	0.000	7.553	
	gnl	gluconolactonase	EC:3.1.1.17	K01053	0.000	1.160	
	gnaD	gluconate/galacto	EC:4.2.1.140	K05308	275.381	13.255	
	kdgA	2-dehydro-3-deox	EC:4.1.2.51	K18127	0.000	50.590	
	kdpG	2-dehydro-3-deox	EC:4.1.2.55	K11395	198.733	6.432	
	cutA	glyceraldehyde de	EC:1.2.99.8	K18020	199.935	0.000	
	gadh	D-glyceraldehyde	EC:1.2.1.89	K18128	219.927	90.457	
	aor	aldehyde:ferredox	EC:1.2.7.5	K03738	227.278	872.991	
	gck, gckA,	glycerate 2-kinas	EC:2.7.1.165	K11529	415.540	382.248	
	kdgK	2-dehydro-3-deox	EC:2.7.1.45	K00874	0.000	174.837	
	eda	2-dehydro-3-deox	EC:4.1.2.14 4.1.3	K01625	0.000	176.405	
	G6PD, zwf	glucose-6-phosph	EC:1.1.1.49 1.1.1	K00036	180.422	373.333	
	PGLS, pgl, devB	6-phosphoglucon	EC:3.1.1.31	K01057	116.711	11.280	
Pentose phosphate	PGD	6-phosphoglucon	EC:1.1.1.44 1.1.1	K00033	86.228	306.820	
	rpiA	ribose 5-phosphat	EC:5.3.1.6	K01807	632.918	93.959	
	hxlA	3-hexulose-6-pho	EC:4.1.2.43	K08093	434.442	0.000	
	hxlB	6-phospho-3-hexu	EC:5.3.1.27	K08094	439.653	44.818	
	rpe	ribulose-phosphat	EC:5.1.3.1	K01783	72.444	337.616	
	tktA, tktB	transketolase	EC:2.2.1.1	K00615	776.608	1346.788	
	talA, talB	transaldolase	EC:2.2.1.2	K00616	74.925	465.263	
Methanogenesis	ackA	acetate kinase	EC:2.7.2.1	K00925	0.000	295.434	
	pta	phosphate acetyl	EC:2.3.1.8	K00625	0.000	25.066	
	acs	acetyl-CoA synth	EC:6.2.1.1	K01895	1310.426	281.918	
	fwdA, fmdA	formylmethanofu	EC:1.2.7.12	K00200	0.000	0.578	
	ptr	formylmethanofu	EC:2.3.1.101	K00672	0.000	0.537	
Sulfur metabolism	Assimilatory sulfate reduction	sat	sulfate adenyltr	EC:2.7.7.4	K00958	0.000	507.059
		cysC	adenylsulfate ki	EC:2.7.1.25	K00860	2.071	285.933
		cysH	phosphoadenosin	EC:1.8.4.8/ 1.8.4.	K00390	4.952	204.357
	Dissimilatory sulfate reduction and oxidation	aprA	adenylsulfate re	EC:1.8.99.2	K00394	0.000	85.079
		aprB	adenylsulfate re	EC:1.8.99.2	K00395	0.000	72.689
		qmoA	quinone-modifying oxidoreductase,		K16885	0.000	74.924
		qmoB	quinone-modifying oxidoreductase,		K16886	0.000	84.525
		qmoC	quinone-modifying oxidoreductase,		K16887	0.000	87.162
		dsrA	dissimilatory sulfi	EC:1.8.99.5	K11180	0.000	143.628
		dsrB	dissimilatory sulfi	EC:1.8.99.5	K11181	0.000	116.807
		dsrN	cobyritic acid a,c	EC:6.3.5.9 6.3.5.	K02224	321.779	74.448
		dsrD	dissimilatory sulfite reductase D		no KO assigned	.	.
		dsrL	glutamate synthase		K00266	173.547	709.413
		dsrC	sulfurtransferase	EC:2.8.1.-	K11179	1.590	119.716
		dsrM	nitrate reductase	EC:1.7.5.1 1.7.99	K00374	2.350	35.973
		dsrK	(Fe-S)-binding protein		no KO assigned	.	.
	dsrE	sulfurtransferase	EC:2.8.1.-	K07235	84.986	0.000	
	dsrF	sulfurtransferase TusC		K07236	103.597	0.000	
	dsrH	sulfurtransferase TusB		K07237	93.026	0.000	
	SOX system	soxA	sulfur-oxidizing protein SoxA		K17222	4.563	14.931
		soxB	sulfur-oxidizing pi	EC:3.1.6.20	K17224	152.347	28.294
		soxY	sulfur-oxidizing protein SoxY		K17226	69.932	10.407
		soxZ	sulfur-oxidizing protein SoxZ		K17227	65.545	14.724
	Other related genes	cysE	serine O-acetyltr	EC:2.3.1.30	K00640	1.419	619.786
		cysM	cysteine synthase	EC:2.5.1.144	K12339	67.164	72.993
		sqr	sulfide:quinone ox	EC:1.8.5.4	K17218	2505.135	698.201
		ttrA	tetrathionate reductase subunit A		K08357	66.853	17.912
		ttrB	tetrathionate reductase subunit B		K08358	66.897	76.848
doxA		thiosulfate dehydr	EC:1.8.5.2	K16936	558.309	24.710	
doxD		thiosulfate dehydr	EC:1.8.5.2	K16937	788.383	24.710	

Pathway	Gene	Product	EC number	KO	Water	Sediment
Hydrogen metabolism	hydB	quinone-reactive	EC:1.12.5.1	K05922	0.000	35.060
	hydA	quinone-reactive	EC:1.12.5.1	K05927	0.000	27.882
	hypA	hydrogenase nickel incorporation p		K04651	233.994	32.456
	hypB	hydrogenase accessory protein		K04652	82.923	28.557
	hypC	hydrogenase assembly chaperone		K04653	112.149	30.681
	hypD	hydrogenase expression/formation		K04654	116.811	33.949
	hypE	hydrogenase expression/formation		K04655	676.046	31.909
	hypF	transcriptional regulatory protein		K04656	138.362	44.402
	hycl	hydrogenase 1 m	EC:3.4.23.-	K03605	125.483	28.901
	hyaC	Ni/Fe-hydrogenase 1 B-type cytochl		K03620	67.484	23.845
	hyfB	hydrogenase-4 cc	EC:1.-.-.-	K12137	77.471	52.512
	hyfE	hydrogenase-4 cc	EC:1.-.-.-	K12140	248.989	145.639
	hyfF	hydrogenase-4 cc	EC:1.-.-.-	K12141	228.159	176.075
Acid stress	TC.CPA1	monovalent cation:H+ antiporter, C		K03316	2.236	28.001
	TC.SSS	solute:Na+ symporter, SSS family		K03307	299.713	57.045
	kdpA	K+-transporting	EC:3.6.3.12	K01546	193.259	63.907
	kdpB	K+-transporting	EC:3.6.3.12	K01547	143.969	69.385
	kdpC	K+-transporting	EC:3.6.3.12	K01548	70.776	30.307
	kup	KUP system potassium uptake prot		K03549	1.240	40.964
	pstA	phosphate transport system permea		K02038	113.338	324.066
	pstB	phosphate transp	EC:3.6.3.27	K02036	134.515	386.198
	pstC	phosphate transport system permea		K02037	129.539	256.002
	pstS	phosphate transport system substra		K02040	100.555	321.274
	pdaD	arginine decarbox	EC:4.1.1.19	K02626	0.000	101.166
slc	sodium/hydrogen exchanger					
Heavy metal stress	arsA	arsenite/tail-anch	EC:3.6.3.16/ 3.6.:	K01551	77.149	97.248
	arsB	arsenical pump membrane protein		K03893	176.454	30.049
	arsC	arsenate reductas	EC:1.20.4.1	K03741	164.919	297.318
	arsR	ArsR family transcriptional regulat		K03892	84.419	511.116
	merA	mercuric reducta:	EC:1.16.1.1	K00520	370.104	100.917
	merR	MerR family transcriptional regulat		K08365	0.000	5.743
	copB	Cu2+-exporting	EC:3.6.3.4	K01533	598.612	33.030
	cusA	Cu(I)/Ag(I) efflux system membra		K07787	0.000	29.191
	cusB	membrane fusion protein, Cu(I)/Ag		K07798	0.000	8.550
	czcD	cobalt-zinc-cadmium efflux system		K16264	356.853	430.082
	TC.HAE1	hydrophobic/amphiphilic exporter-1		K03296	130.448	68.294
	acrA	membrane fusion protein, multidrug		K03585	1.437	48.511
	acrB	multidrug efflux pump		K18138	0.000	95.797
	ABC.CD.TX	HlyD family secretion protein		K02005	68.367	274.544
	tolC	outer membrane protein		K12340	0.944	53.224
	OZS1	C4-dicarboxylate transporter/malic acid transport protein				
	cdf	cation diffusion facilitator family transporter				
Transport	modA	molybdate transport system substra		K02020	146.055	81.345
	modB	molybdate transport system permea		K02018	106.390	30.557
	modC	molybdate transport system regulat		K02019	389.832	483.265
	nixA	high-affinity nickel-transport protei		K07241	466.748	321.270
	ABC.PE.A	peptide/nickel transport system AT		K02031	978.206	1583.502
	ABC.PE.A1	peptide/nickel transport system AT		K02032	603.761	1185.026
	ABC.PE.P	peptide/nickel transport system per		K02033	888.546	2321.846
	ABC.PE.P1	peptide/nickel transport system per		K02034	1090.258	2102.139
	ABC.PE.S	peptide/nickel transport system sub		K02035	519.555	7225.674
Oxidative stress	ahpC	peroxiredoxin (alk	EC:1.11.1.15	K03386	994.124	503.140
	trxB	thioredoxin reduc	EC:1.8.1.9	K00384	1756.477	923.543
	yhjA	cytochrome c551	EC:1.11.1.5	K00428	0.000	6.561
	prxQ	peroxiredoxin Q/IEC:	1.11.1.15	K03564	683.541	574.023
	trxA	thioredoxin 1		K03671	916.475	91.506
	tpx	thiol peroxidase, ε	EC:1.11.1.15	K11065	75.582	0.000
	fprB	rubrerythrin		K19824	74.511	0.000
	rubB	rubredoxin	EC:1.18.1.1	K05297	0.000	159.565

Pathway	Gene	Product	EC number	KO	Water	Sediment
NADH:quinone oxidoreductase, prokaryotes	nuoA	NADH-quinone oxidoreductase subunit A	EC:7.1.1.2	K00330	404.231	48.327
	nuoB	NADH-quinone oxidoreductase subunit B	EC:7.1.1.2	K00331	334.427	316.627
	nuoC	NADH-quinone oxidoreductase subunit C	EC:7.1.1.2	K00332	417.317	257.883
	nuoD	NADH-quinone oxidoreductase subunit D	EC:7.1.1.2	K00333	328.777	362.513
	nuoCD	NADH-quinone oxidoreductase subunit C/D	EC:7.1.1.2	K13378	182.174	11.415
	nuoBCD	NADH-quinone oxidoreductase subunit B/C/D	EC:7.1.1.2	K13380	0.000	0.000
	nuoE	NADH-quinone oxidoreductase subunit E	EC:7.1.1.2	K00334	70.549	574.471
	nuoF	NADH-quinone oxidoreductase subunit F	EC:7.1.1.2	K00335	124.043	994.068
	nuoG	NADH-quinone oxidoreductase subunit G	EC:7.1.1.2	K00336	205.557	422.357
	nuoH	NADH-quinone oxidoreductase subunit H	EC:7.1.1.2	K00337	425.298	389.790
	nuoI	NADH-quinone oxidoreductase subunit I	EC:7.1.1.2	K00338	391.427	95.473
	nuoJ	NADH-quinone oxidoreductase subunit J	EC:7.1.1.2	K00339	412.005	117.569
	nuoK	NADH-quinone oxidoreductase subunit K	EC:7.1.1.2	K00340	379.475	31.415
	nuoL	NADH-quinone oxidoreductase subunit L	EC:7.1.1.2	K00341	719.659	81.296
nuoM	NADH-quinone oxidoreductase subunit M	EC:7.1.1.2	K00342	202.349	403.146	
nuoN	NADH-quinone oxidoreductase subunit N	EC:7.1.1.2	K00343	537.058	76.578	
Succinate dehydrogenase, prokaryotes	sdhC, frdC	succinate dehydrogenase / fumarate reductase, cytochrome b subunit		K00241	328.896	71.235
	sdhD, frdD	succinate dehydrogenase / fumarate reductase, membrane anchor subunit		K00242	0.000	71.874
	sdhD, frdD	succinate dehydrogenase / fumarate reductase, subunit D		K18859	241.351	0.000
	sdhD, frdD	putative succinate dehydrogenase / fumarate reductase, subunit D		K18860	1.821	0.000
	sdhA, frdA	succinate dehydrogenase / fumarate reductase, flavoprotein subunit	EC:1.3.5.1 1.3.5.4	K00239	404.133	157.157
sdhB, frdB	succinate dehydrogenase / fumarate reductase, iron-sulfur subunit	EC:1.3.5.1 1.3.5.4	K00240	436.239	110.791	
Fumarate reductase, prokaryotes	frdA	fumarate reductase flavoprotein subunit	EC:1.3.5.4	K00244	0.000	0.000
	frdB	fumarate reductase iron-sulfur subunit	EC:1.3.5.4	K00245	0.000	0.000
	frdC	fumarate reductase subunit C		K00246	0.000	0.000
	frdD	fumarate reductase subunit D		K00247	0.000	0.000
Cytochrome c oxidase, prokaryotes	coxB, ctaC	cytochrome c oxidase subunit II	EC:7.1.1.9	K02275	14.370	2.652
	coxA, ctaD	cytochrome c oxidase subunit I	EC:7.1.1.9	K02274	1182.346	10.545
	coxC, ctaE	cytochrome c oxidase subunit III	EC:7.1.1.9	K02276	1.193	0.000
V/A-type ATPase, prokaryotes	ATPVA, ntpA, atpA	V/A-type H <sup>+</sup> /Na <sup>+</sup> -transporting ATPase subunit A	EC:7.1.2.2 7.2.2.1	K02117	410.092	487.235
	ATPVB, ntpB, atpB	V/A-type H <sup>+</sup> /Na <sup>+</sup> -transporting ATPase subunit B		K02118	498.600	444.894
	ATPVC, ntpC, atpC	V/A-type H <sup>+</sup> /Na <sup>+</sup> -transporting ATPase subunit C		K02119	3.600	390.090
	ATPVD, ntpD, atpD	V/A-type H <sup>+</sup> /Na <sup>+</sup> -transporting ATPase subunit D		K02120	294.068	406.607
	ATPVE, ntpE, atpE	V/A-type H <sup>+</sup> /Na <sup>+</sup> -transporting ATPase subunit E		K02121	512.264	0.000
	ATPVF, ntpF, atpF	V/A-type H <sup>+</sup> /Na <sup>+</sup> -transporting ATPase subunit F		K02122	383.241	351.749
	ATPVI, ntpI, atpI	V/A-type H <sup>+</sup> /Na <sup>+</sup> -transporting ATPase subunit I		K02123	387.247	659.249
	ATPVK, ntpK, atpK	V/A-type H <sup>+</sup> /Na <sup>+</sup> -transporting ATPase subunit K		K02124	292.766	423.102
Oxidative phosphorylation	ppk	polyphosphate kinase	EC:2.7.4.1	K00937	3.129	48.769
	ppk2	polyphosphate kinase	EC:2.7.4.1	K22468	1.603	55.233
	ppa	inorganic pyrophosphatase	EC:3.6.1.1	K01507	469.885	40.797
	ppaC	manganese-dependent inorganic pyrophosphatase	EC:3.6.1.1	K15986	0.000	250.084
	PMA1, PMA2	H <sup>+</sup> -transporting ATPase	EC:7.1.2.1	K01535	310.938	727.397