

IPICYT

**INSTITUTO POTOSINO DE INVESTIGACIÓN
CIENTÍFICA Y TECNOLÓGICA, A.C.**

POSGRADO EN CIENCIAS AMBIENTALES

**Oxidación Anaerobia de Metano Acoplada a la
Reducción de Sustancias Húmicas y sus
Análogos Estructurales**

Tesis que presenta

Edgardo Iván Valenzuela Reyes

Para obtener el grado de

Maestro en Ciencias Ambientales

Director de la Tesis:

Dr. Francisco Javier Cervantes Carrillo

San Luis Potosí, S.L.P., Julio de 2015



Constancia de aprobación de la tesis

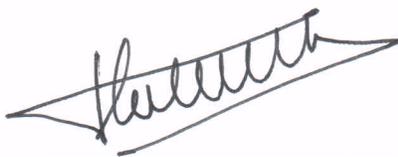
La tesis "***Oxidación Anaerobia de Metano Acoplada a la Reducción de Sustancias Húmicas y sus Análogos Estructurales***" presentada para obtener el Grado de Maestro en Ciencias Ambientales fue elaborada por **Edgardo Iván Valenzuela Reyes** y aprobada el **diecisiete de julio del dos mil quince** por los suscritos, designados por el Colegio de Profesores de la División de Ciencias Ambientales del Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A.C.



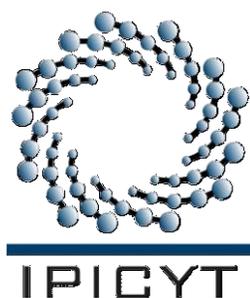
Dr. Francisco Javier Cervantes Carrillo
Director de la tesis



Dra. Nguyen Esmeralda López Lozano
Miembro del Comité Tutorial



Dr. Frédéric Thalasso Siret
Miembro del Comité Tutorial



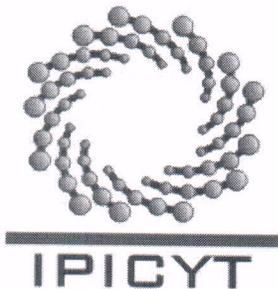
Créditos Institucionales

Esta tesis fue elaborada en el Laboratorio de Biotecnología e Ingeniería Ambiental de la División de Ciencias Ambientales del Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A.C., bajo la dirección del Dr. Francisco Javier Cervantes Carrillo.

Durante la realización del trabajo el autor recibió una beca académica del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (299501) y del Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A. C.

Este trabajo de investigación fue financiado por CONACyT a través del proyecto de Ciencia Básica SEP-CONACYT 155656.

Al Comité de Becas del Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A. C., por los recursos financieros otorgados para la divulgación de parte de los resultados de esta investigación en el XVI Congreso Nacional de Biotecnología y Bioingeniería.



Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A.C.

Acta de Examen de Grado

El Secretario Académico del Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A.C., certifica que en el Acta 019 del Libro Primero de Actas de Exámenes de Grado del Programa de Maestría en Ciencias Ambientales está asentado lo siguiente:

En la ciudad de San Luis Potosí a los 17 días del mes de julio del año 2015, se reunió a las 10:00 horas en las instalaciones del Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A.C., el Jurado integrado por:

Dr. Frédéric Thalasso Siret	Presidente	CINVESTAV
Dra. Nguyen Esmeralda López Lozano	Secretaria	IPICYT
Dr. Francisco Javier Cervantes Carrillo	Sinodal	IPICYT

a fin de efectuar el examen, que para obtener el Grado de:

MAESTRO EN CIENCIAS AMBIENTALES

sustentó el C.

Edgardo Iván Valenzuela Reyes

sobre la Tesis intitulada:

Oxidación Anaerobia de Metano Acoplada a la Reducción de Sustancias Húmicas y sus Análogos Estructurales

que se desarrolló bajo la dirección de

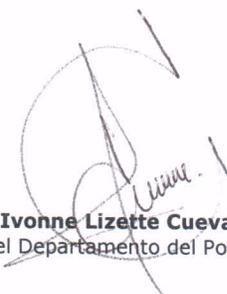
Dr. Francisco Javier Cervantes Carrillo

El Jurado, después de deliberar, determinó

APROBARLO

Dándose por terminado el acto a las 11:17 horas, procediendo a la firma del Acta los integrantes del Jurado. Dando fe el Secretario Académico del Instituto.

A petición del interesado y para los fines que al mismo convengan, se extiende el presente documento en la ciudad de San Luis Potosí, S.L.P., México, a los 17 días del mes de julio de 2015.


Mtra. Ivonne Lizette Cuevas Vélez
Jefa del Departamento del Posgrado


Dr. Marcial Bonilla Marín
Secretario Académico



Dedico este trabajo de tesis a mis padres Isabel y Enrique quienes han sido un ejemplo de perseverancia y mi inspiración para seguir adelante. ¡Gracias por su apoyo incondicional!

Agradecimientos

Quiero agradecer en primera instancia al Dr. Francisco Cervantes, por tener la confianza de dejar en mis manos este gran proyecto que nos apasiona a ambos, el gran apoyo recibido en todos los sentidos, y por respetar y valorar mi trabajo e ideas.

Agradezco a mi comité tutorial por el tiempo invertido en la revisión de este trabajo, así como por los comentarios y observaciones realizadas a éste. Agradezco especialmente a la Dra. Sonia Arriaga por haberme inspirado e impulsado a continuar en el campo de la investigación durante mi estancia de licenciatura en IPICYT, agradezco sus consejos y amistad.

Agradezco el apoyo técnico recibido por parte del cuerpo técnico de la División de las Ciencias Ambientales, LANBAMA y LINAN: a la M. C. Beatriz Adriana Rivero Escoto, al M.C. Juan Pablo Rodas, a la I. Q. María del Carmen Rocha y al M.C. Guillermo Vidriales. Doy gracias especialmente a la M.C. Dulce Partida, Dra. Angélica Aguilar Aguilar y M.C. Elizabeth Cortez Cedillo, por su amabilidad, espíritu de servicio y compromiso.

Agradezco a la Dra. Valeria Souza (UNAM) por su gran apoyo en el viaje a Cuatro Ciénegas para la obtención de los sedimentos Pozas Rojas y Churince, y a la Dra. Alejandra Prieto Davo (UNAM) por la provisión del sedimento Ciénega Sisal.

Doy gracias también a la IBQ. Érika Ríos Valenciana, a la M. C. Aurora Pat Espadas y a la M. C. Emilia Ríos del Toro por resolver un gran número de dudas tanto fuera como dentro del laboratorio.

Contenido

Oxidación Anaerobia de Metano Acoplada a la Reducción de Sustancias Húmicas y sus Análogos Estructurales.

Constancia de aprobación de la tesis	ii
Créditos institucionales	iii
Acta de examen	iv
Dedicatorias	v
Agradecimientos	vi
Lista de tablas	x
Lista de figuras	xi
Abreviaturas	xiii
Resumen	xiv
Abstract	xv

1. INTRODUCCIÓN	1
2. MARCO TEÓRICO	3
2.1 GASES DE EFECTO INVERNADERO	3
2.1.1 Importancia de la Emisión Natural de Gases de Efecto Invernadero	4
2.1.2 Metano: Fuentes y Sumideros	5
2.2 OXIDACIÓN ANAEROBIA DE METANO	6
2.2.1 Metanotrofía Anaerobia: Microbiota y Rutas Metabólicas	8
2.3 SUSTANCIAS HÚMICAS	9
2.3.1 Grupos Funcionales Transportadores de Electrones en las Sustancias Húmicas	10
2.4 MICROORGANISMOS REDUCTORES DEL HUMUS	11
2.5 OXIDACIÓN ANAEROBIA DE CH ₄ ACOPLADA A LA REDUCCIÓN DE SUSTANCIAS HÚMICAS	13
2.6 ÓXIDOS METÁLICOS: GOETHITA Y VERNADITA	13
3. JUSTIFICACIÓN	15
4. HIPOTESIS Y OBJETIVOS	15
4.1 HIPÓTESIS	15
4.2 OBJETIVO GENERAL	15

4.3 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	16
5. MATERIALES Y MÉTODOS	16
5.1 SEDIMENTOS	16
5.2 MEDIO BASAL	17
5.3 ACEPTORES DE ELECTRONES	18
5.3.1 AQDS	18
5.3.2 Leonardita	18
5.3.3 Humiados de Hierro	18
5.3.4 Goethita	18
5.3.5 Vernadita	19
5.4 INCUBACIONES	19
5.4.1 Incubaciones con AQDS (1 ^{er} Ciclo)	19
5.4.1.1 Incubaciones con AQDS (2 ^{do} y 3 ^{er} Ciclo)	20
5.4.2 Incubaciones con Humiados de Hierro	21
5.4.3 Incubaciones Leonardita y Goethita (1 ^{er} Ciclo)	21
5.4.3.1 Incubaciones Leonardita y Goethita (2 ^{do} Ciclo)	21
5.4.3.2 Incubaciones Leonardita y Goethita (3 ^{er} Ciclo)	22
5.4.4 Incubaciones Leonardita y Vernadita (1 ^{er} Ciclo)	22
5.4.4.1 Incubaciones Leonardita y Vernadita (2 ^{do} Ciclo)	23
5.5 MÉTODOS ANALÍTICOS	24
5.5.1 Composición Elemental	24
5.5.2 Sólidos Totales, Volátiles y Fijos	24
5.5.3 Carbono Orgánico Total	24
5.5.4 Determinación de Sulfato	24
5.5.5 Determinación de Hierro Ferroso	25
5.5.6 Determinación de la Reducción de los Ácidos Húmicos	25
5.5.7 Determinación de la Reducción de la AQDS	26
5.5.8 Cuantificación del Manganeso Reducido	26
5.5.9 Cuantificación del Sulfuro Disuelto	26
5.5.10 Cuantificación de las Concentraciones de CH ₄	26

5.5.11	Difracción de Rayos X	27
5.6	DIAGRAMAS DE ESPECIACIÓN	27
6	RESULTADOS Y DISCUSIÓN	28
6.1	Caracterización de Sedimentos	28
6.2	INCUBACIONES CON AQDS COMO AFE	30
6.2.1	Granja Don Jorge y Pozas Rojas	30
6.2.2	Churince, Cuatro Ciénegas	30
6.2.3	San Quintín, Baja California	33
6.2.4	Sisal, Yucatán	37
6.3	INCUBACIONES CON LEONARDITA Y GOETHITA COMO AFE	42
6.3.1	San Quintín, Baja California	42
6.3.2	Churince, Cuatro Ciénegas	43
6.3.3	Sisal, Yucatán	45
6.4	INCUBACIONES CON LEONARDITA Y VERNADITA COMO AFE	51
6.4.1	Sisal, Yucatán	51
6.5	INCUBACIONES CON HUMIATOS DE HIERRO COMO AFE	55
7	CONCLUSIONES	57
7.1	PRINCIPALES HALLAZGOS	57
7.2	CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS	58
8	BIBLIOGRAFÍA	60

Lista de tablas

Oxidación Anaerobia de Metano Acoplada a la Reducción de Sustancias Húmicas y sus Análogos Estructurales.

1. Potenciales de Calentamiento Global y Vida Media de los GEI más relevantes.	3
2. Resumen de reacciones OAM y energía libre de Gibbs obtenida.	7
3. Biota con capacidad de llevar a cabo el proceso OAM, hábitats que la alberga y rutas metabólicas propuestas.	8
4. Interacciones de relevancia ambiental de las SH.	10
5. Sedimentos y su ubicación geográfica.	17
6. Sumario de experimentos y controles CH ₄ -AQDS.	20
7. Sumario de experimentos y controles CH ₄ -leonardita-óxidos metálicos.	23
8. Caracterización de sedimentos.	28
9. Resumen de actividad OAM en incubaciones Churince-AQDS.	32
10. Resumen de actividad OAM en incubaciones San Quintín-AQDS.	35
11. Resumen de actividad OAM en incubaciones Sisal-AQDS.	41
12. Balance de electrones y consumos totales de CH ₄ en el experimento Sisal con leonardita y goethita.	46
13. Balance de electrones y consumos totales de CH ₄ en el experimento Sisal con leonardita y vernadita	52

Lista de figuras

Oxidación Anaerobia de Metano Acoplada a la Reducción de Sustancias Húmicas y sus Análogos Estructurales.

1. Estimación de la emisión natural anual de metano.	5
2. Estructura hipotética de las SH.	9
3. Estructura general de las quinonas y estructura de la antraquinona-2,6-disulfonato.	11
4. Oxidación de un contaminante con SH o quinonas como AFE.	12
5. SH como mediadores redox en la oxidación anaerobia de contaminantes con óxidos metálicos como AFE.	12
6. Oxidación anaerobia de metano y reducción de AQDS por el sedimento Churince (Ciclo 2).	31
7. Oxidación anaerobia de metano y reducción de AQDS por el sedimento San Quintín (Ciclo 2).	34
8. Oxidación anaerobia de metano y reducción de AQDS por el sedimento Sisal (Ciclo 1).	37
9. Oxidación anaerobia de metano y reducción de AQDS por el sedimento Sisal (Ciclo 2).	38
10. Oxidación anaerobia de metano y reducción de AQDS por el sedimento Sisal (Ciclo 3).	40
11. Oxidación anaerobia de metano y reducción de Leonardita y Goethita por el sedimento San Quintín.	42
12. Oxidación anaerobia de metano y reducción de Leonardita y Goethita por el sedimento Churince.	44
13. Oxidación anaerobia de metano y reducción de Leonardita y Goethita por el sedimento Sisal.	45
14. Diagrama de especiación del Fe^{+2} en el medio basal empleado.	48
15. Difractogramas del sedimento, sedimento después de la incubación con Leonardita y Goethita y la Goethita sintetizada.	49
16. Oxidación anaerobia de metano y reducción de Leonardita y Vernadita por el sedimento Sisal.	51

17. Diagrama de especiación del Mn^{+2} en el medio basal empleado.	53
18. Difractogramas del sedimento, sedimento después de la incubación con Leonardita y Vernadita y la Vernadita sintetizada.	54
19. Oxidación anaerobia de metano en sedimentos Churice y San Quintín con Humiados de Fe como AFE.	56

Abreviaturas

Oxidación Anaerobia de Metano Acoplada a la Reducción de Sustancias Húmicas y sus Análogos Estructurales.

AFE	Aceptor final de electrones.
AH	Ácidos húmicos.
AH₂DS	Antrahidroquinona-2,6-disulfonato.
ANME	Anaerobic methanophilic archaea.
AMO	Anaerobic methane oxidation.
APHA	American Public Health Association.
AQDS	Antraquinona-2,6-disulfonato.
α-FeO(OH)	Forma de hierro en estado de oxidación (III) conocida como Goethita.
BSR	Bacteria sulfato reductora.
COT	Carbono orgánico total.
δ-MnO₂	Forma de manganeso en estado de oxidación (IV) conocida como Vernadita.
EPA	Environmental Protection Agency.
FISH	Fluorescence In Situ Hybridization.
GEI	Gases de Efecto Invernadero.
HS	Humic substances.
ICP-OES	Plasma de acoplamiento inductivo con espectrofotómetro de emisión óptico.
IHSS	International Humic Substances Society.
IPCC	Intergovernmental Panel on Climate Change.
MBGD	Microorganismos del grupo Marino Béntico tipo D.
OAM	Oxidación anaerobia de metano.
PCG	Potencial de calentamiento global.
SH	Sustancias Húmicas.
SV	Sólidos volátiles.
ΔG	Energía libre de Gibbs.

Edgardo Valenzuela Reyes (2015). Oxidación Anaerobia de Metano Acoplada a la Reducción de Sustancias Húmicas y sus Análogos Estructurales.

Resumen

Las **sustancias húmicas (SH)**, provenientes de la descomposición de materia vegetal, juegan importantes roles en el medio ambiente. Un ejemplo, es la capacidad de las SH para ser **aceptores finales de electrones (AFE)** en la respiración microbiana. El humus, puede además fungir como **transportador de electrones**, entre microorganismos anaerobios, y aceptores de electrones sólidos como los óxidos metálicos. Esta reactividad de las SH, y su ubicuidad en ecosistemas terrestres y acuáticos, las colocan como piezas clave en el metabolismo microbiano en suelos y sedimentos carentes de O₂. La **oxidación anaerobia de metano (OAM)**, contribuye como sumidero de este gas de efecto invernadero en el océano, ríos, lagos y humedales. La OAM **convierte biológicamente el CH₄ en CO₂**, en total ausencia de oxígeno, es decir, la OAM convierte una molécula que tiene un **potencial de calentamiento global de 25** en una que tiene **1**. La OAM, a la fecha, ha sido documentada bajo el acoplamiento a la reducción de AFEs alternativos de relevancia ambiental, sin embargo, aunque teórica y termodinámicamente es posible, la **ocurrencia de la OAM acoplada a la reducción de SH no ha sido documentada**. En este trabajo se buscó microbiota con la capacidad de acoplar la OAM a la reducción de SH y sus análogos estructurales en sedimentos de cinco cuerpos de agua mexicanos. Sólo un sedimento proveniente de una Ciénega Yucateca (**Ciénega Sisal**), mostró la capacidad de acoplar la OAM a la reducción de un análogo de las SH (**antraquinona,2-6,disulfonato**), y a una forma de ácidos húmicos (**leonardita**) a través de varios ciclos. Este estudio muestra evidencia de que las SH y los microorganismos que las reducen, tienen el potencial de **actuar como sumidero de CH₄** en cuerpos de agua. Adicionalmente, se documenta el efecto de los **óxidos de Fe y Mn (goethita y vernadita, respectivamente)** sobre el proceso al aumentar el consumo de CH₄ **re-oxidando los ácidos húmicos**.

PALABRAS CLAVE: Humus, sedimentos, sumidero de CH₄, metanotrofia, quinonas, efecto invernadero, óxidos metálicos.

Edgardo Valenzuela Reyes (2015). Anaerobic Methane Oxidation coupled to the Reduction of Humic Substances and their Structural Analogues.

Abstract

Humic substances (HS) is the name given to the recalcitrant molecules formed through the chemical and biochemical decomposition of organic matter. HS constitute a highly relevant **terminal electron acceptor (TEA)** due to its widespread presence in terrestrial and aquatic environments. Humus reducing microorganisms have shown biotechnological potential by oxidizing priority pollutants using both, HS and their structural analogues (model quinones i.e.: **anthraquinone,2-6,disulfonate; AQDS**) to accomplish its respiratory pathway. One important biological process regulating the emission of CH₄ to the atmosphere is **anaerobic methane oxidation (AMO)**. In the AMO process, anaerobic microorganisms uptake methane as carbon and energy source at the time they reduce an alternative TEA. Sulfate, nitrate, nitrite and metallic ions, such as iron and manganese, have been reported to serve as TEA in AMO taking place at the ocean and fresh water bodies, like lakes and wetlands. Although energetically favorable and theoretically feasible, the AMO process coupled to HS reduction has not been reported to date, underestimating what could be an important sink of CH₄ in soils and anoxic sediments of a variety of water bodies. The aim of this work was to evaluate the capacity of five Mexican anoxic sediments to **accomplish the oxidation of CH₄ coupled to the reduction of HS and the humic model compound, AQDS**. A sediment from the **Sisal marsh** (Yucatán, Mexico) was capable of performing the AMO process coupled to AQDS and Leonardite (a form of humic acids) reduction through several cycles. Also, the re-oxidizing effect of Fe & Mn oxides (goethite and vernadite, respectively) was evaluated. To our knowledge, this is the first evidence of the existence of a CH₄ sink in which HS and the microorganisms capable of reducing them play a major role on AMO.

KEY WORDS: Humus, sediments, CH₄ sinks, methanotrophy, quinones, greenhouse effect, metallic oxides

1. INTRODUCCIÓN

El planeta Tierra ha experimentado un aumento de 0.8 °C en su temperatura media a partir de 1880. La mayor parte de este incremento (dos tercios) ha ocurrido desde 1975 (0.15 – 0.2°C por década) teniendo como consecuencia el *Cambio Climático* (Nasa Earth Observatory, 2010). En la actualidad, el efecto del Cambio Climático se hace visible a través de consecuencias notorias; los glaciares han perdido volumen por derretimiento, el nivel del mar ha aumentado, y se han experimentado ondas de calor más prolongadas e intensas, por mencionar algunos ejemplos (climate.nasa.gov/effects, 2015). Las estimaciones del Panel Intergubernamental en Cambio Climático (IPCC) pronostican que en los próximos 100 años, la temperatura media del planeta se incrementará de 0.3 a 1.7 °C (IPCC, 2007) trayendo consigo efectos significantes a la flora, fauna, y al ser humano. Actualmente, los científicos del IPCC, manifiestan que los gases de efecto invernadero (GEI) son responsables en un 95% del incremento en la temperatura que el planeta ha sufrido (IPCC, 2014). El término GEI, se aplica a un grupo de gases de distinta composición química que se encuentran en la atmósfera terrestre y que son capaces de absorber y emitir radiación de onda larga (infrarrojo) hacia el planeta tierra. Como consecuencia de esto, el aumento en la concentración de GEI se ve reflejado en un incremento en la temperatura terrestre. Las fuentes de emisión de GEI pueden ser de origen natural, o de origen antropogénico (provenientes de actividades humanas). Estas últimas reciben comúnmente mayor atención, pese a esto, las fuentes naturales no son triviales, ya que éstas, en el caso de algunos gases, pueden representar porcentajes de emisión mayores al 50% anual (por ejemplo el N₂O). Otros motivos para dirigir la mirada hacia las emisiones de GEI naturales, es el hecho de que éstas también han mostrado cambios a lo largo del tiempo que son directa o indirectamente consecuencia de la actividad humana (Cao *et al*, 1998). Con propósito de hacer estimaciones de concentraciones de GEI en la atmósfera, se requiere un conocimiento completo de las fuentes y sumideros de gases existentes (flux), lo cual es requerido también para la elaboración de

proyecciones concernientes a cambio climático en el futuro (EPA, 2010). El CH₄, es un potente GEI (25-32>CO₂) cuya emisión natural constituye un 37% de la emisión total anual. De este porcentaje, aproximadamente 209.4 TgCH₄/año son emitidos por cuerpos de agua (océano, pantanos, humedales, lagos y ríos) (EPA, 2010). Las emisiones de CH₄ por cuerpos de agua son de origen geológico (hidratos y reservorios) o microbiano (*metanogénesis*). Mientras que la metanogénesis es un proceso fisiológico, bioquímico y genéticamente bien conocido, la *metanotrofia* (estrategia metabólica para utilizar CH₄ como fuente de C y energía) aún requiere de estudio. La *metanotrofia anaerobia*, que es de reciente descubrimiento, demanda de un estudio a fondo en las áreas anteriormente mencionadas; además, la investigación de la metanotrofia acoplada a la reducción de *aceptores finales de electrones* de relevancia ambiental, es necesaria bajo la premisa de descubrir la totalidad de procesos microbianos que actúan como sumideros de CH₄. Este tipo de procesos microbianos aportan servicios ecosistémicos de regulación al planeta Tierra y sin su existencia la vida en el planeta no sería posible. Las sustancias húmicas (SH) son materia recalcitrante (no biodegradable) de formación centenaria, y características excepcionales (Stevenson, 1994). La gran cantidad de grupos funcionales con capacidad de transportar electrones que las SH poseen, les otorga la capacidad de ser utilizadas como aceptor final de electrones (AFE) en la respiración microbiana (Lovley *et al*, 1996). Ya que las SH son ubicuas tanto en ambientes terrestres, como acuáticos, y se ha demostrado que una gran variedad de microorganismos (Coates *et al*, 1998) tienen la capacidad de reducirlas, la existencia de procesos como la Oxidación Anaerobia de Metano (OAM) acoplada a la reducción de SH podría ser un proceso que contribuye a la mitigación de la emisión de CH₄. Debido a las interacciones que las SH pueden tener con metales como el hierro y el manganeso, la OAM acoplada a la reducción de SH podría ser un sumidero aún mayor bajo la presencia de estos iones. Debido a la gran abundancia del Fe y Mn en la naturaleza, esta hipótesis tiene grandes implicaciones en la mitigación de CH₄ en suelos y sedimentos.

2. MARCO TEÓRICO

2.1 GASES DE EFECTO INVERNADERO

Gas de efecto invernadero (GEI), es el nombre que reciben aquellas moléculas gaseosas que tienen la capacidad de absorber y emitir radiación de onda larga (infrarrojo) en la atmósfera terrestre. Los investigadores del *Panel Intergubernamental en Cambio Climático* (IPCC) coinciden en que la emisión de GEI ha contribuido en un 95% al aumento de temperatura que la tierra ha sufrido desde la década de los 50's (IPCC, 2014; Hansen *et al*, 2010). Las fuentes de emisión de GEI se dividen en antropogénicas y naturales. Actividades como la agricultura, la industria, y el transporte, son ejemplos de actividades humanas que emiten gases (EPA, 2013). Por otro lado, las emisiones naturales son el resultado de fenómenos geoquímicos y biológicos. Algunas fuentes de emisión natural son los hidratos de metano, el permafrost, los eventos de actividad volcánica, los incendios naturales, y la emisión de gases por plantas y microorganismos. En la **Tabla 1** se enlistan los GEI más importantes y sus características más relevantes proyectadas a distintas escalas de tiempo.

Tabla 1. Potenciales de calentamiento global y vida media de los GEI más relevantes (IPCC, 2007).

Nombre del gas	Fórmula química	Vida media (años)	Potencial de Calentamiento Global para un horizonte temporal dado		
			20 años	100 años	500 años
Dióxido de carbono	CO ₂		1	1	1
Metano	CH ₄	12	72	25	7.6
Óxido nitroso	N ₂ O	114	289	298	153
CFC-12	CCl ₂ F ₂	100	11000	10900	5200
HCFC-22	CHClF ₂	12	5160	1810	549
Tetrafluorometano	CF ₄	50000	5210	7390	11200
Hexafluoroetano	C ₂ F ₆	10000	8630	12200	18200
Hexafluoruro de Azufre	SF ₆	3200	16300	22800	32600
Trifluoruro de Nitrógeno	NF ₃	740	12300	17200	20700

Distintos GEI, poseen tanto distinta vida media en la atmósfera, como distinto potencial de calentamiento global (PCG). El PCG es una medida relativa que compara la cantidad de calor atrapada por una determinada cantidad de un gas con respecto a la cantidad de calor atrapada por la misma cantidad de CO₂. Es de esta manera que aunque el CO₂ sea el GEI más abundante en la atmósfera, gases de menor concentración como el CH₄ o el N₂O representan un peligro mayor. Tomando en cuenta esto, los tres GEI de mayor impacto son: el dióxido de carbono (CO₂), el metano (CH₄) y el óxido nitroso (N₂O). Los tres gases reducen la capacidad oxidante de la atmósfera, propiciando la acumulación de ozono en la tropósfera; además, su gran capacidad de absorción de radiación infrarroja, provoca que, pequeños incrementos en la concentración de estos gases, se vean reflejados en un gran impacto en su contribución al cambio climático.

2.1.1 Importancia de la Emisión Natural de Gases de Efecto Invernadero

Mientras que mucha atención se presta a la emisión antropogénica de GEI, existe mucha evidencia de que la emisión de estos gases también ha sufrido un incremento a través del tiempo (Cao *et al*, 1998). Esto puede deberse a que las actividades humanas tienen un potencial significativo de modificar estas emisiones naturales tanto directa, como indirectamente (EPA, 2013). Las estimaciones a futuro (proyecciones) indican que la emisión natural de estos gases, en los próximos 100 años, se verá influenciada por el aumento en la temperatura de la Tierra que ha venido ocurriendo y que actualmente continúa (IPCC, 2007). La realización de este tipo de estimaciones requiere del conocimiento del *flux neto* de emisión de gases en puntos específicos. Debido a que un *flux* contempla la contribución de las fuentes, pero también de los *sumideros* de un determinado gas, se debe realizar un esfuerzo mayor en la identificación de actores naturales en el flux de gases con altos PCG con la finalidad de integrarlos a los modelos actuales de emisión.

2.1.2 Metano: Fuentes y Sumideros

El metano (CH_4), es un GEI que se encuentra abundantemente en la atmósfera terrestre (2^{do} más abundante), con un incremento anual del 1%, y un tiempo de vida media en la atmósfera de 12 años, el CH_4 se posiciona como uno de los gases de mayor potencial de calentamiento global (PCG; 25 a 34 veces $>$ CO_2 ; IPCC, 2007). La emisión natural de CH_4 constituye un 37% del flux total anual y los principales componentes de esta emisión son los cuerpos de agua, reservorios naturales y algunos animales como las termitas y los rumiantes. La emisión por cada uno de estos contribuyentes se resume en la **Figura 1**.

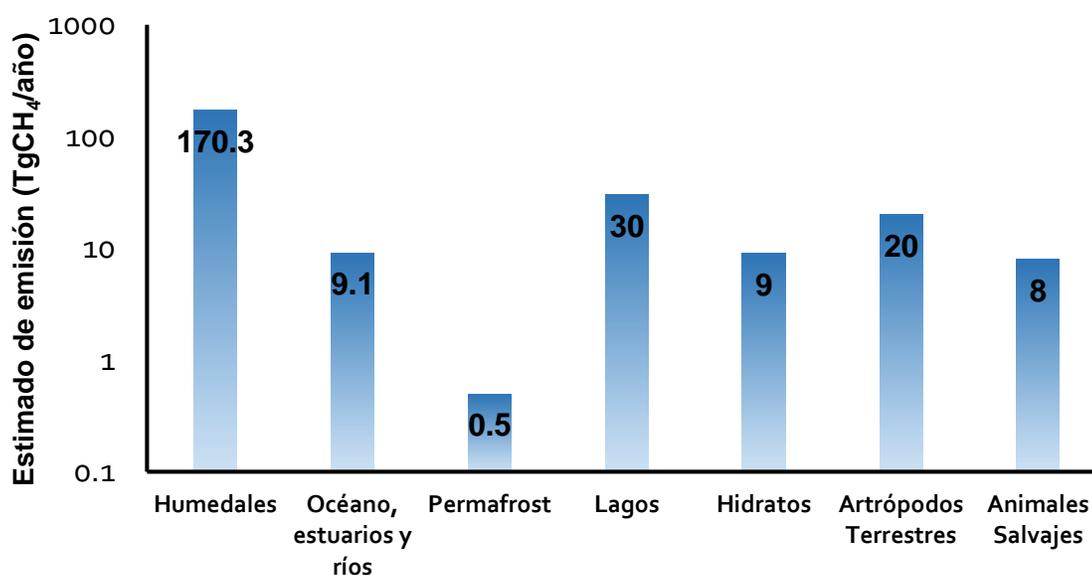


Figura 1. Estimación de la emisión natural anual de metano (IPCC, 2013).

Como se observa en la **Figura 1**, más de 200 Tg de CH_4 son emitidos al año por cuerpos de agua que van desde el océano hasta ríos. En estos cuerpos de agua, la mayoría del CH_4 es producido en sedimentos como una estrategia metabólica de la microbiota para obtener energía. Esta estrategia ha sido nombrada *metanogénesis* y puede ser resultado de la reducción biológica del CO_2 con H_2 como donador de electrones (*hidrogenotrófica*), o resultado de la partición de la molécula de acetato (CH_3COOH ; producto de la fermentación de la materia orgánica) en una molécula de CH_4 y una de CO_2 (*acetoclástica*). El CH_4 producido por estas vías, asciende a

través del sedimento y la columna de agua en cuyo camino puede ser tomado como fuente de carbono y energía por otro grupo de microorganismos, éstos lo oxidan a la vez que reducen una molécula de potencial redox más positivo (metanotrofia anaerobia). Finalmente, el CH₄ que logra alcanzar la zona aerobia, es oxidado con O₂ como el agente oxidante, y el remanente es liberado a la atmósfera, donde puede ser oxidado abióticamente debido al ataque químico de radicales libres como el hidroxilo (OH·), que tienen como producto de reacción CO₂ y H₂O.

2.2 OXIDACIÓN ANAEROBIA DE METANO

Oxidación Anaerobia de Metano (OAM) es el nombre del proceso llevado a cabo por archaeas y bacterias en ausencia de O₂ mediante el cual la molécula de CH₄ es oxidada hasta CO₂. La OAM, a diferencia de la oxidación *aerobia* de metano, representa un reto metabólico para los microorganismos que la llevan a cabo. Mientras que el proceso aerobio es realizado vía una reacción catalizada por una enzima *mono-oxigenasa*, la OAM implica la utilización de vías más complejas para lograr el ataque microbiano de una molécula tan estable como es el CH₄. Esta alta estabilidad del CH₄ llevó a los investigadores a negar la existencia de la OAM calificándolo como un proceso bioquímicamente imposible (Sorokin, 1959). Fue al final de los 70's que algunos estudios geoquímicos mostraron perfiles peculiares en la concentración del sulfato (SO₄²⁻) y CH₄ en sedimentos marinos, sugiriendo un consumo de CH₄ desde los sedimentos hacia la columna de agua y una concentración de SO₄²⁻ inversa, menor en las zonas de menor concentración de CH₄ (Barnes & Goldberg, 1976; Zehnder & Brock, 1979). Estas observaciones sugirieron que la oxidación de CH₄ podría estar acoplada a la sulfato reducción (en un proceso 100% anaerobio), éste hecho fue comprobado en años siguientes por estudios de trazado isotópico (Iversen & Jorgensen, 1985); posteriormente, la microbiota asociada fue identificada y las rutas metabólicas fueron propuestas (Hinrichs *et al.*, 1999; Boetius *et al.*, 2000; Hinrichs & Boetius, 2002) . La OAM acoplada a la sulfato-reducción da a los microorganismos una ganancia energética baja ($\Delta G = -20$ a -40 kJ/mol), esto implica que los microorganismos que llevan a cabo este proceso (*archaeas metanotróficas* y bacterias *sulfatoreductoras*) tienen

poca energía disponible para destinar a síntesis celular, y por tanto, su crecimiento es muy lento. Alrededor de 20 años después, Islas-Lima y colaboradores (2004) descubrieron que el proceso OAM podía estar acoplado a la desnitrificación, y dos años después Raghoebarsing y colaboradores (2006) lograron identificar los microorganismos capaces de sustentar el proceso mediante técnicas moleculares y de microscopía (FISH). Estos sorprendentes descubrimientos impulsaron la búsqueda de más procesos respiratorios que pudiesen usar CH₄ como donador de electrones, y fue así que Ettwig *et al.* (2008) documentaron el proceso utilizando nitrito como AFE, Beal *et al.* (2009), usando óxidos metálicos (Fe y Mn), y recientemente Luo y colaboradores usando perclorato (2015). La **Tabla 2** es un resumen de las reacciones de OAM acoplada a la reducción de AFEs de relevancia ambiental, la cantidad de *energía libre de Gibbs* obtenida bajo condiciones estándar y el año de descubrimiento.

Tabla 2. Resumen de reacciones OAM y energía libre obtenida.

Aceptor terminal de electrones	Reacción	Energía libre de Gibbs ΔG (kJ mol ⁻¹)	Ref.
SO₄⁻²	CH ₄ + SO ₄ ⁺² → HS ⁻ + CO ₂ + H ₂ O	-16.6	Reeburgh <i>et al.</i> , 1976
NO₃⁻	CH ₄ + 4NO ₃ ⁻ → CO ₂ + 4NO ₂ ⁻ + 2H ₂ O	-503.4	Islas-Lima <i>et al.</i> , 2004
NO₂⁻	3CH ₄ + 8NO ₂ ⁻ + 8H ⁺ → 3CO ₂ + 4N ₂ + 10H ₂ O	-928	Ettwig <i>et al.</i> , 2008
Fe⁺³	CH ₄ + 8Fe ³⁺ + 2H ₂ O → CO ₂ + 8Fe ⁺² + 8H ⁺	-418.3	Beal <i>et al.</i> , 2009
Mn⁺⁴	5CH ₄ + 8MnO ₄ ⁻ + 19H ⁺ → 5HCO ₃ ⁻ + 8Mn ⁺² + H ₂ O	-991.7	Beal <i>et al.</i> , 2009
Sustancias Húmicas	CH ₄ + SH _{ox} → CO ₂ + SH _{red} + H ₂ O	-30.85 a -416.47	Este estudio
AQDS	CH ₄ + 4AQDS + 2H ₂ O → CO ₂ + 4AH ₂ QDS	-43.2	Este estudio

Hoy día la OAM es reconocida como un importante sumidero de CH₄ en cuerpos de agua; como ejemplo, sin la contribución de la OAM en el océano, la emisión neta del gas sería 90% mayor de lo que actualmente es (9.1 TgCH₄/año). Se estima que los metanótrofos anaerobios consumen de 70 a 300 TgCH₄/año proveniente de las emisiones oceánicas (Conrad, 2009).

2.2.1 Metanotrofia Anaerobia: Microbiota y Rutas Metabólicas

El tipo de microorganismos responsables de la OAM puede ser distinto dependiendo del AFE empleado en el proceso. Las *archaeas metanotróficas*, llamadas ANME por sus siglas en inglés (Hinrichs *et al*, 1999; Orphan *et al*, 2001; Knittel *et al*, 2005) comprenden tres clústers filogenéticos de archaeas (ANME-1, ANME-2 y ANME-3) genéticamente cercanas a los *Methanosarcinales* y *Methanomicrobiales* (archeas metanogénicas). De hecho, las archaeas ANME-1 pueden llevar a cabo actividad metanotrófica o metanogénica dependiendo de la zona y las condiciones en las que se encuentren (Michaelis *et al*, 2002; Orphan *et al*, 2002). Mientras que la OAM acoplada a la sulfato-reducción es llevada a cabo por asociaciones de ANME y bacterias sulfato-reductoras (BSR; Boetius *et al*, 2000, Orphan *et al*, 2002), la OAM acoplada a la reducción de óxidos de Mn^{+4} y Fe^{+3} carece aún de evidencia para generalizar la existencia de una asociación obligada como en el caso de las ANME y BSR. Sin embargo, se sabe que los microorganismos involucrados son los tres tipos de ANME, y microorganismos afiliados al grupo MBGD (Marine Benthic Group D; Beal *et al*, 2009).

Tabla 3. Biota con capacidad de llevar a cabo el proceso OAM, hábitats que los albergan y rutas metabólicas propuestas.

Aceptor final de electrones	Microorganismos	Ruta propuesta	Hábitat
SO_4^{2-}	Asociaciones de ANME y BSR	Metanogénesis reversa	Sedimentos marinos, lagos, suelos, filtraciones de CH_4 .
NO_3^-	<i>M. nitroreducens</i> (archaea)	Metanogénesis reversa	Ecosistemas de agua dulce.
NO_2^-	<i>M. oxyfera</i> (bacteria)	Via intra-aerobia	Ecosistemas de agua dulce.
Fe^{+3} y Mn^{+4}	Asociaciones de ANME y MBGD (DI**)	SD*	DI**
Sustancias Húmicas	SD*	SD*	SD*

*SD: Se desconoce, **DI: Datos insuficientes para hacer una generalización

En un caso totalmente distinto, la OAM acoplada a la reducción de nitrato y nitrito es llevada a cabo por filotipos específicos: *Candidatus Methanoperedens*

nitroreducens (*M. nitroreducens*) y *Candidatus Methylomirabilis oxyfera* (*M. oxyfera*) respectivamente (Haroon *et al*, 2013). La **Tabla 3** muestra una comparación entre los microorganismos involucrados en la OAM dependiendo del aceptor de electrones, la ruta metabólica propuesta y los hábitats en donde se ha detectado el proceso. La **Tabla 3** muestra que a mayor número de procesos respiratorios acoplados a la OAM, mayores son la cantidad de cuerpos de agua o ecosistemas en donde no se había contemplado la existencia de un sumidero de CH₄. A la fecha, aspectos de la microbiota OAM, tales como características fisiológicas y rutas metabólicas empleadas han implicado un reto de investigación debido al lento tiempo de duplicación que éstas presentan.

2.3 SUSTANCIAS HÚMICAS

Sustancia húmica (SH) es el término usado para referirse al residuo refractario proveniente de la descomposición de la materia orgánica. Estas sustancias pueden ser encontradas en el suelo de ambientes acuáticos y terrestres. Las SH se han acumulado históricamente debido a su largo tiempo de vida media que puede ir desde cientos hasta miles de años. Debido a esta alta estabilidad se le ha calificado a las SH como *sustancias recalitrantes*. La génesis de las SH recibe el nombre de *humificación*. La humificación consiste de transformaciones químicas y bioquímicas de rompimiento, formación de metabolitos y polimerización estocástica que tienen como resultado final una estructura compleja y heterogénea (**Figura 2**) (Stevenson, 1994).

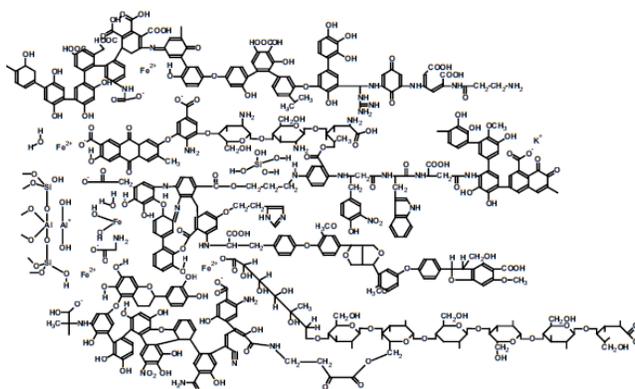


Figura 2. Estructura hipotética de las SH (Kleihempel, 1970).

Las SH pueden clasificarse en: ácidos húmicos (AH) ó ácidos fúlvicos dependiendo de su solubilidad a diferentes intervalos de pH, mientras que las huminas son la fracción de las SH estrictamente insolubles. La composición de las tres fracciones es altamente similar: están compuestas por un núcleo con características hidrofóbicas sustituido con grupos funcionales, pueden contener cadenas alifáticas y fracciones de macromoléculas como carbohidratos y proteínas en la periferia del núcleo (Stevenson, 1994; Field, 2001). Estos componentes estructurales le dan a las SH la capacidad de interactuar de muchas maneras con prácticamente todos los químicos presentes en la naturaleza, esta interacción puede ser de distinta índole: física, química e incluso biológica (**Tabla 4**).

Tabla 4. Interacciones de relevancia ambiental de las SH (Manahan, 1989; Stevenson, 1994, Field, 1991; Lovley *et al*, 1996).

Interacción	Característica estructural o grupos funcionales	Compuestos que interactúan	Naturaleza de la interacción
Agente quelante	Grupos carboxilo, fenólicos e hidroxilo.	Metales (pesados, de transición), radionúclidos.	Química
Capacidad de sorción	Grupos funcionales en el núcleo hidrofóbico.	Compuestos hidrofóbicos.	Física y química (puentes de hidrógeno y fuerzas Van der Waals).
Interacción redox biótica y abiótica	Cualquier grupo funcional con capacidad de transferir e ⁻	Hidrocarburos, halogenados, colorantes, etc. nitroaromáticos, metales, etc.	Química y bioquímica.

Este amplio espectro de cualidades ha posicionado a las SH como herramientas para la remediación de problemas ambientales, por ejemplo, en el atrapamiento de metales pesados mediante la formación de quelatos, o sirviendo como AFE en la respiración microbiana cuando un contaminante está siendo utilizado como sustrato (Manahan S., 1989; Lovley *et al*, 1996).

2.3.1 Grupos Funcionales Transportadores de electrones en las SH

Los primeros estudios que reportaron la actividad del humus en el tratamiento de contaminantes prioritarios apuntaron hacia los grupos quinona como los grupos

responsables de la actividad de transporte de electrones de las SH (Tratnyek & Macalady, 1989; Dunnivant *et al.*, 1992). Al día de hoy, muchos estudios han confirmado la predominante capacidad redox de los grupos quinona en el humus a través de distintas técnicas: resonancia de spin electrónico (Scott *et al.*, 1998), intensidad de espectro infrarrojo (Hernández-Montoya *et al.*, 2012), métodos electroquímicos (Aeschbacher *et al.*, 2010) y experimentos genéticos (Newman & Kolter, 2000). Es por los motivos anteriores que se ha escogido a quinonas modelo, como la *antraquinona-2,6-disulfonato* (AQDS) y la *antraquinona-2-sulfonato* (AQS), como análogos de las SH en experimentos exploratorios de degradación anaerobia de contaminantes (**Figura 3**).

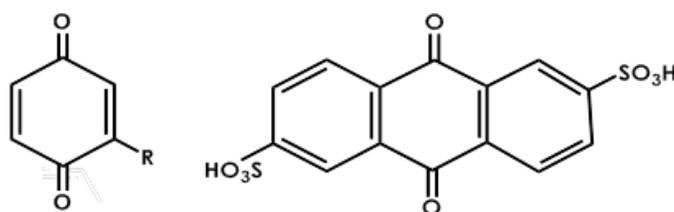


Figura 3. Estructura general de las quinonas (izquierda) y estructura de la antraquinona-2,6-disulfonato (derecha).

2.4 MICROORGANISMOS REDUCTORES DEL HUMUS

Debido a los grupos funcionales con capacidad de transferir electrones que las SH poseen, algunos microorganismos pueden utilizar a éstas como aceptores terminales en su proceso respiratorio (Lovley *et al.*, 1996). En los últimos 20 años se ha buscado aprovechar esta funcionalidad para acoplar la respiración de SH a la oxidación de contaminantes prioritarios (**Figura 4**). Este escenario presenta atractivas aplicaciones en el tratamiento de efluentes y en la biorremediación de sitios contaminados (Martínez *et al.*, 2013).

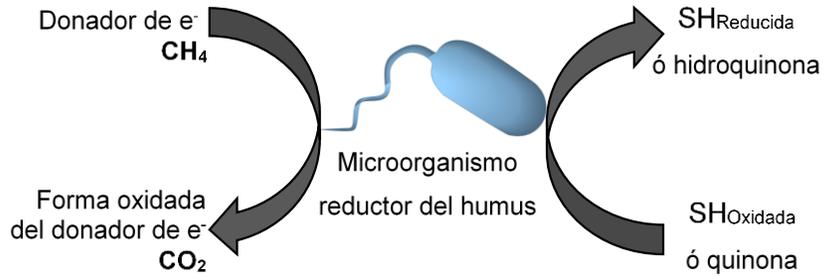


Figura 4. Oxidación de un contaminante con SH o quinonas como AFE.

Un escenario aún más favorable, es el reciclaje de SH mediante la re-oxidación por óxidos metálicos (Figura 5). Después de que la SH es reducida al aceptar los electrones del sustrato, ésta puede ser re-oxidada si un óxido metálico está presente (p. ej. óxidos de hierro o manganeso). Este mecanismo se convertirá eventualmente en un ciclo oxidación/reducción de las SH y los óxidos metálicos, lo cual representa una ventaja ya que de otra manera llegaría un punto en que la totalidad de las SH se reducirían deteniendo la degradación del contaminante (donador de electrones) (Lovley *et al.*, 1998; Cervantes *et al.*, 2001).

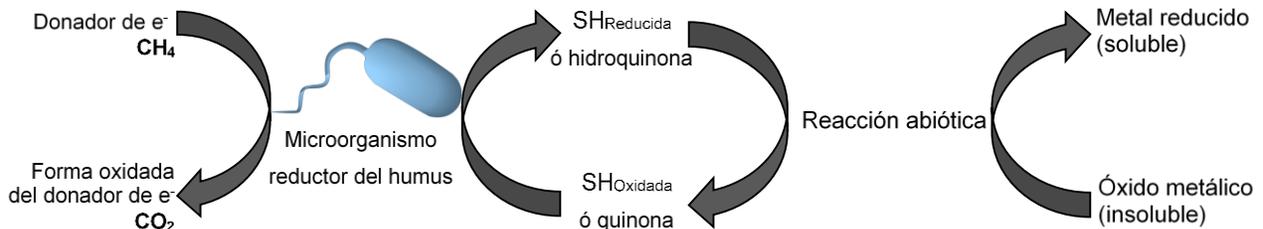


Figura 5. SH como mediadores redox en la oxidación anaerobia de contaminantes con óxidos metálicos como AFE.

El escenario esquematizado en la **Figura 5**, además de presentar ventajas debido al reciclaje de las SH, une la respiración de éstas a la reducción desasimilatoria de metales (Lovley *et al.*, 1998). Esto abre la posibilidad de que las SH puedan intervenir como mediadores redox en la oxidación anaerobia de contaminantes acoplada a la reducción de óxidos metálicos debido a: I) su abundancia, II) ventajas para los microorganismos que llevan a cabo este proceso

(p. ej. la mejor accesibilidad del AFE sólido a los microorganismos) y III) la gran diversidad de microorganismos que pueden reducir SH y la gran cantidad de ambientes donde se encuentran.

2.5 OXIDACIÓN ANAEROBIA DE CH₄ ACOPLADA A LA REDUCCIÓN DE SUSTANCIAS HÚMICAS

Los ecosistemas, como humedales y turberas, son en conjunto una de las fuentes más significativas de emisión de CH₄, éstos se caracterizan por ser ricos en materia orgánica en descomposición (Mikaloff *et al*, 2004). Smemo y Yavitt en 2007, durante la búsqueda del proceso OAM en turberas, formulan la hipótesis de la existencia de *metanótrofos reductores de las SH* que podrían estar mitigando la emisión de CH₄ en este tipo de ecosistemas. Sin embargo a la fecha, sólo se ha documentado la supresión de la metanogénesis en humedales por la adición de ácidos húmicos (Keller *et al*, 2009; Blodau & Deppe, 2012) debido a la mayor favorabilidad termodinámica que el proceso de reducción de los ácidos húmicos posee vs la metanogénesis (Cervantes *et al*, 2000). También se ha reportado la existencia de comunidades metanótrofas anaerobias en suelos de turberas, las cuales han sido caracterizadas por técnicas moleculares (Gupta *et al*, 2012). Concerniente a este hallazgo, se ha sugerido que el AFE que soporta esta actividad metanótrofa son los ácidos húmicos debido a la aparente ausencia de otros aceptores (Holmes *et al*, 2015), sin embargo, a la fecha no se cuenta con evidencia cuantitativa que demuestre este proceso.

2.6 ÓXIDOS METÁLICOS: GOETHITA Y VERNADITA

El hierro y el manganeso son metales que juegan papeles clave en los ciclos biogeoquímicos. Estos elementos pueden actuar como especies oxidantes ó reductoras dependiendo de su estado de oxidación. Ambos metales son altamente abundantes en la naturaleza, en especial el hierro, que ocupa el 4^{to} lugar en abundancia en la corteza terrestre. A pH's cercanos a la neutralidad, estos elementos se encuentran formando fases sólidas. Formas oxidadas del Fe y Mn se encuentran comúnmente como minerales insolubles en el suelo y en sedimentos de

cuerpos de agua tanto marinos, como de agua dulce. Los minerales de Fe y Mn pueden poseer diverso nivel de cristalinidad, área superficial, propiedades termodinámicas (potencial redox) y pueden encontrarse en asociación con otros elementos químicos presentes en la naturaleza. La reducción biológica de estos metales a valores de pH alrededor de 7 posee limitaciones debido a la dificultad que representa para los microorganismos acceder a la fase sólida (Lovley, 1991), sin embargo, algunos grupos de microorganismos poseen mecanismos como la excreción de quelantes, o poseen pilis que les permiten solubilizar, o acceder, respectivamente, al sólido metálico permitiendo su reducción (Straub *et al*, 2001; Weber *et al*, 2006). Las SH, actúan como transportadores de electrones naturales entre los microorganismos y los óxidos metálicos (Lovley *et al*, 1998), éste constituye un mecanismo más de reducción de metales y presenta una ventaja para los microorganismos desde el punto de vista energético. En el contexto de los procesos de oxidación de contaminantes con SH como aceptores finales de electrones, la presencia de óxidos metálicos como los de Fe y Mn, representa también una ventaja, ya que estos pueden aceptar abióticamente electrones de las SH reducidas como se muestra en la **Figura 5** y rebasar el consumo de contaminante que la estequiometría restringe al contar con la totalidad de los grupos funcionales de los ácidos húmicos reducidos. Algunos ejemplos de óxidos de hierro y manganeso abundantes en la naturaleza son la *goethita* y la *vernadita*. La goethita (α -FeOOH), es una forma de óxido de hierro de cristalinidad baja. La goethita se encuentra altamente presente en sedimentos, junto a la ferrihidrita (Straub *et al*, 2001). La síntesis química de la goethita es sencilla, y por este motivo ha sido utilizada en experimentos que involucran su reducción biológica (Roden & Urritia, 1999) o química por SH reducidas (Cervantes *et al*, 2001). Por otro lado, la vernadita (δ -MnO₂) es una forma mineral del manganeso en estado de oxidación (IV). La vernadita muestra una gran área superficial amorfa, ésta característica ha mostrado ser propicia para su rápida reducción tanto química, como biológica (Burdige *et al*, 1992). Tanto la goethita como la vernadita, son óxidos metálicos ideales para ser usados como modelos en experimentos que involucren la reducción biológica de las SH ya que su potencial redox y cristalinidad, no representan una limitante.

3. JUSTIFICACIÓN

Debido a que la actividad biológica en sedimentos anóxicos aporta una gran cantidad de CH₄ a la atmósfera, se requiere un conocimiento profundo de procesos biológicos que producen y consumen este gas bajo diversas condiciones redox. En este contexto, los procesos microbianos de respiración de sustancias húmicas no han sido contemplados como sumideros de CH₄; no obstante la ubicuidad tanto del humus, como de los microorganismos que reducen, abre la posibilidad de la existencia de OAM ligada a la reducción de SH, lo que no se han estudiado. Conocimientos de esta naturaleza son primordiales en la proyección de escenarios de cambio climático, pese a esto, actualmente no están siendo contemplados en balances de emisión. Este estudio contribuirá a aportar los primeros indicios de que la OAM es un proceso que puede ocurrir en sedimentos de cuerpos de agua por biota que puede acoplar el proceso a la reducción de SH. Adicionalmente, aportará conocimiento acerca de la posible contribución de óxidos metálicos de hierro y manganeso a un mayor consumo de CH₄ mediante la re-oxidación de las SH reducidas.

4. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

4.1 HIPÓTESIS

Los microorganismos reductores del humus, tanto de ambientes marinos, como de agua dulce, participan en la oxidación anaerobia de metano, al utilizar a las SH solubles e insolubles como aceptores de electrones de manera directa, o como transportadores de electrones entre los microorganismos y óxidos metálicos.

4.2 OBJETIVO GENERAL

Determinar la capacidad de la microbiota de sedimentos marinos y de agua dulce para llevar a cabo la oxidación anaerobia de metano con sustancias húmicas y sus análogos como aceptores finales de electrones, o como mediadores redox entre el contaminante y óxidos de hierro y manganeso.

4.3 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- i. Conocer si la microbiota de los sedimentos seleccionados es capaz de llevar a cabo la oxidación anaerobia de CH₄ usando antraquinona-2,6-disulfonato como aceptor final de electrones.
- ii. Conocer si los sedimentos capaces de acoplar la oxidación anaerobia de CH₄ a la reducción de AQDS pueden acoplar el proceso también a la reducción de material húmico, como la leonardita o los ácidos húmicos altamente purificados.
- iii. Elucidar el efecto de óxidos de hierro y manganeso, como la vernadita (δ -MnO₂) y la goethita (α -FeO(OH)), sobre la OAM acoplada a la reducción de sustancias húmicas.

5. MATERIALES Y MÉTODOS

5.1 SEDIMENTOS

Los cinco sedimentos utilizados en este trabajo fueron tomados a una profundidad de 1 m, en diversos cuerpos de agua mexicanos. Dos sedimentos marinos fueron obtenidos, el primero fue tomado de la Granja Acuícola Don Jorge (Mazatlán, Sinaloa), y el segundo de la Playa San Quintín (Baja California). Estos dos sedimentos de agua salada han mostrado capacidad para oxidar amonio anaerobiamente (Ríos-del Toro & Cervantes, 2015). Dos de los sedimentos de agua dulce fueron tomados de pozas oligotróficas del desierto Chihuahuense (Cuatro Ciénegas) donde se ha reportado una gran diversidad de biota endémica que se han conservado a través de miles de años (Souza *et al.* 2006; Escalante *et al.* 2008). El primero, pertenece a una poza en proceso de desecación que se nombrará *Pozas Rojas*, el segundo pertenece al sistema hidrológico *Churince*. El quinto sedimento pertenece a una Ciénega llamada Sisal ubicada en el estado de Yucatán. En la **Tabla 5** se especifican las coordenadas geográficas de los puntos de muestreo de sedimento.

Tabla 5. Sedimentos y su ubicación geográfica

Sedimentos			Coordenadas geográficas	
Naturaleza	Ubicación	Nombre*	Latitud (N)	Longitud (W)
Agua dulce	Cuatro Ciénegas, Coahuila	Churince	25.848°	-102.142°
		Pozas Rojas	26.871°	-102.021°
	Hunucmá, Yucatán	Sisal	21.160°	-90.043°
Agua salada	Mazatlán, Sinaloa	Granja Don Jorge	23.15°	-106.31°
	San Quintín, Baja California	San Quintín	30.45°	-116.01°

*Nombre con el que se refiere al sedimento a lo largo del texto

5.2 MEDIO BASAL

El medio basal empleado en las incubaciones tuvo una composición en g/L: NaHCO_3 (5), NH_4Cl (0.3), K_2HPO_4 (0.2), $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (0.03) y CaCl_2 (0.1). Se añadió 1 mL/L de solución de elementos traza que constó de la siguiente composición en mg/L: $\text{FeCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ (2,000), H_2BO_3 (50), ZnCl_2 (50), $\text{CuCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (90), $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (2000), $\text{NiCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (920), $\text{Na}_2\text{SeO}_3 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ (162), $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24}$ (500), EDTA (1,000), $\text{Na}_2\text{WO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ (100) y 1 mL de HCl al 36%. Adicionalmente, el medio basal empleado para las incubaciones de sedimentos marinos, se adicionó con 30 g/L de cloruro de sodio para semejar la alta concentración salina del agua del océano. Al final de la preparación de las incubaciones se inyectó Na_2S a partir de un stock concentrado hasta alcanzar una concentración de 0.1 g/L, esto permite consumir las trazas de oxígeno en el medio basal una vez establecidas las condiciones anaerobias en la atmósfera del microcosmos. Este medio basal contiene bicarbonato de sodio a una concentración 5 g/L, lo que asegura un sistema de amortiguamiento para la obtención de un pH de aproximadamente 7.2 tomando en cuenta la composición de la atmósfera y su contenido de CO_2 ($\text{N}_2:\text{CO}_2$, 80%/20%).

5.3 ACEPTORES DE ELECTRONES

5.3.1 AQDS

La aceptor de electrones empleado como quinona modelo fue la 9,10-antraquinona,2-6,disulfonato (**Figura 3**) Marca [®]TCI America con una pureza mayor al 98%.

5.3.2 Leonardita

Las sustancias húmicas utilizadas como aceptor de electrones fueron los ácidos húmicos nombrados *Leonardita*. La leonardita utilizada fue obtenida de la Sociedad Internacional de Sustancias Húmicas (IHSS, # de catálogo: BS140L), y proviene de la mina Gascoyne en el Condado Bowman, Dakota del Norte, U.S.A.

5.3.3 Humiados de Hierro

Los humiados de hierro empleados como aceptor de electrones fueron sintetizados mediante la metodología propuesta por Zhang y colaboradores (2014). Esta metodología consistió en hacer reaccionar la fracción soluble de leonardita (1.5 g/L) obtenida por centrifugación (15,000 g x 15 min), con 5 mmol/L de $\text{Fe}(\text{SO}_4) \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ a pH 7 y agitación rápida por 7 días a 30 °C. Los compuestos que precipitaron después del tiempo de reacción se colectaron por centrifugación (15,000 g x 20 min) y se liofilizaron.

5.3.4 Goethita

La goethita ($\alpha\text{-FeOOH}$) empleada se sintetizó químicamente de acuerdo al protocolo propuesto por Burlage *et al.* (1998). Esta metodología consistió en neutralizar una solución de 50 g $\text{Fe}(\text{NO}_3)_3 \cdot 9\text{H}_2\text{O}$ (825 mL) con 200 mL de una solución de KOH 2.5 N. El pH de la suspensión se ajustó a 12 y se dejó reposar a 60 °C por 24 h. El precipitado resultante se lavó varias veces con agua destilada por medio de centrifugación (10,000 rpm x 10 min) y el precipitado limpio se dejó secar a temperatura ambiente antes de pesar y suspender en el medio basal. Se verificó

la cristalinidad propia de la goethita mediante Difracción de Rayos X (**Figura 15, Panel a**).

5.3.5 Vernadita

La vernadita (δ -MnO₂) empleada como aceptor de electrones se sintetizó químicamente de acuerdo al protocolo propuesto en *Techniques in Microbial Ecology* (Burlage *et al*, 1998). Esta metodología consistió en neutralizar una solución (74.1 mL) de 2.96 g de KMnO₄ con 3.71 mL de NaOH 5N durante agitación a 90 °C. Esta mezcla se hizo reaccionar con una solución (27.8 mL) de 5.55g de MnCl₂·4H₂O y se dejó enfriar a temperatura ambiente con agitación durante los primeros 30 min. El precipitado resultante se lavó y secó como se indica en la **sección 5.3.4** antes de pesar y suspender en el medio basal. Se verificó la cristalinidad propia de la vernadita mediante Difracción de Rayos X (**Figura 17, Panel a**).

5.4 INCUBACIONES

5.4.1 Incubaciones con AQDS (1^{er} Ciclo)

Todos los experimentos se llevaron a cabo en botellas serológicas de 120 mL. Para los experimentos del 1^{er} Ciclo de degradación se utilizó como inóculo el equivalente a 10 g de sólidos volátiles (SV) por microcosmo. El volumen de medio basal fue 60 mL y la concentración de aceptor de electrones (AQDS) fue de 10 mmol/L. El oxígeno en el medio basal con AQDS fue desplazado al burbujear el medio por 5 minutos con una mezcla de CO₂:N₂ (20%/80%) previo a la inoculación. Las botellas se sellaron con tapones de goma y arillos metálicos, posterior a esto la atmósfera del microcosmos fue intercambiada por 5 minutos con la misma mezcla CO₂:N₂. Una vez establecidas las condiciones de atmósfera anaerobia se inyectó sulfuro de sodio como se indica en la **sección 5.2** para eliminar las trazas de O₂. El volumen de reacción final (medio basal + sedimento) fue aproximadamente 65 mL, mismo volumen que se utilizó para la elaboración de la curva de calibración de CH₄. Las botellas se incubaron en un cuarto oscuro a 28 °C, en obscuridad, sin agitación.

5.4.1.1 Incubaciones con AQDS (2^{do} y 3^{er} Ciclos)

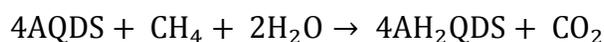
Una vez que la totalidad de la AQDS había sido reducida en los microcosmos se dio comienzo a nuevos ciclos de degradación al tomar aproximadamente la sexta parte de la totalidad (mezcla de sedimento y medio basal) del contenido de cada microcosmos y trasvasarlo a nuevas botellas serológicas dentro de una cámara anaerobia con atmósfera H₂:N₂ (5%/95%). El volumen transferido se aforó a 60 mL, se sellaron nuevamente las botellas y se inyectó la misma cantidad de Na₂S para eliminar remanentes de O₂. Hecho lo anterior, se inyectó un nuevo pulso de CH₄ de 30 mL. En la **Tabla 6** se resumen los controles que se corrieron a la par de los experimentos completos así como el número de réplicas.

Tabla 6. Sumario de experimentos y controles CH₄-AQDS

Ensayo o control	Experimento completo	Sin análogo de las SH	Sin CH ₄	Estéril
Características del ensayo	Sedimento + AQDS + CH ₄	Sedimento + CH ₄	Sedimento + AQDS	Sedimento + AQDS + CH ₄ + 3 ciclos de autoclave
Información que da	OAM acoplada a la reducción de AQDS	OAM acoplada a la reducción de AFE que no son AQDS	Reducción de AQDS por otros donadores	Reacciones abióticas
Número de réplicas	3	2	3	2

La reacción esperada en estas incubaciones se muestra en la siguiente ecuación:

Ecuación 1:



Nótese que, por cada molécula de metano que se oxide, se requerirán cuatro moléculas de AQDS para llevar a cabo la completa oxidación a dióxido de carbono ya que cada molécula de AQDS puede aceptar dos electrones.

5.4.2 Incubaciones con Humiados de Hierro

Se realizaron experimentos con humiados de Fe como aceptores de electrones a una concentración de 2.5 g/L. El medio basal utilizado como base fue el mismo especificado en la **sección 5.2**. Se establecieron condiciones anaerobias en la atmósfera y en el medio líquido como se indica en la **sección 5.3.1**. El volumen de reacción fue 30 mL y la cantidad de sedimento empleada fue el equivalente a 3 g SV/L. Los controles y número de réplicas fueron iguales a los representados en la **Tabla 6**, se tuvieron controles sin humiados, con humiados pero sin CH₄ y estériles. Las botellas se incubaron en un cuarto oscuro a 28 °C, en obscuridad, sin agitación.

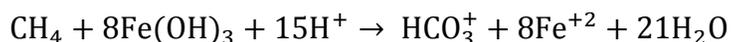
5.4.3 Incubaciones con Leonardita y Goethita (1^{er} Ciclo)

Los experimentos para comprobar la actividad de las SH como mediadores redox entre los microorganismos y la forma de óxido de hierro goethita se llevaron a cabo con microcosmos con 3 g SV/L adicionados con 5 g/L de leonardita y una concentración de 50 mmol/L de goethita. El volumen de reacción en estos experimentos fue 30 mL. La concentración de goethita empleada se seleccionó de acuerdo a la reacción estequiométrica de la OAM acoplada a la reducción de hierro. Las botellas se incubaron en un cuarto oscuro a 28 °C, en obscuridad, sin agitación.

5.4.3.1 Incubaciones con Leonardita y Goethita (2^{do} Ciclo)

El segundo ciclo de degradación de CH₄ con leonardita y goethita se llevó a cabo desechando el medio basal de los microcosmos, adicionando medio basal fresco y trasvasando el 50% a nuevas botellas serológicas, el nuevo medio basal contuvo 2.5 g/L de leonardita y 50 mmol/L de goethita. El cambio de medio se llevó a cabo bajo condiciones anaerobias. La concentración de goethita empleada fue 50 mmol/L basándose en la siguiente estequiometría para la OAM acoplada a la reducción de hierro (III):

Ecuación 2.



Nótese que, por cada molécula de metano oxidado, ocho moléculas de hierro en forma férrica son requeridas para la completa oxidación a la molécula de carbonato, ya que una molécula de óxido metálico puede aceptar un electrón.

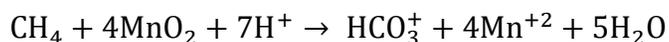
5.4.3.2 Incubaciones con Leonardita y Goethita (3^{er} Ciclo)

El 3^{er} Ciclo de estos microcosmos se llevó a cabo renovando la atmósfera de los ensayos por CO₂:N₂ e inyectando nuevamente 30 mL de CH₄. No se realizó un cambio de medio o adición de AFEs.

5.4.4 Incubaciones con Leonardita y Vernadita

Los experimentos para comprobar la actividad de las SH como transportadores de electrones entre los microorganismos y la forma de óxido de manganeso vernadita se llevaron a cabo con microcosmos de 120 mL a los cuales se adicionó una cantidad equivalente a 1 g SV/L de sedimento como inóculo y 2.5 g/L de leonardita y 25 mmol/L de vernadita. El volumen de reacción en estos experimentos fue 30 mL. Los controles que se corrieron a la par de los ensayos completos (descritos en los párrafos anteriores) se resumen en la **Tabla 6**. Las botellas se incubaron en un cuarto oscuro a 28 °C, en obscuridad, sin agitación. La concentración de vernadita empleada fue escogida basándose en la estequiometría presentada en la siguiente ecuación:

Ecuación 3:



Nótese que, para llevar a cabo la oxidación completa de una molécula de metano se necesitan cuatro moléculas de óxido de manganeso, ya que cada molécula de manganeso (IV) puede aceptar dos electrones.

Tabla 7. Sumario de experimentos y controles CH₄-leonardita-óxidos metálicos

Experimento	Características	Número de réplicas
SH + Óxido Metálico 1	Sedimento + leonardita + goethita + CH ₄	3
SH + Óxido Metálico 2	Sedimento + leonardita + vernadita + CH ₄	3
Óxido Metálico 1	Sedimento + goethita + CH ₄	3
Óxido Metálico 2	Sedimento + vernadita + CH ₄	3
Sin Óxido Metálico	Sedimento + leonardita + CH ₄	3
Endógenos	Igual a los experimentos anteriores, sin CH ₄	3 por cada experimento de los anteriores (Total = 15)
Estériles	Sedimento + SH + óxido m. + CH ₄ + Autoclave	2 por cada óxido metálico (Total = 4)

5.4.1 Incubaciones con Leonardita y Vernadita (2^{do} Ciclo)

El 2^{do} Ciclo de estos microcosmos se llevó a cabo renovando la atmósfera de los ensayos con CO₂:N₂ e inyectando nuevamente 30 mL de CH₄. No se realizó un cambio de medio o adición de AFEs.

5.5 MÉTODOS ANALÍTICOS

5.5.1 Composición Elemental

La composición elemental de los sedimentos se determinó realizando una digestión ácida de 2 g de sedimento utilizando agua regia (HNO₃:HCl). El precipitado de la digestión se re-suspendió con ácido clorhídrico y se aforó a 100 mL con agua desionizada. La solución resultante se analizó por Espectroscopia de Plasma de Acoplamiento Inductivo (ICP-OES Varian 730-ES). Las condiciones de operación del equipo fueron: potencia 1 kW, flujo auxiliar 1.5 L/min, flujo neto 0.75 L/min, retraso de toma de muestras de 30 s y el número de réplicas por muestra fue 3, el gas utilizado fue argón.

5.5.2 Sólidos Totales, Volátiles y Fijos

Los sólidos volátiles y fijos se determinaron por triplicado de acuerdo a métodos estándares (APHA, 1998). Se tomaron 20 g de sedimento y se depositaron en crisoles a peso constante. Se secó a 105 °C una noche y se pesaron. Se calcinaron en una mufla a 550 °C y se registró el peso final.

5.5.3 Carbono Orgánico Total

Para medir el contenido de materia orgánica o donadores de electrones, basados en carbono orgánico, presentes en los sedimentos, se procedió a medir el carbono orgánico total (COT) en muestras de sedimento. Para esto se utilizó un equipo de medición de COT Shimadzu TOCVCS/TNM-1 equipado con un módulo de muestreo de sólidos (SSM-5000A). 1 g de sedimento seco (peso constante) se procesó por 6 minutos a 900°C utilizando O₂ (500 mL/min) con una pureza del 99.9% como gas acarreador. Las muestras se procesaron por triplicado.

5.5.4 Cuantificación de Sulfato

Para realizar la medición de sulfato en el agua de poro de los sedimentos, se tomó un volumen de alrededor de 10 mL de sedimento y se centrifugó a 10,000

rpm x 20 min. El sobrenadante se filtró con filtros de nitrocelulosa de 0.22 µm y se analizaron en un Sistema de Electroforesis Capilar Agilent (Agilent Technologies) de acuerdo al método propuesto por Soga y Ross (1999).

5.5.5 Determinación de Hierro Ferroso

La determinación de hierro en el estado de oxidación II se realizó mediante la técnica ferrozina propuesta por Stookey (1970). La técnica ferrozina permite medir el hierro reducido de manera colorimétrica al hacer reaccionar el hierro ferroso liberado mediante una extracción ácida (HCl 0.5 M) con el reactivo 3-(2-piridil)-5,6-bis(ácido 4-fenilsulfónico)-1,2,4-triazina (reactivo ferrozina), a una concentración de 0.2 g/L, en medio amortiguado con HEPES (ácido 4-(2-hidroxiethyl)-1-piperazineetanesulfónico) a una concentración 50 mm/L. Una vez completada la extracción ácida, las muestras se centrifugaron durante 10 minutos a 10,000 g utilizando una centrífuga Spectrafuge 16M. Los tiempos de extracción ácida y reacción con el reactivo ferrozina fueron 30 minutos y 10 minutos, respectivamente. La determinación se hizo en ausencia de oxígeno en la cámara de anaerobiosis descrita en la sección 5.4.1.1. Las muestras se centrifugaron a 10000 g x 10 min. La curva de calibración se realizó disolviendo Sal de Moh'r ($\text{Fe}(\text{NH}_4)_2(\text{SO}_4)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$) en medio basal bajo condiciones normales, o salinas. El complejo violeta obtenido tiene su máxima absorbancia a 562 nm y se midió en un espectrofotómetro Thermo Scientific Genesis 10 UV.

5.5.6 Determinación de la Reducción de los Ácidos Húmicos

La reducción de leonardita y de humiats de hierro se cuantificó mediante una modificación a la técnica ferrozina descrita en la **sección anterior (5.5.4)** propuesta por Lovley y colaboradores (1996). Una vez extraída la muestra del microcosmos, ésta se hace reaccionar con un volumen igual de una solución de citrato férrico (20 mmol/L) durante 3 horas. Después de este paso, el procedimiento seguido es el descrito en la **sección 5.5.4**.

5.5.7 Determinación de la Reducción de la AQDS

Los electrones transferidos a la AQDS (producción de hidroquinona) se cuantificaron con el método propuesto por Cervantes y colaboradores (2001). Se extrajeron muestras de 400 μL , se centrifugaron 16,000 g x 5 min y se midieron a 450 nm. El procedimiento se llevó a cabo bajo condiciones anaerobias. La centrífuga y espectrofotómetro utilizados fueron los especificados en la **sección 5.5.4**.

5.5.8 Cuantificación del Manganeso Reducido

El manganeso de estado de oxidación II producto de la reducción por parte de la leonardita reducida biológicamente se cuantificó al final del experimento extrayendo 10 mL de muestra (únicamente sobrenadante) y filtrándola en nitrocelulosa de tamaño de poro 0.22 μm . El filtrado resultante se analizó por Espectroscopia de Plasma de Acoplamiento Inductivo (ICP-OES Varian 730-ES). Los valores obtenidos se utilizaron para cuantificar los miliequivalentes e^- que representan el número de electrones recibidos por la vernadita debidos a la OAM.

5.5.9 Cuantificación de Sulfuro Disuelto

La cuantificación de sulfuro se realizó mediante el método de Cord-Ruwisch (1985); se tomaron muestras de 0.1 mL del medio, las cuales se hicieron reaccionar con 4 mL de una solución ácida de CuSO_4 . De inmediato, se cuantificó la absorbancia en un espectrofotómetro UV-VIS (Thermo Spectronic) a una longitud de onda de 480 nm.

5.5.10 Cuantificación de las Concentraciones de Metano

Para cuantificar la concentración de CH_4 en la atmósfera de los microcosmos, se tomó un volumen de 100 μL y se inyectó en un cromatógrafo de gases (Agilent Technologies 6890M), equipado con un detector de conductividad térmica y una columna Hayesep D (Alltech, Deerfield, Illinois, USA) con las siguientes dimensiones: 3.048m x 3.18m x 2.16 mm. Se utilizó helio como gas acarreador a un flujo de 12 mL/min. La temperatura del puerto de inyección del

horno y del detector fue de 250, 60 y 250 °C respectivamente. Se elaboró una curva de calibración de CH₄ para cada volumen de reacción empleado (65, 60 y 30 mL), se elaboraron estándares bajo las mismas condiciones que se trabajaron en los microcosmos (composición de atmósfera, presión, temperatura, y volumen líquido) y se inyectaron distintos volúmenes de CH₄ los cuales constituyeron los puntos de las curvas.

5.5.11 Difracción de Rayos X

Muestras del sedimento fresco, los óxidos metálicos sintetizados y sedimento proveniente de los microcosmos al final de los ciclos de oxidación se secaron, trituraron en un mortero de Agatha y se procesaron en un Difractómetro de polvos SmartLab X-ray Diffractometer de RIGAKU con tubo de Cobre y Detector de alta velocidad (D/teX), utilizando un tamaño de paso de 0.02°, un tiempo por paso de 2 s y un marco de lectura en 2θ de 10 a 80.

5.6 DIAGRAMAS DE ESPECIACIÓN

Se construyeron diagramas de especiación para el Fe⁺² y Mn⁺² tomando en cuenta la composición de los iones principales del medio basal empleado y las concentraciones de Fe y Mn adicionadas a las incubaciones (50 y 25 mmol/L) (**Sección 5.2**) a una temperatura de 28°C y en un rango de pH de 6 a 8. Se empleó el software Visual MINTEQ 3.0.

6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

6.1 Caracterización de Sedimentos

A continuación, en la **Tabla 8**, se resume la caracterización de los cinco sedimentos en función de posibles aceptores finales de electrones (AFE), concentración de materia orgánica o biomasa aproximada por sólidos volátiles y carbono orgánico total.

Tabla 8. Caracterización de los sedimentos.

Sedimento	Carbono Orgánico Total (mg _{CO_T} /g _{sedimento})	Sólidos Volátiles (%)	Hierro Total (mg _{Fe} /g _{sedimento})	Manganeso Total (mg _{Mn} /g _{sedimento})	Sulfato en agua de poro (mM)
Churince, Cuatro Ciénegas	6.2±0.9	6.17	0.13±0.03	0.002	40.4±0.4
Pozas Rojas, Cuatro Ciénegas	7.4±1.3	8.3	0.2±0.09	0.013	ND
San Quintín, Baja California	6.5±0.02	4.38	3.2±0.4	0.04	ND
Granja San Jorge, Sinaloa	11.8±0.2	8.5	9.14±3	0.1±0.04	ND
Sisal, Yucatán	13.7±0.3	11	0.12±0.01	0.003	19.3±0.5

*ND: No detectado

El error presentado representa la desviación estándar, las mediciones se llevaron a cabo por triplicado.

En términos de AFEs que pudiesen jugar un papel clave en la OAM, o interferir en la documentación de la actividad buscada, el sulfato, hierro y manganeso podrían jugar papeles clave. La medición de hierro total reveló la presencia de una alta concentración de este metal en los sedimentos marinos: Granja Don Jorge (9.14±3 mg/g_{sedimento}), seguido por San Quintín (3.2±0.4 mg/g_{sedimento}). Por otro lado, como se esperaba debido a su naturaleza oligotrófica extrema (Souza *et al*, 1996), en Pozas Rojas y Churince (provenientes de Cuatro Ciénegas) se detectaron cantidades muy pequeñas de hierro en comparación con los sedimentos marinos (<0.2 mg/g_{sedimento}). La misma carencia en Fe ocurre con el sedimento Sisal (≈ 0.1 mg/g_{sedimento}). El alto contenido de hierro en San Quintín, y especialmente en Mazatlán, implica una capacidad intrínseca del sedimento para llevar a cabo la oxidación de donadores de electrones utilizando el metal como AFE si éste se encuentra en el estado de oxidación (III). En un estudio previo, Ríos del Toro y Cervantes (2015) han documentado la oxidación anaerobia de amonio en sistemas en lote inoculados con el sedimento Granja Don Jorge en controles en los

que no se había adicionado un AFE. Otra posibilidad, es que el hierro férrico re-oxide a la hidroquinona (**Figura 5**) aceptando electrones provenientes de la reducción biológica y esto no permita ver una tasa de reducción de AQDS mediante la determinación por espectrometría UV/Vis (**Secciones 5.5.6 y 5.5.7**); sin embargo, se podría estar llevando a cabo una reducción del Fe acoplada a la oxidación de la hidroquinona (AH₂QDS) y aunado a esto, se esté oxidando el sustrato endógeno o el CH₄. En el caso de manganeso (**Tabla 8**), el sedimento con mayor contenido de este metal fue también Granja San Jorge con una concentración de 0.118±0.04 mg/g_{sedimento}. Para el Mn, en general, las concentraciones son menores a 0.04 mg/g_{sedimento}, una vez más el contenido de este metal es mucho menor en los ambientes oligotróficos. En el caso de este metal las implicaciones son las mismas que con el Fe, el Mn(IV) puede oxidar a la hidroquinona, o puede actuar por sí solo como AFE (Lovley, 1991; **Ecuación 3**). Por otro lado, las concentraciones de sulfato en los sedimentos Churince y Sisal fueron muy altas (alrededor de 40 y 20 mmol/L, respectivamente) en el agua de poro del sedimento indicando una posible ruta metabólica predominante en este sedimento, es decir, la presencia de bacterias sulfato-reductoras. Como una estimación de la materia orgánica o donadores de electrones basados en carbono orgánico presentes en los sedimentos, se procedió a medir el COT en muestras secas de sedimento (**Tabla 8**). De acuerdo a los resultados obtenidos tanto en términos de COT como en términos de sólidos volátiles, los sedimentos con mayor contenido de materia orgánica son Sisal (13.7±0.3 mg_{COT}/g_{Sedimento} y 11% de SV) y Mazatlán (11.8±1.2 mg_{COT}/g_{Sedimento} y 8.5% de SV) mientras que el sedimento de menor contenido es San Quintín (5.1±0.16 mg_{COT}/g_{Sedimento} y 4.38% de SV). Con base en esta información, podría pensarse que un sedimento con gran contenido de COT tendría una fase de latencia mayor al iniciar un ciclo de degradación de un contaminante, ya que, al haber donadores de electrones intrínsecos, compuestos por carbono, la biota optaría por el uso del donador de electrones más sencillo o al que ha estado expuesto por mayor tiempo y para cuya degradación posee las enzimas necesarias. Por otro lado, un gran contenido en COT y SV puede ser indicativo también de una gran cantidad de biomasa. A lo largo del texto se discutirán estas implicaciones, así como la

posible influencia de los AFEs de mayor concentración en cada sedimento y su relación con la actividad OAM observada.

6.2 INCUBACIONES CON AQDS COMO AFE

6.2.1 Granja Don Jorge y Pozas Rojas

Los experimentos de Granja Don Jorge (Mazatlán) y Pozas Rojas (Cuatro Ciénegas) no han mostraron actividad de consumo de CH₄ en 164 y 144 días de incubación, respectivamente. Granja Don Jorge, ha mostrado una actividad escasa de reducción de AQDS con una concentración al día 135 de aproximadamente 5 mmol/L de AH₂QDS producida, mientras que Pozas Rojas presenta una concentración menor a 1 mmol/L de AH₂QDS en el mismo lapso de tiempo. Por los motivos anteriores se decidió detener estos experimentos.

6.2.2 Churince, Cuatro Ciénegas

El 1^{er} ciclo de degradación con Churince como inóculo, tuvo una duración de 50 días en los cuales 10 mmol/L de AQDS fueron reducidos a la correspondiente hidroquinona sin mostrar indicios de consumo de CH₄; de hecho, como se puede observar en la **Tabla 8**, la concentraciones de CH₄ aumentaron en todos los experimentos. Este fenómeno ha sido observado por Sivan y colaboradores (2014) quienes sugieren que si el sedimento empleado contiene CH₄ generado por la biota previo a la incubación de las botellas, este puede ser liberado por difusión en los primeros días de incubación. Sin embargo, no se puede descartar la existencia de *archaeas metanotróficas* que bajo determinadas concentraciones echen a andar en reversa su mecanismo de OAM (Holler *et al*, 2011; Yoshinaga *et al*, 2014) y de esta manera, en este 1^{er} Ciclo, la biota del sedimento al disponer de materia orgánica fermentable dirigió su metabolismo hacia la generación de CH₄. El día 50 se realizó un cambio de medio como se indica en la **sección 5.4.1.1** sin modificar el volumen de sedimento dando paso al inicio del Ciclo 2. En el segundo ciclo de degradación, después de 64 días de inactividad, el día 114 (**Figura 6, panel a, línea azul**), se detectó una caída importante en la concentración de CH₄ desde una concentración

inicial de 26.6 ± 0.2 hasta 21.16 ± 0.9 mmol/L, acoplada a una reducción de quinona que fue desde 2.3 ± 0.8 hasta 6.7 ± 1.1 mmol/L. Éste fue el primer vislumbre de la OAM acoplada a reducción de AQDS en el experimento completo; sin embargo, la reducción de AQDS en el control endógeno fue de la misma magnitud que en el experimento completo (**Figura 6, panel b, línea negra**) cuando ésta debió haber sido nula. El día 129, las mediciones de CH_4 indicaron que se había alcanzado una fase estacionara, llegando a una concentración final de 21.44 ± 0.4 mmol/L y una velocidad máxima de consumo (Y_{max}) de 0.1306 ± 0.008 mmol/L-día, velocidad que es 9 veces mayor a la observada en el control sin AQDS y 3.3 veces mayor a la observada en el control estéril, indicando que este último control aún poseía actividad biológica.

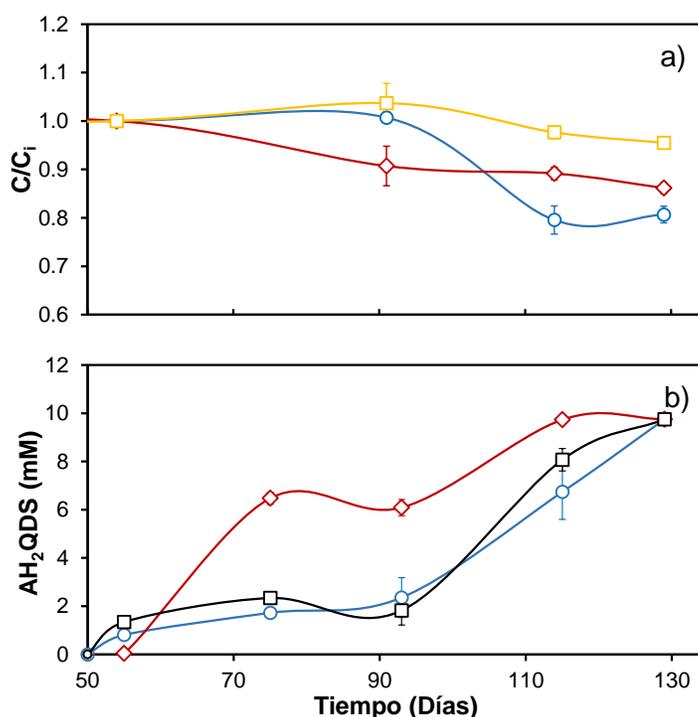


Figura 6. Oxidación anaerobia de CH_4 y reducción de AQDS por el sedimento Churince (Ciclo 2). Panel a: Consumo normalizado de CH_4 y Panel b: reducción de AQDS a lo largo del tiempo. La línea azul (-○-) representa el experimento completo (CH_4 + AQDS), línea roja (-◇-) los controles estériles, línea negra (-□-) los controles endógenos (Sin CH_4) y línea amarilla (-□-) los controles sin aceptor de e^- (Sin AQDS). Las barras de error representan el error estándar de la media.

La relación estequiométrica de oxidación de CH₄ acoplado a la reducción de AQDS es de 1:4, mientras que la relación obtenida fue de 1:1.83, esto sin corregir para el control endógeno, si se corrige para el control endógeno, no hay una relación entre el CH₄ consumido y la quinona reducida indicando que otro AFE intrínseco al sedimento es el debió haber promovido la actividad metanótrofa. En la búsqueda de la presencia de un AFE alternativo se realizó la medición de SO_4^{2-} en el agua de poro del sedimento fresco, y en la **Tabla 8** se observa que este sedimento es el que mayor concentración de sulfato posee con 40.4±4 mmol/L. Debido a esto, se realizó una medición de sulfuro en el control *Sin AQDS* bajo la sospecha de que el proceso de sulfato-reducción se estuviese llevando a cabo utilizando al CH₄ como donador de electrones. La medición de sulfuro reveló la presencia de aproximadamente 25±0.5 mmol/L de sulfuro disuelto en el medio líquido, lo cual apoya la teoría previamente mencionada, aunque una parte de esta sulfato-reducción pudo ser sustentada por la oxidación de materia orgánica endógena. Otro efecto que pudo haber sido motivo de la alta concentración de sulfuro es la alta reducción de AQDS en el control estéril, de haber ocurrido sulfato-reducción debida a la alta temperatura del autoclave y la presencia de donadores de electrones orgánicos, el sulfuro disuelto producido podría explicar la gran tasa de producción de hidroquinona al haber ocurrido una reacción exclusivamente química en donde el sulfuro reduce a la AQDS.

Tabla 9. Resumen de actividad OAM en las incubaciones Churince-AQDS.

		Concentración Inicial (mmol CH ₄ /L)	Concentración Final (mmol CH ₄ /L)	Consumo Neto (mmol CH ₄ /L)	Y _{max} (mmol/L·día)	Reducción de AQDS (mmol/L)	Relación CH ₄ Ox: AQDS _{Red}
Ciclo 1 (50 días)	Completo	19.3±2.1	26.7±0.2	-	-	10	-
	Sin AQDS	16.6±3.7	20±0.5	-	-	-	-
	Endógeno	-	-	-	-	10	-
	Estéril	19.1±0.5	21.66±0.5	-	-	10	-
Ciclo 2 (79 días)	Completo	26.6±0.2	21.4±0.4	5.13±0.4	0.1306±0.008	10	-
	Sin AQDS	21.8	20.8	1	0.01441	-	-
	Endógeno	-	-	-	-	10	-
	Estéril	22.2±0.5	19.14±0.2	3.08±0.3	0.0398±0.006	10	-

Para dar inicio al Ciclo 3, se redujo la cantidad de sedimento para reducir ruidos endógenos como se indica en la **sección 5.4.1.1**; sin embargo, en un periodo de 3 meses no se observó consumo de CH_4 , reducción de quinona mayor a 0.5 mmol/L, o producción de sulfuro. Estos resultados indican que Churince posee microorganismos reductores el humus, sin embargo, éstos estuvieron activos sólo el tiempo en el que tuvieron disponible materia orgánica para usar como donador de electrones. A la par de esto, otro tipo de microorganismos usó un AFE intrínseco al sedimento o a su agua de poro para llevar a cabo la OAM. La caracterización del sedimento en términos de AFEs y la alta concentración de sulfuro al final del segundo ciclo de degradación indican que el AFE del que se trata es SO_4^{-2} . Para esclarecer esto, se montaron microcosmos con 20 mmol/L de Na_2SO_4 como AFE, sin embargo, no se detectó actividad de OAM durante dos meses de incubación. Experimentos futuros deberán contemplar incubaciones más largas con sulfato como AFE, a los cuales en este trabajo no se dio un seguimiento más prolongado debido a que esta premisa se encontraba fuera de los objetivos de esta tesis.

6.2.3 San Quintín, Baja California

El sedimento marino San Quintín tuvo un 1^{er} ciclo de degradación de 73 días en los que 10 mmol/L de AQDS fueron reducidos; sin embargo, no se presentó consumo de CH_4 , por el contrario, y de la misma manera que en el sedimento Churince, se presentó un aumento en las concentraciones del gas (**Tabla 9**). El 2^{do} Ciclo (**Figura 7**) se inició el día 74, y fue hasta alrededor del día 110 que tanto en los experimentos completos como en los estériles, se presentaron los primeros indicios de consumo de CH_4 y producción de hidroquinona. La concentración de CH_4 disminuyó desde una concentración inicial de 24.9 ± 1.4 mmol/L, hasta una concentración de 19.6 ± 1.4 el día 148 con una velocidad máxima de consumo (Y_{max}) de 0.0564 ± 0.005 mmol/L·día, una vez visto este consumo, la concentración se mantuvo constante durante 62 días más que se monitoreó el experimento.

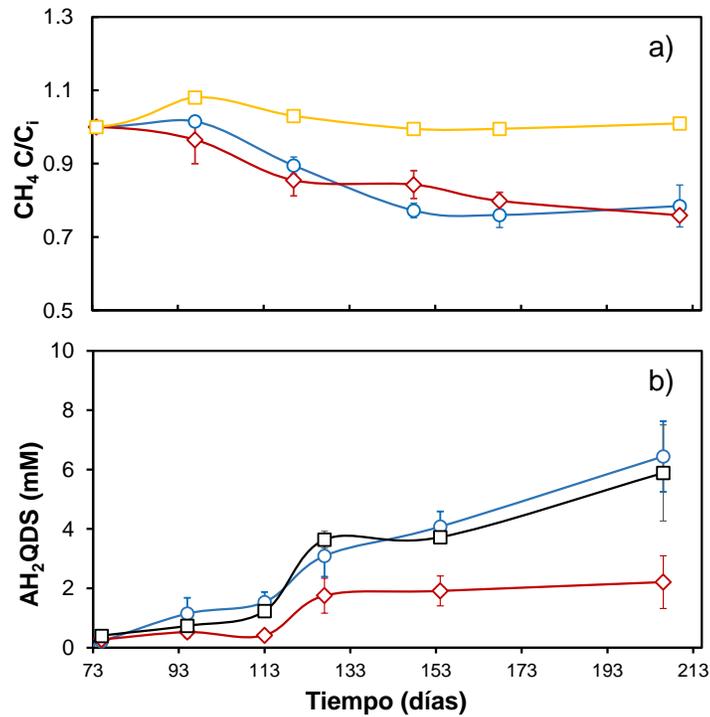


Figura 7. Oxidación anaerobia de CH₄ y reducción de AQDS por el Sedimento San Quintín (Ciclo 2) Panel a: Consumo normalizado de CH₄ y Panel b: reducción de AQDS a lo largo del tiempo. La línea azul (-○-) representa el experimento completo (CH₄ + AQDS), línea roja (-◇-) los controles estériles, línea negra (-□-) los controles endógenos (Sin CH₄) y línea amarilla (-□-) los controles sin aceptor de e⁻ (Sin AQDS). Las barras de error representan el error estándar de la media.

Debido a que el control desprovisto de AQDS conservó la misma concentración CH₄ durante todo el experimento (210 días) se pueden deducir dos cosas: 1) la AQDS jugó un papel clave para que la OAM se llevara a cabo en este juego de microcosmos y, 2) la actividad en el control estéril se debe única y exclusivamente a la ineffectividad del tratamiento térmico. El control estéril tuvo un comportamiento sumamente similar al experimento completo (**Figura 7, paneles a y b**), con un consumo total de 4.7 ± 0.6 mmolCH₄/L y Y_{\max} de 0.0564 ± 0.005 mmol/L·día, sin embargo, la cantidad de AQDS reducida fue menor y no hay una relación estequiométrica, ya que la cantidad de AQDS reducida en el control endógeno es mayor a la reducida en el control estéril (**Tabla 10**).

Tabla 10. Resumen de actividad OAM en las incubaciones San Quintín-AQDS.

		Concentración Inicial (mmol CH ₄ /L)	Concentración Final (mmol CH ₄ /L)	Consumo Neto (mmol CH ₄ /L)	Y _{max} (mmol/L·día)	Reducción de AQDS (mmol/L)	Relación CH ₄ Ox: AQDS _{Red}
Ciclo 1 (74 días)	Completo	26.72±2.4	35.8±0.5	-	-	10	-
	Sin AQDS	27.9±2.4	37.36±0.9	-	-	-	-
	Endógeno	-	-	-	-	10	-
	Estéril	26.72±0.2	34.42±0.03	-	-	10	-
Ciclo 2 (136 días)	Completo	24.9±1.4	19.6±1.4	5.3±0.2	0.0564±0.005	6.4±1.1	1:0.07*
	Sin AQDS	23.81	24.01	-	0	-	-
	Endógeno	-	-	-	-	5.8±1.6	-
	Estéril	19.7±0.2	14.9±0.37	4.7±0.6	0.0399±0.0004	2.2±0.8	-

*Relación estequiométrica corregida para el control endógeno al día 153

El incremento en la concentración de la hidroquinona al día 153 (cuando se obtuvo el consumo total de CH₄) fue de 4.07±0.5 y 3.7±0.2 mmol/L (en el experimento completo y en el endógeno), indicando dos cosas: 1) la cantidad de CH₄ consumida es mucho mayor a la esperada según la estequiometría con esta concentración de AQDS reducida (**Tabla 10**) y 2) la presencia de donadores de e⁻ endógenos aún enmascara la reducción de AQDS por electrones provenientes del CH₄. Soportando esta teoría, la última medición de hidroquinona de este ciclo de degradación indicó que la reducción de quinona continuó, aun cuando el consumo de CH₄ se había detenido meses atrás (6.4±1.1 mmol/L). Es decir, el consumo de CH₄ que llevó a cabo el sedimento San Quintín debe relacionarse a la presencia de un AFE además de la AQDS, pero más importante, este aceptor de electrones puede fungir como tal sólo bajo la presencia de la quinona. Los aceptores que cumplen con esta característica son los metales presentes (como Fe y Mn) que a valores de pH neutros suelen encontrarse en formas minerales amorfas o cristalinas (Straub *et al*, 2001) que son inaccesibles para los microorganismos, ya que la quinona puede fungir como transportador de electrones al ayudar a los microorganismos a reducir metales a los que éstas no pueden acceder por características tales como la morfología (Lovley *et al*, 1998).

En la **Tabla 8** se muestra que el sedimento San Quintín es, junto con el de Mazatlán, uno de los dos sedimentos con concentraciones importantes de Fe total (3.2±0.4 mg Fe/g_{sedimento}). Dado que los microcosmos del experimento San Quintín que se

han discutido hasta ahora contenían una cantidad importante de sedimento (10 g SV/L que corresponden a 13.7 g de sedimento por botella), se tendría también en los ensayos una gran cantidad de Fe; aproximadamente 43.84 mg de Fe total, que en 60 mL de volumen de reacción corresponden a una concentración 13.3 mmol/L. De acuerdo a la estequiometría presentada en la **Ecuación 2**, 13.3 mmol/L de Fe^{+3} , servirían para la oxidación anaerobia de 1.7 mmol/L de CH_4 si se asume que todo el hierro en el sedimento se encontraba como hierro férrico, no obstante, la cantidad de CH_4 oxidado sigue siendo mayor. Al final del 2^{do} ciclo de degradación se midió la cantidad de hierro ferroso mediante la técnica Ferrozina (Stookey, 1970) y se encontró una concentración 12.49 ± 1 mg Fe^{+2} /L en los experimentos completos, 7.37 ± 1 mg Fe^{+2} /L en los experimentos sin CH_4 y 8.1 ± 0.5 mg Fe^{+2} /L en los experimentos sin AQDS. Con el objetivo de deshacerse del ruido endógeno se trasvasó una pequeña cantidad de sedimento ($\approx 16\%$) a nuevas botellas serológicas y se propiciaron las mismas condiciones que se han descrito anteriormente. Después de 3 meses de incubación, estos microcosmos no han mostrado una reducción de quinona mayor a 1 mmol/L y no se ha detectado cambios en la concentración de CH_4 .

6.2.4 Sisal, Yucatán

El primer ciclo de degradación llevado a cabo con el sedimento Sisal tuvo una duración de 101 días. En este ciclo, 10 mmol/L de AQDS fueron reducidos, y la concentración de CH_4 se vio disminuida en 2.48 ± 0.5 mmol/L a una velocidad Y_{\max} de 0.0594 ± 0.01 mmol/L·día (**Figura 8, paneles a y b**). Por otro lado, los controles sin AQDS también mostraron actividad metanótrofa (0.63 ± 0.5 mmol/L, Y_{\max} de 0.1052 ± 0.007 mmol/L·día), y los controles sin CH_4 presentaron la misma tasa de reducción de quinona. Esto sugiere la presencia tanto de un AFE, como de materia orgánica, endógenos en el sedimento. El 2^{do} Ciclo de degradación (**Figura 9**) se comenzó al hacer un cambio de medio basal y una disminución de volumen de sedimento ($\approx 16\%$ respecto a la cantidad originalmente inoculada).

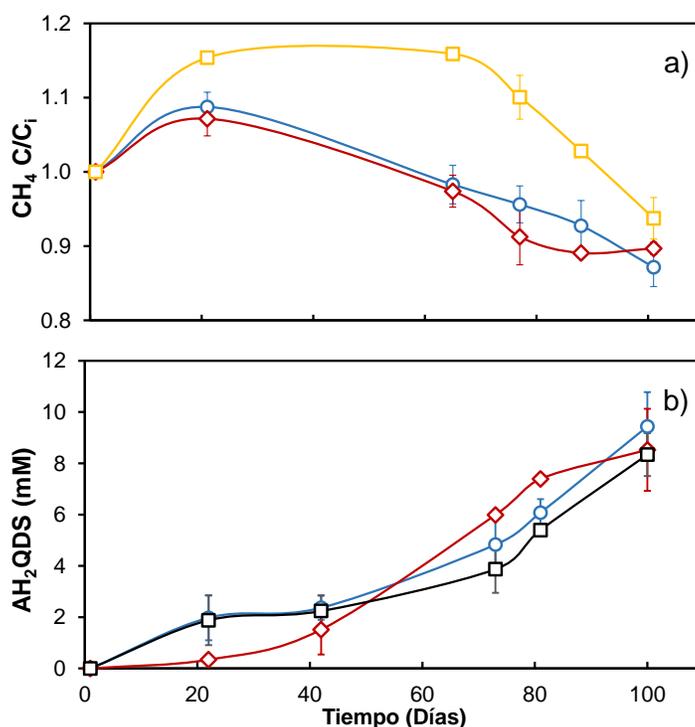


Figura 8. Oxidación anaerobia de CH_4 y reducción de AQDS por el Sedimento Sisal (Ciclo 1) Panel a: Consumo normalizado de CH_4 y Panel b: reducción de AQDS a lo largo del tiempo. La línea azul (-○-) representa el experimento completo ($\text{CH}_4 + \text{AQDS}$), línea roja (-◇-) los controles estériles, línea negra (-□-) los controles endógenos (Sin CH_4) y línea amarilla (-□-) los controles sin aceptor de e^- (Sin AQDS). Las barras de error representan el error estándar de la media.

En este ciclo se observó un incremento en la tasa de reducción de quinona, al reducirse a 38 días, y como se puede observar en el **panel b (Figura 9)**, la reducción de AQDS por donadores de electrones endógenos se vio disminuida de manera importante con respecto al Ciclo 1 (**panel b, Figura 8**), es decir, mientras que el experimento con metano tuvo una reducción de la totalidad de la AQDS disponible (10 mmol/L), el control carente de metano tuvo sólo un 21%. La relación estequiométrica obtenida en este ciclo fue: 5.5:1 (AH₂QDS producida:CH₄ consumido, día 38). Desafortunadamente, las mediciones en este ciclo no fueron frecuentes ya que se esperaba una reacción de la misma tasa que el primer ciclo y al día 38, la concentración de CH₄ había incrementado hasta igualar la concentración inicial, lo cual indica que al no haber disponibilidad de un AFE, la microbiota cambia su metabolismo hacia la metanogénesis. La capacidad del inóculo para realizar metanogénesis fue observada también en los controles endógenos (Sin CH₄), que en los primeros dos ciclos de degradación tuvieron una producción de alrededor de 100 µmol/L de CH₄.

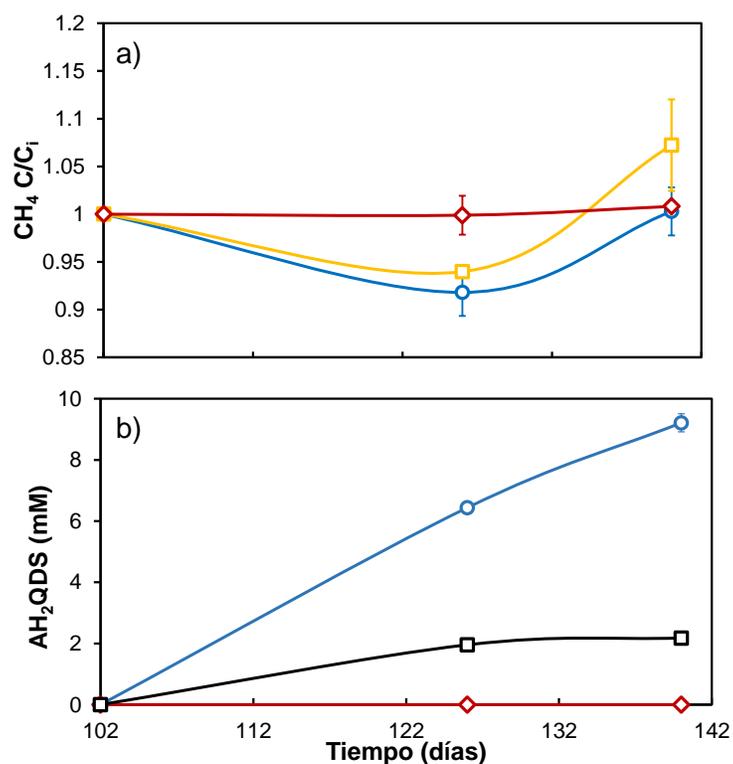


Figura 9. Oxidación anaerobia de CH₄ acoplada a la reducción de AQDS por el Sedimento Sisal (Ciclo 2) Panel a: Consumo normalizado de CH₄ y Panel b: reducción de

AQDS a lo largo del tiempo. La línea azul (-○-) representa el experimento completo (CH₄ + AQDS), línea roja (-◇-) los controles estériles, línea negra (-□-) los controles endógenos (Sin CH₄) y línea amarilla (-□-) los controles sin aceptor de e⁻ (Sin AQDS). Las barras de error representan el error estándar de la media.

Con respecto a la capacidad para generar CH₄, en el Ciclo 1 (**panel a, Figura 8**), se puede observar que la primera respuesta del sedimento al ser incubado es la producción de CH₄. Analizando de manera global (entre sedimentos) la producción de CH₄, se puede observar que los tres sedimentos con capacidad OAM tuvieron la misma reacción al ser incubados, Churince y San Quintín, produjeron metano en sus primeros ciclos, los cuales fueron largos y fue hasta que se hizo un cambio de medio y se disminuyó la cantidad de sedimento que se observaron los indicios de la actividad metanótrofa. ¿Qué implicaciones puede tener esto, y ¿cuál es la diferencia entre los sedimentos Churince y San Quintín y el originario de Sisal? La prolongada fase de latencia que San Quintín y Churince muestran puede ser indicativo de una menor densidad celular con la capacidad de oxidar CH₄ anaerobiamente, o una mayor cantidad de sustratos endógenos que fungen como materia orgánica fermentable que termina siendo convertida a metano. En contraste con estos sedimentos, Sisal, al ser el sedimento con mayor cantidad de sólidos volátiles y COT (**Tabla 8**), tiene una fase de latencia menor, y en el primer ciclo da los primeros indicios de OAM (a los 65 días aprox.) aun cuando el volumen de sedimento en las botellas era grande. Bajo estos indicios de alta densidad celular se comenzó un 3^{er} Ciclo de degradación (**Figura 10**) conservando el mismo volumen de sedimento. El 3^{er} ciclo de degradación (**Figura 10**) se redujo a 11 días, el control endógeno presentó una reducción de AQDS mínima y la relación estequiométrica obtenida entre AQDS reducido y metano oxidado fue de 4.7:1, la cual es muy cercana a la esperada de la **Ecuación 1**. Este ciclo representa la 1^{er} evidencia contundente de la OAM acoplada a la reducción de un análogo estructural de las SH, la Y_{max} observada fue 0.371 mmol/L·día, la cual es 6.3 veces mayor a la velocidad obtenida en el 1^{er} Ciclo.

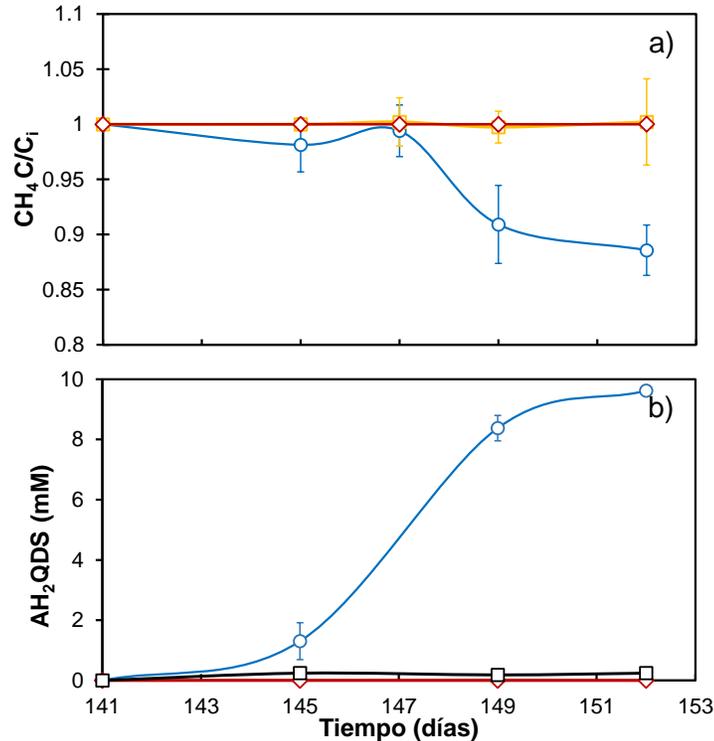


Figura 10. Oxidación anaerobia de CH₄ acoplada a la reducción de AQDS por el Sedimento Sisal (Ciclo 3). Panel a: Consumo normalizado de CH₄ y Panel b: reducción de AQDS a lo largo del tiempo. La línea azul (-○-) representa el experimento completo (CH₄ + AQDS), línea roja (-◇-) los controles estériles, línea negra (-□-) los controles endógenos (Sin CH₄) y línea amarilla (-□-) los controles sin aceptor de e⁻ (Sin AQDS). Las barras de error representan el error estándar de la media.

Con respecto a comparaciones entre velocidades máximas, las velocidades en el experimento completo (**líneas azules, Figuras 8 y 9**), no muestra diferencia significativa entre la tasa de consumo de CH₄ entre ciclos (**Tabla 11**); sin embargo, el volumen de inóculo en el 2^{do} Ciclo fue mucho menor, lo cual es indicio de un aumento en la velocidad de utilización de sustrato por una cantidad de microorganismos menor. Basados en la teoría de *partición de sustrato y rendimiento celular* (Rittmann & McCarty, 2001) tenemos que la mayor parte de electrones obtenidos del donador (en este caso CH₄), son transferidos al AFE (f_e^0) para proveer energía para la conversión de otra porción de electrones (f_s^0) en material celular. Ya que la reacción de OAM acoplada a la reducción de AQDS da una ganancia energética muy baja (**Tabla 2**), es más probable que la mayor parte de los electrones se destinen a la obtención de energía, y no a síntesis celular. Basados en esta teoría, podemos concluir que el impacto en la cinética de la reacción no se

debe al crecimiento de nueva biomasa, si no a la aclimatación del inóculo. El concepto de aclimatación de inóculo, se puede definir como la expresión genética de las enzimas necesarias para llevar a cabo el metabolismo requerido, en este caso, para la utilización de CH₄ como fuente de carbono con una quinona como aceptor terminal de electrones. En el caso de estos experimentos, la expresión génica de estas enzimas pudo ocurrir en el periodo intermedio entre la metanogénesis y los primeros indicios del consumo de metano. Esta actividad podría confirmarse mediante experimentos de transcriptómica dirigidos a la expresión de genes conocidos involucrados en la ruta metabólica de interés. La **Tabla 11** es un resumen de la actividad OAM durante los tres ciclos de las incubaciones con el sedimento Sisal.

Tabla 11. Resumen de actividad OAM en las incubaciones Sisal-AQDS.

		Concentración Inicial (mmol CH ₄ /L)	Concentración Final (mmol CH ₄ /L)	Consumo Neto (mmol CH ₄ /L)	Y _{max} (mmol/L·día)	Reducción de AQDS (mmol/L)	Relación CH ₄ Ox: AQDS _{Red}
Ciclo 1 (101 días)	Completo	19.18±0.5	16.7±0.2	2.48±0.5	0.0594±0.01	10	-
	Sin AQDS	19.74±0.4	19.06±0.9	0.628±0.5	0.1052±0.014	-	-
	Endógeno	-	-	-	-	10	-
	Estéril	18±0.4	16.14±0.5	1.85±0.1	0.037±0.007	10	-
Ciclo 2 (38 días)	Completo	17.24±0.3	15.8±0.25	1.42±0.44	0.059±0.02	10	1:5.5*
	Sin AQDS	19.26±0.25	18.1±0.31	1.15±0.02	0.048	-	-
	Endógeno	-	-	-	-	2.18±0.1	-
	Estéril	17.53±0.5	17.51±0.32	0	0	0	-
Ciclo 3 (11 días)	Completo	18.06±0.5	16±0.33	2.07±0.33	0.371±0.045	10	1:4.7*
	Sin AQDS	18.16±0.6	18.16±0.6	0	0	-	-
	Endógeno	-	-	-	-	0	-
	Estéril	17.68±0.31	17.68±0.3	0	0	0	-

*Relación estequiométrica corregida para el control endógeno

En la tabla anterior se puede observar que, contrario al caso del experimento con AQDS, la cinética de los microcosmos carentes de quinona tiende a disminuir su velocidad posiblemente debido a la extinción paulatina del aceptor de electrones intrínseco al sedimento. Aunque las concentraciones de sulfato en el agua propia del sedimento Sisal fueron altas, aunque no tan altas como las del sedimento Churince, las mediciones de sulfuro disuelto nunca fueron mayores a la lectura inicial (HS⁻ añadido al medio como agente reductor). Aunque esto podría tomarse como indicativo de que el sedimento Sisal no usa sulfato como AFE, el sulfuro producido por reacciones biológicas como la OAM acoplada a la sulfato-reducción

puede formar precipitados con componentes propios del sedimento, principalmente metales. Los resultados obtenidos con el sedimento sisal confirman de manera contundente que la OAM acoplada a la reducción de grupos quinona es factible. Debido a esta evidencia, la OAM acoplada a la reducción de SH sería posible para la biota de este sedimento.

6.3 INCUBACIONES CON LEONARDITA Y GOETHITA COMO AFE

6.3.1 San Quintín, Baja California

Debido a los indicios que presentó el sedimento San Quintín para llevar a cabo la OAM en presencia de quinonas, en un proceso donde el hierro intrínseco al sedimento podría haber estado involucrado (**Sección 6.2.3**), se llevaron a cabo incubaciones bajo la adición de ácidos húmicos (leonardita) y un óxido metálico de hierro cristalino (goethita) bajo las condiciones especificadas en la **Sección 5.4.4**, los controles que se corrieron a la par se enlistan en la **Tabla 7**. El Sedimento, San Quintín no presentó degradación de CH_4 en ninguno de los controles durante más de 80 días que se dio seguimiento al experimento (**Figura 11**).

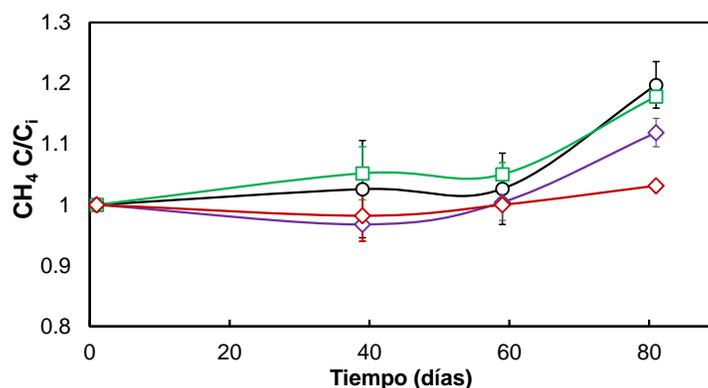


Figura 11. Oxidación anaerobia de CH_4 y reducción de Leonardita y Goethita por el sedimento San Quintín. Consumo normalizado de CH_4 . La línea morada (-◇-) representa el experimento completo (Leo + Goe), línea roja (-◇-) los controles estériles (Leo + Goe), línea negra (-○-) los controles sin goethita (Leonardita) y línea verde (-□-) los controles sin leonardita (Goethita). Las barras de error representan el error estándar de la media.

Estos resultados no coinciden con lo observado para el sedimento San Quintín con AQDS (**Sección 6.2.3**). La teoría en el caso de los experimentos con AQDS es que la quinona actúo como transportador de electrones entre los microorganismos y una forma de hierro desconocida que el sedimento contiene, sin embargo, de ser cierto esto último, el sedimento San Quintín debería haber tenido actividad metanótrofa en los experimentos que contenían leonardita, y teóricamente, esta actividad debió manifestarse tras una fase de latencia menor debido a la menor cantidad de sedimento con la que se inocularon los microcosmos, sin embargo y como se observa en la Figura 11, los experimentos comenzaron a manifestar actividad metanogénica a partir del día 60. Como se ha mencionado anteriormente, todos los microcosmos que presentaron actividad metanótrofa anaerobia tuvieron como primer respuesta generación de metano, por tanto, el sedimento San Quintín deberá incurrir en un segundo ciclo de degradación en investigaciones futuras. Por supuesto, tanto la falta de congruencia con la estequiometría presentada en la **Ecuación 1** que se discutió en la **Sección 6.2.3**, como la inactividad de los experimentos con leonardita, puede significar que el AFE en San Quintín era otro distinto a la AQDS o al Fe^{3+} , y que al disminuirse el volumen de sedimento en estos últimos ensayos, no se contaba con el AFE intrínseco suficiente para llevar a cabo la OAM.

6.3.2 Churince, Cuatro Ciénegas

El sedimento Churince mostró una ligera caída en la concentración de CH_4 en todos los experimentos excepto en los que sólo contenían goethita y en los estériles; sin embargo, no se vio el efecto de re-oxidación de la leonardita por la goethita al no haber diferencia significativa entre los tratamientos en ausencia y presencia del óxido de hierro (**líneas negra y morada, Figura 12**).

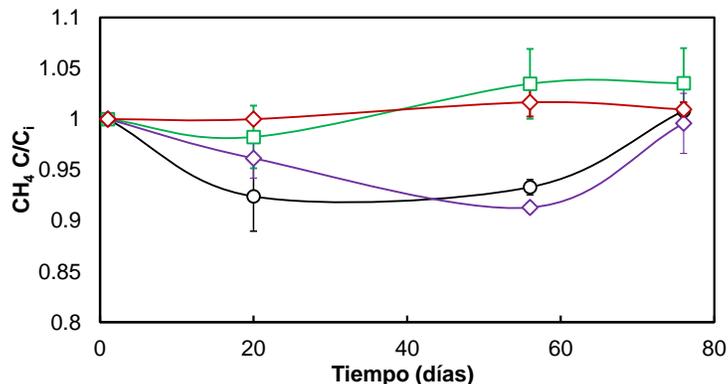


Figura 12. Oxidación anaerobia de CH₄ y reducción de Leonardita y Goethita por el sedimento Churince. Consumo normalizado de CH₄. La línea morada (-◇-) representa el experimento completo (Leo + Goe), línea roja (-◇-) los controles estériles (Leo + Goe), línea negra (-○-) los controles sin goethita (Leonardita) y línea verde (-□-) los controles sin leonardita (Goethita). Las barras de error representan el error estándar de la media.

¿Por qué los microcosmos que sólo contenían goethita (línea verde) no mostraron indicios de degradación de CH₄ del día 20 al día 40 como ocurre con los experimentos leonardita (línea negra) y leonardita con goethita (línea morada)? Como se observó en los experimentos con AQDS (**Sección 6.2.2**), el sedimento Churince posee biota capaz de reducir quinonas al oxidar donadores de electrones endógenos, por tanto, en los experimentos con leonardita, la biota tuvo un AFE adicional al intrínseco (que presumiblemente fue sulfato) para oxidar otros donadores que no son CH₄, mientras que la biota de los experimentos que sólo contenían hierro, posiblemente no poseían capacidad de utilizarlo como AFE y consumieron el sulfato para oxidar donadores endógenos antes que el CH₄. Por tanto, los experimentos con leonardita poseían sulfato remanente para oxidar CH₄ ya que gran parte de los donadores de electrones endógenos fueron oxidados por microorganismos reductores del humus. Debido al antecedente del sedimento Churince de presentar consumo de CH₄ no acoplado a la reducción del material húmico, y a los resultados obtenidos en este 1^{er} Ciclo de degradación, se decidió dejar de monitorear los microcosmos después de casi 80 días del experimento. Tanto en el caso de Churince y San Quintín, no se realizaron experimentos utilizando óxido de manganeso debido a los resultados no favorecedores que se obtuvieron con los óxidos de hierro.

6.3.3 Sisal, Yucatán

Para conocer si el sedimento Sisal era capaz de acoplar la OAM no sólo a la reducción de quinonas modelo, sino también a la reducción de material húmico, se realizaron ensayos en los cuales se utilizó leonardita (forma de ácidos húmicos encontrada en Dakota del Norte, U.S.A. con 80% de pureza), y adicionalmente se tuvieron microcosmos a los que además de leonardita se adicionó óxido de hierro en forma de goethita (**Sección 5.3.4**). Las concentraciones de AFEs, y condiciones de estos experimentos son las descritas en la **Sección 5.4.3**.

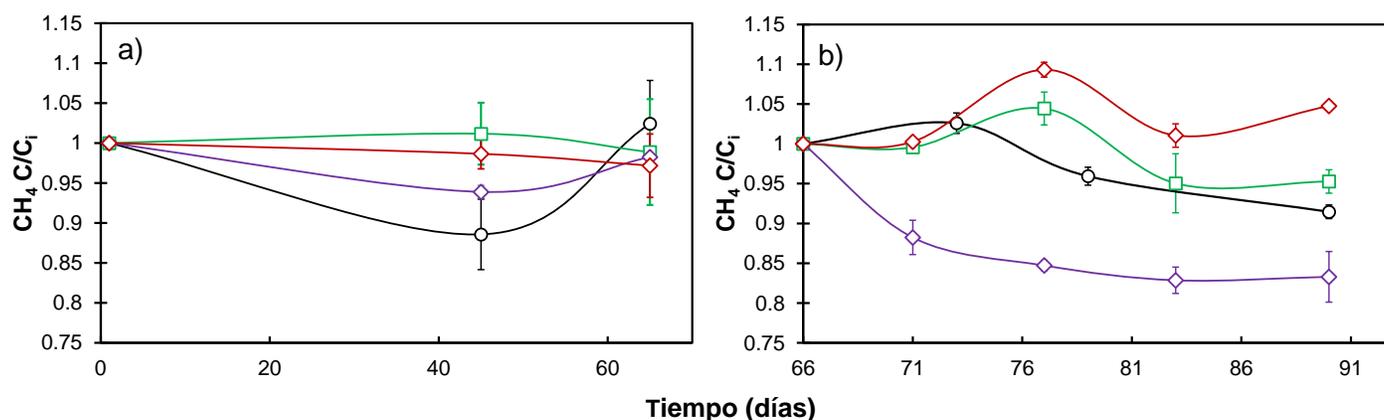


Figura 13. Oxidación anaerobia de CH₄ y reducción de Leonardita y Goethita por el sedimento Sisal. Consumo normalizado de CH₄. La línea morada (-□-) representa el experimento completo (Leonardita + Goethita), línea roja (-◇-) los controles estériles (Leonardita + Goethita), línea negra (-○-) los controles sin goethita (Leonardita) y línea verde (-□-) los controles sin leonardita (Goethita). Las barras de error representan el error estándar de la media.

En el 1^{er} Ciclo de degradación (**Figura 13, Panel a**) el experimento que contenía solamente leonardita como AFE mostró un consumo de 5.5 ± 1.6 mmol/L al día 45, mientras que los experimentos que contenían óxido de hierro además del material húmico mostraron un consumo de CH₄ menor (2.57 ± 0.2 mmol/L). Tanto los controles estériles como los ensayos que sólo contenían la goethita no mostraron cambios en la concentración en 65 días mientras que los experimentos con leonardita y leonardita/goethita mostraron aumentos en la concentración de CH₄ que posiblemente fueron detonados por el agotamiento de la capacidad aceptora de electrones del medio. En este 1^{er} Ciclo no se llevó a cabo la medición de la

capacidad aceptora de electrones o de hierro reducido, por tanto, no se pudo realizar un balance de electrones. En el 2^{do} Ciclo de degradación (**Figura 13, Panel b**) que dio inicio el día 61 de incubación, se observó la actividad OAM instantáneamente en los experimentos que contenían ácidos húmicos y óxido de hierro (línea morada; $Y_{\max} = 0.312 \pm 0.2$ mmol/L·día), mientras que el control que sólo contenía leonardita presentó una velocidad de consumo Y_{\max} de 0.170 ± 0.04 mmol/L·día, es decir, la velocidad de reacción en presencia de goethita fue casi 3 veces mayor que en la ausencia del óxido de hierro. La cantidad de CH₄ consumido por el experimento leonardita + goethita fue 1.6 veces mayor al experimento que sólo contenía leonardita (5.8 ± 0.8 vs. 3.5 ± 0.7 mmol/L) mientras que el control que contenía únicamente goethita tuvo un consumo de 1.3 ± 0.5 mmol/L y tuvo la Y_{\max} más baja entre sus contrapartes (0.115 ± 0.09 mmol/L·día).

Tabla 12. Balance de electrones y consumos totales de CH₄ en el experimento Sisal con leonardita y goethita.

	Ciclo 2 (25 días)			
	Leonardita	Goethita [α -FeO(OH)]	Leonardita + Goethita	Estéril [Leonardita + Goethita]
Concentración Inicial CH₄ (mmol/L)	41.2±0.6	25.8±1.1	29±0.4	24.6±1.6
Concentración Final CH₄ (mmol/L)	37.6±0.06	24.3±0.1	23.9±0.8	25.9±1.6
Consumo neto de CH₄ (mmol/L)	3.5±0.7	1.3±0.5	5.8±0.8	0
Velocidad máxima (Y_{\max}) (mmol/L·día)	0.17±0.04	0.115±0.09	0.505±0.054	0
e⁻ aceptados (milieq e⁻/L)*	0.098±0.015	0	0.58±0.42	0
% de e⁻ donados que explica la reducción del aceptor**	3.4	0	10.0	0
Número de réplicas	3	3	3	2

* Corregido para los controles endógenos (Sin CH₄)

** (# milieq e⁻ aceptados/# milieq e⁻ donados)*100

Para comprobar que los ácidos húmicos hubiesen actuado como AFEs en la oxidación anaerobia de CH₄, se cuantificaron los mili-equivalentes electrónicos (milieq e⁻) tanto en los microcosmos con CH₄, como en los microcosmos sin CH₄

mediante la técnica de la Ferrozina (Lovley *et al*, 1996) al final del ciclo de degradación. Los resultados se resumen en la **Tabla 12**. Según los resultados obtenidos para los experimentos con leonardita, sólo un 3.4% de los electrones donados por el CH₄ es justificado por los milieq e⁻ aceptados por los ácidos húmicos, éste es un porcentaje muy bajo de recuperación que puede deberse, entre otros motivos, a las limitaciones que presenta la técnica de la ferrozina. La primer limitante, es que una gran variedad de grupos funcionales de los ácidos húmicos pueden aceptar electrones del CH₄ mediante la respiración microbiana, no obstante, no todos estos grupos funcionales reducidos pueden donar electrones al citrato férrico que se emplea en la técnica ferrozina, o al menos, no en el tiempo de reacción que la técnica indica. Debido a esta restricción, no se cuantifica la totalidad de hierro ferroso que se podría tener debido a la reducción del citrato férrico por los ácidos húmicos reducidos, y por tanto, los milieq e⁻ están siendo subestimados. Otra limitante de la técnica, es la inefectividad en la extracción ácida del hierro ferroso. Este paso es importante, ya que debido a la especiación del Fe⁺² en un medio tan complejo como es el que trabaja en estos microcosmos (medio basal de composición compleja, además de cationes y aniones propios del sedimento), el Fe⁺² liberado de la reducción de la goethita puede formar especies reducidas del hierro como carbonatos, fosfatos y sulfuros que están presentes en fases sólidas. En la **Figura 14** se presenta el diagrama de especiación para el Fe⁺² presente en el medio (si se asume que la totalidad de la goethita ha sido reducida) bajo la composición de aniones y cationes que el medio basal descrito en la metodología contiene. Las líneas azules representan las especies que se encontrarían como precipitados en el rango de pH de 6 a 7. Para el pH de trabajo que se tiene en las incubaciones (7.2) más del 95% del Fe²⁺ liberado por la reducción de la goethita por las SH se encontraría formando precipitados, principalmente carbonatos de hierro como la Siderita, precipitados de sulfuro como la Mackinawita o compuestos de fósforo como la Vivianita.

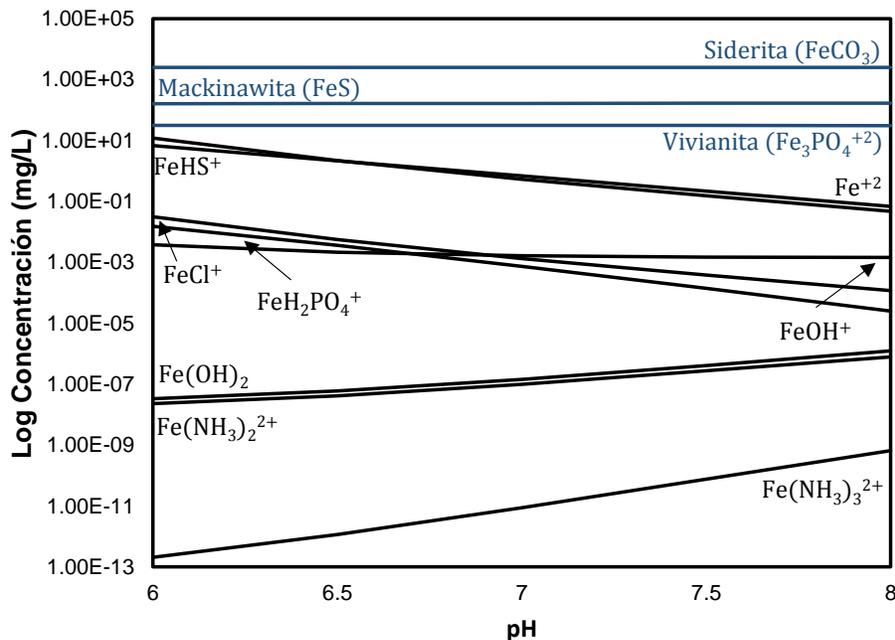


Figura 14. Diagrama de especiación del Fe^{+2} en el medio basal empleado.

Cabe mencionar que el diagrama mostrado no contempla la composición de aniones y cationes del sedimento la cual puede influir de gran manera a la formación de más precipitados debido a la alta concentración de calcio, magnesio y sodio. La ineficiencia en la extracción ácida del Fe^{+2} entonces, podría ser el motivo del bajo balance de electrones obtenido para el experimento de leonardita y goethita. Cabe mencionar además, que el Fe^{+2} puede ser quelado por los grupos funcionales de las SH formando enlaces de fuerza variable (Manahan, 1989), o adsorbidos tanto al sedimento, como a los propios óxidos metálicos (goethita; Roden & Urrutia, 1999). En el caso del experimento que sólo contenía el óxido de hierro, no se encontró diferencia en términos de millieq e^- entre los experimentos con CH_4 y sus pares endógenos (sin CH_4) lo cual indica que el consumo de CH_4 visto en estos ensayos no se debe a la reducción del hierro férrico (**Ecuación 2**), si no, a la reducción de un AFE intrínseco al sedimento tal y como se observó en los primeros ciclos de incubación con AQDS (**Figuras 8 y 9**). Si se asume que el sedimento aún poseía capacidad para oxidar CH_4 por los motivos explicados anteriormente, entonces el balance de electrones podría cerrar mejor al corregir los experimentos para un control sin AFE. Una vez concluido el 2^{do} Ciclo de degradación y debido a la poca

cantidad de hierro reducido en comparación con la concentración de goethita inicial, en los experimentos con leonardita y goethita, se decidió comenzar un 3^{er} Ciclo sin hacer un cambio de medio ni añadir nueva goethita o leonardita, es decir, bajo la creencia que el medio de reacción aún tenía capacidad de aceptar electrones, o expresado de mejor manera, aún había Fe^{+3} suficiente para continuar oxidando los ácidos húmicos reducidos. Bajo esta premisa se decidió sólo intercambiar la atmósfera del experimento e inyectar de nueva cuenta un pulso de CH_4 de 30 mL para volver a contar con una presión parcial de CH_4 suficiente en el medio líquido para que la reacción de consumo de CH_4 continuase.

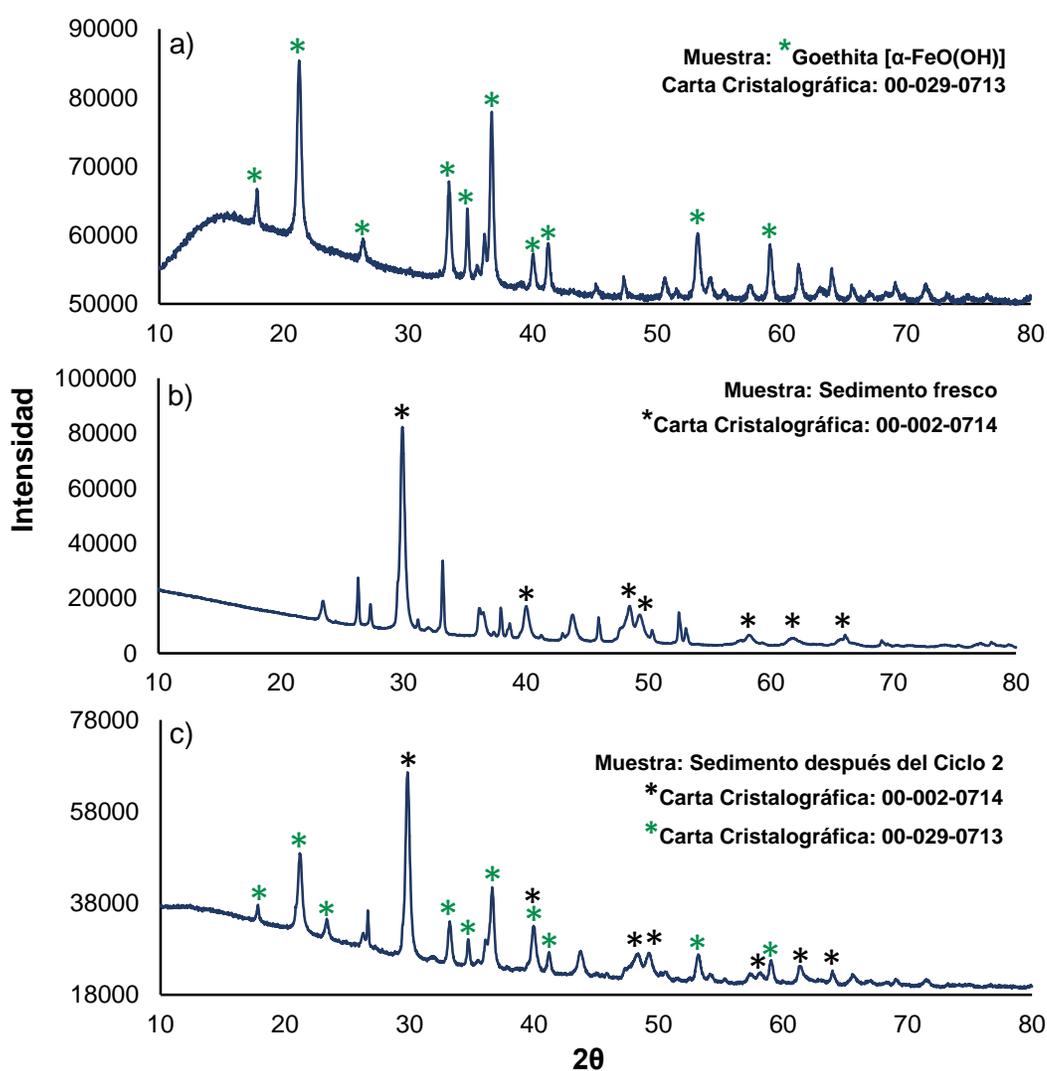


Figura 15. Difractogramas del sedimento, sedimento después de la incubación con leonardita y goethita, y la goethita sintetizada.

En este 3^{er} Ciclo no se observó consumo de CH₄ en un mes que se monitoreó el experimento, por el contrario, se observó una ligera producción de CH₄ de alrededor de 100 μmol/L. En la búsqueda de los carbonatos de hierro y demás especies sólidas que ayudasen a confirmar el término de la capacidad aceptora de electrones del medio, se procesaron muestras de sedimento fresco y de sedimento con leonardita y goethita después del ciclo de incubación para confirmar la presencia de carbonatos de hierro y la ausencia de la goethita. Los resultados se muestran en la **Figura 15**. De acuerdo al difractograma presentado en el **Panel c** de la **Figura 15**, después del 2^{do} ciclo de degradación del sedimento Sisal con leonardita y goethita, aún se encontraron remanentes de óxido de hierro que se manifiestan con la presencia de las *cuentas* o picos señalados con los asteriscos verdes, con asteriscos negros se señalan los picos propios del sedimento que corresponden a un carbonato de calcio y manganeso (una especie entre la rodocrosita y la calcita). Si el medio aún contenía entonces una especie oxidante de los ácidos húmicos reducidos: ¿Por qué se detuvo la actividad OAM? Reportes en donde se han empleado óxidos metálicos en incubaciones biológicas han indicado que la acumulación de iones Fe⁺² puede mermar la actividad biológica haciendo los ciclos de degradación subsecuentes más lentos (Villatoro-Monzón *et al*, 2008), una posible explicación a este efecto es que la alta acumulación de iones de Fe⁺² puede bloquear sitios de los de sólidos de hierro evitando su reducción, además de entorpecer la actividad de la microbiota al adsorberse en las membranas celulares. Soportando esta teoría Roden y Urrutia en 2009, documentan cómo la remoción del hierro ferroso de un medio de cultivo de *Shewanella alga*, no solo mejora la tasa de reducción de goethita, si no que incrementa la producción de proteína indicando un incremento en la duplicación celular. Relacionando este reporte con el trabajo presente, se puede reiterar que mientras que la actividad OAM se repitió en un segundo ciclo, después de descartar el medio basal de la primera incubación, al no hacer lo mismo antes de comenzar el 3^{er} ciclo, la actividad se ve estancada aún en presencia de goethita. Los resultados obtenidos en esta sección, indican que la OAM puede estar acoplada a la respiración de SH, aunado a esto, la evidencia

sugiere que este proceso puede consumir grandes cantidades de CH₄ bajo la presencia de formas oxidadas de hierro.

6.4 INCUBACIONES CON GOETHITA Y VERNADITA COMO AFE

6.4.1 Sisal, Yucatán

Para conocer el efecto de un mineral de manganeso sobre la OAM acoplada a la reducción de leonardita, se corrió un experimento similar al presentado anteriormente que se describe en la **Sección 5.4.4**. Los resultados obtenidos se muestran en la **Figura 16**.

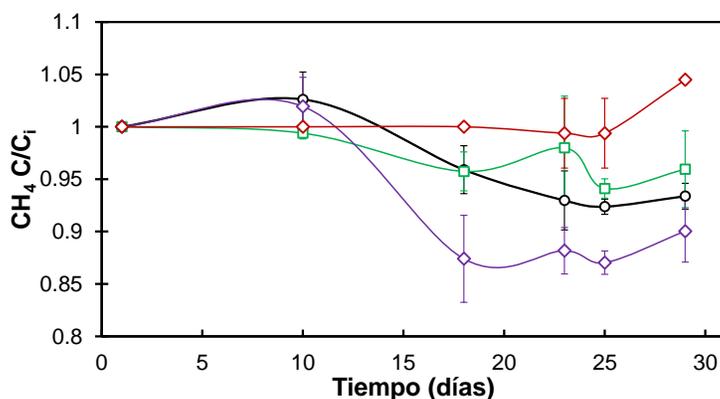


Figura 16. Oxidación Anaerobia de Metano en Sedimento Sisal con Leonardita y Vernadita. Consumo normalizado de CH₄. La línea morada (-□-) representa el experimento completo (Leonardita + Vernadita), línea roja (-◇-) los controles estériles (Leonardita + Vernadita), línea negra (-○-) los controles sin goethita (Leonardita) y línea verde (-□-) los controles sin leonardita (Vernadita). Las barras de error representan el error estándar de la media

Dado a los resultados positivos en la disminución del ruido endógeno que se obtuvieron al reducir la cantidad de sedimento empleada como inóculo en los experimentos pasados, en estos microcosmos se utilizó 1 g SV/L de sedimento fresco. Sorpresivamente en este 1^{er} Ciclo de degradación, se observó una velocidad mayor en el experimento que contenía los ácidos húmicos y el óxido de manganeso, que se vio reflejada en un consumo de 4.9 ± 0.2 mmol/L de CH₄ en 8 días (día 10 al 18), mientras que el control que sólo contenía Leonardita presentó un consumo 1.8 veces menor (2.7 ± 0.7 mmol/L de CH₄) en 13 días (día 10 al 23), es decir, la velocidad máxima de consumo fue 1.4 veces mayor (0.436 ± 0.7 vs

0.312±0.2 mmol/L·día). Por otro lado, el control que contenía únicamente vernadita tuvo un consumo de 1.7±1.5 mmol/L de CH₄. Para comprobar que los ácidos húmicos hubiesen actuado como AFEs en la oxidación anaerobia de CH₄ se cuantificaron los mili-equivalentes electrónicos (milieq e⁻) tanto en los microcosmos con CH₄, como en los microcosmos sin CH₄ mediante la técnica de la Ferrozina (Lovley *et al*, 1996) para el caso de la leonardita, y mediante ICP-OES como se describe en la **Sección 5.5.8** para el caso de la vernadita al final del ciclo de degradación. Los resultados se resumen en la **Tabla 13**. Tal y como en los experimentos con leonardita y goethita, el porcentaje de electrones aceptados por la Leonardita y por la vernadita con respecto al total de electrones dados por el consumo de metano es muy bajo. Una vez más, en el caso de la leonardita esto pudo deberse a las restricciones de la técnica Ferrozina que se discuten en la **Sección 6.3.3**, y en el caso del manganeso, hay una explicación similar que se discute a continuación.

Tabla 13. Balance de electrones y consumos totales de CH₄ en el experimento Sisal con leonardita y vernadita.

	Ciclo 1 (29 días)			
	Leonardita	Vernadita [MnO ₂]	Leonardita + Vernadita	Estéril [Leonardita + Vernadita]
Concentración Inicial CH ₄ (mmol/L)	41.2±0.6	42.07±0.3	39.01±2.1	37.9±1.8
Concentración Final CH ₄ (mmol/L)	37.6±0.1	40.35±1.2	35.15±2.32	39.5±1.8
Consumo neto de CH ₄ (mmol/L)	2.74±0.5	1.7±1.5	4.9±0.2	0
Velocidad máxima (Y _{max}) (mmol/L·día)	0.312±0.2	0.246±0.09	0.436±0.07	0
e ⁻ aceptados (milieq e ⁻ /L)*	0.098±0.015	0.137±0.08	0.33±0.047	0
% de e ⁻ donados que explica la reducción del aceptor**	3.6	8.1	6.7	0
Número de réplicas	3	3	3	2

* Corregido para los controles endógenos (Sin CH₄)

** (# milieq e⁻ aceptados/# milieq e⁻ donados)*100

La cuantificación del Mn²⁺ se realizó por ICP-OES a partir de una muestra de sobrenadante (medio basal) extraída bajo condiciones anaerobias. La muestra

después de ser extraída del microcosmos fue filtrada a través de nitrocelulosa de 0.22 μm de apertura de poro, esto con la intención de retirar moléculas insolubles de Mn^{+4} (óxidos) que se pudiesen haber tomado del microcosmos. Si se analiza la especiación del Mn^{2+} bajo las composición del medio basal que se usó en los microcosmos, encontramos al igual que en el caso del Fe^{+2} , que el manganeso se encuentra en forma insoluble formando precipitados (principalmente carbonatos y fosfatos), dicha especiación se presenta en la **Figura 17**.

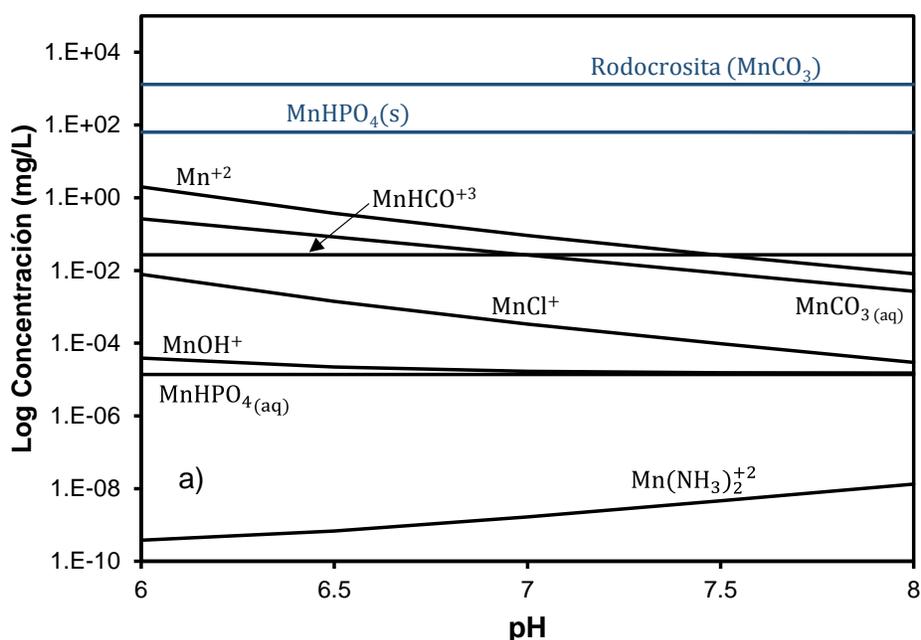


Figura 17. Diagrama de especiación del Mn^{+2} en el medio basal empleado

Ya que se ha explicado la metodología de cuantificación del manganeso reducido, la precipitación del Mn^{2+} en forma de minerales como la Rodocrosita (carbonato de manganeso), podría ser la respuesta al balance de electrones tan deficiente que se obtiene en la incubación con leonardita y vernadita (6.7%). Para soportar esta teoría se sacrificó un microcosmos de los ensayos leonardita + vernadita y se llevó a cabo un análisis de Difracción de Rayos X (**Figura 18, Panel c**). En este difractograma se encontró el patrón de picos típico de una mezcla de carbonatos de Ca y Mn encontrada ampliamente en la naturaleza (una especie intermedia entre la rodocrosita y la vernadita; Katsikopoulos, 2009). Recordando de la **Tabla 8** que el sedimento Sisal aparentemente no contiene cantidades altas de Mn en su

composición, se podría pensar que la presencia del precipitado $(\text{Mn,Ca})\text{CO}_3$ es proveniente de la reducción del Mn^{+4} al aceptar los electrones de las sustancias húmicas reducidas, sin embargo, al procesar una muestra de sedimento a la que no se había añadido manganeso, el mismo patrón de la calcita de manganeso $(\text{Mn,Ca})\text{CO}_3$ es encontrado (**Figura 18, Panel b**).

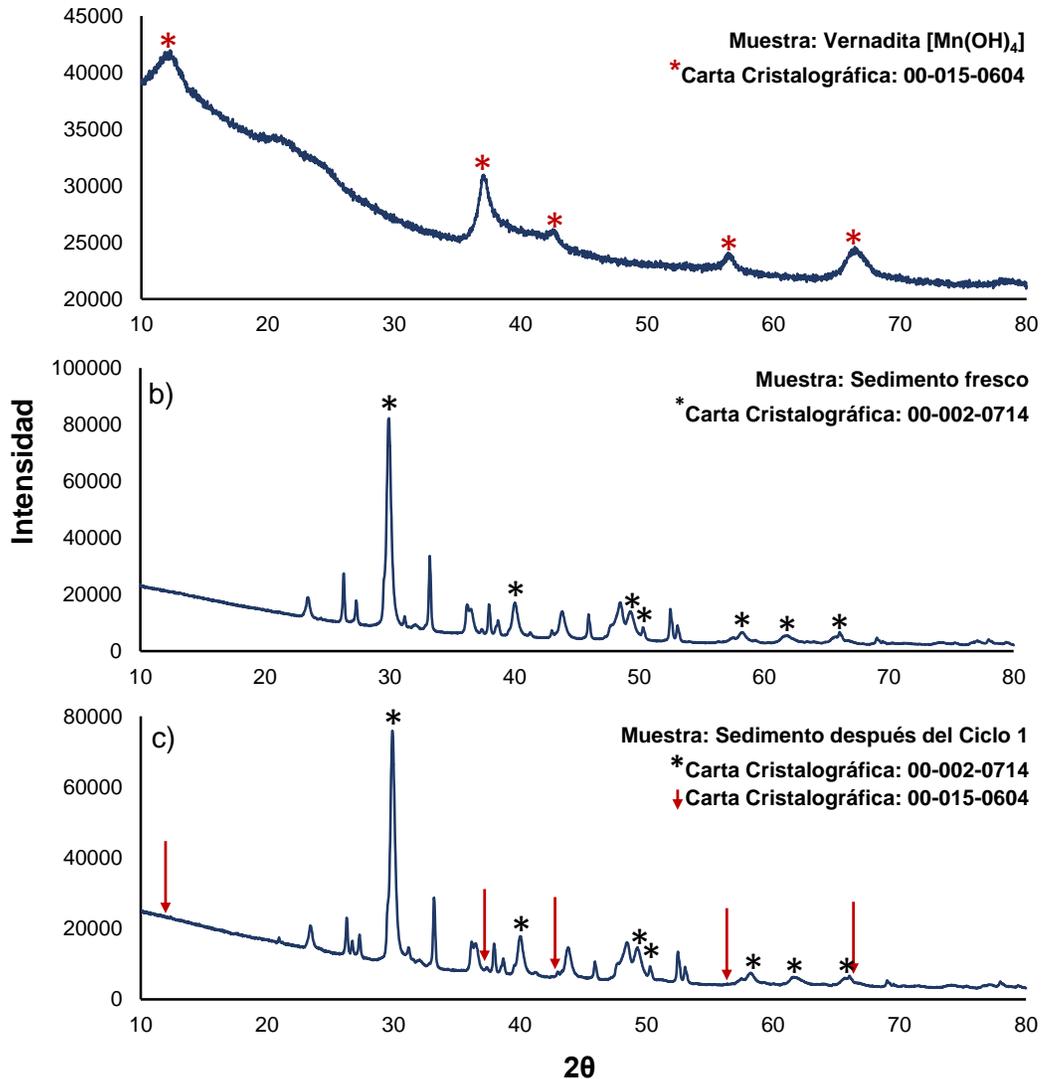


Figura 18. Difractogramas del sedimento, sedimento después de la incubación con leonardita y vernadita, y la vernadita sintetizada.

Este hecho es muy interesante, la OAM en el océano es considerada un gran sumidero de secuestro de carbono inorgánico al inducir la diagénesis y precipitación de distintos tipos de carbonatos autigénicos, las comunidades ANME, de hecho, pueden ser encontradas en nódulos de carbonatos cuya formación se estima es

milenaria y pueden formar tapetes de varios metros cuadrados de extensión (Jorgensen, 1992; Mason *et al*, 2015). Si se considera que el Sedimento Sisal mostró indicios de acoplar la OAM a la reducción de Mn^{+4} al observar consumo de CH_4 (1.7 ± 2.2 mmol/L) en los experimentos que sólo contenían la vernadita como AFE, y la observación de una diferencia de Mn reducido entre este experimento y su control endógeno (sin CH_4) de 0.137 ± 0.08 milieq e^- no sería sorprendente que la microbiota del sedimento Sisal tuviera la capacidad de llevar a cabo la OAM acoplada a la reducción de Mn (**Ecuación 3**) y éste sea el motivo de la existencia de carbonatos de manganeso en su composición. A la fecha, y hasta donde se ha revisado la bibliografía, sólo existe un reporte que documenta la OAM dependiente de la reducción de manganeso (Beal *et al*, 2009). Otro aspecto al que hay que poner atención en el **Panel c** del difractograma mostrado en la **Figura 18**, es la ausencia de los picos esperados del mineral vernadita (se indica con fechas rojas), el difractograma de la vernadita sintetizada químicamente se presenta en el **Panel a** de la misma figura. Esta ausencia indica que la totalidad de la vernadita adicionada a las incubaciones fue reducida, por lo cual, aunque, se renovó la atmósfera de los microcosmos y se inyectó un nuevo pulso de CH_4 , no se observó consumo en más de un mes de monitoreo, puesto que la capacidad re-oxidante de los ácidos húmicos reducidos había sido agotada, contrario al caso de los experimentos con los óxidos de hierro, donde aún existía goethita en el medio, pero los impedimentos para que la reacción continuara fueron de otra naturaleza.

6.5 INCUBACIONES CON HUMIATOS DE FE COMO AFE

Con la finalidad de conocer si formas insolubles de las SH como son los humiados de hierro pudiesen actuar como AFEs en la oxidación anaerobia de CH_4 , se utilizaron microcosmos con los sedimentos San Quintín y Churince que hasta ese momento habían dado actividad positiva de OAM en presencia de AQDS. Los resultados se muestran en la **Figura 19**.

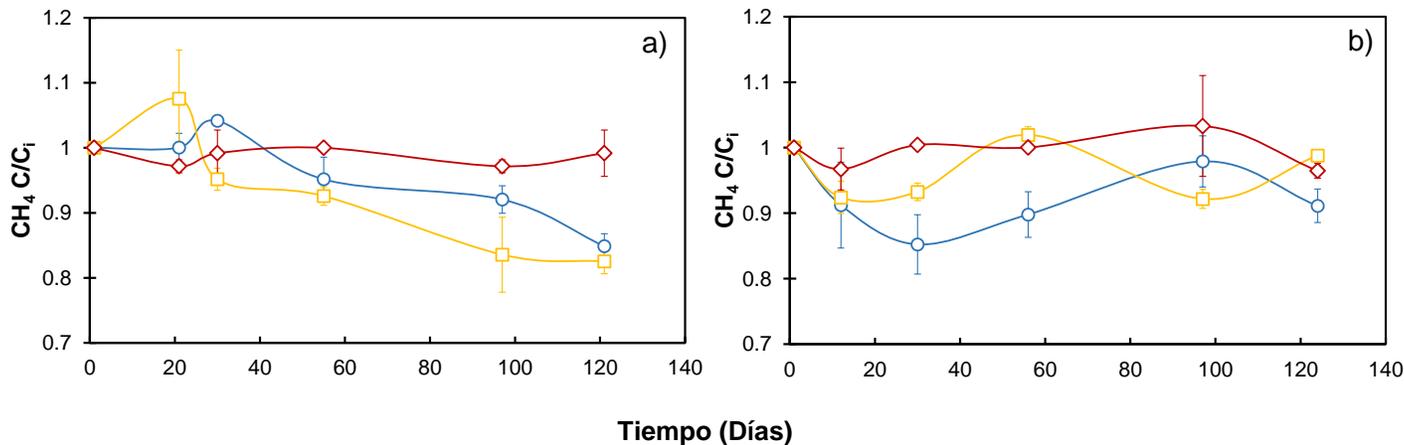


Figura 19. Oxidación Anaerobia de Metano en Sedimentos Churince y San Quintín con Humiatos de Fe. Panel a: Consumo normalizado de CH₄ por el sedimento Churince y, panel b: por el sedimento San Quintín. La línea azul (-○-) representa el experimento completo (CH₄ + Humiato), línea roja (-◇-) los controles estériles (CH₄ + Humiato), línea negra (-□-) los controles endógenos (Humiato, Sin CH₄) y línea amarilla (-□-) los controles sin aceptor de e⁻ (Sin Humiato). Las barras de error representan el error estándar de la media.

En la gráfica que corresponde a Churince (**panel a**) se puede observar que la actividad metanótrofa ocurrió desde el día 28 hasta el día 120 aproximadamente, sin embargo, no se distinguió una diferencia ni en velocidad de consumo o en total de CH₄ consumido entre el control sin humiato y el experimento con humiato. De hecho, el consumo de metano ocurrido en los microcosmos sin humiats fue mayor que el consumo por su contraparte: 6.4 ± 1.76 mmol/L vs 8.8 ± 1.58 mmol/L. Como contraste al sedimento Churince, en el **panel b**, se observa que el sedimento San Quintín en presencia de los humiats, presenta un consumo de 6.9 ± 4 mmol/L mientras que el control sin humiats tuvo una disminución en la concentración de CH₄ de 3.1 ± 0.6 mmol/L al día 30. Después de esto la concentración de CH₄ comenzó a elevarse hasta alcanzar casi la concentración original. Se realizó la técnica de la Ferrozina para comparar la cantidad de e⁻ aceptados entre los microcosmos que tenían humiats y CH₄ y los que no tenían CH₄, sin embargo, no se distinguió una diferencia entre estas mediciones.

7. CONCLUSIONES

7.1 PRINCIPALES HALLAZGOS

En este trabajo se documentan los primeros indicios de que la biota de un sedimento de un cuerpo de agua tipo humedal (Sisal, Yucatán) puede acoplar el proceso de OAM a la reducción de quinonas modelo. Así mismo, se ha documentado el efecto positivo que los óxidos metálicos de hierro y manganeso de pobre cristalinidad (goethita y vernadita) inducen sobre el proceso de oxidación de metano acoplado a la reducción de una forma de ácidos húmicos (leonardita). Estos primeros indicios darán pie a trabajos que profundicen en la repetitividad de los ciclos de degradación de CH_4 al sobrellevar las limitaciones que tiene trabajar con metales y matrices complejas como sedimentos. Dado que el proceso OAM acoplado a la reducción de metales es un campo que se encuentra en ciernes, el descubrimiento de las SH como intermediarios y facilitadores del proceso cambiará el paradigma bajo el que se ha contemplado la metanotrofia con metales como AFEs. Éste y más trabajos que vayan a fondo en la biota y los microorganismos asociados al proceso OAM acoplado a la reducción de SH ampliarán la percepción que se tiene de los sumideros de metano en cuerpos de agua impulsando la búsqueda de sitios que presenten metanotrofia y actúen como sumideros.

Además de este descubrimiento, se ha documentado la capacidad de un sedimento marino y un sedimento de una poza oligotrófica (San Quintín y Churince), los cuales aparentemente poseen capacidad para consumir metano bajo condiciones anaerobias. Aunque en este trabajo, no se logró esclarecer cual fue el aceptor de electrones ligado a este proceso, ambos sedimentos tuvieron características de consumo distintas en términos de fase lag (latencia), velocidad máxima de consumo, y relación con la tasa de reducción de AQDS a través de varios ciclos de reducción. Mientras que San Quintín mostró que su consumo de metano estuvo ligado indirectamente a la presencia de AQDS, Churince mostró independencia de la adición de AQDS para oxidar metano pero sí presencia de microorganismos reductores del humus. Hasta donde se tiene conocimiento, estos son los primeros indicios de que estos sitios poseen biota que lleve a cabo

metanotrofia lo cual tiene importantes implicaciones en el estudio del ciclo del carbono y la regulación de la emisión del gas de efecto invernadero en estos cuerpos de agua. En el futuro se deberán realizar esfuerzos mayores para desentrañar el fenómeno OAM en estos sedimentos ya que hasta este punto, constituyen una caja negra.

7.2 CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS

La búsqueda de nuevos procesos respiratorios microbianos acoplados a la oxidación anaerobia de metano, es de suma importancia para el entendimiento de las dinámicas de liberación de este gas de efecto invernadero a la atmósfera. En este trabajo se han identificado tres sedimentos mexicanos de distintas características que poseen biota con la capacidad de oxidar metano en ausencia de oxígeno. Cada uno de los sedimentos mostró un comportamiento característico que podría ser un reflejo de las condiciones en las que éstos se encuentra *in situ* y la función que desempeñan prestando un servicio ecosistémico de regulación como es la OAM. Los AFE que los microorganismos de los sedimentos con actividad OAM usan en su ambiente natural son aún desconocidos, por lo cual se requiere de un estudio más profundo de éstos.

En este trabajo se ha documentado por primera vez la oxidación anaerobia de metano acoplada a la reducción de sustancias húmicas y sus análogos *in vitro*, y más allá de esto, se ha documentado el impacto de dos tipos de óxidos metálicos ampliamente encontrados en la naturaleza (goethita y vernadita) en el consumo total de metano. Si bien la oxidación anaerobia de metano acoplada a la reducción de sustancias húmicas es un gran descubrimiento, aún constituye una caja negra, tanto en cuanto a la biota asociada, mecanismos energéticos y rutas metabólicas, como en el impacto ecológico y la contribución total a la mitigación de la emisión de metano a la atmósfera. Para lograr el total entendimiento del acoplamiento de la OAM a la reducción de SH por el sedimento Sisal se hacen las siguientes recomendaciones:

- i) Realizar una caracterización profunda en términos de aceptores terminales de electrones presentes en el sedimento y en el agua de poro asociada.
- ii) Llevar a cabo caracterizaciones físicoquímicas del sedimento, para tratar de cuantificar el contenido de material húmico intrínseco que el sedimento pudiese contener, así como grupos funcionales aceptores de electrones que pudiesen existir en la materia propia al sedimento.
- iii) Realizar un análisis molecular de la biota intrínseca del sedimento para conocer si las comunidades de *archaeas* y bacterias presentes en éste caen dentro de las clasificaciones de microorganismos metanótrofos que se encuentran documentadas en bases de datos como el NCBI. Con respecto a este punto y al anterior, se debe tener presente que el sedimento por sí mismo, antes de aplicar cualquier tratamiento, constituye una caja negra.
- iv) Comprobar posibles asociaciones de microorganismos reductores del humus y *archaeas metanotróficas* mediante técnicas de sondas fluorescentes como la técnica de FISH (*Fluorescence In Situ Hybridization*).
- v) Utilizar isótopos estables del carbono como el $^{13}\text{CH}_4$ para tener la prueba contundente de la mineralización del metano y poder discernir entre el metano consumido y el producido por la biota puesto a su capacidad para realizar metanogénesis.
- vi) Llevar a cabo un monitoreo constante de la reducción de los ácidos húmicos para lograr documentar la progresión en el proceso de su reducción acoplada a la oxidación del CH_4 .
- vii) Implementar otro tipo de técnicas para medir la reducción de los ácidos húmicos como las metodologías electroquímicas, para tener una mejor documentación de la capacidad aceptora de electrones de las sustancias húmicas.

8. BIBLIOGRAFÍA

- Aeschbacher, M., Sander, M., Schwarzenbach, R.P.** (2010) Novel electro-chemical approach to assess the redox properties of humic substances. *Environmental Science and Technology*, 44(1):87–93.
- APHA, AWWA, WEF,** Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater, 20th ed., American Public Health Association, Washington, DC, USA, 1998.
- Barnes, R.O., and Goldberg, E.D.** (1976). Methane production and consumption in anaerobic marine sediments. *Geology* 4:297–300.
- Beal, E. J., House, C. H., & Orphan, V. J.** (2009). Manganese- and iron-dependent marine methane oxidation. *Science*, 325(5937):184-187.
- Blodau, C., and Deppe, M.** (2012), Humic acid addition lowers methane release in peats of the Mer Bleue bog, Canada. *Soil Biology and Biochemistry*, 52:96–98.
- Boetius, A., Ravensschlag, K., Schubert, C., Rickert, D., Widdel, F.** (2000). A marine microbial consortium apparently mediating anaerobic oxidation of methane. *Nature*, 407:623–26.
- Burlage, R. S., Atlas, R., Stahl, D., Geesey, G., Sayler, G.** Techniques in Microbial Ecology. Oxford University Press Inc. 26 de Marzo de 1998.
- Cao M., Gregson K., & Marshall S.** (1998). Global methane emission from wetlands and its sensitivity to climate change. *Atmospheric Environment*, 32(19):3293-3299.
- Cervantes, F. J., Van Der Velde, S., Lettinga, G., & Field, J. A.** (2000). Competition between methanogenesis and quinone respiration for ecologically important substrates in anaerobic consortia. *FEMS Microbiology Ecology*, 34(2):161-171.
- Cervantes, F.J., Dijkma, W., Duong-Dac, T., Ivanova, A., Lettinga, G., Field, J.A.** (2001) Anaerobic mineralization of toluene by enriched sediments with quinones and humus as terminal electron acceptors. *Applied and Environmental Microbiology* 67(10):4471-4478.
- Coates, J. D., Ellis, D. J., Blunt-Harris, E. L., Gaw, C. V., Roden, E. E., & Lovley, D. R.** (1998). Recovery of humic-reducing bacteria from a diversity of environments. *Applied and Environmental Microbiology*, 64(4):1504-1509.
- Conrad, R.** (2009). The global methane cycle: recent advances in understanding the microbial processes involved. *Environmental Microbiology Reports*, 1:258-292.

- Cord-Ruwisch, R.** (1985). A quick method for the quantification of dissolved and precipitated sulfides in cultures of sulfate-reducing bacteria. *Journal of Microbiological Methods*, 4(1):33-36.
- Dunnivant, F.M.,** Schwarzenbach, R.P., Macalady, D.L. (1992) Reduction of substituted nitrobenzenes in aqueous solutions containing natural organic matter. *Environmental Science and Technology*, 26(11):2133-2141.
- Escalante, A. E.,** Eguiarte, L. E., Espinosa-Asuar, L., Forney, L. J., Noguez, A. M., Souza-Saldivar, V. (2008) Diversity of aquatic prokaryotic communities in the Cuatro Ciénegas basin. *FEMS Microbiology Ecology*, 65:50–60.
- Ettwig, K. F.,** Shima, S., Van De Pas-Schoonen, K. T., Kahnt, J., Medema, M. H., Op Den Camp, H. J. M., Strous, M. (2008). Denitrifying bacteria anaerobically oxidize methane in the absence of archaea. *Environmental Microbiology*, 10(11):3164-3173.
- Field, J.A.** (2001) Recalcitrance as a catalyst for new developments. *Water Science and Technology*, 44(8):33-40.
- Hansen, J.,** Sato, M., Ruedy, R., Lo, K., Lea, D. W., & Medina-Elizade, M. (2006). Global temperature change. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*, 103(39):14288-14293.
- Haroon, M.F.,** Hu, S., Shi Y., Imelfort, M., Keller, J., Hugenholtz, P., Yuan, Z., Tyson, G.W. (2013) Anaerobic oxidation of methane coupled to nitrate reduction in a novel archaeal lineage. *Nature*, 500(7464):567–570
- Hernández-Montoya, V.,** Alvarez, L.H., Montes-Morán, M.A., Cervantes, F.J. (2012) Reduction of quinone and non-quinone redox functional groups in different humic acid samples by *Geobacter sulfurreducens*. *Geoderma*, 183–184:25–31.
- Hinrichs, K.U.,** Hayes, J.M., Sylva, S.P., Brewer, P.G., DeLong, E.F. (1999). Methane-consuming Archae- bacteria in marine sediments. *Nature*, 398:802–5.
- Hinrichs, K.U., Boetius, A.** (2002). The anaerobic oxidation of methane: new insights in microbial ecology and biogeochemistry. In *Ocean Margin Systems*, ed. G Wefer, D Billett, D Hebbeln, BB Jørgensen, MSchlüter, TCE vanWeering, pp. 457–77. Berlin: Springer-Verlag
- Holmes, M. E.,** Chanton, J. P., Tfaily, M. M., & Ogram, A. (2015). CO₂ and CH₄ isotope compositions and production pathways in a tropical peatland. *Global Biogeochemical Cycles*, 29(1):1-18.

- Gupta, V.,** K. A. Smemo, J. B. Yavitt, and N. Basiliko. (2012). Active methanotrophs in two contrasting North American Peatland ecosystems revealed using DNA-SIP, *Microbiology Ecology*, 63:438–445.
- Holler, T.,** Wegener, G., Niemann, H., Deusner, C., Ferdelman, T. G., Boetius, A., Widdel, F. (2011). Carbon and sulfur back flux during anaerobic microbial oxidation of methane and coupled sulfate reduction. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 108(52):1484-1490.
- IPCC.** (2007). Summary for Policymakers, in *Climate Change 2007: Impacts, Adaptation and Vulnerability. Contribution of Working Group II to the Fourth Assessment Report of the Intergovernmental Panel on Climate Change*, Cambridge University Press, Cambridge, UK, p. 17.
- IPCC.** (2014). Summary for Policymakers. In: *Climate Change 2014: Mitigation of Climate Change. Contribution of Working Group III to the Fifth Assessment Report of the Intergovernmental Panel on Climate Change* [Edenhofer, O., R. Pichs-Madruga, Y. Sokona, E. Farahani, S. Kadner, K. Seyboth, A. Adler, I. Baum, S. Brunner, P. Eickemeier, B. Kriemann, J. Savolainen, S. Schlömer, C. von Stechow, T. Zwickel and J.C. Minx (eds.)]. Cambridge University Press, Cambridge, United Kingdom and New York, NY, USA.
- Islas-Lima, S.,** Thalasso, F., & Gómez-Hernandez, J. (2004). Evidence of anoxic methane oxidation coupled to denitrification. *Water Research*, 38(1):13-16.
- Iversen, N., & Jørgensen, B. B.** (1985). Anaerobic methane oxidation rates at the sulfate-methane transition in marine sediments from Kattegat and Skagerrak (Denmark). *Limnology & Oceanography*, 30(5):944-955.
- Jørgensen, N.O.** (1992) Methane-derived carbonate cementation of marine sediments from the Kattegat, Denmark: geochemical and geological evidence. *Marine Geology*, 103:1–13.
- Katsikopoulos, D.,** Fernández-González, Á., Prieto, M. (2009). Crystallization behaviour of the (Mn,Ca)CO₃ solid solution in silica gel: nucleation, growth and zoning phenomena. *Mineralogical Magazine*, 73:269-284.
- Keller, J.K.,** Weisenhorn, P.B., Megonigal, J.P. (2009). Humic acids as electron acceptors in wetland decomposition. *Soil Biology and Biochemistry*, 41:1518-1522.
- Knittel, K.,** Lösekann T., Boetius A., Kort R., Amann R. (2005). Diversity and distribution of methanotrophic archaea at cold seeps. *Applied and Environmental Microbiology*, 71(1):467-479.
- Lovley, D. R.** (1991). Dissimilatory Fe(III) and Mn(IV) reduction. *Microbiological Reviews*, 55(2):259-287.

- Lovley, D. R.**, Coates, J.D., Blunt-Harris, E.L., Phillips, E.J.P., Woodward, J.C. (1996) Humic substances as electron acceptors for microbial respiration. *Nature*, 382:445-448.
- Lovley, D. R.**, Fraga J. L., Blunt-Harris E. L., Hayes L. A., Phillips E. J. P., & Coates J. D. (1998). Humic substances as a mediator for microbially catalyzed metal reduction. *Acta Hydrochimica Et Hydrobiologica*, 26(3):152-157.
- Luo, Y.**, Chen, R., Wen, L., Meng, F., Zhang, Y., Lai, C., Zheng, P. (2015). Complete perchlorate reduction using methane as the sole electron donor and carbon source. *Environmental Science and Technology*, 49(4):2341-2349.
- Manahan S.E.**, "Humic Substances and the Fates of Hazardous Waste Chemicals," Chapter 6 in Influence of Aquatic Humic Substances on Fate and Treatment of Pollutants, Advances in Chemistry Series 219, American Chemical Society, Washington, D.C., 1989, pp. 83-92.
- Martinez, C. M.**, Alvarez, L. H., Celis, L. B., & Cervantes, F. J. (2013). Humus-reducing microorganisms and their valuable contribution in environmental processes. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 97(24):10293-10308.
- Mason, O. U.**, Case, D. H., Naehr, T. H., Lee, R. W., Thomas, R. B., Bailey, J. V., & Orphan, V. J. (2015). Comparison of archaeal and bacterial diversity in methane seep carbonate nodules and host sediments, Eel river basin and Hydrate ridge, USA. *Microbial Ecology*, (En impresión).
- Michaelis, W.**, R. Seifert, K. Nauhaus, T. Treude, V. Thiel, M. Blumenberg, *et al.* (2002). Microbial reefs in the Black Sea fueled by anaerobic oxidation of methane. *Science*, 297:1013-1015.
- Mikaloff Fletcher, S. E.**, Tans, P. P., Bruhwiler, L. M., Miller, J. B., and Heimann, M. (2004). CH₄ sources estimated from atmospheric observations of CH₄ and its C-13/C-12 isotopic ratios: 1. Inverse modeling of source processes, *Global Biogeochemical Cycles*, 18, Gb4004, doi:10.1029/2004GB002223, 2004.
- NASA Earth Observatory.** Fact Sheet: Global Warming. <http://earthobservatory.nasa.gov/Features/WorldOfChange/decadaltemp.php>. (2010). (Revisado: junio, 2015).
- NASA Global Climate Change.** <http://climate.nasa.gov/effects/>. The current and future consequences of global change. (2015). (Revisado: junio, 2015).

- Newman, D.K.**, and Kolter, R. (2000) A role of excreted quinones in extracellular electron transfer. *Nature*, 405(6782):94–97.
- Orphan, V. J.**, C. H. House, K.-U. Hinrichs, K. D. McKeegan, and E. F. DeLong. (2001). Methane-consuming archaea revealed by directly coupled isotopic and phylogenetic analysis. *Science*, 293:484-487.
- Orphan, V. J.**, C. H. House, House, K.-U. Hinrichs, K. D. McKeegan, and E. F. DeLong. (2002). Multiple archaeal groups mediate methane oxidation in anoxic cold seeps sediments. *Proceedings of the National Academy of Science USA*, 99:7668-7668.
- Raghoebarsing, A. A.**, Pol, A., Van De Pas-Schoonen, K. T., Smolders, A. J. P., Ettwig, K. F., Rijpstra, W. I. C., Strous, M. (2006). A microbial consortium couples anaerobic methane oxidation to denitrification. *Nature*, 440(7086):918-921.
- Reeburgh, W. S.** (1976). Methane consumption in Cariaco Trench waters and sediments. *Earth and Planetary Science Letters*, 47:345-352.
- Ríos del Toro, E., and Cervantes, F. J.** (2015). Recycling of nitrite fuels the coupling between anammox and autotrophic denitrification for simultaneous removal of ammonium and sulfide by marine sediments (enviado a *Biodegradation Journal*).
- Rittman, B.E. y McCarty, P.L.**, 2001, Environmental Biotechnology: Principles and applications. Stoichiometry and Bacterial Energetics Cap. 2. Pp. 144. McGrawHill.
- Roden, E. E., & Urrutia, M. M.** (1999). Ferrous iron removal promotes microbial reduction of crystalline iron(III) oxides. *Environmental Science and Technology*, 33(11):1847-1853.
- Scott, D.T.**, McKnight, D. M., Blunt Harris, E.L., Kolesar, S.E., Lovley, D.R. (1998) Quinone moieties act as electron acceptors in the reduction of humic substances by humic-reducing microorganisms. *Environ Science and Technology*, 32(19):2984-2989.
- Soga, T., y Ross G. A.** (1999). Simultaneous determination of inorganic anions, organic acids, amino acids and carbohydrates by capillary electrophoresis. *Journal of Chromatography A*, 837(1–2):231-239.
- Sorokin, Y.I.** (1957). On the ability of sulfate reducing bacteria to utilize methane for the reduction of sulfate to hydrogen sulfide. *Mikrobiologiya*, 115-816.
- Souza, V.**, Espinosa-Asuar L., Escalante A. E., Eguiarte L. E., Farmer J., Forney L., Lloret L., Rodríguez-Martínez J. M., Soberón X., Dirzo R., Elser J. J. (1996). An endangered oasis of aquatic microbial biodiversity in the Chihuahuan desert. *Proceedings of the National Academy of Science USA*, 103 (17):6565–6570.

- Sivan, O.**, Antler, G., Turchyn, A. V., Marlow, J. J., & Orphan, V. J. (2014). Iron oxides stimulate sulfate-driven anaerobic methane oxidation in seeps. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*, 111(40):4139-4147
- Smemo, K. A., & Yavitt, J. B.** (2007). Evidence for anaerobic CH₄ oxidation in freshwater peatlands. *Geomicrobiology Journal*, 24(7-8):583-597.
- Smemo, K. A., & Yavitt, J. B.** (2011), Anaerobic oxidation of methane: An underappreciated aspect of methane cycling in peatland ecosystems?, *Biogeosciences*, 8:779–793, .
- Stevenson, F.J.** (1994) Humus chemistry: genesis, composition reactions. Wiley, New York.
- Stookey, L. L.** (1970). Ferrozine - A new spectrophotometric reagent for iron. *Analytical Chemistry*, 42(7):779-781.
- Straub, K. L.**, Benz, M., & Schink, B. (2000). Iron metabolism in anoxic environments at near neutral pH. *FEMS Microbiology Ecology*, 34(3):181-186.
- Tratnyek, P.G., and Macalady, D.L.** (1989) Abiotic reduction of nitro aromatic pesticides in anaerobic laboratory systems. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 37(1):248-254.
- United States of Environmental Protection Agency.** (2010). Methane and Nitrous Oxide Emissions From Natural Sources (PDF). <http://www.epa.gov/methane/sources.html>. (Revisado: junio, 2015).
- United States of Environmental Protection Agency.** (2013). Global Greenhouse Gas Emissions Data. U.S. Environmental Protection Agency, Washington, DC, USA. <http://www.epa.gov/climatechange/ghgemissions/global.html> (Revisado: junio,2015)
- Villatoro-Monzón, W. R.**, Morales-Ibarria, M. G., Velázquez, E. K., Ramírez-Saad, H., & Razo-Flores, E. (2008). Benzene biodegradation under anaerobic conditions coupled with metal oxides reduction. *Water, Air, and Soil Pollution*, 192(1-4):165-172.
- Weber, K. A.**, Achenbach, L. A., & Coates, J. D. (2006). Microorganisms pumping iron: Anaerobic microbial iron oxidation and reduction. *Nature Reviews Microbiology*, 4(10), 752-764.
- Yoshinaga, M. Y.**, Holler, T., Goldhammer, T., Wegener, G., Pohlman, J. W., Brunner, B., Elvert, M. (2014). Carbon isotope equilibration during sulphate-limited anaerobic oxidation of methane. *Nature Geoscience*, 7(3):190-194.
- Zehnder, A. J., Brock, T.D.** (1979). Methane formation and methane oxidation by methanogenic bacteria. *Journal of Bacteriology*, 137:420–32.

Zehnder, A. J., Brock, T. D. (1980). Anaerobic methane oxidation: occurrence and ecology, *Applied and Environmental Microbiology*, 39:194–204.

Zhang, C., Zhang, D., Li Z., Akatsuka, T., Yang, S., Suzuki, D., Katayama, D. (2014) Insoluble Fe-humic acid complex as a solid-phase electron mediator for microbial reductive dechlorination. *Environmental Science and Technology*, 48(11):6318–6325.