



BENEMÉRITA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE PUEBLA

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

ANÁLISIS MICROBIANO Y FUNCIONAL DE LAS MICROBIALITAS Y
TAPETES MICROBIANOS DE TRES LAGOS TIPO MAAR DE MÉXICO

Tesis para obtener el título de
LICENCIADO EN BIOLOGÍA

PRESENTA:

Bogdan Mundo Velázquez

DIRECTORA DE TESIS: Dra. Rocío Jetzabel Alcántara Hernández

ASESORES DE TESIS: Dra. Adriana Ramírez Vargas y M. en C.
Héctor Julio García Flores

Octubre 2020



Agradecimientos Institucionales

Esta investigación se realizó gracias al financiamiento otorgado por el Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica UNAM-DGAPA-PAPIIT IN121420, otorgado a la Dra. Rocio Jetzabel Alcántara Hernández.

A la Dra. Patricia Valdespino Castillo del Lawrence Berkeley National Laboratory, por el apoyo científico y técnico de para la obtención de algunas de las muestras analizadas en este estudio y conocimientos sobre su procesamiento.

Así mismo, se agradece a los revisores, quienes con su conocimiento y comentarios enriquecieron esta investigación.

Agradecimientos a título personal

Esta investigación se realizó gracias al financiamiento otorgado por el Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica UNAM-DGAPA-PAPIIT IN121420, otorgado a la Dra. Rocío Jetzabel Alcántara Hernández.

A la Dra. Patricia Valdespino Castillo del Lawrence Berkeley National Laboratory, por el apoyo científico y técnico de para la obtención de algunas de las muestras analizadas en este estudio y conocimientos sobre su procesamiento.

Así mismo, se agradece a los revisores, quienes con su conocimiento y comentarios enriquecieron esta investigación.

Índice general

Agradecimientos Institucionales	i
Agradecimientos a título personal	ii
Índice general.....	iii
Índice de figuras	iv
Índice de tablas	v
Glosario.....	vi
Resumen.....	vii
Abstract.....	ix
1. Introducción	1
2. Marco teórico	2
2.1. Tapetes microbianos litificados y no litificados.....	2
2.2. Microbialitas	4
2.3. Contexto astrobiológico de los tapetes microbianos y microbialitas.....	6
2.4. Metabolismo microbiano	8
2.4.1. Fijación de carbono.....	9
2.4.2. Ciclo biológico del nitrógeno y fijación de nitrógeno	10
2.5. Comunidades microbianas y la diversidad de metabolismos en tapetes microbianos.....	12
2.6. Lagos tipo mar	13
2.7. Herramientas moleculares para el estudio de las comunidades microbianas ..	15
2.7.1. El gen 16S rRNA como marcador para obtener filogenias	15
2.7.2. Extracción y purificación de ADN metagenómico	16
2.7.3. Secuenciación.....	17
3. Justificación	19
4. Estudios previos	20
5. Hipótesis.....	24
6. Objetivos.....	25
6.1. General	25
6.2. Específicos.....	25
7. Materiales y Métodos.....	26
7.1. Sitios de estudio.....	26
7.2. Colecta de muestras	28
7.3. Extracción de ADN y amplificación de fragmento 16S rRNA	29

7.4. Secuenciación y análisis bioinformático de los datos.....	29
8. Resultados.....	31
8.1. Secuencias 16S rRNA obtenidas.....	31
8.2. Diversidad alfa y beta.....	33
8.3. Composición de las comunidades.....	36
8.3.1. A nivel phylum.....	37
8.3.2. A nivel orden.....	39
8.3.3. Especies principales	40
8.4. Efecto del gradiente de profundidad sobre la comunidad bacteriana de Alchichica 41	
8.5. Efecto del gradiente salino-alcalino sobre las comunidades microbianas.....	44
8.6. Predicción funcional	45
9. Discusión	48
9.1. Litificación	50
9.2. Salinidad	51
9.3. Profundidad.....	53
10. Conclusiones.....	55
11. Bibliografía	56
12. Anexos	66
12.1. Extracción y cuantificación de ADN	66
12.2. Amplificación de fragmento 16S rRNA.....	66

Índice de figuras

Figura 1: Diagrama de flujo de la extracción de ADN y amplificación del gen 16S rRNA.	29
Figura 2: Curvas de rarefacción	33
Figura 3: Diversidad y uniformidad de los tapetes litificantes y no litificantes	34
Figura 4: Comparación estadística de la composición entre las muestras(PCoA y PERMANOVA).	35
Figura 5: Abundancias relativas a nivel dominio	37

Figura 6: Abundancias relativas a nivel phylum.	38
Figura 7: Abundancias relativas a nivel orden.....	40
Figura 8: : Comparación de la diversidad y uniformidad en las muestras de Alchichica (gradiente de profundidad)	42
Figura 9: PCoA de las muestras de Alchichica en un gradiente de profundidad.	43
Figura 10: Comparación de la diversidad y uniformidad de las muestras en un gradiente de salinidad	44
Figura 11: PCoA de las muestras de los tres lagos en un gradiente de profundidad. ...	45
Figura 12: Abundancia de los procesos de fijación de carbono y del ciclo del nitrógeno con respecto a un gradiente de profundidad, un gradiente de salinidad y al estado de litificación.....	47

Índice de tablas

Tabla 1: Rutas metabólicas de fijación de carbono en procariontes	10
Tabla 2: Reacciones de oxidación y reducción del nitrógeno.....	11
Tabla 3: Características físicas y químicas del agua de los tres lagos maar estudiados	14
Tabla 4: Resumen del tamizaje bioinformático de las muestras de este estudio.	31
Tabla 5: Especies bacterianas principales y sus abundancias relativas	41
Tabla 6: Resumen de los grupos microbianos encargados de fijar carbono y nitrógeno así como de los fotosintéticos anoxigénicos en los tres sitios de estudio	49

Glosario

Microbialita: estructura sedimentaria creada por microbios. Se refiere a las rocas de carbonato de calcio creadas por la actividad de tapetes microbianos.

Lago maar: se refiere a cuerpos de agua alojados en cráteres de origen volcánico (freatomagmático), lo cual les confiere características químicas especiales, por ejemplo pH básico o alta salinidad, dependiendo del tipo de rocas y productos volcánicos que hay en el sitio.

EPS: siglas de Extracellular Polimeric Substance. Es una sustancia de origen biológico que consiste en una matriz de sacáridos, proteínas y lípidos, la cual permite la adhesión de más células, protege de la radiación UV e impide la rápida desecación de las células.

Acreción: crecimiento por adición de materia. Se refiere al crecimiento de las microbialitas por adición de la materia atrapada en la EPS o por las células microbianas que actúan como núcleos donde se solidifican los carbonatos.

COMAMMOX: acrónimo de Complete Ammonia Oxidation. Es una ruta metabólica del ciclo del nitrógeno que consiste en la oxidación del amonio y del nitrito catalizadas por las enzimas que produce la bacteria *Ca. Nitrospira inopinata*. Este organismo utiliza al amonio y al nitrito como donadores electrónicos para obtener energía y crecer. Anteriormente se había afirmado que la oxidación del amonio y del nitrito sólo podía realizarse por dos grupos diferentes de microorganismos: microbios oxidadores del amonio y bacterias oxidadoras del nitrito, respectivamente.

DNRA: siglas de Dissimilatory Nitrate Reduction to Ammonia. Es un proceso metabólico, enmarcado en el ciclo biológico del nitrógeno, donde el nitrato se reduce a nitrito y este último es reducido a amonio. Se realiza por diversas bacterias anaeróbicas quimiolitioautótrofas y heterótrofas que utilizan estos compuestos como aceptores electrónicos.

Resumen

El estudio de las microbialitas modernas y de los tapetes microbianos asociados a éstas, son temas centrales para la astrobiología. La estructura y funcionamiento de estos consorcios microbianos bénticos nos proveen de pistas para entender el origen de la vida y su establecimiento sobre la Tierra primitiva, así como para reconocer biofirmas en la búsqueda de vida en el sistema solar. Por estas razones, en la presente tesis se estudió la diversidad procariótica de los tapetes microbianos –litificados y no litificados– en tres lagos cratéricos tipo maar de Alchichica (Puebla), La Preciosa (Puebla) y Rincón del Parangueo (Guanajuato). Para esto se planteó la hipótesis de que las condiciones hidroquímicas y ambientales en los lagos maar –a lo largo de los gradientes de luz, salinidad y litificación– determinan la estructura de estas comunidades bacterianas, así como su potencial para fijar carbono (C) y, asimilar o fijar nitrógeno (N).

Mediante la secuenciación de la región V4 del gen 16S rRNA con la plataforma Illumina MiSeq y el procesamiento de las secuencias con QIIME2, se determinó que la diversidad filogenética microbiana aumenta conforme la cantidad de luz disminuye y también cuando la capacidad litificante está presente. En el gradiente de salinidad la diversidad filogenética mostró un patrón diferente ya que, a baja salinidad como en La Preciosa (2.2 mS/cm), el rango de valores para la diversidad es casi tan alto como el de Rincón de Parangueo (165 mS/cm) y tan bajo como el de Alchichica (13.28 mS/cm). Los gradientes de luz, litificación y salinidad parecen no tener efectos significativos sobre las abundancias de enzimas clave en procesos metabólicos del nitrógeno y fijación de carbono, tal como lo muestran las predicciones metabólicas de PICRUST2 y los resultados de las pruebas de Kruskal-Wallis. Por otra parte, las pruebas de PERMANOVA indican que la composición microbiana cambia conforme a los gradientes de luz, de salinidad y de litificación.

Lo anterior sugiere que en cada sitio de estudio existen comunidades microbianas con estructuras únicas que tienen capacidades metabólicas similares lo que les permite sobrevivir en entornos con poca luz y muy salinos. Las

comunidades de los tres lagos estuvieron conformadas principalmente por los phyla Cyanobacteria, Proteobacteria y Actinobacteria; cuya abundancia varía conforme a los gradientes estudiados. El gradiente de luz tiende a reducir la abundancia de los taxa fotodependientes mientras que la salinidad permite el aumento en la abundancia de organismos halófilos.

En conclusión, los tapetes litificantes son más diversos y uniformes que los no litificantes debido al gradiente fisicoquímico formado por la actividad metabólica de los organismos presentes. Por otro lado, la profundidad modifica la composición microbiana en las microbialitas permitiendo su diversificación lo que se refleja en los potenciales de fijación de carbono y de nitrógeno, cuya modulación depende de la cantidad de luz y de la salinidad en las microbialitas de los tres lagos maar mexicanos. Finalmente, la comunidad microbiana de cada lago está adaptada a las condiciones ambientales locales lo cual les permite a las comunidades diazotrófica y fotosintética producir amonio y compuestos orgánicos, respectivamente.

Abstract

Since the study of modern microbialites and microbial mats has implications for the understanding of the origin of life as well as for the formation of the Precambrian stromatolites in the early Earth and the search for extraterrestrial life in the solar system, in this work the microbial diversity and metabolic functional prediction of three microbial mats was analyzed along three environmental gradients named light, salinity and lithification. The microbialites were sampled from three Mexican maar lakes located at the Transvolcanic Mexican Belt (Puebla y Guanajuato). Using a metagenomic sequencing approach with the 16S rRNA as marker gene it was found that the diversity and community structure are modulated by the gradients above referred. The scarcity of light in the depth, the existence of lithification capacity as well as the high salinity in the microbial environment are factors that tend to increase the phylogenetic diversity of the samples as indicated by the Kruskal-Wallis test. In addition, the results from the PERMANOVA test and the PICRUST2 predictions suggest that all the communities have different structure but their taxonomical diversity allows for similar microbial diazotrophic and carbon fixation activities. In spite of these structural differences the phyla Cyanobacteria, Proteobacteria and Actinobacteria are the main groups in all samples. It was concluded that the lithifying mats are more diverse than the non-lithifying mats because the former one's metabolic activity creates a physical and chemical micro-gradient that allows for the lithification capacity. In the other hand the light gradient modifies the community microbial composition increasing the microbial diversity. This increase is modulated by the amount of light that the mats receive and the salinity of the water which is also reflected in the metabolic predictions for carbon fixation and diazotrophic activities. One final observation is the fact that each community is adapted to the local environmental conditions and this situation makes possible for the production of ammonia and organic compounds by the microbial mats even when the environmental conditions as the amount of light and salinity becomes more restrictive.

Key words: microbialite, microbial mat, functional prediction, metagenomics, maar lake, next generation sequencing, microbial diversity, community structure, salinity, lithification.

1. Introducción

Las microbialitas son consideradas unas de las primeras formas de vida microbiana en consorcio en la Tierra ya que los registros geológicos indican su presencia desde el Precámbrico (3.5 Ga) y son actualmente el registro fósil más antiguo de vida unicelular que se conoce (Lyons et al., 2015). Estas estructuras organosedimentarias se distribuyeron ampliamente sobre la superficie terrestre, especialmente durante el Arcaico. Pero actualmente, están confinadas a unos pocos lugares del mundo con características especiales, por lo que también se consideran sistemas extremos de estudio. Unas de estas áreas con microbialitas son los lagos maar situados sobre la Faja Transvolcánica Mexicana (FTM), los cuales están aglomerados en regiones como el Valle de Santiago en Guanajuato y la Cuenca Oriental en Puebla (Armienta et al., 2008; Kaźmierczak et al., 2011).

Los lagos maar de La Preciosa (Puebla), Alchichica (Puebla) y Rincón de Parangueo (Guanajuato), son sistemas acuáticos que cuentan con condiciones ambientales que favorecen los puntos de saturación para la formación de microbialitas, como una alta alcalinidad y concentración de iones (Stolz, 2000; Armienta et al., 2008). Esto permite el establecimiento de las comunidades procariontes litificantes dominadas por cianobacterias y proteobacterias (Dupraz et al., 2009).

Así mismo, los metabolismos procariontes de las microbialitas están íntimamente asociados con los ciclos biogeoquímicos del carbono (C) y nitrógeno (N), debido a que ambos elementos son importantes para la formación de biomoléculas esenciales para la vida. Estos metabolismos dependen de la composición de la comunidad microbiana que, generalmente, está conformada en su mayoría por los phyla Cyanobacteria, Proteobacteria, Acidimicrobiales y Bacteroidetes. En México, Centeno et al. (2012) realizaron un estudio de la diversidad bacteriana en microbialitas de diversos sistemas como lagos, lagunas, y lagos tipo maar; donde observaron que el pH y la salinidad influyen en la estructura de las comunidades microbianas. Sin embargo, a la fecha no hay un

estudio más detallado de cómo sucede esta variación en los lagos tipo maar de México. Por ello, en este estudio se plantea la hipótesis de que las condiciones hidroquímicas y ambientales en los lagos maar –a lo largo de los gradientes de luz, salinidad y litificación– determinan la estructura de estas comunidades bacterianas, así como su potencial para fijar C y asimilar o fijar N.

Los métodos microbiológicos independientes de cultivo se han usado en años recientes para estudiar a estas comunidades sésiles bénticas (Breitbar et al., 2009; Couradeau et al., 2011; entre otros). Este enfoque ha tenido gran auge debido al desarrollo de herramientas computacionales y de secuenciación, capaces de generar y procesar cantidades masivas de datos por precios relativamente asequibles. También permite explorar la diversidad microbiana de sistemas complejos donde resulta difícil cultivar a los representantes de las comunidades microbianas, además de otorgar una gran cobertura de la diversidad bacteriana en estos sistemas. Otras ventajas de estos métodos es que posibilitan la secuenciación masiva en tiempos cortos y tienen una baja tasa de errores (Loman et al., 2012).

Consecuentemente, en este trabajo se estudiará la diversidad procarionte (bacterias y arqueas) en microbialitas desde una perspectiva independiente de cultivo, mediante la secuenciación masiva del marcador 16S rRNA, aportando al conocimiento de las microbialitas en lagos tipo maar de México.

2. Marco teórico

2.1. Tapetes microbianos litificados y no litificados

Los tapetes microbianos son comunidades de microorganismos que generalmente tienen una microestratigrafía, es decir, se dividen en estratos generados por gradientes en escalas micrométricas y debido a la gran diversidad taxonómica y metabólica que presentan pueden denominarse casi autosustentables (Stolz, 2000). La disposición en la estratificación de estos grupos funcionales de microorganismos depende de los

gradientes físicos, químicos y ambientales del medio que les rodea. Stolz (2000) menciona que las características físicas como la luz, la temperatura y la tasa del flujo del agua alrededor del tapete; así como las características químicas como la salinidad, el pH, la concentración de oxígeno, sulfuro, nitrito, hierro, carbono orgánico disuelto, el potencial de oxido-reducción y la alcalinidad del agua influyen en la formación de estas comunidades sésiles bénticas.

Drupaz et al. (2005) mencionan la existencia de seis gremios microbianos principales que conforman las capas de los tapetes microbianos:

I) Los fotótrofos oxigénicos, representados principalmente por cianobacterias o microalgas, que realizan dos funciones primordiales para el conjunto de gremios microbianos: fijar dióxido de carbono usando la energía lumínica del sol y fijar el nitrógeno atmosférico en el caso de las cianobacterias. Otros servicios de este grupo son la gran producción de sustancias poliméricas extracelulares (EPS, por sus siglas en inglés de Extracellular Polymeric Substances), que sirven para la captura y unión de sedimentos que a su vez posibilita la acreción de la microbialita.

II) Los fotótrofos anoxigénicos, que incluyen a las bacterias verdes y azules que utilizan sulfuro de hidrógeno como donador electrónico. Algunos de ellos también fijan nitrógeno molecular.

III) Las bacterias heterótrofas aeróbicas, las cuales degradan la materia orgánica usando oxígeno como aceptor electrónico.

IV) Los fermentadores, los cuales transforman la materia orgánica usando compuestos orgánicos como aceptores electrónicos.

V) Los heterótrofos anaeróbicos, que son principalmente bacterias reductoras del sulfato y desnitrificantes que degradan la materia orgánica a la par que respiran sulfato o nitrato, y que producen sulfuro de hidrógeno o gases de nitrógeno, respectivamente.

VI) Las bacterias oxidantes del azufre, que son las que oxidan compuestos reducidos de azufre usando oxígeno o nitrato como aceptores electrónicos, mientras fijan dióxido de carbono.

La presencia de los organismos fotoautótrofos y la existencia de un gradiente químico muy pronunciado entre las capas del tapete son características esenciales de estos ecosistemas. La existencia de un gradiente químico pronunciado permite la existencia de especies microbianas particulares en un espacio muy reducido, con una amplia variedad taxonómica y metabólica. Por otra parte, los organismos fotoautótrofos, además de ser los productores primarios, capturan sedimentos mediante la producción de EPS. Esta captura y unión de sedimentos es un proceso importante en la producción de estructuras órgano-sedimentarias o estructuras litificadas como las microbialitas (Brigmon et al., 2008; Stolz, 2000). La capacidad litificante de los tapetes microbianos depende entonces de la producción de EPS y del Índice de Saturación (SI) del medio, los cuales se controlan directamente por la radiación UV, cantidad de luz, temperatura, concentración iónica, el pH y la cantidad de nutrientes (Dupraz et al., 2009; Dupraz et al., 2005).

2.2. Microbialitas

Las microbialitas son estructuras órgano-sedimentarias construidas principalmente de carbonatos y formados por las secciones microbianas litificantes de los tapetes, mediante la captura y unión de partículas sedimentarias o fungiendo como sitios donde ocurre la precipitación mineral (Kaźmierczak et al., 2011; Ragon et al., 2014; Saghaï et al., 2015; Shen et al., 2008). De acuerdo a su estructura, las microbialitas se clasifican en: estromatolitos (formados por capas de carbonatos apiladas una sobre otra), trombolitos (estructura grumosa no estratificada), microbialitas dendriformes (ramificadas), oncolitos (con laminación concéntrica), entre otros (Riding, 1999; Shen et al., 2008).

Los estromatolitos son estructuras sedimentarias laminadas principalmente producidas por tapetes microbianos litificantes aunque también existe una contribución minoritaria por precipitación abiótica (Dupraz et al., 2005; Riding, 2011; Tewari et al., 2011). Los estromatolitos producidos por tapetes microbianos calcificantes se dividen en

los de grano fino y los de grano grueso aglutinado. En los primeros, los microentramados dominantes están constituidos por gránulos finos de micrita y microespatos, que son generalmente grumosos y peloidales, producidos por bacterias heterótrofas que calcifican mediante EPS; y filamentos producidos por la acumulación de microfósiles tubiformes de cianobacterias embebidos en matrices de gránulos finos. Los estromatolitos de grano grueso aglutinado tienen macroentramados toscamente laminados y se forman por la captura de sedimentos arenosos en las EPS (Riding, 2011).

A diferencia de los estromatolitos, los trombolitos son estructuras sedimentarias con un macroentramado grumoso y no laminado, que a su vez está formado de un microentramado interno de grumos embebidos en una matriz detrítica. Los trombolitos se clasifican en: i) aquellos formados por microbios calcificados, en donde los grumos se ordenan de acuerdo a un armazón compuesto de micro-fósiles calcificados, tienen formas ameboides o dendríticas, además de estar rodeados por sedimentos detríticos; y ii) trombolitos de grano grueso aglutinado constituidos por sedimentos arenosos capturados por microbios embebidos en una matriz granular más delgada y endurecida mediante la actividad microbiana (Riding, 2011).

Las microbialitas son estructuras litificadas que se producen mediante el proceso conocido como precipitación de carbonatos. Aunque este proceso puede existir de forma abiótica (Dupraz et al., 2005), los microorganismos de las microbialitas también realizan mediante la captura y unión de partículas (acreción biológica) (Burne et al., 1987), o como mediadores químicos del proceso (T. Zhu et al., 2016). Los principales microorganismos litificantes que se han reportado son: las cianobacterias (bacterias fotosintéticas oxigénicas), las bacterias fotótrofas anoxigénicas y las bacterias heterótrofas reductoras de sulfato (Ragon et al., 2014). Sin embargo, la formación de carbonatos de origen biológico sucede por la ocurrencia de diversas actividades metabólicas como la fotosíntesis, ureólisis, desnitrificación, amonificación, sulfato reducción y oxidación del metano (Rajasekar et al., 2017; X. Zhu et al., 2016). Además, la precipitación biótica puede

incluir otros minerales como los silicatos y sulfatos, que pueden coprecipitar con los carbonatos (Dupraz et al., 2005).

La precipitación de carbonatos inducida por microorganismos (PCIM) se define como la creación biológica de microambientes locales con las condiciones necesarias para la precipitación del carbonato. A la fecha, se han identificado cuatro factores principales que influyen en este proceso: i) la concentración de calcio en el medio, ii) la cantidad de carbono inorgánico disuelto en el medio, iii) la disponibilidad de sitios de nucleación y iv) el pH del medio, el cual depende del equilibrio químico entre el CO_2 y los iones bicarbonato (Dhami et al., 2014). La PCIM consiste en la unión química de aniones carbonato (CO_3^-) con cationes de calcio (Ca^{2+}) en la superficie exterior de los microorganismos. Los grupos funcionales de la membrana celular con cargas negativas posibilitan la adsorción de cationes como el Ca^{2+} , los cuales se unen con los iones $\text{HCO}_3^-/\text{CO}_3^{2-}$ para formar eventualmente los carbonatos cálcicos. De esta manera, la superficie celular funciona como sitio de nucleación en donde se forman las moléculas de carbonatos cálcicos (T. Zhu et al., 2016). Consecuentemente, la producción de EPS influye notablemente en la PCIM, ya que el EPS también contienen moléculas cargadas negativamente que atraen cationes. En una primera fase los cationes se unen y encapsulan en la matriz de las EPS e inhiben el proceso de PCIM; pero cuando el EPS se degrada los cationes de calcio alcanzan una alta concentración lo cual permite la precipitación de carbonatos (Dupraz et al., 2005; T. Zhu et al., 2016).

2.3. Contexto astrobiológico de los tapetes microbianos y microbialitas

El entendimiento sobre la diversidad microbiana actual y los factores ambientales que la modifican son herramientas usadas en estudios enfocados en el origen y evolución de la vida terrestre. La búsqueda de vida fuera del planeta Tierra y los posibles cambios a futuro en la vida terrestre actual son tópicos que conforman el campo de estudio de la astrobiología (Hays et al., 2015), por lo que los tapetes microbianos actuales son modelos que sirven para explicar la dinámica pasada y presente, tanto de la vida terrestre como de la que existe potencialmente más allá de la Tierra. Además, es posible

pronosticar las posibles respuestas de estas comunidades ante cambios ambientales mayores que se aproximan como es el caso del constante calentamiento global y la acidificación de los océanos. (Foster et al., 2010).

La interacción entre los microorganismos y su ambiente es la idea central de la investigación astrobiológica. Estas interacciones resultan a partir del acoplamiento de los metabolismos microbianos con los ciclos geoquímicos terrestres de forma que la diversidad microbiana de los tapetes regula los ciclos del carbono, nitrógeno, azufre, etc. Al mismo tiempo, la disponibilidad de estos elementos es el factor limitante que moldea a las comunidades biológicas en cuanto su estructura espacial, temporal y composicional (Hays et al., 2015).

Los tapetes microbianos litificantes actuales son parecidos a los tapetes que dieron origen a las microbialitas del registro fósil, las cuales se consideran como las huellas de vida más antiguas que se conocen (de hasta 3.5 mil millones de años) (Benzerara et al., 2014; Foster et al., 2010). Se piensa que los ambientes que ocupan hoy estas comunidades microbianas son análogos a los ambientes de la Tierra primitiva (Foster et al., 2010), y por ello representan una oportunidad para resolver el enigma del origen de la vida y su evolución temprana. Por ejemplo, Shagai et al. (2015) mencionan que la litificación causada por la fotosíntesis anoxigénica y la sulfato reducción en zonas poco oxigenadas del tapete son fenómenos análogos al de las microbialitas del periodo Precámbrico (3 - 0.5 mil millones de años) que existieron antes de que aumentaran los niveles de oxígeno en la atmósfera. Esta hipótesis es mencionada por Kaźmierczak et al. (2011) para el lago de Alchichica y por Chacón et al. (2018) para el exlago de Rincón de Parangueo.

Por otro lado, los tapetes microbianos permiten saber dónde y cómo buscar vida fuera de la Tierra. El examen minucioso de cómo los metabolismos actuales encajan con los ciclos biogeoquímicos sientan un precedente terrestre que sirve de modelo para buscar biofirmas en planetas extraterrestres. Lo anterior, aunado al descubrimiento de los estadios pasados del ambiente terrestre, permite ampliar la gama de lugares, fuera del planeta Tierra, donde es probable que la

vida microbiana se esté desarrollando o donde es muy probable que lo haya hecho (Hays et al., 2015).

Por último, la comprensión del acoplamiento entre los metabolismos y los ciclos geoquímicos nos permite saber cómo responde la vida microbiana ante perturbaciones ambientales como el exceso de nitrógeno o el aumento del dióxido de carbono atmosférico. Estos fenómenos, de origen principalmente humano, son un posible escenario más en la gama de condiciones planetarias donde pudiera haber vida (Foster et al., 2010).

2.4. Metabolismo microbiano

El metabolismo es el conjunto de procesos bioquímicos dentro de las células, necesarios para obtener energía e incrementar la cantidad de biomasa (Fenchel et al., 1988; Konhauser, 2007). Estos procesos se clasifican en dos grandes grupos: catabólicos y anabólicos. El catabolismo implica la degradación de macromoléculas en monómeros y en la obtención de una parte de la energía almacenada en los enlaces químicos de estas moléculas. Mientras que, el anabolismo ocurre en sentido contrario, donde se construyen moléculas más grandes invirtiendo energía para unir los monómeros (Fenchel et al., 2012).

En la diversificación de la vida unicelular se desarrollaron una serie de estrategias para obtener energía a partir de reacciones de oxido-reducción (redox), dependiendo de la disponibilidad de sustratos, lo que ocurrió principalmente durante el Arcaico (Moore et al., 2017; Sousa et al., 2013).

Cualquier tipo de vida terrestre utiliza alguna forma de transporte electrónico para obtener energía, la diferencia radica en la manera de obtener los donadores electrónicos. Esto es que, mientras que en la fototrofia los electrones se obtienen de la energía lumínica, en la quimiotrofia los electrones se obtienen a partir de moléculas orgánicas (quimioorganotrofia) o inorgánicas (quimiolitotrofia) (Konhauser, 2007).

2.4.1. Fijación de carbono

La capacidad de fijación de C es un tipo de metabolismo desarrollado durante el Arcaico como una estrategia para sintetizar C-biomásico a partir de fuentes inorgánicas como el CO_2 o el HCO_3^- (Konhauser, 2007). Esta capacidad surgió en la vida procarionte y después se heredó a microalgas y plantas (Margulis, 1981). La quimioautotrofia y la fototrofia son los únicos tipos de metabolismo que tienen la capacidad de fijar carbono inorgánico (Falkowsky, 2012).

Los organismos quimioautótrofos incorporan el carbono inorgánico sin necesidad de una fuente lumínica; usan sustancias inorgánicas como el H_2S , NH_4^+ o Fe^{2+} para obtener energía. Este tipo de metabolismo es muy común en ambientes sin oxígeno, como en los sedimentos o en columnas de agua anóxicas con poca luz (Konhauser, 2007). En cambio, los organismos fotoautótrofos usan fotones como fuente de energía para fijar CO_2 o HCO_3^- en compuestos orgánicos. Las cianobacterias son los únicos procariontes que utilizan clorofila como compuesto fotosintético para producir oxígeno gaseoso mediante la ruptura de moléculas de agua. Este proceso se conoce como fotosíntesis oxigénica. Los demás organismos fotosintéticos son anaerobios que, al emplear donadores electrónicos no oxigenados, no pueden producir oxígeno como subproducto, por lo tanto, se le conoce como fotosíntesis anoxigénica. Además, estos microorganismos fotosintéticos utilizan bacterioclorofilas como pigmentos fotosintéticos (Falkowsky, 2012).

Actualmente existen seis rutas bioquímicas para producir compuestos orgánicos a partir de carbono inorgánico (CO_2 ó HCO_3^-) (Fenchel et al., 2012; Hügler et al., 2011) que se resumen en la tabla 1.

Tabla 1: Rutas metabólicas de fijación de carbono en procariontes. Se muestran las enzimas clave que participan en cada ruta y los phyla de procariontes que la poseen. (Modificado de Zarzycki et al. 2009).

Vía metabólica	Enzima clave	Phylas que lo presentan
Ciclo reductivo de la pentosa fosfato (Calvin-Benson-Bassham)	RubisCO	Cyanobacteria, Proteobacteria, Firmicutes y Chloroflexi
Ciclo reverso de ácido tricarboxílico (Arnon-Buchanan)	Piruvato sintasa, fosfoenolpiruvato carboxilasa, ATP-citrato liasa, 2-oxoglutarato sintasa, fumarato reductasa, isocitrato deshidrogenasa	Chlorobi, Proteobacteria, Nitrospirae y Aquificae (Aquificales)
Vía reductora del acetil-CoA (Wood-Ljungdahl)	Piruvato sintasa, fosfoenolpiruvato carboxilasa, ATP-citrato liasa, 2-oxoglutarato sintasa, fumarato reductasa, isocitrato deshidrogenasa	Euryarchaeota, Spirochaetes, Planctomycetes, Firmicutes y Proteobacteria
Biciclo 3-Hidroxipropionato	CO deshidrogenasa / acetil-CoA sintasa, formato deshidrogenasa, piruvato sintasa	Chloroflexi
Ciclo 3-Hidroxipropionato / 4-hidroxibutirato	Acetil-CoA carboxilasa, Propionil-CoA carboxilasa, Malil-CoA/β-metilmalil-CoA/Citramalil-CoA (MMC) liasa	Chrenarchaeota
Ciclo Dicarboxilato / 4-hidroxibutirato	Acetil-CoA carboxilasa, propionil-CoA carboxilasa, 4-hidroxibutiril-CoA deshidratasa.	Chrenarchaeota

2.4.2. Ciclo biológico del nitrógeno y fijación de nitrógeno

Este ciclo consiste en una serie de reacciones redox del nitrógeno en presencia de enzimas procariontes específicas. Salvo por la asimilación de nitrógeno, varios pasos de este ciclo son llevado a cabo exclusivamente por procariontes; aunque también existen reportes de hongos capaces de reducir óxido nitroso (Shoun et al., 1992). En un primer paso, podría considerarse a la fijación de nitrógeno cuando una molécula de N₂ es convertida en amoníaco y se usa para crear biomasa; este amonio se libera cuando la biomasa se descompone (Kuypers et al., 2018). El amonio es luego oxidado de forma aeróbica o anaeróbica (nitrificación y comammox) para producir NO₂⁻ o N₂, respectivamente. La hidroxilamina es un producto intermedio en la oxidación aeróbica del amonio que posteriormente es oxidado hasta nitrito. Por último, el nitrito es oxidado hacia nitrato que es una de las formas más oxidadas del nitrógeno (Ward, 2012). Estas reacciones químicas están plasmadas en la Tabla 2.

La desnitrificación es la reducción escalonada del NO_3^- hasta N_2 . Primeramente, el nitrato es usado en la respiración de algunos microorganismos para producir nitrito (Kuypers et al., 2018). Éste es reducido a óxido nítrico el cual puede ser subsecuentemente reducido a óxido nitroso y finalmente a N_2 . Alternativamente, el nitrato/nitrito puede ser reducido directamente a amonio mediante el proceso conocido como reducción no asimilatoria del nitrito (DNRA, por sus siglas en inglés, Dissimilatory Nitrate Reduction to Ammonium).

Tabla 2: Las principales reacciones químicas que llevan al nitrógeno molecular hasta su estado más oxidado (nitrato) y su posterior reducción hacia amonio o nitrógeno molecular. Modificado de Kuypers et al. (2018).

Fijación de nitrógeno molecular	$\text{N}_2 + 8\text{e}^- + 8\text{H}^+ + 16\text{ATP} \rightarrow 2\text{NH}_3 + \text{H}_2 + 16\text{ADP} + 16\text{Pi}$
Oxidación de amonio hacia hidroxilamina	$\text{NH}_4^+ + \text{O}_2 + 2\text{e}^- + \text{H}^+ \rightarrow \text{NH}_2\text{OH} + \text{H}_2\text{O}$
Oxidación de hidroxilamina hacia óxido nítrico	$\text{NH}_2\text{OH} \rightarrow \text{NO} + 3\text{e}^- + 3\text{H}^+$
Oxidación de óxido nítrico hacia nitrito	$\text{NO} + \text{H}_2\text{O} \rightarrow \text{NO}_2^- + \text{e}^- + 2\text{H}^+$
Oxidación de nitrito hacia nitrato	$\text{NO}_2^- + \text{H}_2\text{O} \rightarrow \text{NO}_3^- + 2\text{e}^- + 2\text{H}^+$
Reducción de nitrato hacia nitrito	$\text{NO}_3^- + 2\text{e}^- + 2\text{H}^+ \rightarrow \text{NO}_2^- + \text{H}_2\text{O}$
Reducción de nitrito hacia amonia	$\text{NO}_2^- + 6\text{e}^- + 8\text{H}^+ \rightarrow \text{NH}_4^+ + 2\text{H}_2\text{O}$
Reducción de nitrito hacia óxido nítrico	$\text{NO}_2^- + \text{e}^- + 2\text{H}^+ \rightarrow \text{NO} + \text{H}_2\text{O}$
Reducción de óxido nítrico hacia óxido nitroso	$2\text{NO} + 2\text{e}^- + 2\text{H}^+ \rightarrow \text{N}_2\text{O} + \text{H}_2\text{O}$
Reducción de óxido nitroso hacia nitrógeno molecular	$\text{N}_2\text{O} + 2\text{e}^- + 2\text{H}^+ \rightarrow \text{N}_2 + \text{H}_2\text{O}$

La fijación de nitrógeno es una estrategia de supervivencia procarionte cuyo origen es anterior a la oxigenación de la atmósfera terrestre, (hace aproximadamente 2.4 mil millones de años). Lo anterior se refleja en la poca o nula afinidad de la nitrogenasa hacia el oxígeno y en la separación espacio temporal entre la fotosíntesis oxigénica y la fijación de N_2 dentro de algunas células cianobacterianas. El nitrógeno atmosférico se incorpora a la biomasa en forma de proteínas y ácidos nucleicos cuando se reduce y se transforma en amonio por acción de la metaloenzima nitrogenasa. Esta enzima se distribuye ampliamente en Bacteria y Archaeae debido a que precede al evento de divergencia entre los dos linajes (Berman-Frank et al., 2003). El proceso de fijación de nitrógeno está acoplado a la producción de energía, ya que para fijar una molécula de N_2 se requieren 16 moléculas de ATP (Kuypers et al., 2018; Stal et al., 2010).

Esta capacidad de proveer formas solubles de nitrógeno a partir de N₂ también la tienen otros grupos bacterianos como Proteobacteria o Bacteroidetes (Bacteroidales) (Inoue et al., 2015; Severin et al., 2012). Sin embargo, las cianobacterias (Cyanobacteria) han desarrollado varias estrategias metabólicas para incorporar N₂ a las células, enfocadas en resolver el problema de la inhibición de la nitrogenasa por la presencia de O₂ resultado de la fotosíntesis oxigénica. Para hacerlo, las cianobacterias han separado a la nitrogenasa del oxígeno mediante una partición temporal de ambos procesos; como en *Plectonema boryanum*, *Phormidium* spp. y algunas especies de *Pseudoanabaena* (todas ellas carentes de heterocistos). Otras cianobacterias que no necesitan heterocistos ni un ambiente microaeróbico para fijar N₂ son *Symploca*, *Lyngbya majuscula*, *Gleothoece* y *Cyanothece*. La diferenciación de los heterocistos del resto de células constituye la estrategia de separación espacial entre la fotosíntesis oxigénica y la fijación de N₂, como en el género *Mastigocladus*. Estas células diferenciadas tienen una membrana gruesa que aminora el paso de O₂ y que carecen de capacidad fotosintética oxigénica, así como reproductiva; por lo que se les considera son una innovación de los procariontes con respecto a la estrategia de separación temporal surgida anteriormente (Berman-Frank et al., 2003).

2.5. Comunidades microbianas y la diversidad de metabolismos en tapetes microbianos

Las comunidades biológicas son conjuntos de organismos de diferentes especies que mantiene simbiosis entre sí y que tienen las propiedades de estar estructuradas en el espacio-tiempo así como de tener gremios de organismos que realizan funciones particulares (Begon et al., 2006; Morin, 2011). Los tapetes microbianos son comunidades estratificadas en microgradientes (Foster et al., 2011) donde cada capa contiene grupos de microbios particulares, cuya distribución se determina principalmente por la cantidad y calidad de la luz que reciben (Dupraz et al., 2009; Dupraz et al., 2005).

De manera general, la superficie verde azulada de los tapetes está dominada por cianobacterias, seguida por una capa rojiza compuesta por bacterias púrpuras del azufre y en la capa subsecuente hay bacterias verdes del azufre. Las capas más profundas de

los tapetes son generalmente negras y contienen sulfuros de hierro, pirita y carbono orgánico; además, pueden tener intercaladas bandas grises que contienen materia orgánica en menor proporción y sedimentos (Dupraz et al., 2009).

Aunque la cantidad de especies presentes en un tapete es ingente, Dupraz et al. (2009) definen siete grupos metabólicos o gremios principales que conforman a los tapetes microbianos: 1) fotolitoautótrofos, 2) quimioorganoheterótrofos aeróbicos, 3) fermentadores, 4) heterótrofos anaeróbicos, 5) oxidantes del azufre, 6) fotótrofos anoxigénicos, y 7) metanógenos.

Entre estos gremios existe un acoplamiento energético de manera que los autótrofos convierten el carbono inorgánico en orgánico; este carbono orgánico luego es tomado por los quimioorgano-heterótrofos que lo oxidan rápidamente acabando las reservas de O₂. Es en este momento cuando los organismos anaerobios son capaces de llevar a cabo sus funciones metabólicas. Por su parte, los organismos heterótrofos y fermentadores degradan moléculas orgánicas de gran tamaño para convertirlas en compuestos de menor peso molecular que usan los organismos reductores del sulfato y los metanogénicos (Dupraz et al., 2009).

2.6. Lagos tipo mar

Un lago maar es cualquier volcán monogenético cuya génesis se atribuye a erupciones freáticas o freatomagmáticas (Chacón et al., 2018). Estos lagos se forman cuando se calienta el agua de mantos freáticos por un flujo de magma, resultando en erupciones explosivas sobre la superficie (Armienta et al., 2008; Decker et al., 2006). Los cráteres resultantes de estas explosiones generalmente se llenan de agua formando un lago. Los lagos maar y los anillos de tufa son formas volcánicas relacionadas entre sí. Un maar es un cráter con el fondo aplanado y que tiene un anillo de escombros formados por rocas nativas, mientras que un anillo de tufa se forma por múltiples corrientes piroclásticas que añaden material rocoso nuevo pero también material nativo, alrededor de un cráter (Decker et al., 2006).

La composición química del agua en estas cuencas depende de los procesos de dilución o concentración de los minerales presentes en función de la cantidad de lluvia, la evaporación, las condiciones redox del sitio, el aporte de agua subterránea hacia el lago y la composición de las rocas (Paternoster et al., 2016).

La distribución de los lagos maar en el mundo coincide con la distribución de las zonas volcánicas activas. En estas zonas existen campos volcánicos donde es común que el magma interactúe con el agua superficial o subterránea debido a la subsidencia entre las placas tectónicas (Graettinger, 2018). Los lagos maar en México se distribuyen principalmente a lo largo de la Faja Transvolcánica Mexicana (FTM) debido a la actividad volcánica de la región impulsada por la subducción de las placas de Cocos y Rivera bajo las placas de Norteamérica y del Caribe. Los volcanes de esta Faja se distribuyen en latitudes entre 19 y 20° N cruzando el país en dirección E-O; y algunos de éstos albergan lagos aun cuando todavía están activos (Armienta et al., 2008).

Los lagos maar estudiados en esta tesis se ubican en dos zonas de la FTM. Por un lado, el Exlago de Rincón de Parangueo se sitúa en el campo volcánico Valle de Santiago, perteneciente al campo volcánico de Michoacán y Guanajuato; mientras que, los lagos de Alchichica y La Preciosa están en el campo volcánico Serdán-Oriental de Puebla (Cano-Cruz et al., 2008; Graettinger, 2018).

Tabla 3: Características físicas y químicas del agua de tres lagos maar: Alchichica y La Preciosa (Puebla) y el exlago Rincón de Parangueo (Guanajuato). Construida con datos de Caballero et al., 2003; Armienta et al., 2008; Alcocer et al., 2010; Kaźmierczak et al., 2011; Sigala et al., 2017; Torres-Huesca, 2018 y Alcocer, 2017.

Lago	Profundidad (m)	pH	T (°C)	C.E (mS cm ⁻¹)	O ₂ (umol/L)	Na ⁺ (mg/L)	K ⁺ (mg/L)	Ca ²⁺ (mg/L)	Mg ²⁺ (mg/L)	HCO ₃ ⁻ (mg/L)	Cl ⁻ (mg/L)	SO ₄ ²⁻ (mg/L)	CO ₃ ²⁻ (mg/L)	NO ₂ ⁻ (umol/L)	NO ₃ ⁻ (umol/L)	PO ₄ ³⁻ (umol/L)	NH ₄ ⁺ (umol/L)	Iones dominantes
Alchichica	10	8.89	18.3	13.28	213	2369	223	6	435	1162	3673	1090	1317	0.65	0.97	1.58	0.98	Cl ⁻ , Na ⁺
	20	8.89	15.3	13.28	97	2335	222	6.7	435	1164	3642	1095	1278	1.74	3.23	0	0	
	26	8.88	14.8	13.28	41	2426	223	6.3	435	1160	3787	1088	1239	1.74	5	0.53	0	
La Preciosa	0.5	8.6	17.8	2.2	-	190	18	14	200	491	330	139	170	-	-	-	-	HCO ₃ ⁻ , Mg ²⁺
Rincón de Parangueo	0.5	10.2	18.1	165	-	4250	5070	-	-	12000	64000	76	40000	-	-	-	-	NaCl, NaCO ₃ , NaHCO ₃

2.7. Herramientas moleculares para el estudio de las comunidades microbianas

2.7.1. El gen 16S rRNA como marcador para obtener filogenias

Los ribosomas son estructuras celulares de proteínas y ácidos ribonucleicos que se componen por dos subunidades, siendo éstas la 30S y la 50S en procariontes, y cuya interacción constituye un paso importante en el proceso de la síntesis proteínica. La subunidad 50S está compuesta por las cadenas de ARN ribosomal (rRNA, por sus siglas en inglés) 5S y 23S más 31 proteínas; mientras que la subunidad 30S se compone por el 16S rRNA más 21 proteínas. El gen que codifica para el componente 16S es utilizado en estudios metagenómicos para delinear perfiles bacterianos mediante su secuenciación masiva (Mandigan, 2015; Ramazzotti et al., 2018).

El ribonucleótido 16S rRNA tiene cerca de 1,500 pares de bases, en cuya estructura se identifican nueve regiones hipervariables (V1-V9) (Martinez-Porchas et al., 2017; Ramazzotti et al., 2018).

Zhang et al. (2017) mencionan que es difícil secuenciar completamente el gen 16S rRNA, mientras que Martinez-Porchas et al. (2017) afirman que la generación de estas secuencias tiene una baja relación costo-rendimiento. Por esta última razón el estudio de este gen para la generación de clasificaciones taxonómicas es una herramienta viable para estudiar la ecología de comunidades microbianas. El reducido tamaño de las secuencias generadas por secuenciación masiva (100-400 pb) y las diferencias en capacidad informativa de las regiones hipervariables son factores limitantes para la construcción de clasificaciones taxonómicas. Aunque a la fecha se ha considerado que esta información es suficiente en el contexto de los estudios de diversidad microbiana independientes de cultivo. Consecuentemente, el marcador 16S rRNA es uno de los más empleados en estos estudios desde los 1990s, además de que se cuentan ya con bases de datos de comparación que cada día se incrementan y se actualizan (por ejemplo, GreenGenes o SILVA).

2.7.2. Extracción y purificación de ADN metagenómico

La extracción y purificación de material genético se puede clasificar en tres grandes pasos (Green et al., 2012):

1) Lisis celular, que consiste en romper las membranas y paredes celulares para exponer el material citoplasmático mediante una combinación de detergentes iónicos, agentes caotrópicos y la combinación de una sustancia básica con detergentes iónicos (lisis química). Este procedimiento también puede apoyarse de la lisis enzimática, empleando proteínas como la proteinasa K y lisozima; así como de la lisis mecánica mediante perlas de vidrios u otro material.

2) La liberación del ADN del resto del material celular y la remoción de proteínas ligadas al material genético, así como la inactivación de nucleasas intracelulares. Este paso se puede realizar con extracciones secuenciales de fases orgánicas/acuosas con solventes como cloroformo y fenol; también pueden emplearse algunas sales y compuestos químicos que coprecipitan impurezas.

3) La remoción de sales y obtención del ADN. Este paso se puede hacer mediante el uso de alcoholes como etanol o isopropanol combinado con sales como el acetato de sodio (CH_3COONa) 3M o NaCl 6M, las cuales favorecen la precipitación del ADN. Tras varios lavados para remover las sales y centrifugaciones para obtener el ADN, se pueden obtener los ácidos nucleicos deseados. Actualmente también existen pasos de purificación con columnas de sílica, las cuales primeramente retienen el ADN y permiten lavados que eliminan las sales e impurezas; y luego el ADN es recuperado por elución en agua o en un amortiguador que preserva los ácidos nucleicos.

Cuando se obtiene ADN de una sola cepa se conoce como ADN genómico y cuando el ADN se obtiene de una muestra con consorcios de microorganismos lo conocemos como ADN metagenómico. Esta extracción permite tener todos los ácidos nucleicos representativos de la comunidad y es un paso crítico para el estudio de la diversidad de sistema complejos. Consecuentemente, en la actualidad se han mejorado los protocolos y estandarizados para que los resultados sean representativos de los diversos sistemas de estudio.

2.7.3. Secuenciación

Las herramientas de Secuenciación de “Siguiete Generación” o secuenciación masiva (NGS, por sus siglas en inglés) tienen dos variantes principales: i) aquellas que necesitan un proceso de amplificación de genes microbianos previo a la secuenciación para lo cual se emplea un marcador genético específico; y ii) aquellas que no necesitan tal proceso (Shokralla et al., 2012). El método más empleado por su factibilidad, precio y capacidad de comparación entre sistemas de estudio es el de amplificación de secuencias 16S rRNA, el cual se usa ampliamente para describir la diversidad procariótica en muestras ambientales complejas.

A la fecha existen varias tecnologías de secuenciación masiva que ofrecen diferentes características y ventajas, así como desventajas o contratiempos. Entre estas tecnologías están las plataformas 454 Roche (pirosecuenciación), Ion Proton, Illumina, PacBio, etc. (Loman et al., 2012). Sin embargo, entre los más empleados en los estudios de diversidad están Illumina (MiSeq y HiSeq) y Roche 454.

La tecnología de la plataforma Illumina, se basa en un proceso de secuenciación por síntesis y usa la amplificación tipo puente para la generación de piezas de ADN secuenciables. El proceso de secuenciación de Illumina se puede dividir en cuatro pasos principales (Illumina Inc, 2016):

i) Preparación de las muestras. Las piezas de ADN generadas mediante amplificación de PCR, a partir de las muestras metagenómicas, tienen que ser procesadas con la finalidad de añadirles adaptadores específicos en los extremos de las cadenas de ADN para que sean reconocidas en el paso siguiente. La adición de estos adaptadores se hace mediante la amplificación de ciclo reducido o en el primer paso de generación de las piezas de ADN. En este paso también se pueden agregar los identificadores o barcodes a cada muestra con el fin de identificarlas en el tamizaje final de análisis de las secuencias.

ii) Generación de clusters. Esta parte del procedimiento se realiza en placas que tiene carriles de cristal, donde se anclan oligonucleótidos delanteros y

reversos a los que se unen (mediante los adaptadores del paso anterior) los amplicones de las bibliotecas a secuenciar. Para este paso es necesario que los amplicones de doble cadena de las librerías se desnaturalicen en amplicones monocatenarios con el fin de hibridarlos con los oligonucleótidos anclados al cristal. Estos oligos funcionan como cebadores para volver a formar una molécula de ADN de doble cadena usando como moldes a los amplicones de las bibliotecas.

Los amplicones molde se remueven después de haberse copiado y las monocadenas de ADN resultantes son usadas para generar un grupo de moléculas con moldes idénticos mediante amplificación isotermal. Estas monocadenas se doblan hasta que el extremo 3' se hibrida con un oligonucleótido pegado al cristal (formando una especie de puente) para después copiarse mediante la alternación cíclica de tres amortiguadores químicos a 60°C.

El paso final consiste en remover una de las dos cadenas de ADN, separándolas en el punto de clivaje de los oligonucleótidos; así como bloquear los extremos 3' con didesoxinucleótidos para evitar que se hibriden con otros oligonucleótidos anclados al cristal (Buermans et al., 2014).

iii) Secuenciación. Este paso consiste en la amplificación de las monocadenas de ADN creadas en el paso anterior, usando una DNA polimerasa y desoxiribonucleótidos trifosfato (dNTP) fluorescentes. Durante la amplificación, la incorporación de cada nucleótido es escaneada y una vez hecho esto, el siguiente dNTP se incorpora a la cadena creciente para volver a ser escaneado hasta que la cadena nueva alcanza una determinada longitud. Luego la cadena nueva se remueve y el proceso continúa hasta que la cadena procedente del paso anterior es completamente copiada. El proceso anterior se hace primero con las monocadenas de ADN reversas (generadas a partir de los amplicones de las librerías) para después hacerlo con las cadenas delanteras.

Para este paso se requiere la incorporación de los cuatro tipos de dNTP, los cuales están dotados de moléculas fluorescentes que emiten una señal específica para cada dNTP al momento de ser excitados por una fuente lumínica externa. Estas moléculas fluorescentes también inhiben la incorporación del siguiente nucleótido hasta que la luz que emiten sea escaneada. Una vez escaneado el dNTP, la molécula fluorescente se

desprende, permitiendo la incorporación de la siguiente base (Buermans et al., 2014; Shokralla et al., 2012).

iv) Análisis de los datos

Las lecturas de secuencias delanteras y reversas se agrupan complementariamente y después se acomodan. Estas secuencias se procesan con ordenadores para depurar la información (Shokralla et al., 2012). El programa principal para lecturas del 16S rRNA, es QIIME2 (Quantitative Insights Into Microbial Ecology), que corre sobre GNU/Linux y tiene interfaz de línea de comandos (Bolyen et al., 2019). Este programa se asocia con varios algoritmos para procesar, filtrar, separar, alinear y hacer árboles filogenéticos a partir de las secuencias 16S rRNA obtenidas.

3. Justificación

Las comunidades microbianas de las microbialitas son un interesante objeto de estudio, ya que se han relacionado con el surgimiento de la vida unicelular en la Tierra durante el Arcaico y a la posible existencia de vida en otros sitios del universo. Las microbialitas que se desarrollan en sistemas salinos alcalinos, como los lagos tipo maar, son relevantes por las características fisicoquímicas del sistema acuático. Esto debido a que, la vida terrestre pudo haberse originado en océanos cuyas concentraciones de sales eran dos veces mayores a las de los océanos actuales (Westall et al., 2015) y además existían zonas de este océano primitivo en donde el pH rondaba entre 9 y 11 por la interacción del agua hipersalina con las rocas del sitio (Arndt et al., 2012). Por lo anterior, existe la hipótesis de que las características fisicoquímicas de los lagos maar actuales se asemejan a las condiciones de la Tierra primitiva bajo las cuales pudo haberse originado la vida.

Por otro lado, las microbialitas formadas durante el Precámbrico Arcaico (hace 3.5 mil millones de años) fueron una forma de vida sésil béntica exitosa

cuando en la Tierra dominaba una atmósfera reductora y existían escasos nutrientes, principalmente derivados del vulcanismo. Westall et al. (2015) han señalado que lo más probable es que estos ecosistemas antiguos hayan sido sustentados inicialmente por organismos fotosintéticos anoxigénicos capaces de fijar carbono debido a la atmósfera reductora imperante en ese tiempo. Asimismo, los estromatolitos fósiles presentan morfoides similares a las cianobacterias, las cuales contribuyeron a la oxigenación de la atmósfera mediante la fotosíntesis oxigénica (Bekker et al., 2004; Catling et al., 2005; Czaja, 2010); encausando el cambio redox de la atmósfera terrestre hace aproximadamente 2.4 - 2.2 mil millones de años. Estas cianobacterias son también claves en la fijación de carbono. Consecuentemente, las microbialitas resultan un excelente modelo de estudio de la coexistencia de microorganismos fotótrofos anoxigénicos y oxigénicos y pueden ayudar a entender los metabolismos de fijación de carbono y nitrógeno que sostienen la biomasa microbiana en sistemas análogos a la vida durante el Arcaico.

En sintonía con lo anterior, este trabajo se centra en estudiar la diversidad microbiana en microbialitas y tapetes microbianos de lagos tipo maar muestreados en un gradiente de salinidad, luz y litificación. Con ello, se plantea entender cuáles son las diferencias en la estructura de la comunidad en estos gradientes, así como cuáles son los organismos fotótrofos oxigénicos y anoxigénicos junto con sus mecanismos principales de fijación de carbono y asimilación/fijación de nitrógeno que pueden estar manteniendo a la comunidad.

4. Estudios previos

Existen varios estudios sobre las microbialitas en los lagos maar, especialmente en México. Las más estudiadas son aquellas del lago Alchichica (pH 8.9, conductividad eléctrica: 1.3 S/m). Tavera et al. (1996) describieron a los cianoprocariontes presentes en las microbialitas, la columna de agua y el bentos de Alchichica, mediante microscopía

óptica. En este estudio, ellos encontraron que *Nodularia* cf. *spumigena* es la única especie que habita en la columna de agua y otras cuatro en el bentos, como *Chamaesiphon halophilus*, *Heteroleibleinia profunda*, *Mantellum rubrum* y *Xenococcus candelariae*; mientras que las microbialitas tuvieron una mayor diversidad incluyendo los géneros *Aphanocapsa*, *Aphanothece*, *Calothrix*, *Chroococcidium*, *Chroococcus*, *Entophysalis*, *Leptolyngbya*, *Rivularia* y *Trichormus*. Con ello, se demostró que las microbialitas albergaban una mayor diversidad de fotótrofos oxigénicos y que eran diferentes al entorno en el que se desarrollaban.

Más adelante, Couradeau et al. (2011) caracterizaron a las microbialitas de Alchichica en un gradiente de profundidad (0.5, 4 y 14 m), mediante un análisis de bibliotecas de ADN ribosomal de la subunidad pequeña proveniente de Archaea, Bacteria, Cyanobacteria y Eukarya. Los resultados mostraron que las muestras de las tres profundidades estuvieron dominadas por Cyanobacteria, grupo que decrece en abundancia conforme aumenta la profundidad; además de que encontraron algunas alfa-proteobacterias. La abundancia de Actinobacteria aumentó a mayor profundidad; mientras que, Bacteroidetes y Chloroflexi disminuyeron. El phylum Firmicutes sólo fue detectado a 14 m, y sugieren que, la diversidad de este grupo heterotrófico aumenta con la profundidad. Finalmente, estos resultados también muestran que en cuanto a Cyanobacteria, las muestras de 0.5 y 4 m están dominadas por el orden Oscillatoriales, seguido de Gleobacterales y Pleurocapsales; mientras que Pleurocapsales claramente domina a 14 m de profundidad, seguido de Acaryochlorales, Oscillatoriales y Chroococcales. Sin embargo, hay mayor uniformidad en la distribución de abundancia de especies en las microbialitas a 14 m de profundidad.

Benzerara et al. (2014) también describieron la diversidad microbiana del lago Alchichica en un gradiente de profundidad (hasta 14 m), donde se confirmó que Cyanobacteria, algas verdes y diatomeas son los principales organismos fotosintéticos oxigénicos. Por otro lado, miembros de Alphaproteobacteria y Chloroflexi son los principales representantes de las bacterias fotosintéticas anoxigénicas, las cuales cambian su abundancia conforme a la profundidad.

Otros trabajos en torno a las comunidades microbianas de las microbialitas de Alchichica confirman esta dominancia de Cyanobacteria y la poca abundancia de Archaea (<1%) (Centeno et al. 2012; Saghai et al. 2015), donde paralelamente se han observado procesos de fijación de N₂ por cianobacterias de los órdenes Nostocales, Oscillatoriales y Chroococcales; así como por miembros de la clase Alphaproteobacteria (Alcántara-Hernández et al., 2017); y además se ha encontrado que estos procesos están altamente acoplados con la fotosíntesis (Beltrán et al., 2012). Dentro de los organismos con capacidades litificantes, Saghai et al. (2015) encontraron que entre el 15 y 35% de las secuencias 16S rRNA corresponden a linajes que potencialmente pueden contribuir a la litificación, entre los cuales hay fotosintetizadores oxigénicos y anoxigénicos. El resto de las secuencias corresponden a grupos microbianos no fotosintéticos, probablemente heterótrofos que realizan respiración aeróbica, anaeróbica o fermentadores. Los organismos fotosintéticos anoxigénicos alcanzaron abundancias de aproximadamente 15%, siendo menos abundantes a 15 m de profundidad. Finalmente, los sulfato-reductores alcanzaron proporciones de hasta 20% en las muestras superficiales tomadas al norte; mientras que, en el resto de las muestras se registraron abundancias menores.

El primero en comenzar a caracterizar a las cianobacterias de Alchichica en un gradiente de profundidad más amplio (3, 10, 20 y 30 m) fue Águila-Salgado (2018) mediante microscopía y el marcador genético 16S rRNA. Sus resultados de microscopía muestran que, a profundidades de 3 m, las cianobacterias dominantes son *Calothrix* cf. *parietina*, *Chroococcidium gelatinosum*, *Entophysalis atrata*, *Leptolyngbya* sp., *Oculatella* sp. y *Rivularia* sp. A 10 m de profundidad encontró *Chroococcidiopsis* sp., *Chroococcidium gelatinosum*, *Entophysalis atrata*, *Leptolyngbya* sp., *Oculatella* sp., *Phormidium* sp. y *Stanieria* sp. A 20 m, *Chlorogloea* sp., *Chroococcidiopsis* sp., *Entophysalis atrata*, *Nodosilinea* sp., *Pleurocapsa* sp., *Stanieria* sp. y *Xenococcus candelaria*. Mientras que, en la profundidad de 30 m se halló *Chroococcidium gelatinosum*, *Pleurocapsa* sp. y *Xenococcus candelaria*.

Para el lago La Preciosa (pH 8.6, conductividad eléctrica 0.22 S/m), existe menos información. Callieri et al. (2013), secuenciaron los genes 23S y 16S rRNA del género *Synechococcus* (Cyanobacteria) en Alchichica y La Preciosa en un gradiente de

profundidad, encontrando cepas de este género en La Preciosa a 5 y 15 m de profundidad, y en Alchichica a 2 y 20 m de profundidad. De forma similar, Ragon et al. (2014), buscaron poblaciones de *Gleomargarita lithophora* y *Synechococcus calcipolaris* G9 (Cyanobacteria) en microbialitas de Alchichica y La Preciosa; ambos organismos fueron identificados en el lago La Preciosa sin embargo en Alchichica sólo se detectaron secuencias asociadas a *Gleomargarita* (Cyanobacteria) a 1 m de profundidad.

Por su parte, Cortéz-López (2016) describió a los cianoprocariontes de microbialitas en Rincón de Parangueo mediante micrografías, donde encontraron 14 géneros pertenecientes a 3 órdenes de cianobacterias: Chroococcales, Nostocales (con sólo una especie: *Nostoc* sp.) y Oscillatoriales. En Chroococcales, encontraron a las familias: Chroococcaceae, con las especies *Cyanosarcina* sp., *Gloeocapsopsis cyanea*, *G.* sp1 y *G.* sp2; Hyellaceae, con *Pleurocapsa fusca*, *P. hansgirgiana*, *P. minor* y *Radaisia* sp.; Merismopediaceae, con *Aphanocapsa salina* y *A.* sp. 2; Microcystaceae, con *Chondrocystis schauinslandii* y *C. dermochroa*; Synechococcaceae, con *Aphanothece castagnei*, *A.* cf. *saxicola* y *Gloeothece* sp.; Xenococcaceae, con *Chroococcidiopsis* cf. *kashaii*, *C. fissurarum* y *C. gelatinosum*; en el orden Oscillatoriales se identificaron a las familias: Phormidiaceae, con *Phormidium papyraceum*; Pseudanabaenaceae, con *Leptolyngbya* sp1 y *L.* sp2; y a la familia Schizotrichaceae, con *Schizothrix arenaria* y *Schizothrix* sp.

Sánchez (2018) analizó, mediante técnicas independientes de cultivo, la diversidad del gen 16S rRNA en microbialitas y tapetes microbianos no litificantes de Rincón de Parangueo. Sus resultados muestran que los phyla claramente dominantes, en ambos tipos de comunidades, son Cyanobacteria y Proteobacteria; seguidos de Actinobacteria, Bacteroidetes, Planctomycetes, Firmicutes y Deinococcus-Thermus para las microbialitas; y de Bacteroidetes, Planctomycetes, Chloroflexi y Spirochaetes para los tapetes no litificantes. La autora ofrece datos sobre las familias y géneros que componen a las microbialitas y a los tapetes microbianos no litificantes. Xenococcaceae fue encontrada como

la familia de cianobacterias dominante en las microbialitas, mientras que Pseudoanabaenaceae domina en los tapetes no litificantes. El género *Rhodobaca* (Proteobacteria), aunque en menor proporción que las cianobacterias, está presente en ambos tipos de comunidades en cantidades relativamente considerables. Los demás grupos encontrados, tanto en microbialitas como en tapetes no litificantes, son: Nitriliruptoraceae (Actinobacteria), *Synechococcus* y *Nodularia* (Cyanobacteria), *Halorhodospira* y *Mesorhizobium* (Proteobacteria) y *Bacillus* (Firmicutes).

Por último, Sánchez-Sánchez et al. (2019) encontró especies anteriormente reportadas en ambientes alcalinos: *Roseinatronobacter monicus* (Alphaproteobacteria), *Rhodobaca barguzinensis* (Alphaproteobacteria), *Nitriliruptor alkaliphilus* (Actinobacteria), *Mongoliibacter ruber* (Cyclobacteriaceae), *Psychroflexus salis* y *Cacembia lonarensis*. Esto demuestra la diferencia entre los sistemas litificantes y no litificantes, sin embargo, sus resultados pueden estar ligeramente sesgados, debido a que su proceso de extracción dependió de una técnica de dispersión-centrifugación que puede derivar en una pérdida de diversidad.

Dado lo anterior, se sabe que entonces sí hay información sobre las comunidades microbianas de las microbialitas de los lagos maar de Alchichica, La Preciosa y Rincón de Parangueo. Sin embargo, pocos estudios se han realizado con la misma técnica de extracción y secuenciación que permitan la comparación factible de los resultados, lo cual se propone en este estudio. Así mismo, se propone el uso de esta información para realizar inferencias funcionales sobre el potencial de fijación de C y la asimilación/fijación de N, y observar las tendencias de estos rasgos en los diferentes gradientes estudiados.

5. Hipótesis

I) Los tapetes litificantes son diferentes de los no litificantes (muestreados en mismo maar), en cuanto a diversidad y composición microbiana; siendo los primeros los más diversos.

II) Los gradientes de profundidad y salinidad modifican la diversidad y composición microbiana de los tapetes microbianos en los lagos maar. Por ejemplo, a mayor profundidad, habrá menor abundancia de bacterias fotosintéticas oxigénicas; así como a mayor salinidad, existirán menor diversidad de éstas.

III) En todos los tapetes litificantes y no litificantes estudiados existen comunidades procarióticas con la capacidad de fijación de C y asimilación/fijación de N pero su abundancia varía acorde al grado de litificación y salinidad a la que se encuentren.

6. Objetivos

6.1. General

Caracterizar la diversidad procariótica de los tapetes microbianos (litificados y no litificados) en los lagos cratéricos tipo maar de Alchichica (Puebla), La Preciosa (Puebla) y Rincón del Parangueo (Guanajuato); y observar sus diferencias en un gradiente de salinidad, luz y litificación.

6.2. Específicos

Analizar la diversidad procarionte en microbialitas mediante la secuenciación masiva del gen 16S rRNA (región V4).

Determinar las diferencias de las estructuras de las comunidades procarióticas.

Comparar la abundancia de los metabolismos clave para la formación de biomasa, como las rutas de fijación de carbono y asimilación/fijación de nitrógeno, mediante predicción funcional.

7. Materiales y Métodos

7.1. Sitios de estudio

Los tres sitios de estudio de la presente tesis se encuentran distribuidos en el Valle de Santiago, Guanajuato (Rincón de Parangueo) y en la Cuenca de Oriental del estado de Puebla (Alchichica y La Preciosa). Estos lagos pertenecen al sistema de lagos salados endorréicos de la Faja Tranvolcánica Mexicana (Kaźmierczak et al., 2011) y cuentan con diferentes características fisicoquímicas (Tabla 3). Actualmente, el lago de Rincón de Parangueo se ha visto afectado por la extracción de agua de sus alrededores, por lo que ya se puede denominar un exlago.

Lago Alchichica

El lago cratérico Alchichica se ubica en el municipio de Tepeyahualco, Puebla (19°24'N 97°24'O), a una altitud de 2320 metros sobre el nivel del mar (m.s.n.m.). Tiene un área de 2.26 km² y con una profundidad máxima de 66 m (Kaźmierczak et al., 2011; Valdespino-Castillo et al., 2017). El clima del sitio es semiseco templado (BS1k'w) con una precipitación anual de 400 mm. La temperatura del agua fluctúa entre los 14° y 22° C, con una temperatura media anual de 13.9° C (Armienta et al., 2008; Sigala et al., 2017).

El lago se formó por una sola explosión freática durante el Pleistosceno (2.58-0.0117 millones de años) y se clasifica como un lago tipo maar. En este lago ocurre un periodo de estratificación de las aguas desde abril a diciembre, y un periodo de circulación de enero a marzo (Valdespino-Castillo et al. 2017). Se considera que es un lago oligo-mesotrófico, dependiendo de la temporada hidrodinámica (Sigala et al. 2017). La forma de este lago es circular con un diámetro de 1,733 m en dirección sureste-noroeste. La profundidad, con respecto a la distancia desde la costa, aumenta de manera pronunciada debido a la gran inclinación de las seis paredes del cráter que están configuradas de manera opuesta y simétrica. Las paredes albergan a la plataforma más

profunda (60 m) situada en la zona este del lago y orientada de noreste a sureste (Arredondo-Figueroa et al., 1983).

Las entradas de agua hacia el lago ocurren por precipitación y por un flujo de agua subterránea rica en iones de calcio y carbonatos (Kaźmierczak et al. 2011). La entrada de agua rica en sodio proveniente del material volcánico, y la entrada de agua con bicarbonatos proviene de rocas calizas cretácicas y de la evaporación del agua por el clima seco de la región. Éstos, son los principales elementos que determinan la composición química del agua (Caballero et al., 2003).

Lago La Preciosa

La Preciosa se ubica en el municipio de Guadalupe Victoria, Puebla (19°22'N 97°23'O), a una altitud de 2330 m.s.n.m. Tiene un área de 0.78 km², con una profundidad máxima de 45 m. El clima del sitio es semiseco templado (BS1k'w) con una precipitación anual de 500 mm y la temperatura del agua fluctúa entre los 16 y 23 °C (Armienta et al. 2008). Este lago es producto de tres explosiones freáticas durante el Pleistoceno, se clasifica también como lago tipo maar y se comporta como monomíctico cálido. Tiene forma triangular, con una longitud máxima de 1,344 m orientada de noreste a suroeste. En la zona noreste hay un aumento en la profundidad que es inversamente proporcional a la distancia desde la orilla; mientras que en la zona suroeste la pendiente es menor (Arredondo-Figueroa et al., 1983). Existen pocos estudios microbiológicos en este lago, por lo que se sabe poco de su biodiversidad.

Exlago Rincón de Parangueo

El exlago-cratérico de Rincón de Parangueo está en el municipio de Valle De Santiago, Guanajuato, en la región central-oeste del Eje Neovolcánico Transversal Mexicano. Se ubica en las coordenadas 20°25'N 101°15'O, a una

altitud de 1700 msnm (Alcocer, 2017). Se formó hace menos de 137 mil años (Chacón et al., 2018) por una explosión freática y tiene un área de 0.74 km², con una profundidad máxima de 2 m (en el año 1995 fue de 7.5 m), y actualmente sólo cuenta con unas pozas. Tiene una forma elíptica, cuyo diámetro mayor mide 1 km y el menor 0.913 km (Alcocer, 2017). El clima del lugar es templado con luvias en invierno (Cw), y con una precipitación anual de 600 a 800 mm. La temperatura del agua fluctúa entre los 19 y 23 °C (Armienta et al. 2008).

7.2. Colecta de muestras

En Alchichica (97° 23' 51.64" W, 19° 25' 5.62" N; 2,303 msnm), La Preciosa (97° 23' 25.62" W, 19° 22' 20.96" N; 2,334 msnm) y Rincón de Parangueo (101° 14' 47.57" W, 20° 25' 53" N; 1683 msnm) se tomaron muestras de las microbialitas de forma manual, que se depositaron en tubos estériles, usando cincel aséptico y guantes de para evitar la contaminación. El trabajo de muestreo se realizó en Marzo de 2016 para La Preciosa por el Dr. Rafael López-Martínez (karstólogo y buzo científico); en octubre y noviembre de 2016 para Alchichica y Rincón de Parangueo, respectivamente, por la Dra. Patricia Valdespino-Castillo (investigadora especialista en biomineralización).

Las muestras fueron mantenidas en hielo durante su transporte al laboratorio (aprox. 5 h) y después congeladas a -20°C en un congelador Daigger modelo GLFC1526 hasta su procesamiento en febrero de 2018. De Rincón de Parangueo, se obtuvieron muestras de las pozas a 0.2 m de profundidad; de La Preciosa a 0.5 m de profundidad, y en el lago Alchichica a 10, 20 y 26 m de profundidad. Paralelamente, de Rincón de Parangueo se tomaron muestras de tapetes que se colocaron inmediatamente en medio BG11 (Águila- Salgado, 2018). Con estas muestras se representa un gradiente de salinidad (Rincón de Parangueo > Alchichica > La Preciosa), un gradiente de luz (Alchichica, 10 m > 20m > 26 m) y un cambio en la litificación (Rincón de Parangueo, sin litificar y litificado).

7.3. Extracción de ADN y amplificación de fragmento 16S rRNA

El proceso de extracción y purificación del ADN, así como el de amplificación del gen 16S rRNA se muestran esquematizados en la figura 1. Los detalles de cada paso en los procesos se describen en los anexos 12.1 y 12.2.

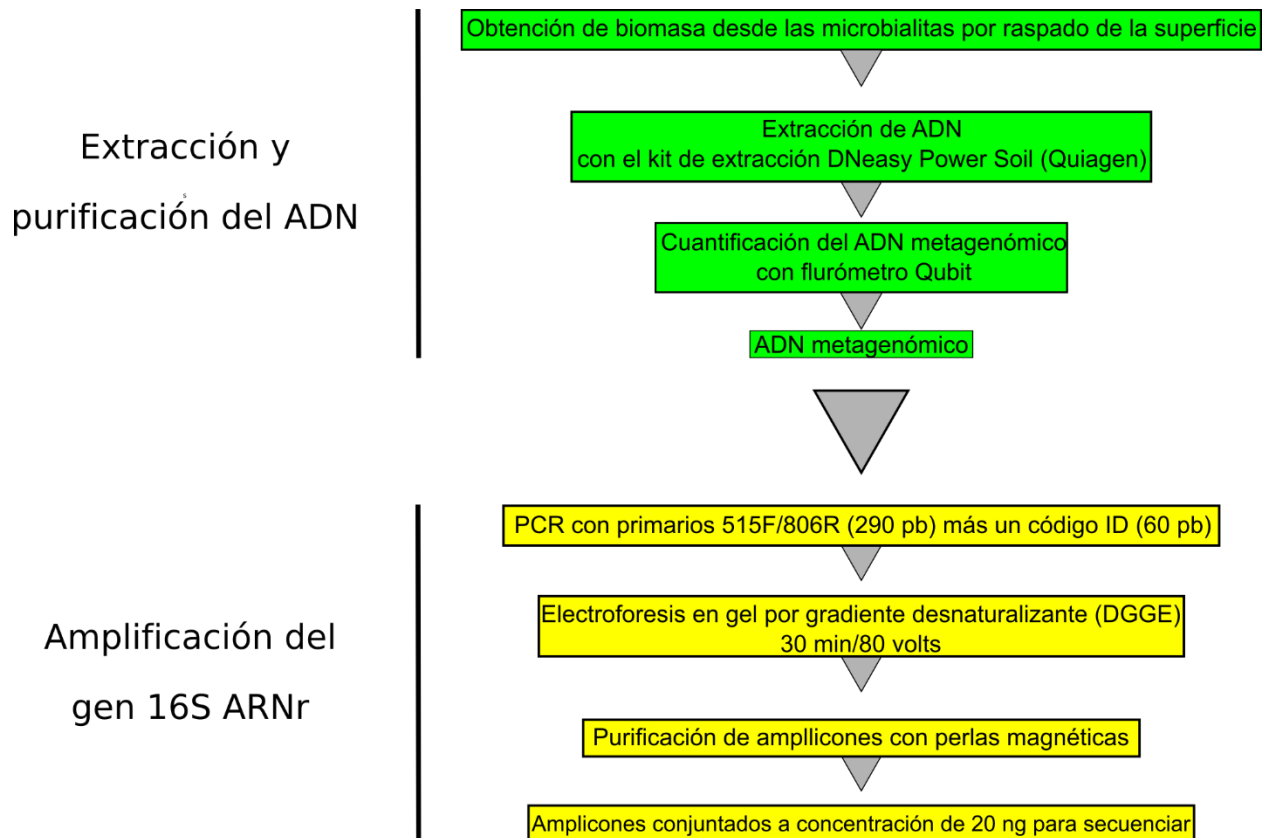


Figura 1: Diagrama de flujo que muestra el procedimiento de extracción y purificación del ADN (recuadros verdes), así como el proceso de amplificación del gen 16S ARNr a partir de ADN metagenómico (recuadros amarillos).

7.4. Secuenciación y análisis bioinformático de los datos

La secuenciación se hizo en el Centro Yale para el Análisis del Genoma (Universidad de Yale) mediante la plataforma Illumina MiSeq. Después, los archivos FASTQ resultantes se procesaron con la línea de comandos QIIME2 (Quantitative Insights Into Microbial Ecology 2) (Bolyen et al., 2019), iniciando con el comando `qiime tools import` para importar las secuencias crudas hacia dispositivos compatibles con el software. A continuación las secuencias se separaron en archivos correspondientes a cada muestra

(demultiplexación), usando el complemento q2-demux, con el comando qiime demux emp-paired, para posteriormente ser sometidas a un proceso de filtrado, eliminación de ruido y quimeras, así como a un proceso de fusión de las secuencias delanteras y reversas mediante la aplicación del método DADA2 (Callahan et al., 2016), usando el comando qiime dada2 denoise-paired. El resultado de DADA2 es la tabla de abundancias de secuencias variantes de amplicones la cual sirve de base para los análisis de diversidad. Estos análisis requieren la generación de un árbol filogenético el cual se hizo con el complemento q2-phylogeny, primero usando el comando qiime alignment mafft para alinear las secuencias, y luego el comando qiime alignment mask para eliminar el ruido generado por posiciones altamente variables en el alineamiento. Después, a partir del artefacto que contiene el alineamiento filtrado, se creó un árbol filogenético con el comando qiime phylogeny fasttree al cual se le asignó posteriormente una raíz con el comando qiime phylogeny midpoint-root.

Los análisis de diversidad se hicieron con el plugin q2-diversity. Para generar las medidas de diversidad y los análisis de coordenadas principales de éstas, se usó el comando qiime diversity core-metrics-phylogenetics con una profundidad de muestreo de 27,000 secuencias. Los cálculos de diversidad alfa se hicieron mediante el comando qiime diversity alpha-group-significance, que generó índices de uniformidad de Pieolu y de diversidad filogenética de Faith. Además, se hicieron pruebas de Kruskal-Wallis para comparar estos índices entre las muestras de los tres lagos. Por otro lado, las pruebas estadísticas de PERMANOVA para diversidad beta, se realizaron con el comando qiime diversity beta-group-significance.

Para los análisis taxonómicos, se usó un clasificador Bayesiano ingenuo preentrenado con la base de datos Greengenes 13_8 (DeSantis et al., 2006) para aplicarlos sobre la tabla de secuencias, mediante el comando qiime feature-classifier classify-sklearn. Posteriormente, se usó el comando qiime taxa-barplot para visualizar la composición de las comunidades mediante gráficas de barras.

Al final, se hizo la predicción funcional para los genes de fijación de carbono y nitrógeno mediante el complemento PICRUST2 (Phylogenetic Investigation of Communities by Reconstruction of Unobserved States) (Douglas et al., 2019). Se usó el

comando qiime fragment-insertion-sepp para posicionar las secuencias de 16S rRNA en un árbol filogenético de referencia. Luego se usó el comando qiime picrust2 custom-tree-pipeline para hacer la predicción funcional, utilizando el método de máxima parsimonia (mp). Una vez obtenidas las tablas de abundancias para las enzimas predichas, se identificaron aquellas enzimas clave del metabolismo energético de carbono y nitrógeno, graficando sus abundancias por cada muestra. La presencia de cada enzima se asumió como la presencia del proceso metabólico del que forman parte. Para definir si el potencial metabólico es similar entre las comunidades se realizaron análisis de Kruskal-Wallis con las abundancias enzimáticas predichas de las muestras con el software R (R core team, 2019) .

8. Resultados

8.1. Secuencias 16S rRNA obtenidas

A partir de la secuenciación del ADN metagenómico de las muestras en la plataforma Illumina MiSeq se inició el análisis de las secuencias 16S rRNA. Luego del proceso de demultiplexado se obtuvieron un total de 1,714,664 secuencias que después de filtrado de calidad y eliminación de secuencias quiméricas con DADA2, resultaron en 1,072,031 secuencias, representando un 62.5% de recuperación (Tabla 4). Las secuencias recuperadas se agruparon en 2,918 variantes de secuencias de amplicones o ASVs, por sus siglas en inglés (Amplicon Sequence Variant) que son equivalentes a las unidades bioinformáticas de secuencias con 100% de identidad nucleotídica. Finalmente, los tapetes microbianos litificantes mostraron un mayor número de ASVs (259-654) que los tapetes no litificantes (21-108).

Tabla 4: Resumen del tamizaje bioinformático de las muestras de este estudio. Todas las muestras se analizaron por triplicado salvo RPNL. El rubro de “Secuencias depuradas” muestra la cantidad de secuencias para cada réplica o muestra después del filtrado de calidad con el programa DADA2.

Sitio	Muestras	Litificación	Profundidad (m)	Secuencia Golay	Secuencias obtenidas	Secuencias depuradas	ASV's identificados
Alchichica	AL10.1	Sí	10	TCTAGCGTA	54458	36989	377
	AL10.2	Sí	10	GGCCACGTA	69227	50350	338
	AL10.3	Sí	10	GTCAATTGA	59960	46673	284
	AL20.1	Sí	20	GAAGTAGTC	130881	43063	654
	AL20.2	Sí	20	AGGCATCTT	59381	36161	506
	AL20.3	Sí	20	AATCAGTCT	95059	42826	585
	AL26.1	Sí	26	CCTCGTTCG	129573	66519	588
	AL26.2	Sí	26	TAGGATTGC	60716	27794	419
	AL26.3	Sí	26	TCGAGGACT	111724	45278	577
La Preciosa	LP1	Sí	0.5	TAGGAACTG	64964	40716	259
	LP2	Sí	0.5	ATGAGACTC	89370	57703	487
	LP3	Sí	0.5	GACGGAACC	85771	55574	414
Rincón de Parangueo	RPL1	Sí	0.5	GGAGACAAG	103309	65532	571
	RPL2	Sí	0.5	CCAGTGTAT	92560	54948	530
	RPL3	Sí	0.5	GCGATATAT	79000	50275	536
	RPNL1	No	0.5	CAGCTAGAA	76846	55325	59
	RPNL2	No	0.5	AATCCGTAC	98388	67449	108
	RPNL3	No	0.5	TGAGTCACT	189368	176051	21
	RPNL4	No	0.5	ATGTGCACG	64109	52805	49
Total	19				1714664	1072031	2918

Mediante curvas de rarefacción a un corte de 25,000 secuencias (Fig. 1) se comprobaron la profundidad de muestreo y los ASVs encontrados. La estabilización asintótica de las curvas sugiere que el esfuerzo de muestreo de secuencias 16S rARN fue suficiente para registrar la mayor cantidad de ASVs en los tapetes litificantes y no litificantes. Las muestras con mayor número de ASVs fueron las de tapetes litificantes (AL20>RPL>AL26>LP>AL10), seguidas de los tapetes no litificantes.

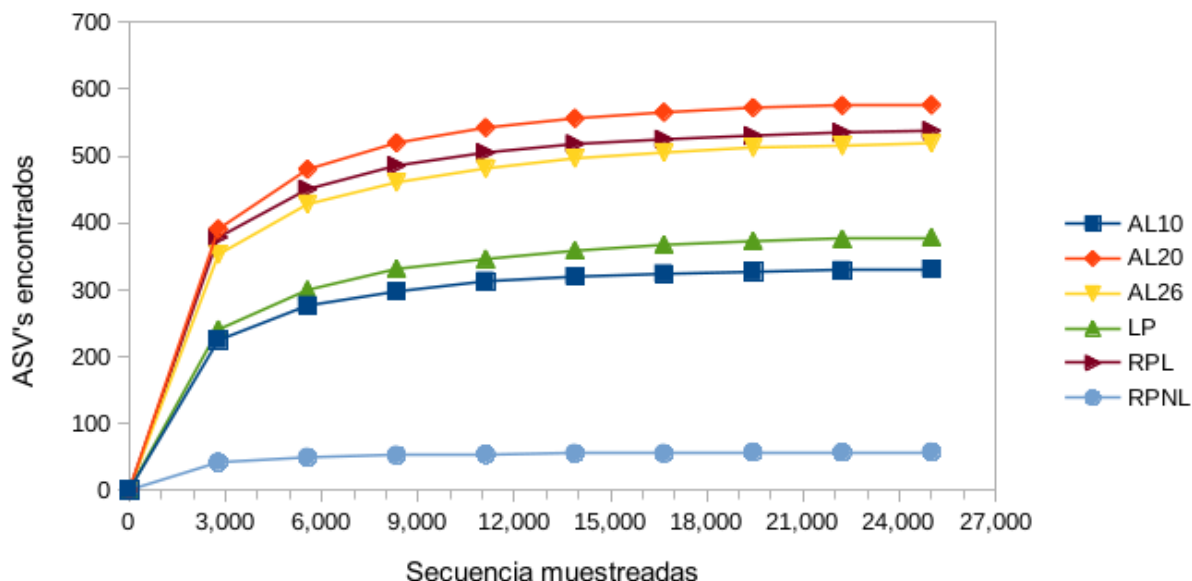


Figura 2: Curvas de rarefacción donde se observan todas las muestras con la cantidad de ASV's encontrados en cada una a diferentes profundidades de muestreo.

8.2. Diversidad alfa y beta

Para conocer la diversidad de los tapetes microbianos se calcularon la uniformidad de Pieolu y el índice de diversidad filogenética de Faith para las muestras de cada lago, además se realizó una prueba de PERMANOVA para comparar estadísticamente las diferencias entre la composición de cada comunidad.

Los resultados de las pruebas de Kruskal-Wallis indican que no hay diferencias significativas de la diversidad microbiana (diversidad filogenética de Faith) entre los tapetes de los tres lagos ($p=0.1875$; $H=3.3473$). Sin embargo, existen diferencias en la diversidad entre los tapetes litificantes y los no litificantes ($p=0.02699$; $H=9$). La misma situación ocurre cuando se analiza la uniformidad en las abundancias de los taxa. La comparación entre sitios indica que las comunidades de cada lago tienen una uniformidad similar ($p=0.59$; $H=1.04$), mientras que las muestras litificantes tienen mayor uniformidad que las no litificantes ($p=0.021$; $H=5.28$) (Fig. 3).

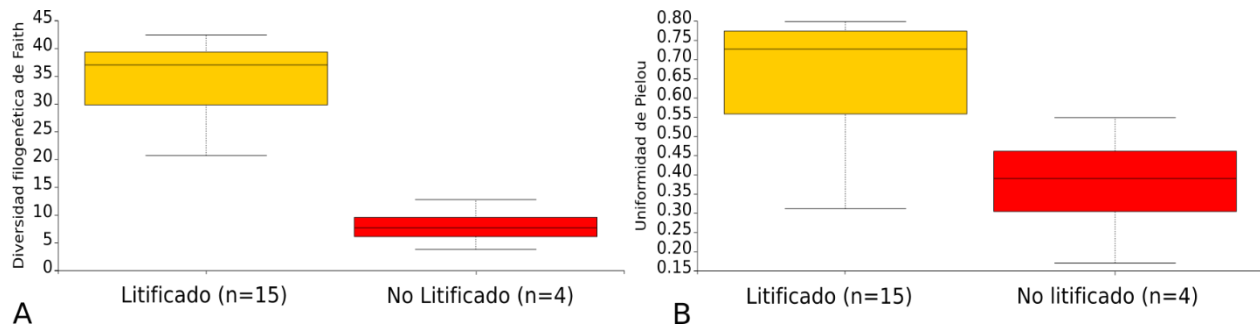


Figura 3: Comparación de la diversidad filogenética (A) y la uniformidad (B) en los tapetes litificantes y no litificantes

La prueba permutacional de análisis de varianza multivariada (PERMANOVA) indica que hay una diferencia en la composición de taxa entre los tres lagos (pseudo-F=6.02; $p=0.001$; con 999 permutaciones). Asimismo, la prueba estadística sugiere que existe una diferencia significativa en la composición taxonómica entre los tapetes litificantes y no litificantes (pseudo-F=5.3; $p=0.001$; con 999 permutaciones). Las diferencias estadísticas de los análisis por pares de PERMANOVA se resumen en la Figura 4.

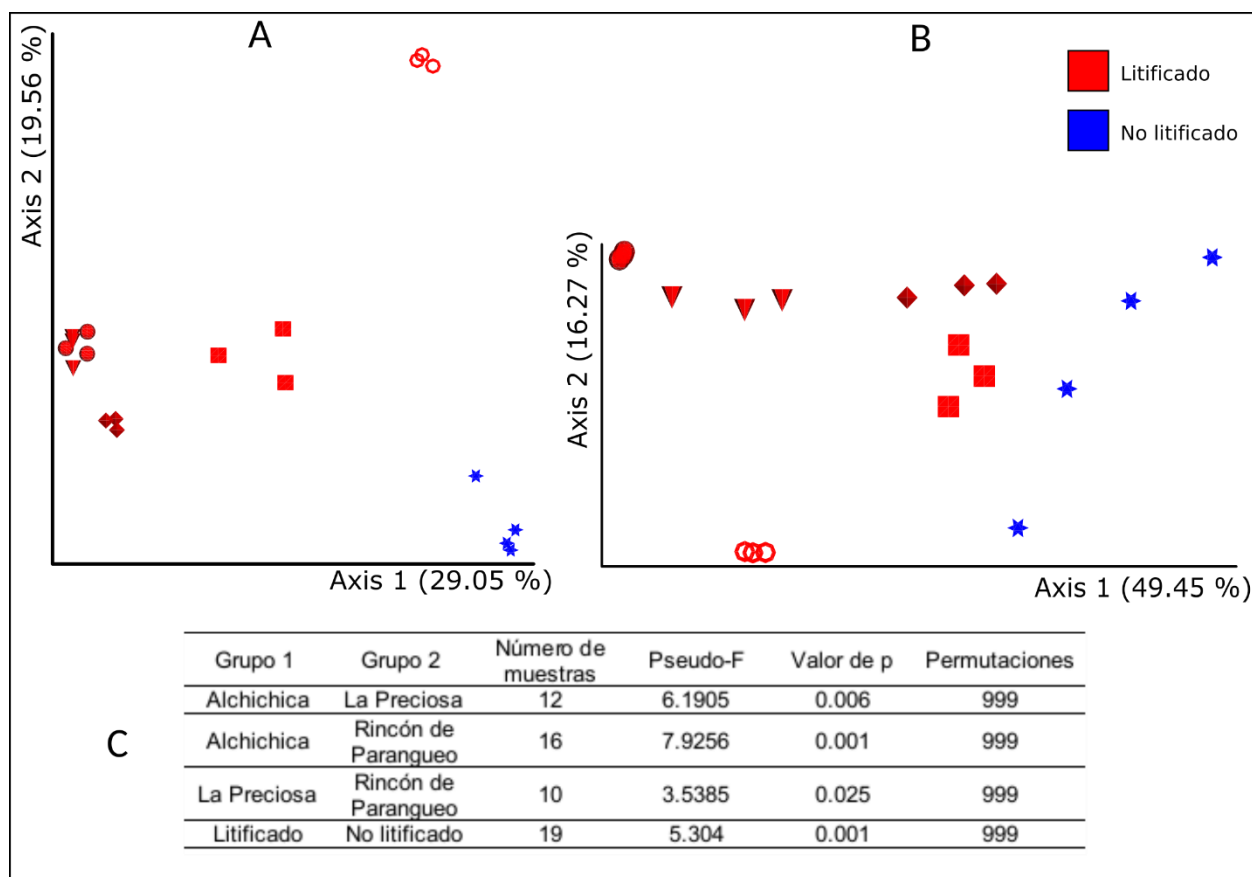


Figura 4: Resultados de los análisis de coordenadas principales (PCoA) usando Unifrac no ponderado (A) y Unifrac ponderado (B) como medidas de distancia. En ambas gráficas las muestras tienen un código de formas: AL10, diamantes (◆); AL20, conos (▼); AL26, esferas (●); LP, cuadrados (■); RPL, anillos (○) y RPNL, estrellas (★). La tabla (C) muestra los resultados de las pruebas por pares (PERMANOVA) comparando muestras por sitio y por su capacidad litificante.

Los análisis de coordenadas principales (PCoA) muestras como se separaron las muestras de cada una de las comunidades de las tres microbialitas en grupos claros, incluyendo a los tapetes no litificantes (Fig. 4). Cuando se observa el PCoA-Unifrac no ponderado, el eje 1 de las coordenadas principales concentra una variación del 29.05%, y el eje 2 del 19.56%; aquí las muestras se agrupan en núcleos bastante definidos, a excepción de AL20 y AL26 que no exhiben variación en ninguno de los ejes. Por otro lado, cuando en los análisis se consideran las abundancias relativas de las muestras, los patrones de agrupamiento cambian (Fig. 4, B); en este caso, en el PCoA-Unifrac ponderado,

las muestras de AL20 y AL26 se definen mejor a lo largo del eje 1, el cual explica el 49.45% de la variación.

El eje 2 explica el 16.27% de la variación observada y en él se distribuyen las muestras de RPNL (estrellas) y a diferencias de la gráfica A, en la B las muestras de RPL (anillos) son más similares a las muestras de AL20 (conos) que a las de RPNL. La misma diferencia se observa con las muestras de LP (cuadrados) y las de AL10 (diamantes) las cuales se distinguen mejor en la gráfica A que en la B, con respecto al eje 1.

8.3. Composición de las comunidades

De forma global, el 99.38% de las secuencias corresponden al dominio Bacteria, 0.61% al dominio Archaea y el 0.0026% no se asignaron a ningún grupo (Fig. 5). El dominio Bacteria es el más abundante ($\geq 95.9\%$) en todas las muestras, aunque se encontraron miembros de Archaea en las muestras de AL20 (0.05-0.1%) y AL26 (0.35-0.106 %), LP (0.07%) y RPL (3.23-4.0%). Por otro lado, las muestras de RPNL y la muestra más superficial de Alchichica (AL10) no concentraron secuencias de Archaea.

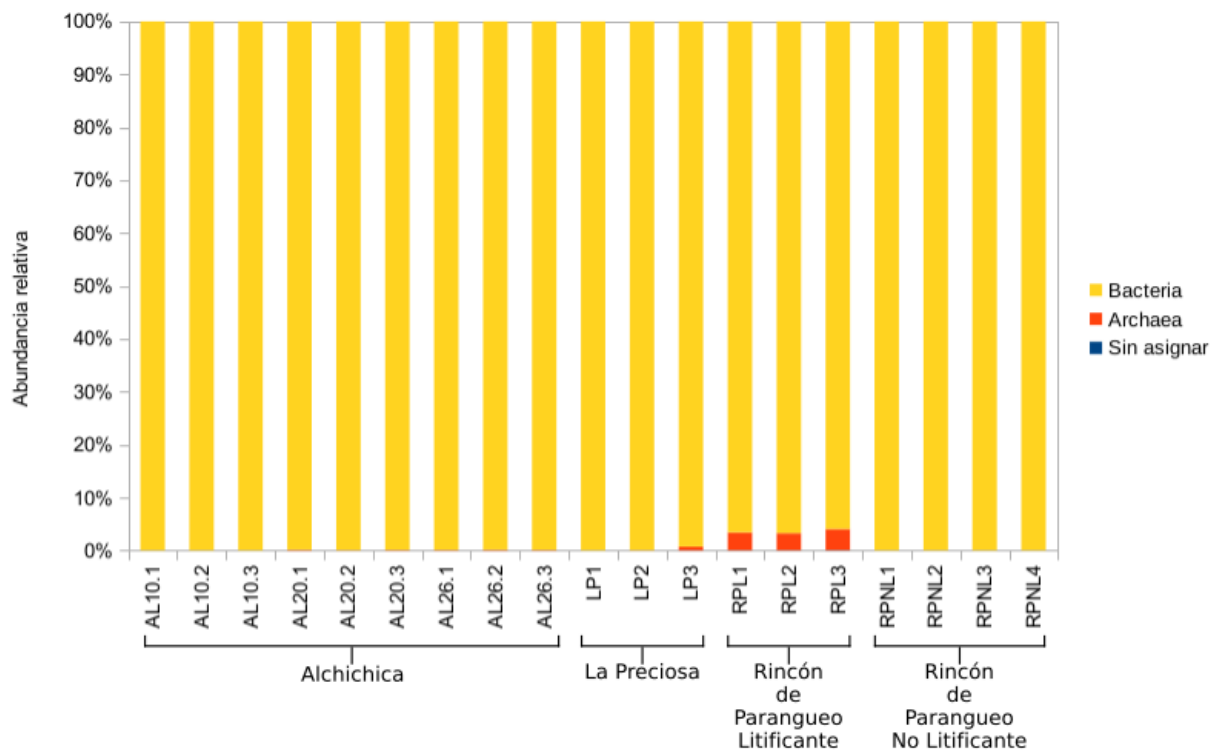


Figura 5: Porcentajes de abundancia relativa a nivel dominio. Se muestra el código de las muestras y a qué lago pertenecen

8.3.1. A nivel phylum

Entre los varios phyla detectados en las muestras de microbialitas y tapetes no litificantes de los tres lagos maar la mayor parte de la abundancia relativa se distribuye entre Cyanobacteria, Proteobacteria y Actinobacteria (Fig. 6), lo que podría ser atribuido a la formación de estas estructuras principalmente en zonas fóticas de los lagos.

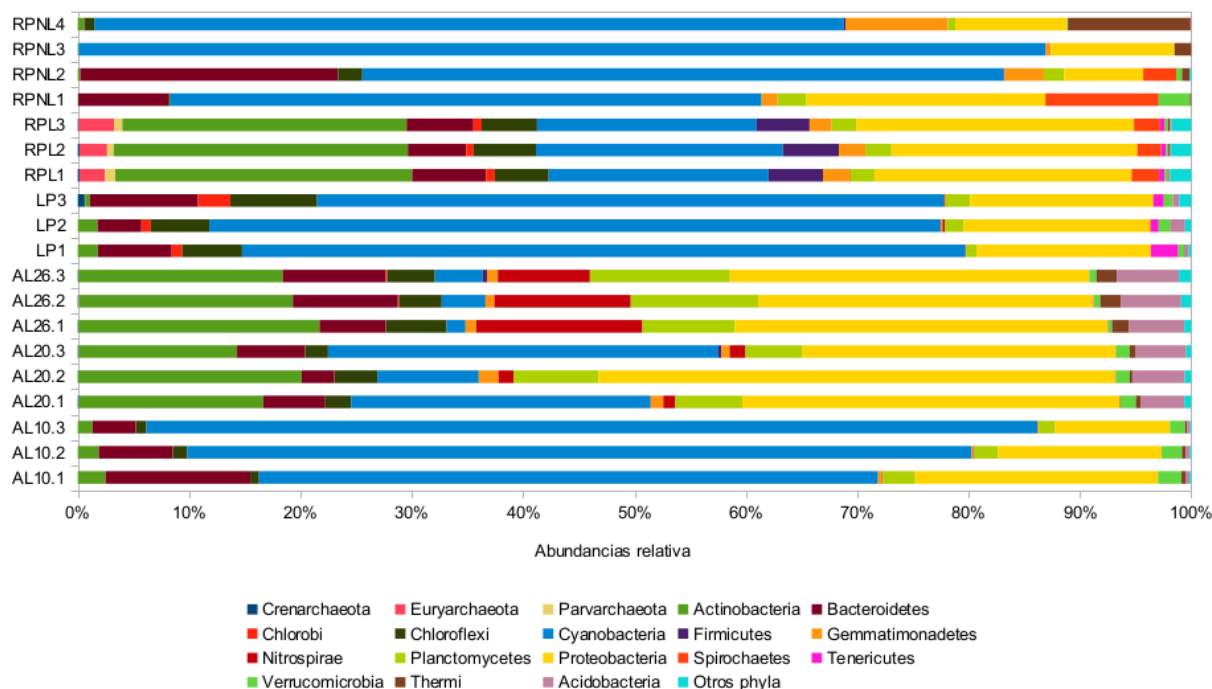


Figura 6: Phyla que registraron las mayores abundancias relativas en cada muestra.

En las muestras de Alchichica, la abundancia del phylum Cyanobacteria fue la más relevante y desciende conforme aumenta la profundidad. Por ejemplo, a 10 m la abundancia relativa es de entre 56 y 80%; a 20 m, entre 9 y 35%; y a 26 m, entre 1.7 y 4.3%. Es probable que debido a la dependencia lumínica de este phylum, este patrón se explique por el gradiente lumínico presente a diferentes profundidades.

Las mayores abundancias de Proteobacteria están concentradas en las muestras de AL20 y AL26 (28.1%-46.4% y 20.1%-33.5%, respectivamente), seguidas de RPL con 22.1%-25%. Las muestras de AL10 tienen abundancias de entre 10% y 21.8%, que junto a las muestras de LP (15.6%-16.75) y las de RPNL (7.1%-21.4%), representan las menores proporciones de este pyhlum.

Otros phyla encontrados fueron Bacteroidetes, Planctomycetes, y Chloroflexi. Los dos últimos tuvieron abundancias mayores conforme aumentó la profundidad, de 1.5 a 12.6% y 0.8 a 5.6%, respectivamente.

El phylum Nitrospirae fue hallado exclusivamente en las muestras de Alchichica y Rincón de Parangueo. AL26 contienen las más altas abundancias de este phylum (8.26-

14.93%), mientras que AL20 se sitúa entre 1.1 y 1.42%. En la muestra de RPL es donde las abundancias de Nitrospirae no supera el 0.2%, siendo 0.1% la abundancia más baja registrada.

Respecto a las arqueas, las mayores abundancias son del phylum Parvarchaeota registradas en RPL (0.6-0.9%). Otras submuestras con este phylum son AL26 con 0.0075-0.035%, y LP2 con 0.01% mientras que en el resto de las muestras no se registraron abundancias de este phylum. Luego. Crenarchaeota se encontró en AL20 (0.05-0.9%), AL26 (0.05-0.06%) y RPL (0.10%-0.16%). Luego, la réplica LP3 es la única que registró abundancia (0.62%), mientras que AL10, LP1, LP2 y RPNL no registraron abundancias de este phylum.

8.3.2. A nivel orden

La distribución de los principales órdenes es reflejo de la dominancia de Cyanobacteria en las microbialitas y tapetes no litificantes estudiados. El orden mejor representando en las microbialitas del lago Alchichica es Chroococcales, el cual mostró la máxima abundancia relativa en las muestras superficiales (AL10, 45-76%) y luego disminuye conforme a la profundidad. Por otro lado, en La Preciosa el orden Pseudanabaenales fue el más importante, con abundancias de 36-57%. Este orden también está presente en los tapetes no litificantes de Rincón de Parangueo (RPNL, 7.87%). Finalmente, en las microbialitas del lago Rincón de Parangueo, se observa el orden Oscillatoriales (9.6-11%) como el más representativo (Fig. 7).

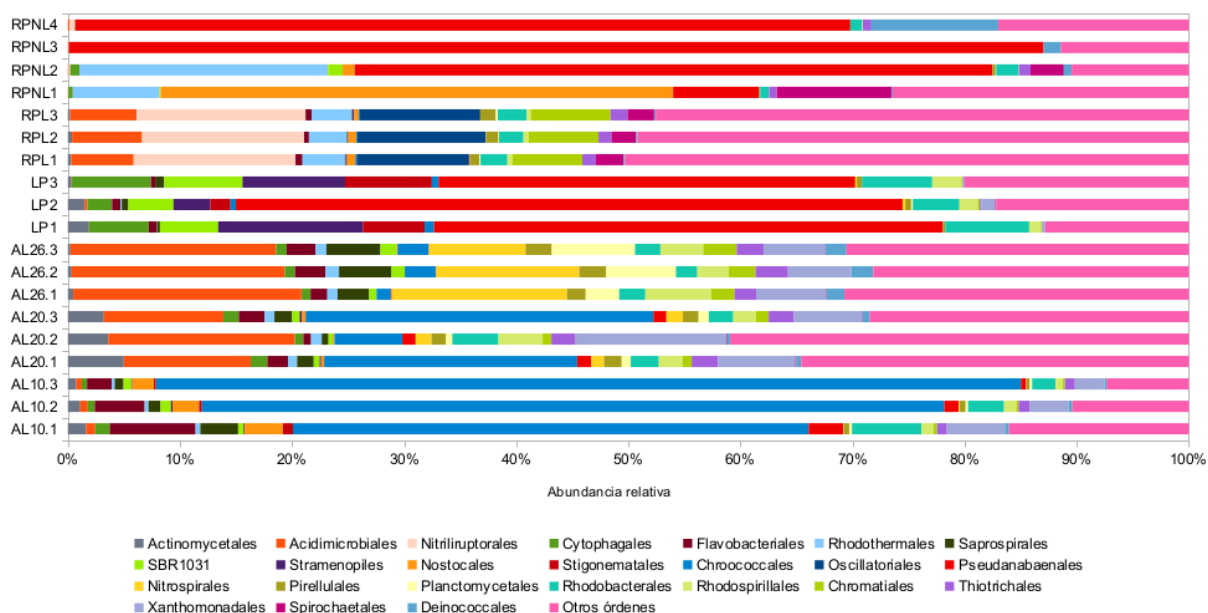


Figura 7: Porcentajes de abundancia relativa para los principales órdenes microbianos encontrados.

El orden Acidimicrobiales también muestra abundancias relativas que aumentan a la profundidad. A 10 m de profundidad, las abundancias son bajas (0.5%-0.8%), a 20 m de profundidad las abundancias se incrementan (10.3%-15.7%), siendo las muestras más profundas las que mayores abundancias concentran (17.5%-19.4%). RPL tiene abundancias de entre 5.3% y 6%. RPNL concentran abundancias por debajo del 0.1%, siendo las réplicas de LP las que menores abundancias relativas registraron (>0.23%).

Otros órdenes encontrados fueron Nitriliruptorales, Rhodothermales, Rhizobiales, Rhodobacterales, Nitrospirales, Chromatiales, Nostocales, Xanthomonadales, Deinococcales, Stramenopiles, Spirochaetales, entre otros. Muchos de estos órdenes tienen microbios fotosintéticos anoxigénicos, fijadores de nitrógeno o partícipes del ciclo del azufre, los cuales son reelevantes en los lagos tipo maar debido a su origen volcánico.

8.3.3. Especies principales

Las especies microbianas principales encontradas en cada muestra se agrupan en la tabla 5. Ya que no fue posible realizar la clasificación taxonómica con la suficiente precisión como para detallar los taxones a nivel especie, se usa el nombre de la jerarquía taxonómica encontrada más próxima para designar a cada especie. Para las muestras

del lago de Alchichica, a 10 y 20 m de profundidad la especie más abundante es miembro de la familia Xenococcaceae, mientras que para las muestras más profundas se encontró una especie del género Nitrospira y otra del orden Acidimicrobiales. Luego, en la muestra microbiana de La Preciosa se encontró una especie del género Leptolyngbya. Finalmente, en las muestras del lago de Rincón de Parangueo se tiene, por un lado, una especie de la familia Nitriliruptoraceae en las muestras de microbialita, mientras que en los tapetes no litificantes se encontró una especie dominante de la familia Pseudanabaenaceae.

Tabla 5: Principales especies encontradas en las muestras de microbialitas y tapetes no litificantes de los tres lagos, con sus respectivos valores de abundancia relativa.

Lago	Muestra	Especie principal	% de abundancia
Alchichica	AL10	Bacteria xenococal (Xenococcaceae)	45-76%
	AL20	Bacteria xenococal (Xenococcaceae)	6-30%
		Nitrospira sp.	8-15%
	AL26	Bacteria acidimicrobial (Acidimicrobiales)	11-15%
La Preciosa	LP	Leptolyngbya sp.	34-54%
Rincón de Parangueo	RPL	Bacteria nitriliruptorial (Nitriliruptoraceae)	13.8-14.4%
	RPL	Bacteria oscillatorial (Oscillatoriales)	8.8-9.9%
	RPNL	Bacteria pseudanabaenal (Pseudanabaenaceae)	4-87%

8.4. Efecto del gradiente de profundidad sobre la comunidad bacteriana de Alchichica

Se observó el efecto de un gradiente de profundidad sobre la estructura de la comunidad microbiana en las muestras del lago Alchichica las cuales pudieron ser recuperadas a 10, 20 y 26 m de profundidad.

En cuanto a la diversidad alfa, los resultados de la prueba no paramétrica de Kruskal-Wallis indica que no existen diferencias significativas entre las muestras de las tres profundidades en cuanto a diversidad filogenética y uniformidad. Sin embargo, en las pruebas por pares de Kruskal-Wallis para diversidad solamente existen diferencias significativas entre las muestras AL10 y AL20, así como entre las muestras de AL10 y AL26. La misma prueba estadística por pares, pero ahora para uniformidad, indica que existen diferencias significativas entre los mismos grupos anteriores y finalmente, las pruebas por pares para las muestras de AL20 y AL26 no muestran diferencias significativas ni en cuanto a diversidad ni a uniformidad.

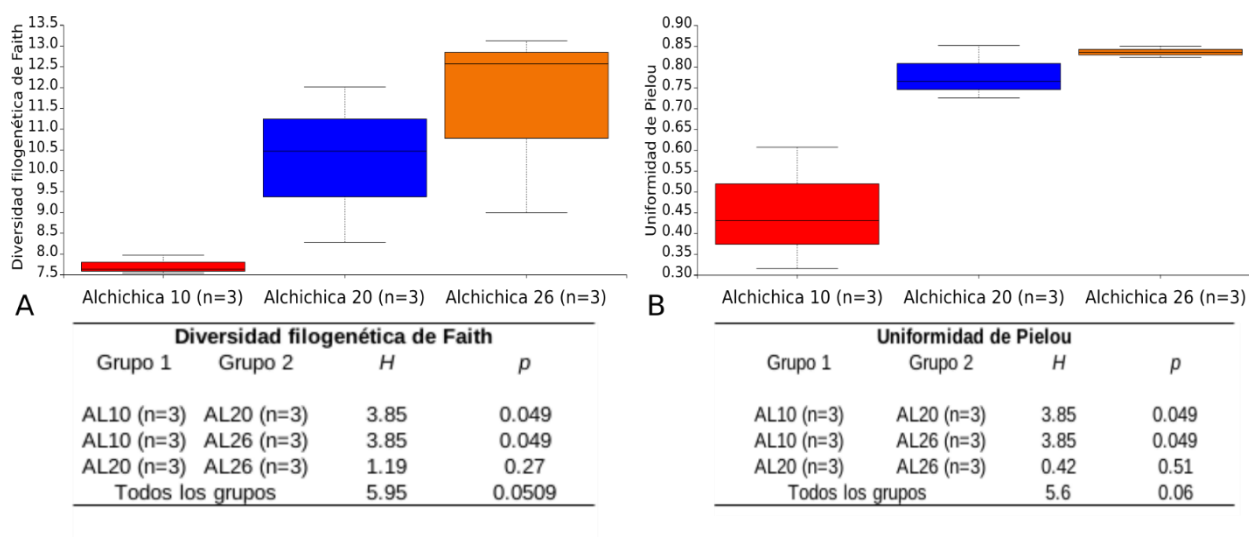


Figura 8: Gráficas de cajas y bigotes para diversidad (A) y uniformidad (B) en muestras de Alchichica que reflejan un gradiente de profundidad. Debajo de cada gráfica se muestran los valores de las pruebas de Kruskal-Wallis entre grupos y de todos los grupos.

El patrón que salta a la vista a partir de graficar los datos de diversidad y uniformidad es que estas dos características de las comunidades son proporcionales al aumento de la profundidad (Fig. 8). Los valores de diversidad se hacen más amplios a mayor profundidad mientras que los de uniformidad se restringen. Se observa un salto abrupto de los valores de diversidad y uniformidad entre las muestras de AL10 y AL20, mientras que la diferencia en valores de AL20 y AL26 es menor.

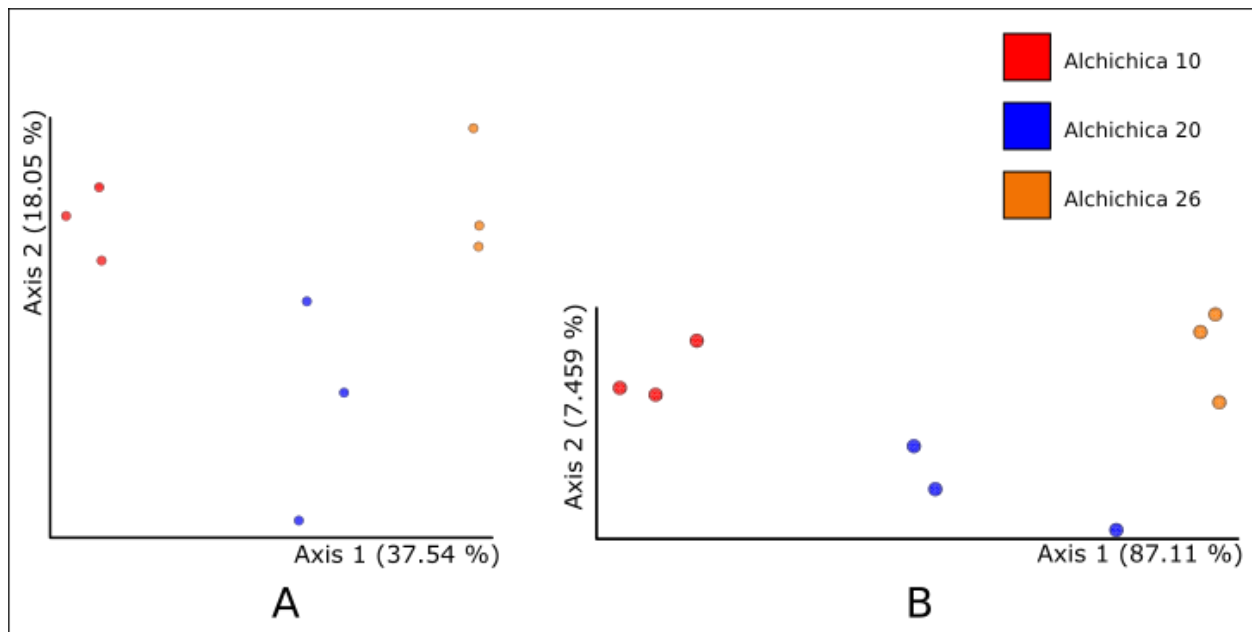


Figura 9: Resultados de los análisis de coordenadas principales (PCoA) para el gradiente de profundidad en Alchichica, usando UniFrac no ponderado (A) y UniFrac ponderado (B) como medidas de distancia.

Por último, los resultados de PERMANOVA indican que existe una diferencia significativa en cuanto a la composición microbiana de los tres grupos de muestras con respecto al gradiente de profundidad (pseudo- $F=3.25$, $p=0.001$ con 999 permutaciones). Los resultados del PCoA, usando UniFrac no ponderado, muestra una separación de las muestras de las tres profundidades de Alchichica (Fig. 9). Los grupos son poco dispersos a lo largo del eje 1, el cual da cuenta del 37% de la variación; mientras que, a lo largo del eje 2 (que explica el 18% de la variación total) los datos son más dispersos, sobre todo los de las muestras de AL20. Al mismo tiempo, los grupos de muestras de las tres profundidades se separan con claridad a lo largo del eje 1, el cual explica el 87% de la variación total, cuando se usa el PcoA con UniFrac ponderado. Donde las muestras de AL20 son las que exhiben mayor variación en este eje, ya que el eje 2 explica sólo el 7% de la variación y los datos están mejor aglutinados sobre este eje.

8.5. Efecto del gradiente salino-alkalino sobre las comunidades microbianas

Las muestras microbianas también mostraron una variación en los valores de diversidad y uniformidad con respecto al gradiente de salinidad y alcalinidad que existe entre los tres lagos de interés debido a su diferente composición, siendo La Preciosa el menos salino-alkalino y Rincón de Parangueo el mayor.

De manera similar a la profundidad, en el gradiente de salinidad hay un claro aumento de la diversidad y de la uniformidad en las muestras de Rincón de Parangueo con respecto a las de La Preciosa y Alchichica (Fig. 10). Sin embargo, las pruebas de Kruskal-Wallis indican que no hay diferencias significativas entre los valores de diversidad filogenética de los tres lagos ($H=5.68$, $p=0.058$), aunque la misma prueba indica que la uniformidad es significativamente diferente entre los tres lagos ($H=7.2$, $p=0.027$). Es interesante notar que, a diferencia del gradiente de profundidad –donde el aumento de la diversidad y uniformidad es proporcional a la profundidad–, cuando se considera un gradiente de salinidad la proporcionalidad entre la conductividad y los valores de diversidad rompen el patrón anterior, específicamente con la muestra de La Preciosa, la cual tiene valores intermedios de diversidad entre Alchichica y Rincón de Parangueo y al mismo tiempo registra los valores más pequeños de conductividad de los tres lagos.

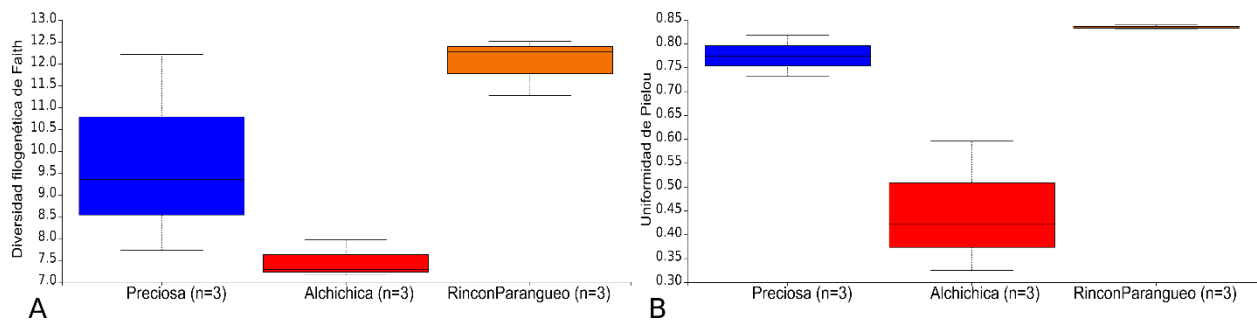


Figura 10: Gráficos de caja y bigote que resumen los valores de diversidad filogenética de Faith (A) y de uniformidad de Pielou (B) en un gradiente de salinidad.

La composición diferencial de taxa entre los tres lagos es visible en los PcoA (Fig. 11). Al considerar un análisis Unifrac no ponderado como medida de distancia, las

muestras de Alchichica y La Preciosa, en el eje 1, apenas logran diferenciarse una de la otra; mientras que en el eje 2, los tres sitios se separan con claridad en tres nubes de puntos. Por otro lado, cuando la medida de distancia es weighted Unifrac (Unifrac ponderado) las muestras de los sitios se diferencian entre sí a lo largo del eje 1, mientras que sobre el eje 2 Alchichica y Rincón de Parangueo se traslapan. Finalmente, cuando las composiciones de taxa entre los tres lagos se compara mediante PERMANOVA, el resultado es que existe una diferencia significativa en la composición de las comunidades de cada lago (pseudo-F=7.78, p=0.007).

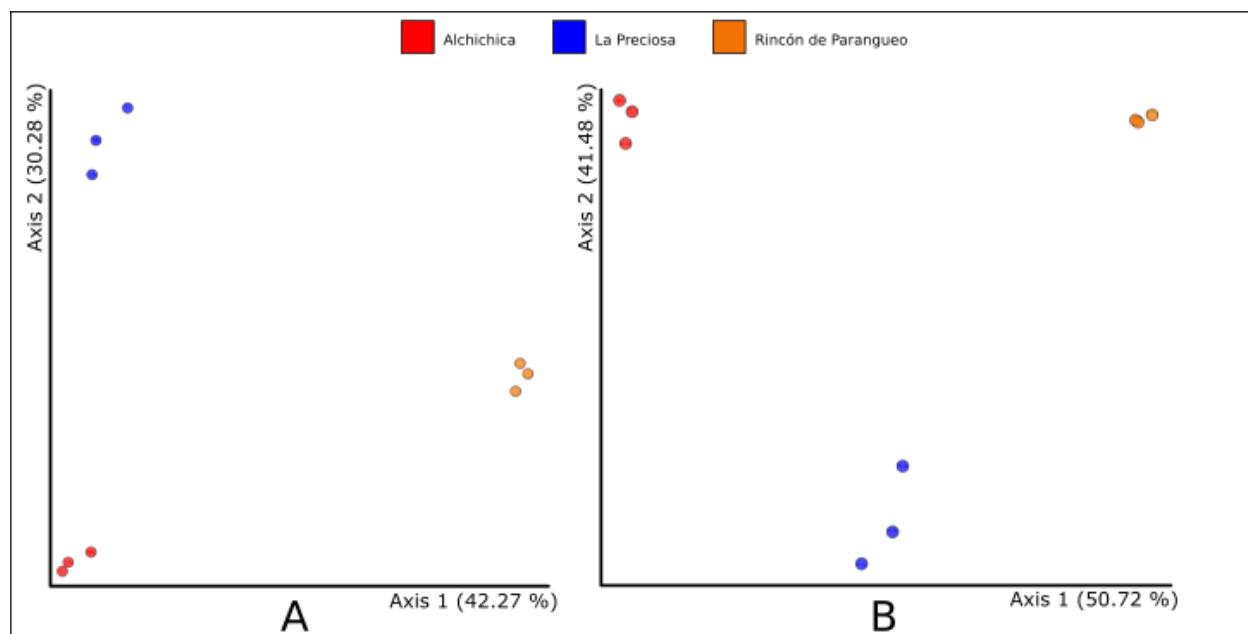


Figura 11: PCoA de la composición taxonómica de la muestra superficial de Alchichica y las muestras de La Preciosa y Rincón de Parangueo, usando unifrac no ponderado (A) y unifrac ponderado como medidas de distancia.

8.6. Predicción funcional

Las predicciones de abundancias de genes funcionales a partir de secuencias 16S rRNA fueron hechas con el complemento PRICRUST2, cuyo producto principal son tablas con las abundancias de los procesos metabólicos y sus enzimas. Al centrarse sobre los procesos de fijación de carbono y los del ciclo del nitrógeno, los resultados de estas predicciones muestran tres formas de fijar carbono que son dominantes en todas

las muestras: i) el biciclo 3-hidroxipropionato (lo realizan bacterias del phylum Chloroflexi), ii) el ciclo de Calvin-Benson-Bassham (CBB) (lo realizan bacterias del phylum Cyanobacteria) y iii) el ciclo Arnon-Buchanan (Fig. 12). El resto de las rutas de fijación de carbono se encontraron en menor proporción, mientras que el ciclo 3-Hidroxipropionato/4-hidroxibutirato no fue predicho para ninguna muestra. Se observa un aumento del ciclo Arnon-Buchanan conforme aumenta la profundidad en Alchichica al mismo tiempo que el ciclo CBB sigue el patrón inverso. Por otra parte, es visible que en la muestra de RPNL el biciclo 3-hidroxipropionato y el ciclo CBB tienen abundancias claramente mayores al resto de muestras, así como una disminución del ciclo Arnon-Buchanan, con respecto a la muestra de RPL.

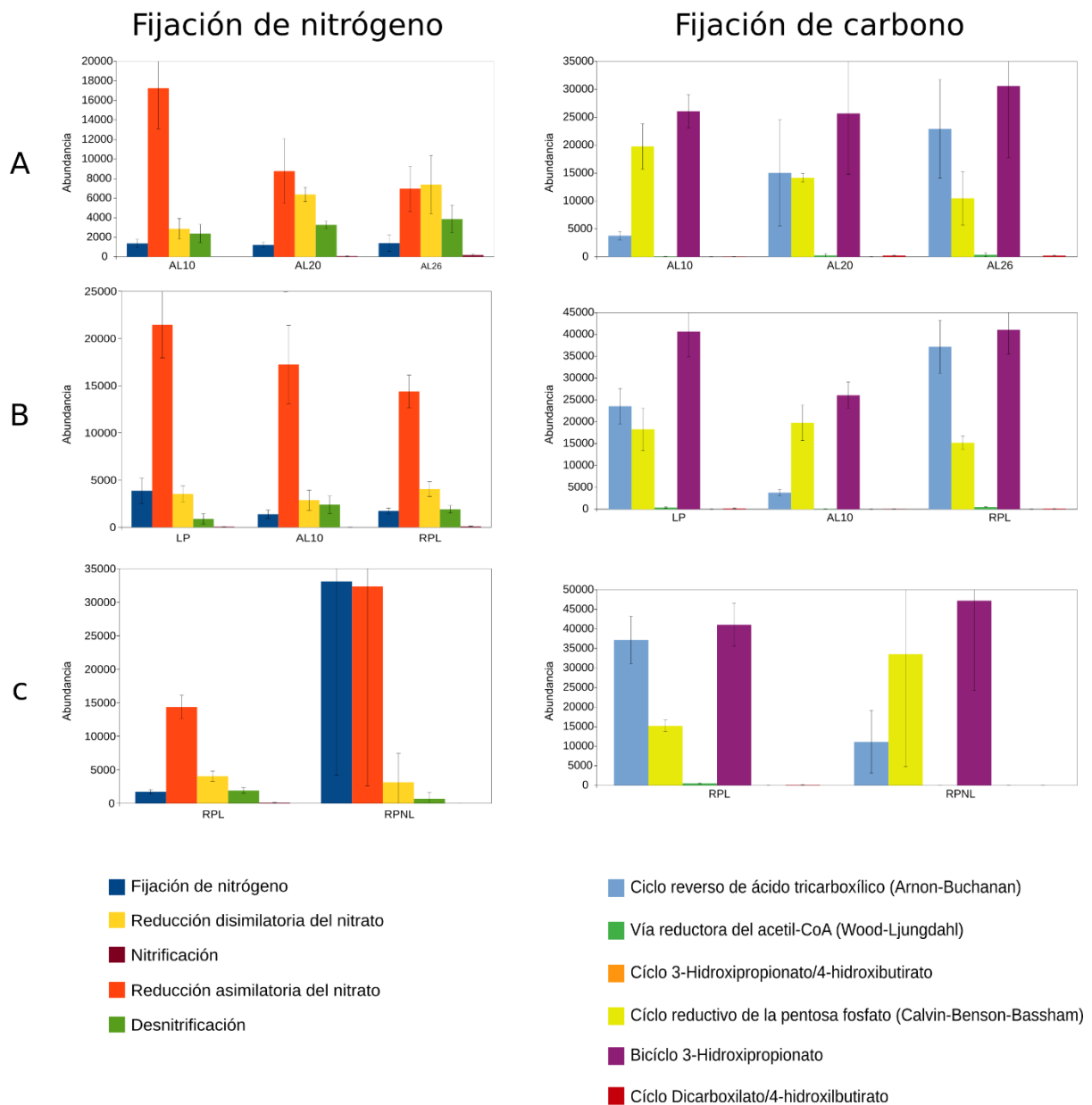


Figura 12: Abundancia de los procesos de fijación de C y del ciclo del nitrógeno con respecto a un gradiente de profundidad (A), un gradiente de salinidad (B) y al estado de litificación (C). Las barras representan valores de abundancia promedio por muestra calculados a partir de las réplicas. Se calcularon también los valores de desviación estándar representados con líneas sobre las barras.

En cuanto al N₂, la reducción del nitrato (asimilatoria y disimilatoria) hacia amonio es el proceso dominante en los tres lagos, seguido de la desnitrificación y la fijación de N₂. Sólo fue posible detectar enzimas relativas a la nitrificación en las muestras de AL20, AL26, LP y RPL, aunque con muy bajas abundancias. También son bastante notorias las diferencias en la fijación de N₂ entre los tapetes litificantes y los no litificantes. De la misma forma, se observa un declive en la reducción asimilatoria del nitrato conforme aumenta la profundidad y una tendencia inversa ocurre con la reducción disimilatoria del nitrato.

Finalmente, los resultados de las pruebas de Kruskal-Wallis para analizar las diferencias en las abundancias de enzimas en procesos energéticos del carbono y nitrógeno mostraron que no hay diferencias significativas ($p=0.4$), lo que puede indicar que las comunidades de los lagos mexicanos aquí estudiados tienden a realizar funciones metabólicas similares a pesar de las limitaciones que pueden presentar los gradientes de litificación, de salinidad y de luz.

9. Discusión

Los resultados indican que la diversidad microbiana es significativamente mayor en los tapetes que litifican con respecto a los no litificantes, siendo esta capacidad de litificación un elemento determinado por la composición microbiana del tapete. Lo anterior sugiere que cada lago tiene una estructura única para su comunidad microbiana, con poblaciones microbianas diferentes y en diferentes proporciones que realizan las mismas funciones, lo que se confirma con los análisis de PERMANOVA (Fig. 4). Esta situación coincide con los resultados de Baumgartner et al. (2009) quienes mencionan que las diferencias en la capacidad litificante de los tapetes está dada en gran parte por los grupos microbianos presentes y su actividad metabólica.

La composición particular de cada comunidad se refleja en los taxones más característicos y en sus abundancias relativas, factores que se modifican por los

gradientes de profundidad y salinidad. La composición taxonómica indica que en cada tapete litificante dominan órdenes específicos de cianobacterias, lo cual sugiere que cada orden cumple funciones ecológicas similares para su comunidad con respecto a la fijación de carbono y nitrógeno. Además, los gradientes de profundidad (luz) y salinidad también actúan sobre la diversidad de cada tapete, aumentándola conforme el gradiente crece, por lo que existe mayor diversidad en las profundidades de Alchichica y en las aguas de Rincón de Parangueo.

Tabla 6: Resumen de los grupos microbianos encargados de fijar carbono y nitrógeno así como de los fotosintéticos anoxigénicos en los tres sitios de estudio. Se muestran también el tipo de mineral carbonatado que forman los tapetes, los tipos de microbialitas asociadas a cada tapete y los iones dominantes del agua en cada sitio. La muestra de RPNL no fue incluida en esta tabla.

	Rincón de Parangueo	Alchichica	La Preciosa
Conductividad	165 mS cm ⁻¹	13.28 mS cm ⁻¹	2.2 mS cm ⁻¹
Fijación de C oxigénica	Oscillatoriales > Nostocaceae (Nostocales)	Chroococcales > Nostocaceae (Nostocales) > Synechococcales	Pseudanabaenaceae (Pseudanabaenales) > Rivularia (Stigonematales)
Fotosíntesis anoxigénica	Proteobacteria > Firmicutes > Chloroflexi Phormidiaceae (Oscillatoriales) > Nostocales > Firmicutes, Acidobacteria	Proteobacteria > Chloroflexi > Acidobacteria	Proteobacteria > Chloroflexi > Chlorobi > Acidobacteria
Fijación de N	<u>Ectothiorhodospira</u> , <u>Geitlerinema</u> , <u>Desulfonatospira</u> , <u>Desulfonatronovibrio</u> y <u>Nodularia</u>	Chroococcales > Nostocales	Pseudanabaenaceae (Pseudanabaenales) > Rivularia (Stigonematales)
Tipo de carbonatos	Hidromagnesita y aragonita	Aragonita e hidromagnesita	Aragonita y calcita
Estructura litificante	Oncolitos, trombolitos y estromatolitos	Estromatolitos y trombolitos	Trombolitos
Iones principales	Mg ²⁺ > Si	Na ⁺ > Cl ⁻ > SO ₄ ²⁻ > CO ₃ ²⁻ > HCO ₃ ⁻	HCO ₃ ⁻ > Cl ⁻ > Na ⁺ > Mg ²⁺

Los resultados indican que la diversidad microbiana es significativamente mayor en los tapetes que litifican con respecto a los no litificantes, siendo esta capacidad de litificación un elemento determinado por la composición microbiana del tapete. Lo anterior sugiere que cada lago tiene una estructura única para su comunidad microbiana, con poblaciones microbianas diferentes y en diferentes proporciones que realizan las mismas funciones, lo que se confirma con los análisis de PERMANOVA (Fig. 4). Esta situación coincide con los resultados de

Baumgartner et al. (2009) quienes mencionan que las diferencias en la capacidad litificante de los tapetes está dada en gran parte por los grupos microbianos presentes y su actividad metabólica.

La composición particular de cada comunidad se refleja en los taxones más característicos y en sus abundancias relativas, factores que se modifican por los gradientes de profundidad y salinidad. La composición taxonómica indica que en cada tapete litificante dominan órdenes específicos de cianobacterias, lo cual sugiere que cada orden cumple funciones ecológicas similares para su comunidad con respecto a la fijación de carbono y nitrógeno. Además, los gradientes de profundidad (luz) y salinidad también actúan sobre la diversidad de cada tapete, aumentándola conforme el gradiente crece, por lo que existe mayor diversidad en las profundidades de Alchichica y en las aguas de Rincón de Parangueo.

9.1. Litificación

Las muestras RPNL estuvieron dominadas por Cyanobacteria, en específico los órdenes Nostocales y Pseudanabaenales (Figs. 6 y 7) y en los PcoA se agruparon lejos de las muestras de RPL (Fig. 4), lo cual sugiere que existen diferencias entre estos dos tipos de comunidades microbianas. Resultados similares reportaron Rusell et al. (2014) entre los tapetes litificantes y los no litificantes del lago Pavilion Lake (Canadá). Ahí encontraron altas abundancias de Cyanobacteria en los tapetes no litificantes, los cuales se agruparon lejos de sus homólogos litificantes, mediante un escalamiento multidimensional (MDS), lo cual indica que existen diferencias entre esas comunidades. La diferencia estadística en la diversidad y uniformidad entre los tapetes litificantes y no litificantes de los tres lagos mexicanos objetos de estudio, podría explicarse por la dinámica de los gradientes físicos y químicos de cada sitio y su interacción con los tapetes microbianos (Prieto-Barajas et al., 2018), además del gradiente geoquímico creado por la actividad microbiana, la cual está gobernada por la radiación solar que recibe durante el día (Drupaz et al., 2005).

A pesar del parecido estructural entre las muestras AL10, LP, y RPNL, una diferencia entre ellas es que las primeras dos proceden de tapetes microbianos

calcificantes. Asimismo, las bacterias del orden Pseudanabaenales son dominantes y comunes a las muestras de RPNL y LP. Al respecto, (Sánchez, 2018) reportó la presencia de abundancias considerables (>40%) de bacterias de la familia Pseudanabaenaceae para los tapetes no litificantes de Rincón de Parangueo. Lo anterior revela una similitud en la estructura comunitaria entre un tapete litificante (LP) y uno no litificante (RPNL) que se encuentran en cuencas endorreicas alejadas entre sí por cientos de kilómetros, aunque esto tendría que confirmarse con un análisis más fino sobre la familia Pseudanabaenaceae en estos dos sitios, ya que en la presente tesis se encontró que *Leptolyngbya* sp. (Pseudanabaenaceae) es el género dominante en los tapetes microbianos litificantes de LP (Tabla 5).

Por otro lado, la diferencia en la diversidad microbiana y capacidad litificante entre las muestras de RPL y RPNL se explica por las diferencias del hábitat que ocupa cada comunidad. Las muestras litificantes están permanentemente expuestas a la atmósfera, debido al descenso en el nivel del agua del acuífero Valle de Santiago-Salamanca, lo que provocó la desecación del lago. Sin embargo, existen algunas pozas donde crecen tapetes microbianos sumergidos sin capacidad litificante (Cortés-López, 2016; Sánchez-Sánchez, 2018), las cuales probablemente experimenten un proceso similar al que se ha reportado en Salt Pan, Bahamas (Drupaz et al., 2004; Drupaz et al., 2005; Baumgartner et al., 2009), donde los tapetes microbianos muestran un gradiente de litificación que parece ser proporcional a la cantidad de luz que reciben. Baumgartner et al., (2009) explican que la disminución de luz en Salt Pan produce ambientes más estables que pueden albergar organismos con poca plasticidad fenotípica, mientras que las microbialitas más expuestas a la luz, tienen mayor tasa fotosintética y por lo tanto, producen mayor cantidad de EPS, que luego se desintegran, dando lugar a la precipitación de carbonatos.

9.2. Salinidad

El índice de diversidad muestra que la comunidad de La Preciosa registró valores casi tan altos como los de Rincón de Parangueo y casi tan bajos como los de Alchichica (Fig.

10). Resultados similares se reportaron por Yue et al., (2019), quienes muestran que en los lagos hipersalinos de la Meseta Tibetana la diversidad y uniformidad microbiana de los productores primarios es similar o incluso más alta que en los lagos salinos y de agua dulce en la misma región. También sugieren que la existencia de nutrientes en el agua y las adaptaciones biológicas a la vida hipersalina favorecen el crecimiento de los productores primarios. La situación oligotrófica de los lagos mexicanos de esta tesis no es compatible con la explicación de los nutrientes de Yue et al., (2019) pero puede serlo con la existencia de adaptaciones que permiten el modo de vida halófilo, de forma que la desecación gradual del Exlago Rincón de Parangueo selecciona aquellos microbios que alcanzan su máximo desarrollo en condiciones de hipersalinidad al mismo tiempo que excluye a aquellos microbios que necesitan cantidades menores de sales para vivir (Pinckney et al., 2011). La evidencia que corrobora lo anterior es que en las microbialitas de Rincón de Parangueo se encontraron de manera exclusiva y con bajas abundancias los géneros *Ectothiorhodospira*, *Geitlerinema*, *Desulfonatospira*, *Desulfonatovibrio*, y *Nodularia*; que han sido reportados por Namsarev et al., (2018) como diazótrofos haloalcalófilos en lagos hipersalinos de Rusia. Los organismos diazótrofos son los principales proveedores de amonio para la comunidad y sus tasas de fijación de N₂ están determinadas parcialmente por la salinidad del sitio. Cuando la salinidad aumenta se reducen tanto la cantidad de amonio entregado al sistema como las tasas fotosintética y de fijación de carbono. (Namsaraev et al., 2018; Pinckney et al., 2011; Yue et al., 2019)

Por otro lado, Sánchez-Sánchez et al. (2019) mencionan que los parámetros que controlan al componente microbiano en Rincón de Parangueo son la salinidad (Bacteria y Archaea) y la alcalinidad (Bacteria). En el lago La Preciosa estos parámetros tienen valores menores y es probable que existan otros factores que moldean a la comunidad microbiana de este sitio y le confiere su estructura característica. Lo anterior también explica las abundancias relativamente altas de Archaea y Actinobacteria, posiblemente *Nitiliruptor* (Stackebrandt et al., 2014) e *Ilumatobacter* (Yokota, 2014), concentradas sobre todo en los tapetes litificantes de Rincón de Parangueo, ya que este lago tiene la mayor salinidad de los tres. Así mismo, la presencia del phylum Firmicutes exclusivamente en la muestra de RPL es indicativo de que la hipersalinidad del agua en

Rincón de Parangueo limita el crecimiento de Cyanobacteria y permite el crecimiento de organismos con adaptaciones a la vida hipersalina (Oren, 2011).

La abundancia predicha de la nitrogenasa es más alta en La Preciosa que en Alchichica y Rincón de Parangueo. Es en este lago donde se registran los menores valores de electroconductividad (EC) y dado que la salinidad del agua impone un límite a la actividad de las nitrogenasas (Severin et al., 2012; Yue et al., 2019), la actividad de esta enzima aumenta en este sitio mientras que en ambientes más salinos (Alchichica y Rincón de Parangueo) la abundancia de esta enzima se ve más limitada, aunque no de manera significativa (Fig. 12B).

La inexistencia de diferencias significativas entre los procesos biológicos del N₂ y fijación de carbono en un gradiente de salinidad (Fig. 12B), en conjunto con las diferencias en la composición microbiana de los tres lagos de esta tesis sugieren que, a pesar de que las condiciones ambientales son diferentes en cada lago, todas las comunidades microbianas bénticas tiene grupos de organismos con capacidades metabólicas que les aseguran un ingreso de carbono y nitrógeno para llevar a cabo sus funciones biológicas y persistir en el tiempo.

9.3. Profundidad

El gradiente de profundidad implica un cambio en las condiciones fisicoquímicas del agua que rodea a los tapetes microbianos, así como en la Radiación Fotosintéticamente Activa (PAR, por sus siglas en inglés) que incide sobre estos últimos, la cual se reduce para los tapetes más profundos (Baumgartner et al., 2009). Lo anterior explica el aumento en la abundancia del Ciclo Reverso del Ácido Tricarboxílico (rTCA) cuya enzima clave es sensible a la presencia del oxígeno (Zarzycki et al., 2009) y la disminución simultánea del Ciclo Reductivo de la Pentosa Fosfato (CBB) conforme aumenta la profundidad. Por otro lado, la poca variación que exhibe el Ciclo 3-Hidroxipropionato en su abundancia a lo largo del gradiente, indica que este ciclo metabólico lo realizan bacterias que no dependen de la luz solar para obtener energía, como (Chloroflexi) sino que hacen fotosíntesis anoxigénica.

En este estudio el aumento de la reducción disimilatoria del nitrato conforme aumenta la profundidad se puede interpretar con las mediciones de oxígeno hechas por Kazmierczak et al. (2011) para Alchichica. En estos datos, a 10 m de profundidad la concentración de oxígeno disminuye abruptamente al mismo tiempo que la concentración del nitrato aumenta, alcanzando su máxima concentración a los 30 m de profundidad. Esto obligaría a los microbios a usar el nitrato como aceptor electrónico (Visscher et al., 2005), resultando en una mayor cantidad de reducción disimilatoria del nitrato. Esta idea la expusieron Peimbert et al. (2012), quienes reportaron que los tapetes microbianos en dos pozas oligotróficas de Cuatro Ciénegas (Coahuila) exhiben mayores abundancias enzimáticas de reductasas asimilatorias (narB) que de las reductasas respiratorias.

La nitrogenasa no exhibe variaciones drásticas en sus abundancias y se deduce que este proceso tiende a minimizarse con respecto al resto, debido a los altos costos energéticos que implica su actividad en un ambiente oligotrófico. Por lo tanto, para las bacterias resulta más eficiente reducir el nitrato mediante procesos asimilatorios que usar nitrogenasa costosa para conseguir amonio nuevo.

Los resultados del presente estudio parecen abonar a la tendencia en la dinámica de las abundancias relativas de los órdenes Chroococcales, Oscillatoriales y Nostocales que se han descubierto anteriormente (Couradeau et al., 2011; Kazmierczak et al., 2011; Saghai et al., 2015; Valdespino-Castillo et al., 2018), así como la dinámica de los fotótrofos anoxigénicos, como Alphaproteobacteria, Chloroflexi, Acidimicrobia, y Nitrospira (Benzerara et al., 2014; Alcántara-Hernandez et al., 2017) en un gradiente de profundidad. Los datos indican que las composiciones microbianas sufren un cambio a 20 m y éste se mantiene, intensificándose hasta los 26 m (Fig. 7); de manera que, la comunidad es más diversa a 26 m, permitiendo el desarrollo de organismos heterótrofos de los grupos Actinobacteria y Nitrospirae.

En las réplicas de AL10 predominan cianobacterias del orden Chroococcales, similar a los que encontraron Kazmierczak et al. (2011) a 8 m de profundidad. Las abundancias de este orden descienden drásticamente en AL20 y AL26, reflejando la alta dependencia de este orden bacteriano hacia la luz solar. Por otra parte, Russell et al.

(2014) reportaron que conforme aumenta la profundidad del Lago Pavilion (Canadá) también aumentan las abundancias de los grupos fotosintéticos anoxigénicos como Acidimicrobia, Nitrospira, y Alphaproteobacteria. Lo anterior es muy similar a lo que ocurre en las muestras AL20 y AL26 del presente estudio (Fig. 6). Russell et al., (2014) asocian la preferencia de phylum Acidimicrobia a la zonas profundas del lago debido a la producción de clorosomas que permiten a las bacterias captar luz en ambientes con valores bajos de PAR, como los que existen en la profundidad de Alchichica, por lo que este phylum aumenta considerablemente en las muestras AL20 y AL26 (Fig. 6). Finalmente, Russell et al., (2014) mencionan que las bacterias sulfato reductoras (Deltaproteobacteria, Firmicutes y Nitrospirae) juegan un papel importante en la manutención de los fotótrofos anoxigénicos, dotándolos de donadores electrónicos. Estas bacterias sulfato reductoras, se presentan principalmente en AL20 y AL26 (Deltaproteobacteria y Nitrospirae), mientras que Firmicutes es exclusivo de RPL. Es interesante notar que el phylum Nitrospirae aumenta considerablemente en AL26 con respecto a las muestras más superficiales de Alchichica.

10. Conclusiones

Los tapetes litificantes son más diversos y uniformes que los no litificantes debido al gradiente fisicoquímico formado por la actividad metabólica de los organismos presentes.

La profundidad modifica la composición microbiana en las microbialitas permitiendo su diversificación.

El potencial de fijación de carbono y nitrógeno están moduladas por la luz y la salinidad en microbialitas de lagos maar. Además, la comunidad de cada sitio está adaptada para producir amonio y compuestos orgánicos mediante la fijación del carbono.

11. Bibliografía

Águila Salgado, B. (2018). Caracterización de cianobacterias en microbialitas del lago cráter Alchichica en un gradiente de profundidad. Universidad nacional Autónoma de México.

Alcántara-Hernández, R. J., Valdespino-Castillo, P. M., Centeno, C. M., Alcocer, J., Merino-Ibarra, M., & Falcón, L. I. (2017). Genetic diversity associated with N-cycle pathways in microbialites from Lake Alchichica, Mexico. *Aquatic Microbial Ecology*, 78(2), 121–133.

Alcocer, J. (2017). Mexican Meromictic Lakes: What We Know So Far. In R. D. Gulati, E. S. Zadereev, & A. G. Degermendzhi (Eds.), *Ecology of Meromictic Lakes* (pp. 353–375). https://doi.org/10.1007/978-3-319-49143-1_12

Armienta, M. A., Vilaclara, G., De la Cruz-Reyna, S., Ramos, S., Cenicerós, N., Cruz, O., ... Arcega-Cabrera, F. (2008). Water chemistry of lakes related to active and inactive Mexican volcanoes. *Journal of Volcanology and Geothermal Research*, 178(2), 249–258. <https://doi.org/10.1016/j.jvolgeores.2008.06.019>

Arndt, N. T., & Nisbet, E. G. (2012). Processes on the Young Earth and the Habitats of Early Life. *Annual Review of Earth and Planetary Sciences*, 40(1), 521–549. <https://doi.org/10.1146/annurev-earth-042711-105316>

Arredondo-Figueroa, J. L., Borrego-Enríquez, L. E., Castillo-Domínguez, R. M., & Valladolid-Laredo, M. A. (1983). Batimetría y morfometría de los lagos “maars” de la cuenca de Oriental, Puebla, México. *Biótica*, 8(1), 37–47.

Baumgartner, L. K., Dupraz, C., Buckley, D. H., Spear, J. R., Pace, N. R., & Visscher, P. T. (2009). Microbial species richness and metabolic activities in hypersaline microbial mats: insight into biosignature formation through lithification. *Astrobiology*, 9(9), 861–874.

Begon, M., Townsend, C. R., & Harper, J. L. (2006). The nature of the community: patterns in space and time. In *Ecology. From individuals to ecosystems* (4th ed., pp. 469–498). Blackwell Publishing Ltd.

- Bekker, A., Holland, H. D., Wang, P.-L., Rumble, D., Stein, H. J., Hannah, J. L., ... Beukes, N. J. (2004). Dating the rise of atmospheric oxygen. *Nature*, 427(6970), 117–120. <https://doi.org/10.1038/nature02260>
- Beltrán, Y., Centeno, C. M., García-Oliva, F., Legendre, P., & Falcón, L. I. (2012). N₂ fixation rates and associated diversity (nifH) of microbialite and mat-forming consortia from different aquatic environments in Mexico. *Aquatic Microbial Ecology*, 67(1), 15–24.
- Benzerara, K., Couradeau, E., Gérard, E., Tavera, R., Lopez-Archilla, A. I., Moreira, D., & Lopez-Garcia, P. (2014). Geomicrobiological study of modern microbialites from Mexico: towards a better understanding of the ancient fossil record. *BIO Web of Conferences*, 2, 02002. <https://doi.org/10.1051/bioconf/20140202002>
- Berman-Frank, I., Lundgren, P., & Falkowski, P. (2003). Nitrogen fixation and photosynthetic oxygen evolution in cyanobacteria. *Research in Microbiology*, 154(3), 157–164. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0923-2508\(03\)00029-9](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0923-2508(03)00029-9)
- Bolyen, E., Rideout, J. R., Dillon, M. R., Bokulich, N. A., Abnet, C. C., Al-Ghalith, G. A., ... Asnicar, F. (2019). Reproducible, interactive, scalable and extensible microbiome data science using QIIME 2. *Nature Biotechnology*, 37(8), 852–857.
- Breitbart, M., Hoare, A., Nitti, A., Siefert, J., Haynes, M., Dinsdale, E., ... Hollander, D. (2009). Metagenomic and stable isotopic analyses of modern freshwater microbialites in Cuatro Ciénegas, Mexico. *Environmental Microbiology*, 11(1), 16–34. <https://doi.org/10.1111/j.1462-2920.2008.01725.x>
- Brigmon, R. L., Morris, P., & Smith, G. (2008). Evaporite microbial films, mats, microbialites and stromatolites. In *Links Between Geological Processes, Microbial Activities&Evolution of Life* (pp. 197–235). Springer.
- Buermans, H. P. J., & Den Dunnen, J. T. (2014). Next generation sequencing technology: advances and applications. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Basis of Disease*, 1842(10), 1932–1941.
- Burne, R. V, & Moore, L. S. (1987). Microbialites: organosedimentary deposits of benthic microbial communities. *Palaios*, 241–254.

Caballero, M., Vilaclara, G., Rodríguez, A., & Juárez, D. (2003). Short-term climatic change in lake sediments from lake Alchichica, Oriental, Mexico. *Geofísica Internacional*, 42(3), 529–537.

Callahan, B. J., McMurdie, P. J., Rosen, M. J., Han, A. W., Johnson, A. J. A., & Holmes, S. P. (2016). DADA2: high-resolution sample inference from Illumina amplicon data. *Nature Methods*, 13(7), 581.

Cano-Cruz, M., & Carrasco-Núñez, G. (2008). Evolución de un cráter de explosión (maar) riolítico: Hoya de Estrada, campo volcánico Valle de Santiago, Guanajuato, México . *Revista Mexicana de Ciencias Geológicas* , Vol. 25, pp. 549–564. scielomx .

Catling, D. C., & Claire, M. W. (2005). How Earth's atmosphere evolved to an oxic state: A status report. *Earth and Planetary Science Letters*, 237(1), 1–20. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.epsl.2005.06.013>

Centeno, C. M., Legendre, P., Beltrán, Y., Alcántara-Hernández, R. J., Lidström, U. E., Ashby, M. N., & Falcón, L. I. (2012). Microbialite genetic diversity and composition relate to environmental variables. *FEMS Microbiology Ecology*, 82(3), 724–735. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6941.2012.01447.x>

Chacón, E., Aranda-Gómez, J. J., Charles-Polo, M., Sánchez-Ramos, M. A., Rivera-Muñoz, E. M., Levresse, G., & Millán-Malo, B. (2018). Biohermal thrombolites of the crater lake Rincón de Parangeo in Central México. *Journal of South American Earth Sciences*, 85, 236–249.

Cortéz López, E. (2016). Cianoprocariontes de microbialitas de lagos de cráter de Guanajuato, México. Universidad Nacional Autónoma de México.

Couradeau, E., Benzerara, K., Moreira, D., Gérard, E., Kaźmierczak, J., Tavera, R., & López-García, P. (2011). Prokaryotic and eukaryotic community structure in field and cultured microbialites from the alkaline Lake Alchichica (Mexico). *PLoS ONE*, 6(12), 1–20. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0028767>

Czaja, A. D. (2010). Microbes and the rise of oxygen. *Nature Geoscience*, 3(8), 522–523. <https://doi.org/10.1038/ngeo929>

Decker, R., & Decker, B. (2006). Cones, craters, and calderas. In *Volcanoes* (Fourth edi, pp. 154–173). W.H. Freeman and Company.

DeSantis, T. Z., Hugenholtz, P., Larsen, N., Rojas, M., Brodie, E. L., Keller, K., ... Andersen, G. L. (2006). Greengenes, a Chimera-Checked 16S rRNA Gene Database and Workbench Compatible with ARB. *Applied and Environmental Microbiology*, 72(7), 5069 LP – 5072. <https://doi.org/10.1128/AEM.03006-05>

Dhami, N. K., Reddy, M. S., & Mukherjee, A. (2014). Application of calcifying bacteria for remediation of stones and cultural heritages. *Frontiers in Microbiology*, 5, 304.

Douglas, G. M., Maffei, V. J., Zaneveld, J., Yurgel, S. N., Brown, J. R., Taylor, C. M., ... Langille, M. G. I. (2019). PICRUSt2: An improved and extensible approach for metagenome inference. *BioRxiv*, 672295. <https://doi.org/10.1101/672295>

Dupraz, C., Reid, R. P., Braissant, O., Decho, A. W., Norman, R. S., & Visscher, P. T. (2009). Processes of carbonate precipitation in modern microbial mats. *Earth-Science Reviews*, 96(3), 141–162. <https://doi.org/10.1016/j.earscirev.2008.10.005>

Dupraz, C., & Visscher, P. T. (2005). Microbial lithification in marine stromatolites and hypersaline mats. *Trends in Microbiology*, 13(9), 429–438.

Dupraz, C., Visscher, P. T., Baumgartner, L. K., & Reid, R. P. (2004). Microbe–mineral interactions: early carbonate precipitation in a hypersaline lake (Eleuthera Island, Bahamas). *Sedimentology*, 51(4), 745–765.

Falkowsky, P. G. (2012). The global carbon cycles: biological processes. In A. H. Knoll, D. E. Canfield, & K. O. Konhauser (Eds.), *Fundamental of geobiology* (1st ed., pp. 5–19). Wiley-Blackwell.

Fenchel, T., King, G., & Blackburn, T. (2012). Bacterial metabolism. In *Bacterial biogeochemistry. The ecophysiology of mineral cycling*. (3th ed., pp. 1–34). Elsevier.

Fenchel, Tom., King, G., & Blackburn, H. (1988). General considerations. In *Bacterial biogeochemistry. The ecophysiology of mineral cycling*. (2nd ed., pp. 4–28). Academic Press.

Foster, J. S., & Green, S. J. (2011). Microbial diversity in modern stromatolites. In *Stromatolites: interaction of microbes with sediments* (pp. 383–405). Springer.

Foster, J. S., & Mobberley, J. M. (2010). Past, present, and future: microbial mats as models for astrobiological research. In *Microbial Mats* (pp. 563–582). Springer.

Garrity, G., Boone, D. R., & Castenholz, R. W. (2001). Phylum BX. Cyanobacteria, oxygenic photosynthetic bacteria. *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, 1.

Graettinger, A. H. (2018). Trends in maar crater size and shape using the global Maar Volcano Location and Shape (MaarVLS) database. *Journal of Volcanology and Geothermal Research*, 357, 1–13. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.jvolgeores.2018.04.002>

Green, M. R., & Sambrook, J. (2012). Isolation and quantification of DNA. In C. S. H. L. Press (Ed.), *Molecular cloning: a laboratory manual*. (4th ed., pp. 1–79). John Inglis.

Hays, L., Archenbach, L., Bailey, J., Barnes, R., Barros, J., Bertka, C., & Boston, P. (2015). NASA Astrobiology strategy. NASA, Washington.

Hügler, M., & Sievert, S. M. (2011). Beyond the Calvin cycle: autotrophic carbon fixation in the ocean. *Annual Review of Marine Science*, 3, 261–289.

Illumina Inc. (2016). Illumina Sequencing by Synthesis. Retrieved from <https://www.youtube.com/watch?v=fCd6B5HRaZ8>

Inoue, J., Oshima, K., Suda, W., Sakamoto, M., Iino, T., Noda, S., ... Ohkuma, M. (2015). Distribution and Evolution of Nitrogen Fixation Genes in the Phylum Bacteroidetes. *Microbes and Environments*, 30(1), 44–50. <https://doi.org/10.1264/jsme2.ME14142>

Kaźmierczak, J., Kempe, S., Kremer, B., López-García, P., Moreira, D., & Tavera, R. (2011). Hydrochemistry and microbialites of the alkaline crater lake Alchichica, Mexico. *Facies*, 57(4), 543–570. <https://doi.org/10.1007/s10347-010-0255-8>

Konhauser, K. (2007). Microbial metabolism. In B. S. Ltd (Ed.), *Introduction to geomicrobiology* (Primera ed, pp. 36–92). Blackwell publishing.

- Kuypers, M. M. M., Marchant, H. K., & Kartal, B. (2018). The microbial nitrogen-cycling network. *Nature Reviews Microbiology*, 16(5), 263.
- Loman, N. J., Constantinidou, C., Chan, J. Z. M., Halachev, M., Sergeant, M., Penn, C. W., ... Pallen, M. J. (2012). High-throughput bacterial genome sequencing: an embarrassment of choice, a world of opportunity. *Nature Reviews Microbiology*, 10(9), 599–606. <https://doi.org/10.1038/nrmicro2850>
- Lyons, T. W., Fike, D. A., & Zerkle, A. (2015). Emerging biogeochemical views of Earth's ancient microbial worlds. *Elements*, 11(6), 415–421.
- Mandigan, M. et al. (2015). Microbial metabolism. In *Brock biology of microorganisms* (Decimocato, pp. 73–106). Pearson.
- Margulis, L. (1981). Symbiosis in cell evolution: Life and its environment on the early earth.
- Martinez-Porchas, M., Villalpando-Canchola, E., Ortiz Suarez, L. E., & Vargas-Albores, F. (2017). How conserved are the conserved 16S-rRNA regions? *PeerJ*, 5, e3036. <https://doi.org/10.7717/peerj.3036>
- Moore, E. K., Jelen, B. I., Giovannelli, D., Raanan, H., & Falkowski, P. G. (2017). Metal availability and the expanding network of microbial metabolisms in the Archaean eon. *Nature Geoscience*, 10, 629. Retrieved from <https://doi.org/10.1038/ngeo3006>
- Morin, J. P. (2011). Communities. In *Community ecology* (2nd ed., pp. 3–23). Blackwell publishing.
- Namsaraev, Z., Samylina, O., Sukhacheva, M., Borisenko, G., Sorokin, D. Y., & Tourova, T. (2018). Effect of salinity on diazotrophic activity and microbial composition of phototrophic communities from Bitter-1 soda lake (Kulunda Steppe, Russia). *Extremophiles*, 22(4), 651–663.
- Oren, A. (2011). Thermodynamic limits to microbial life at high salt concentrations. *Environmental Microbiology*, 13(8), 1908–1923.

Paternoster, M., Mongelli, G., Caracausi, A., & Favara, R. (2016). Depth influence on the distribution of chemical elements and saturation index of mineral phases in twins maar lakes: The case of the Monticchio lakes (southern Italy). *Journal of Geochemical Exploration*, 163, 10–18.

Peimbert, M., Alcaraz, L. D., Bonilla-Rosso, G., Olmedo-Alvarez, G., García-Oliva, F., Segovia, L., ... Souza, V. (2012). Comparative metagenomics of two microbial mats at Cuatro Ciénegas Basin I: ancient lessons on how to cope with an environment under severe nutrient stress. *Astrobiology*, 12(7), 648–658.

Pinckney, J. L., Long, R. A., & Paerl, H. W. (2011). Structural and functional responses of microbial mats to reductions in nutrient and salinity stressors in a Bahamian hypersaline lagoon. *Aquatic Microbial Ecology*, 62(3), 289–298.

Prieto-Barajas, C. M., Valencia-Cantero, E., & Santoyo, G. (2018). Microbial mat ecosystems: structure types, functional diversity, and biotechnological application. *Electronic Journal of Biotechnology*, 31, 48–56.

Ragon, M., Benzerara, K., Moreira, D., Tavera, R., & López-García, P. (2014). 16S rDNA-based analysis reveals cosmopolitan occurrence but limited diversity of two cyanobacterial lineages with contrasted patterns of intracellular carbonate mineralization. *Frontiers in Microbiology*, 5, 331. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2014.00331>

Rajasekar, A., Moy, C. K. S., & Wilkinson, S. (2017). MICP and advances towards eco-friendly and economical applications. *IOP Conference Series: Earth and Environmental Science*, 78(1), 12016. IOP Publishing.

Ramazzotti, M., & Bacci, G. (2018). 16S rRNA-based taxonomy profiling in the metagenomic era. In M. Nagarajan (Ed.), *Metagenomics: perspectives, methods and applications* (1st ed., pp. 103–119). Academic Press.

Riding, R. (1999). The term stromatolite: towards an essential definition. *Lethaia*, 32(4), 321–330.

Riding, R. (2011). Microbialites, stromatolites, and thrombolites. *Encyclopedia of Geobiology*, 635–654.

Russell, J. A., Brady, A. L., Cardman, Z., Slater, G. F., Lim, D. S. S., & Biddle, J. F. (2014). Prokaryote populations of extant microbialites along a depth gradient in Pavilion Lake, British Columbia, Canada. *Geobiology*, 12(3), 250–264.

Saghaï, A., Zivanovic, Y., Zeyen, N., Moreira, D., Benzerara, K., Deschamps, P., ... López-García, P. (2015). Metagenome-based diversity analyses suggest a significant contribution of non-cyanobacterial lineages to carbonate precipitation in modern microbialites. *Frontiers in Microbiology*, 6(AUG), 1–16. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2015.00797>

Sánchez-Sánchez, J., Cerca, M., Alcántara-Hernández, R. J., Lozano-Flores, C., Carreón-Freyre, D., Levresse, G., ... Aranda-Gómez, J. J. (2019). Extant microbial communities in the partially desiccated Rincon de Parangueo maar crater lake in Mexico. *FEMS Microbiology Ecology*, 95(5), fiz051.

Sánchez Sánchez, J. (2018). Estromatolitos y comunidades microbianas en el cráter maar Rincón de parangueo y su relación con la geología. Universidad Nacional Autónoma de México.

Severin, I., Confurius-Guns, V., & Stal, L. J. (2012). Effect of salinity on nitrogenase activity and composition of the active diazotrophic community in intertidal microbial mats. *Archives of Microbiology*, 194(6), 483–491. <https://doi.org/10.1007/s00203-011-0787-5>

Shen, J. W., & Wang, Y. (2008). Modern microbialites and their environmental significance, Meiji reef atoll, Nansha (Spratly) Islands, South China Sea. *Science in China, Series D: Earth Sciences*, 51(4), 608–617. <https://doi.org/10.1007/s11430-008-0035-2>

Shokralla, S., Spall, J. L., Gibson, J. F., & Hajibabaei, M. (2012). Next-generation sequencing technologies for environmental DNA research. *Molecular Ecology*, 21(8), 1794–1805.

Shoun, H., Kim, D.-H., Uchiyama, H., & Sugiyama, J. (1992). Denitrification by fungi. *FEMS Microbiology Letters*, 94(3), 277–281. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.1992.tb05331.x>

Sigala, I., Caballero, M., Correa-Metrio, A., Lozano-García, S., Vazquez, G., Perez, L., & Zawisza, E. (2017). Basic limnology of 30 continental waterbodies of the Transmexican Volcanic Belt across climatic and environmental gradients. *Boletín de La Sociedad Geológica Mexicana*, 69(2).

Sousa, F. L., Thiergart, T., Landan, G., Nelson-Sathi, S., Pereira, I. A. C., Allen, J. F., ... Martin, W. F. (2013). Early bioenergetic evolution. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, 368(1622), 20130088. <https://doi.org/10.1098/rstb.2013.0088>

Stackebrandt, E., & Otten, L. G. (2014). The Class Nitrospirae. In E. Rosenberg, E. F. DeLong, S. Lory, E. Stackebrandt, & F. Thompson (Eds.), *The Prokaryotes: Actinobacteria* (pp. 587–594). https://doi.org/10.1007/978-3-642-30138-4_197

Stal, L. J., Severin, I., & Bolhuis, H. (2010). The Ecology of Nitrogen Fixation in Cyanobacterial Mats BT - Recent Advances in Phototrophic Prokaryotes (P. C. Hallenbeck, Ed.). New York, NY: Springer New York.

Stolz, J. F. (2000). Structure of microbial mats and biofilms. In *Microbial sediments* (pp. 1–8). Springer.

Tavera, R., & Komárek, J. (1996). Cyanoprokaryotes in the volcanic lake of Alchichica, Puebla State, Mexico. *Arch. Hydrobiol.(Suppl.)(Algol. Stud.)*, 117, 511–538.

Team, R. C. (2019). R: A Language and Environment for Statistical Computing. Retrieved from <https://www.r-project.org/>

Tewari, V., & Seckbach, J. (2011). *Stromatolites: interaction of microbes with sediments* (Vol. 18). Springer Science & Business Media.

Torres Huesca, J. (2018). Detección y caracterización molecular de las bacterias sulfato reductoras en microbialitas de un lago crater alcalino de México. Universidad Nacional Autónoma de México.

Valdespino-Castillo, P. M., Alcántara-Hernández, R. J., Merino-Ibarra, M., Alcocer, J., Macek, M., Moreno-Guillén, O. A., & Falcón, L. I. (2017). Phylotype dynamics of bacterial

P utilization genes in microbialites and bacterioplankton of a monomictic endorheic lake. *Microbial Ecology*, 73(2), 296–309.

Visscher, P. T., & Stolz, J. F. (2005). Microbial mats as bioreactors: populations, processes, and products. In *Geobiology: Objectives, Concepts, Perspectives* (pp. 87–100). Elsevier.

Ward, B. (2012). The global nitrogen cycle. In H. A. Knoll, D. E. Canfield, & K. O. Konhause (Eds.), *Fundamental of geobiology* (1st ed., pp. 36–48). Wiley-Blackwell.

Westall, F., Foucher, F., Bost, N., Bertrand, M., Loizeau, D., Vago, J. L., ... Bréhéret, J.-G. (2015). Biosignatures on Mars: what, where, and how? Implications for the search for martian life. *Astrobiology*, 15(11), 998–1029.

Yokota, A. (2014). The Family Iamiaceae. In E. Rosenberg, E. F. DeLong, S. Lory, E. Stackebrandt, & F. Thompson (Eds.), *The Prokaryotes: Actinobacteria* (pp. 391–395). https://doi.org/10.1007/978-3-642-30138-4_281

Yue, L., Kong, W., Ji, M., Liu, J., & Morgan-Kiss, R. M. (2019). Community response of microbial primary producers to salinity is primarily driven by nutrients in lakes. *Science of The Total Environment*, 696, 134001.

Zarzycki, J., Brecht, V., Müller, M., & Fuchs, G. (2009). Identifying the missing steps of the autotrophic 3-hydroxypropionate CO₂ fixation cycle in *Chloroflexus aurantiacus*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 106(50), 21317–21322.

Zhang, J., Ding, X., Guan, R., Zhu, C., Xu, C., Zhu, B., ... Lu, Z. (2017). Evaluation of different 16S rRNA gene V regions for exploring bacterial diversity in a eutrophic freshwater lake. *Science of the Total Environment*, 618, 1254–1267. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2017.09.228>

Zhu, T., & Dittrich, M. (2016). Carbonate precipitation through microbial activities in natural environment, and their potential in biotechnology: a review. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, 4, 4.

Zhu, X., Li, W., Zhan, L., Huang, M., Zhang, Q., & Achal, V. (2016). The large-scale process of microbial carbonate precipitation for nickel remediation from an industrial soil. *Environmental Pollution*, 219, 149–155.

12. Anexos

12.1. Extracción y cuantificación de ADN

Las muestras de microbialitas se mantuvieron a -20°C hasta su análisis. La biomasa de cada muestra (0.25 g) fue obtenida mediante el raspado de la superficie (Torres-Huesca, 2018) con navajas estériles, en varios sitios de la muestra con el fin de rescatar la mayor diversidad de genomas y la mayor cantidad de biomasa. Para los tapetes, se colectaron muestras de biomasa de un peso semejante. El procesamiento fue hecho en condiciones asépticas para evitar la contaminación. Una vez obtenida la biomasa, se realizó la extracción del ADN metagenómico con el kit de extracción DNeasy PowerSoil (Qiagen) siguiendo el procedimiento recomendando por el fabricante, exceptuando el último paso, donde se añadieron 50 µL de la solución C6 (amortiguador de elución, Tris 10 mM) para obtener mayor concentración del material genético. La cuantificación del ADN metagenómico se hizo con el fluorómetro Qubit 3.0 (Thermo Fisher Scientific), empleando el ensayo de alta sensibilidad.

12.2. Amplificación de fragmento 16S rRNA

Para conocer la composición procariótica (bacterias y arqueas) en las microbialitas y tapetes, se hizo una exploración de fragmentos 16S rRNA. La generación de amplicones 16S rRNA a partir de ADN metagenómico extraído anteriormente se hizo siguiendo el protocolo del Earth Microbiome Project (Thompson et al., 2017), donde se secuencian con la plataforma Illumina MiSeq. Para generar los fragmentos 16S rRNA a secuenciar se usaron los oligonucleótidos iniciadores (o primers) 515F, (5'-GTGYCAGCMGCCGCGGTAA-3') y 806R, (5'-GGACTACHVGGGTWTCTAAT-3'); los cuales flanquean la región hipervariable V4 del gen (ca. 290 pares de bases del

fragmento). Los oligonucleótidos contenían los adaptadores para la secuenciación más un código identificador lo cual hace que los amplicones aumenten de tamaño a 350 pares de bases (pb).

La mezcla para PCR fue hecha con un volumen final de 25 μL al cual se le agregaron 13 μL de agua grado molecular, 2.5 μL de PCR buffer (10X), 0.5 μL de cada oligonucleótido (directo y reverso) (10 μM), 0.5 μL de dNTPs (200 μM), 1 U DNA polimerasa ExTaKaRa (TaKaRa Inc.) y 1 μL del ADN molde (2-50 ng). El perfil térmico usado se estableció en un termociclador MaxyGene (Axygen) con una desnaturalización inicial de 3 min a 94 °C, seguido de 35 ciclos de i) 94°C por 30 s, ii) 55°C por 30 s y iii) 72°C por 30 s; finalizando con un ciclo final de 72°C por 10 min. Los amplicones fueron verificados por geles de agarosa al 1% teñidos con SYBR Safe (Invitrogen) 1X y 1X de amortiguador TAE (pH 8, 40mM Tris-Acetato y 1 mM EDTA), en una electroforesis realizada a 80 V durante 25 min, en TAE 0.5X.

Finalmente, los geles se visualizaron en un transiluminador con luz LED azul. Los amplicones fueron purificados por perlas magnéticas (Agencourt AMPure XP, Beckman Coulter) y conjuntados a una concentración de 20 ng para su envío al secuenciado.