



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

**POSGRADO EN CIENCIAS AMBIENTALES**

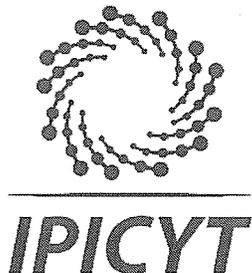
**Sustancias húmicas como mediadores redox durante la  
oxidación anaerobia de metano y la reducción de óxido  
nitroso por la microbiota de un sedimento de un  
humedal costero**

Tesis que presenta  
**Claudia Padilla Loma**

Para obtener el grado de  
**Maestra en Ciencias Ambientales**

**Director de la Tesis:**  
**Dr. Francisco Javier Cervantes Carrillo**

San Luis Potosí, S.L.P. Enero de 2019

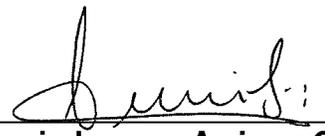


## Constancia de aprobación de la tesis

La tesis "***Sustancias húmicas como mediadores redox durante la oxidación anaerobia de metano y la reducción de óxido nítrico por la microbiota de un sedimento de un humedal costero***" presentada para obtener el Grado de Maestra en Ciencias Ambientales fue elaborada por **Claudia Padilla Loma** y aprobada el seis de febrero del dos mil diecinueve 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. Sonia Lorena Arriaga García**  
Miembro del Comité Tutoral



**Dr. Cesar Nieto Delgado**  
Miembro del Comité Tutoral



### Créditos Institucionales

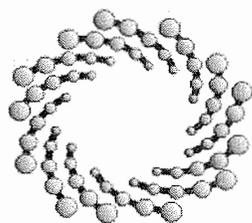
Esta tesis fue elaborada en los laboratorios de la División de Ciencias Ambientales del Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A. C., bajo la dirección del Dr. Francisco Javier Cervantes Carrillo

Durante la realización del trabajo el autor recibió una beca académica del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (611456) y del Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A. C.

Este trabajo de investigación fue financiado por CONACyT **a través del proyecto 1289 del Programa Fronteras de la Ciencia.**

Al comité de becas del Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A.C., por los recursos financieros otorgados para la divulgación de los resultados obtenidos a través de esta investigación en el evento Sixth International Symposium of Environmental Biotechnology and Engineering y en el IV Congreso Nacional de Tecnologías y Ciencias Ambientales, llevados a cabo en Ciudad Obregón, Sonora, México.

Las cinéticas de oxidación-reducción y la secuenciación de clonas fueron llevadas a cabo en el Laboratorio Nacional de Biotecnología Agrícola, Médica y Ambiental (LAMBAMA) y La transformación de células bacterianas fue realizada en el Laboratorio de genómica funcional y comparativa (Lagefuco) de la división de Biología Molecular.



**IPICYT**

# 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 071 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 6 días del mes de febrero del año 2019, se reunió a las 10:00 horas en las instalaciones del Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A.C., el Jurado integrado por:

<b>Dra. Sonia Lorena Arriaga García</b>	<b>Presidenta</b>	<b>IPICYT</b>
<b>Dr. Cesar Nieto Delgado</b>	<b>Secretario</b>	<b>IPICYT</b>
<b>Dr. Francisco Javier Cervantes Carrillo</b>	<b>Sinodal</b>	<b>IPICYT</b>

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

**MAESTRA EN CIENCIAS AMBIENTALES**

sustentó la C.

**Claudia Padilla Loma**

sobre la Tesis intitulada:

*Sustancias húmicas como mediadores redox durante la oxidación anaerobia de metano y la reducción de óxido nitroso por la microbiota de un sedimento de un humedal costero*

que se desarrolló bajo la dirección de

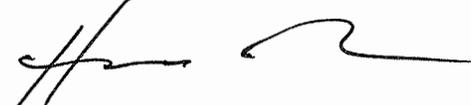
**Dr. Francisco Javier Cervantes Carrillo**

El Jurado, después de deliberar, determinó

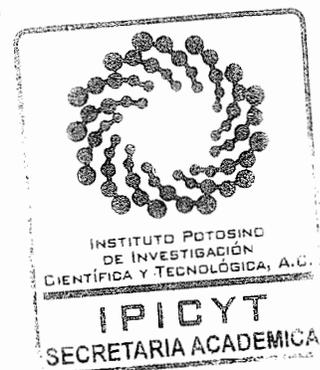
**APROBARLA**

Dándose por terminado el acto a las 11:42 horas, procediendo a la firma del Acta los integrantes del Jurado. Dando fe el Secretario Académico del Instituto.

A petición de la interesada y para los fines que a la misma convengan, se extiende el presente documento en la ciudad de San Luis Potosí, S.L.P., México, a los 6 días del mes de febrero de 2019.

  
**Dr. Horacio Flores Zúñiga**  
Secretario Académico

  
**Mtra. Ivonne Lizette Cuevas Vélez**  
Jefa del Departamento del Posgrado



## Dedicatorias

*A mi hermosa familia.*

*Por su amor, comprensión, paciencia y apoyo incondicional en todo momento para alcanzar este logro, que también es suyo. Especialmente a mis padres Margarita y Jorge, quienes con sus enseñanzas de trabajo y esfuerzo arduo, me hacen creer que no hay imposibles.*

*Con cariño para ustedes.*

## Agradecimientos

Agradezco primeramente a Dios, por permitirme culminar esta etapa.

Mis más sinceros agradecimientos hacia toda mi familia, quienes son el pilar fundamental en mi vida. A mis padres, a quienes admiro y respeto profundamente por la valentía, esfuerzo y trabajo constante que a diario desempeñan. Gracias por educarme con amor, valores y apoyar cada una de mis decisiones, son mi ejemplo, sin ustedes nada de esto sería posible. A mis hermanos, Alma, Luis y Alan, por creer en mis locuras, ser mi ejemplo de perseverancia y por darme la oportunidad de ser tía de cuatro sobrinitos maravillosos Jeny, Yeyé, Santy y Emi, quienes alegran mis días con sus llamadas y me hacen recordar que nunca se debe perder la curiosidad y la imaginación.

De manera muy especial agradezco mi asesor, el Dr. Francisco J. Cervantes Carrillo, por brindarme la oportunidad de aportar un poco de conocimiento a este gran proyecto, por creer, apoyar y respetar mis ideas en todo momento. Gracias también por el tiempo invertido en esta tesis, por sus conocimientos y comentarios tan certeros, por la manera en que me permitió desarrollarme profesionalmente y finalmente agradecerle el gran ser humano que es antes de ser investigador.

Principalmente, quiero agradecer a mi compañero de batallas, quien nunca dejó de creer en mí, ni mucho menos dejó que me rindiera, quien me apoyó, escuchó, me brindó su amor y comprensión en los momentos más difíciles, me alentó en cada momento y me enseñó a ver la vida desde otra perspectiva; me hizo crecer. Gracias Antonio por ser la paz en mi mundo tan caótico, sin ti, literalmente no estaría aquí. Con cariño para ti.

A mi comité evaluador, Sonia Arriaga García y Cesar Nieto Delgado por las críticas acertadas y por su disponibilidad para este proyecto. También quiero agradecer a los Doctores Esmeralda López Lozano y Sergio Casas Flores, que sin ser parte inicial de este trabajo, siempre estuvieron dispuestos a colaborar en la resolución de dudas y apoyar en la medida de lo posible, a ustedes muchas gracias por la experiencia transmitida para hacer de este proyecto algo extraordinario.

A mi gran equipo, mi “segundo director de tesis” quien en conjunto desarrollamos parte de este proyecto, M. en C. Edgardo Valenzuela, que sin su experiencia y conocimiento, esta tesis no hubiera sido lo que es. Gracias por cada consejo, correctivo, palabras de aliento, por compartir tu tiempo y tu forma de trabajar, gracias totales.

Al Dr. Nicolás Gómez, por su disposición, paciencia, conocimiento y entrega, con quien estoy profundamente agradecida por tratar este proyecto como suyo y apoyarme en los peores momentos de crisis experimentales. Gracias Nico por todas las dudas resueltas.

Agradezco a la parte técnica de la División de Ciencias ambientales, a la QFB. Elizabeth Cortez Cedillo por la disposición y apoyo a este proyecto. A Verónica Zárate de LANBAMA, por su apoyo técnico en la secuenciación de muestras y su gran espíritu de servicio. A la I.Q. Ma. Del Carmen Rocha y a I.Q. Guadalupe Ortega, por todo el apoyo técnico brindado en el Laboratorio Nacional de Biotecnología Agrícola, Médica y Ambiental (LANBAMA) gracias por permitirme compartir durante meses su espacio y conocimientos y siempre recibirme con una sonrisa

Quiero agradecer especialmente a mi familia IPICYT es decir, mis amigos; porque esta institución aparte de nuevos retos y conocimiento, me dió un regalo muy grande, la amistad invaluable de excelentes personas, mismas que estuvieron a lo largo de este gran proyecto y que en mayor o menor medida siempre me brindaron una palabra de aliento, un abrazo, se preocuparon por mí, me compartieron su tiempo y algo muy importante, su conocimiento. A todos ustedes, gracias por hacer esta etapa especial y divertida, sin ustedes no lo hubiera logrado, los quiero amigos: Moni, Andrea, Carmen, Anaí, Sandra, Saúl, Fany, Edgar, Ernesto, Ivan, Francisco, Valeria y Ricardo.

Un agradecimiento en particular a mi amiga Beatriz Gómez, quien me apoyó desde la llegada a este estado y me ha acompañado a lo largo de muchas aventuras, gracias Betty por el gran ser humano que eres. Así como también agradezco eternamente a Liliana, Chino, Lari, Laura, Juan, Clau, Reno y Esme, quienes son como mis hermanos pues siempre han estado ahí para apoyarme incondicionalmente, los quiero demasiado.

# Contenido

## Sustancias húmicas como mediadores redox durante la oxidación anaerobia de metano y la reducción de óxido nitroso por la microbiota de un sedimento colectado de un humedal costero

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

### TABLA DE CONTENIDO

<b>1. INTRODUCCIÓN</b> .....	<b>1</b>
<b>2. MARCO TEÓRICO</b> .....	<b>2</b>
2.1 Gases de efecto invernadero: Emisiones naturales .....	2
2.2 Ecosistemas acuáticos emisores de GEI .....	3
2.3 Humedales .....	4
2.4 Metano (CH <sub>4</sub> ) .....	5
2.5 Metanotrofia anaerobia .....	6
2.6 Óxido nitroso (N <sub>2</sub> O) .....	8
2.7 Reducción de N <sub>2</sub> O por medios biológicos .....	9
2.8 Sustancias húmicas .....	11
2.9 Microorganismos reductores y oxidadores del humus .....	12

<b>3. JUSTIFICACIÓN .....</b>	<b>12</b>
<b>4. HIPÓTESIS.....</b>	<b>13</b>
<b>5. OBJETIVOS .....</b>	<b>14</b>
5.1 Objetivo general .....	14
5.2 Objetivos específicos .....	14
<b>6. MATERIALES Y MÉTODOS .....</b>	<b>15</b>
6.1 Sedimento .....	15
6.2 Medio basal.....	16
6.3 Sustancias húmicas. ....	17
6.4 Aclimatación del sedimento.....	17
6.5 Diseño experimental.....	17
6.6 Ensayos en lote.....	19
6.7 Cuantificación de gases $^{13}\text{CH}_4$ , $^{15}\text{N}_2\text{O}$ , $^{13}\text{CO}_2$ , $^{15}\text{N}_2$ .....	19
6.8 Composición elemental.....	20
6.9 Carbono orgánico total .....	20
6.10 Determinación de Sulfato.....	20
6.11 Determinación de sulfuro disuelto.....	20
6.12 Sólidos Totales, Volátiles y fijos.....	21
6.13 Determinación de Hierro .....	21
6.14 Determinación de la reducción de ácidos húmicos .....	21

6.15	Grupos funcionales de las sustancias húmicas y sitios redox.....	21
6.16	Nitrato, nitrito y amonio .....	21
6.17	Análisis moleculares de Sedimentos.....	22
6.18	Extracción DNA.....	22
6.19	PCR 16s rRNA.....	23
6.20	PCR convencional del gen <i>nosZ</i> .....	23
6.21	Clonación .....	24
6.22	Secuenciación y procesamiento .....	25
6.23	Análisis Estadísticos .....	25
<b>7.</b>	<b>RESULTADOS .....</b>	<b>26</b>
7.1	Caracterización de sedimentos: Carbono en agua y sedimentos.....	26
7.2	Caracterización de sedimentos .....	28
7.3	Barrido elemental por ICP-OES .....	30
7.4	Cinéticas de oxidación de metano y reducción de óxido nitroso .....	33
7.4.1	Pre incubación y selección de sedimentos a evaluar .....	33
7.4.2	Ensayos en lote: Ciclo I .....	34
7.4.3	Capacidad aceptora de electrones de las sustancias húmicas, ciclo I	
	36	
7.5	Ensayos en lote: Ciclo II.....	38
7.5.1	Reducción de Óxido Nitroso .....	38

7.5.1 Capacidad aceptora de electrones de las sustancias húmicas, ciclo II..	43
7.6 Biotransformación simultánea mediada por SH: Porcentaje de $^{15}\text{N}_2\text{O}$ explicado por la mineralización de metano .....	45
7.6 Extracción de DNA y PCR basado en 16s rRNA.....	46
7.5 Detección del gen funcional <i>nosZl</i> .....	47
7.6 Clonación y secuenciación.....	49
7.7 Comunidad microbiana basada en el clado II del gen <i>nosZ</i> .....	49
7.8 Relaciones evolutivas.....	54
<b>8 Diagrama de Venn.....</b>	<b>57</b>
<b>9. CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS.....</b>	<b>59</b>
9.1. Perspectivas.....	60
<b>10 BIBLIOGRAFÍA.....</b>	<b>61</b>
<b>11 Anexos .....</b>	<b>72</b>

## LISTA DE TABLAS

<b>TABLA 1.</b> TIEMPO DE VIDA, EFICIENCIA RADIATIVA DIRECTA (EXCEPTO PARA METANO) Y POTENCIALES DE CALENTAMIENTO GLOBAL RELATIVOS AL CO <sub>2</sub> . EN UN HORIZONTE DE 100 AÑOS.	3
<b>TABLA 2.</b> UBICACIÓN DE SEDIMENTOS UTILIZADOS.	15
<b>TABLA 3.</b> DISEÑO EXPERIMENTAL USANDO PAHOKEE PEAT (PP) COMO SUSTANCIAS HÚMICAS EXTERNAS.	18
<b>TABLA 4.</b> COMPENENTES DE LA RACCIÓN DE LIGACIÓN.	24
<b>TABLA 5.</b> CARBONO ORGÁNICO TOTAL Y CARBONO TOTAL EN AGUA DE PORO.	27
<b>TABLA 6.</b> CONCENTRACIÓN DE CARBONO TOTAL EN SEDIMENTO	28
<b>TABLA 7.</b> CARACTERIZACIÓN FISICOQUÍMICA DE AGUA DE PORO Y SEDIMENTO DE ALASKA, USA Y SIBERIA, RUSIA.	29
<b>TABLA 8.</b> CARACTERIZACIÓN FISICOQUÍMICA DE AGUA DE PORO Y SEDIMENTO DE SISAL, YUCATÁN, MEX. Y BAJA CALIFORNIA, MEX.	30
<b>TABLA 9.</b> ELEMENTOS ANALIZADOS EN AGUA DE PORO Y SEDIMENTO DE LOS CUATRO SITIOS	30
<b>TABLA 10.</b> VELOCIDADES DE REDUCCIÓN DE LAS SH-PP, CICLO 1	37
<b>TABLA 11.</b> BALANCES DE 13-CARBONO Y 15-NITRÓGENO EN EL CICLO II. EN ESTA TABLA SÓLO SE ENLISTAN LOS TRATAMIENTOS CON SUSTANCIAS HÚMICAS.	41
<b>TABLA 12.</b> BALANCES DE 13-CARBONO Y 15-NITRÓGENO EN EL CICLO II. EN ESTA TABLA SÓLO SE ENLISTAN LOS TRATAMIENTOS SIN SUSTANCIAS HÚMICAS	42
<b>TABLA 13.</b> VELOCIDADES DE REDUCCIÓN DE SH. PP, CICLO II.	45
<b>TABLA 14.</b> CARACTERIZACIÓN FILOGENÉTICA DE LA COMPOSICIÓN DE MUESTRAS DE SEDIMENTO POR TRATAMIENTO.	55

## LISTA DE FIGURAS

<b>FIGURA 1.</b> DISTRIBUCIÓN GLOBAL DE LAGOS Y HUMEDALES EHNER, B., & DÖLL, P. (2004)	5
<b>FIGURA 2.</b> ESQUEMA GENERAL DE UN HUMEDAL Y SUS COMPONENTES FÍSICOS, QUÍMICOS Y BIOLÓGICOS.	14
<b>FIGURA 3.</b> LOCALIZACIÓN DEL ÁREA DE MUESTREO DE SEDIMENTOS DE SISAL YUCATÁN.	16
<b>FIGURA 4.</b> CARBONO TOTAL, ORGÁNICO E INORGÁNICO PRESENTE EN EL AGUA DE PORO (A, B Y C) Y CARBONO TOTAL PRESENTE EN SEDIMENTO DE LOS 4 SITIOS ESTUDIADOS (D).	27
<b>FIGURA 5.</b> COMPOSICIÓN ELEMENTAL EVALUADA EN AGUA DE PORO POR ICP-OES DE LOS 4 SITIOS.	31
<b>FIGURA 6.</b> COMPOSICIÓN ELEMENTAL EVALUADA EN SEDIMENTOS SECOS POR ICP-OES DE LOS 4 SITIOS. LAS BARRAS REPRESENTAN EL PROMEDIO DE MEDICIONES POR DUPLICADO.	32
<b>FIGURA 7.</b> CINÉTICA DE METANO Y ÓXIDO NITROSO CON Y SIN SUSTANCIAS HÚMICAS DURANTE EL CICLO I.	35
<b>FIGURA 8.</b> REDUCCIÓN DE SUSTANCIAS HÚMICAS POR EL SEDIMENTO DEL HUMEDAL SISAL, DETERMINADA POR EL MÉTODO DE LA FERROZINA, DURANTE EL CICLO I. REDUCCIÓN DE SUSTANCIAS HÚMICAS POR MÉTODO DE LA FERROZINA, CICLO II.	37
<b>FIGURA 9.</b> CINÉTICA DE METANO Y ÓXIDO NITROSO CON Y SIN SUSTANCIAS HÚMICAS DURANTE EL CICLO II. EN LOS 3 PANELES SE MUESTRAN LOS TRATAMIENTOS CON SUSTANCIAS HÚMICAS EN COLOR AZUL Y LOS QUE NO CONTIENEN SUSTANCIAS HÚMICAS EN COLOR ROJO. LAS GRÁFICAS CORRESPONDEN AL SEGUNDO CICLO DE INCUBACIÓN.	40
<b>FIGURA 10.</b> REDUCCIÓN DE SUSTANCIAS HÚMICAS POR MÉTODO DE LA FERROZINA, CICLO II.	44
<b>FIGURA 11.</b> CORRESPONDENCIA DE LA VELOCIDAD DE REDUCCIÓN DE ÓXIDO NITROSO (BARRAS AZULES) Y LA CAPACIDAD REDUCTORA DE LAS SH (CUADROS AMARILLOS).	46
<b>FIGURA 12.</b> PRODUCTOS DE AMPLIFICACIÓN DEL GEN 16S rRNA EN GEL DE AGAROSA 1X Y TINCIÓN CON BROMURO DE ETIDIO.	47
<b>FIGURA 13.</b> RELACIONES EVOLUTIVAS DE LOS TAXONES BASADAS EN EL CLADO II DEL GEN nosZ.	53
<b>FIGURA 14.</b> DIAGRAMA DE VENN QUE CONTEMPLA DOS TRATAMIENTOS CON SH (TRATAMIENTO 1 Y 3) Y DOS SIN SH (TRATAMIENTO 6 Y 8) , DONDE CADA OBJETO REPRESENTA EL NÚMERO DE ESPECIES ENCONTRADAS POR MUESTREO DENTRO DE CADA TRATAMIENTO.	57

## Resumen

### **Sustancias húmicas como mediadores redox durante la oxidación anaerobia de metano y la reducción de óxido nitroso por la microbiota de un sedimento colectado de un humedal costero.**

Los humedales son la fuente natural principal de emisiones de metano ( $\text{CH}_4$ ), el cual resulta del equilibrio entre procesos microbianos como la metanogénesis y la metanotrofia, misma que bajo condiciones anaerobias, puede ser sustentada a través de la reducción de sulfatos, óxidos de hierro y sustancias húmicas (SH). Otra característica primordial de estos ecosistemas, son las grandes cantidades de materia orgánica natural almacenadas en sus sedimentos, soportando la producción de sustancias húmicas (SH). A la fecha, existe evidencia sobre la actividad de los grupos quinona presentes en las SH, quienes pueden actuar como mediadores redox en los ciclos biogeoquímicos. Por otro lado, el óxido nitroso ( $\text{N}_2\text{O}$ ) es el tercer gas más importante dentro de los gases de efecto invernadero (GEI). Biológicamente, el único sumidero de  $\text{N}_2\text{O}$  conocido hasta hoy, es la reducción de  $\text{N}_2\text{O}$  a gas  $\text{N}_2$ , esto dentro del último paso de la desnitrificación. Dicha reacción está mediada por la enzima del óxido nitroso reductasa, que está codificada por el gen *nosZ*.

Debido al incremento substancial en las concentraciones atmosféricas de ambos gases, resulta crítico esclarecer la función de las SH, de ecosistemas acuáticos, sobre la mitigación de las emisiones de  $\text{CH}_4$  y  $\text{N}_2\text{O}$  de manera simultánea; lo que implicaría una potencial contribución a los ciclos de carbono (C) y nitrógeno (N) que hasta la fecha ha sido ignorada. En este estudio, se evaluó la capacidad de la comunidad microbiana, presente en el sedimento del humedal Sisal, para llevar a cabo la oxidación anaerobia del metano (OAM) acoplada a la reducción de óxido nitroso (RON) mediada por SH externas. Para el objetivo anterior, sedimentos frescos, recolectados del humedal de Sisal, Yucatán, México, fueron incubados en microcosmos bajo una atmósfera de argón. Las muestras se enriquecieron con  $^{13}\text{CH}_4$  y  $^{15}\text{N}_2\text{O}$  y una fuente externa de SH, Pahokee Peat (PP), fue agregada. El consumo y producción de ambos gases fue monitoreada por GC-MS. Finalmente, el gen funcional *nosZ* fue clonado y secuenciado.

Dos ciclos de oxidación-reducción fueron evaluados. Los resultados evidenciaron el impacto positivo, sobre la velocidad de consumo de  $^{15}\text{N}_2\text{O}$ , propiciado por SH-PP en todos los tratamientos que las contenían; de manera puntal, el tratamiento 1 (Sed-PP +  $^{13}\text{CH}_4$  +  $^{15}\text{N}_2\text{O}$ ) presentó una tasa de consumo máxima al día 4 de  $1.21 \pm 0.07$  mmol  $^{15}\text{N}_2\text{O}$  / g sed-d, resultando cuatro veces mayor que su contraparte que no contenía PP. Además, en esta condición, el metano fue mineralizado ( $0.76$  mmol  $^{13}\text{CO}_2$ ) Esta evidencia sugiere, por vez primera, el posible acoplamiento de la mitigación de ambos gases a través de la oxidación- reducción de las SH-PP y, que hasta la fecha, este mecanismo no había sido contemplado. Análisis filogenéticos basados en el gen *nosZ II*, apuntan a *Arenibacter algicola* como la especie dominante del sistema y candidata potencial de sumidero de  $\text{N}_2\text{O}$

**Palabras clave:** ensayos isotópicos, metano, óxido nitroso, *nosZ*, Sustancias húmicas.

## Abstract

### **Humic substances as redox mediators for the anaerobic methane oxidation and nitrous oxide reduction by the microbiota of a sediment collected from a coastal wetland**

Wetlands are the main natural source of methane (CH<sub>4</sub>) emissions, which result from the balance between microbial processes, such as methanogenesis and methanotrophy, which under anaerobic conditions, can be sustained through the reduction of sulfate, iron oxides and humic substances (HS). Another key feature of these ecosystems, are the large amounts of natural organic matter (NOM) stored in their sediments, supporting the production of HS. To date, there is evidence about the activity of quinone groups present in SH, which can act as redox mediators in biogeochemical cycles. On the other hand, nitrous oxide (N<sub>2</sub>O) is the third most important gas in greenhouse gases (GHG). Biologically, the only N<sub>2</sub>O sink known to date is the reduction of N<sub>2</sub>O to N<sub>2</sub> gas, this within the last step of denitrification. This reaction is mediated by the nitrous oxide reductase enzyme, which is encoded by the *nosZ* gene.

Due to the substantial increase in the atmospheric concentrations of both gases, it is critical to clarify the function of SH, of aquatic ecosystems, on the mitigation of CH<sub>4</sub> and N<sub>2</sub>O emissions simultaneously; which would imply a potential contribution to the carbon (C) and nitrogen (N) cycles that has been ignored so far.

In this study, the capacity of the microbial community, present in the sediment of the Sisal wetland, was evaluated in order to carry out the anaerobic methane oxidation (OAM) coupled to nitrous oxide reduction (RON) mediated by external HS. For the previous objective, fresh sediments collected from the Sisal, Yucatan, Mexico wetland were incubated in microcosms under an argon atmosphere. The samples were enriched with <sup>13</sup>CH<sub>4</sub> and <sup>15</sup>N<sub>2</sub>O and an external source of SH, Pahokee Peat (PP), was added. The consumption and production of both gases was monitored by GC-MS. Finally, the functional gene *nosZ* was cloned and sequenced.

Two oxidation-reduction cycles were evaluated. The results showed the positive impact on the reduction rate of <sup>15</sup>N<sub>2</sub>O, favored by SH-PP in all the treatments that contained them; specifically, treatment 1 (Sed-PP + <sup>13</sup>CH<sub>4</sub> + <sup>15</sup>N<sub>2</sub>O) showed a maximum reduction rate at day 4 of 3.38 ± 0.07 mmol <sup>15</sup>N<sub>2</sub>O / g sed-d, ten times higher than its counterpart which did not contain PP; besides, methane was mineralized (0.76 mmol <sup>13</sup>CO<sub>2</sub>) under these conditions. This evidence suggests, for the first time, the possible coupling of the mitigation of both gases through the oxidation-reduction of the SH-PP and, to date, this mechanism had not been considered. Phylogenetic analyzes based on the *nosZ* II gene point to *Arenibacter algicola* as the dominant species in the system and potential N<sub>2</sub>O sink candidate.

**KEYWORDS:** Humic substances, isotope tracer, methane, nitrous oxide reduction, *nosZ*II.

## 1. INTRODUCCIÓN

El metano ( $\text{CH}_4$ ) y el óxido nitroso ( $\text{N}_2\text{O}$ ) han aumentado su concentración en la atmósfera desde 1970 hasta la fecha (Climate Change, 2014: Mitigation of Climate Change). Gran parte de este incremento no proviene de origen antropogénico, por ejemplo, del 25 al 45% del metano liberado a la atmósfera proviene de fuentes naturales; es decir, casi un tercio del metano global. Por otro lado, el  $\text{N}_2\text{O}$  derivado de procesos microbianos, como desnitrificación en suelos, aporta hasta 70% de este gas emitido a la atmósfera y además, es el principal responsable del decremento de la capa de ozono estratosférico (Ravishankara et al., 2009). Además, es sabido que las SH, pueden fungir como aceptores de electrones de la respiración microbiana, por ejemplo, en procesos metanotróficos en humedales costeros se ha documentado su acoplamiento, evitando así la emisión de 1,300 Tg de  $\text{CH}_4$  al año (Valenzuela et al. 2017). Así mismo, se ha documentado la posibilidad de regenerar la capacidad aceptora de electrones en sistemas anóxicos y aumentar el desempeño descrito hasta ahora para la OAM (Klöpffel, Piepenbrock, Kappler, & Sander, 2014) A pesar de estos hallazgos, a la fecha, no ha sido reportado el posible acoplamiento de desnitrificación y metanotrofia vinculados por la transferencia de electrones mediante SH. Por lo tanto, es necesario desarrollar estrategias que permitan la comprensión de manera integral de los sistemas naturales, específicamente de procesos microbianos involucrados en su emisión y consumo y de igual forma elucidar los procesos biogeoquímicos que pudieran estar funcionando como sumideros en los sitios donde se genera.

Esta investigación está enfocada en el impacto de la materia orgánica natural (humus), sobre la dinámica de emisión del  $\text{CH}_4$  y del  $\text{N}_2\text{O}$  derivados de procesos microbianos en sistemas naturales, como los humedales. Experimentalmente, esta tesis pretende demostrar que las SH pueden fungir como mediadores redox entre ambos gases, siendo utilizadas como acarreadores de electrones entre microorganismos provenientes del sedimento de un humedal costero. En términos termodinámicos, si estos componentes ( $\text{CH}_4$  y  $\text{N}_2\text{O}$ ) se encontraran aislados en un sistema, sería favorable la transferencia de electrones debido al alto poder oxidante

del  $N_2O$ . Sin embargo, se pretende explorar de qué manera se comporta este fenómeno en sistemas biológicos que, de ser favorable, posteriormente sirva para sentar las bases de herramientas ingenieriles.

## **2. MARCO TEÓRICO**

### **2.1 Gases de efecto invernadero: Emisiones naturales**

Se denominan gases de efecto invernadero (GEI), a aquellos gases que absorben radiación infrarroja emitida por la superficie de la Tierra. Los gases de efecto invernadero atrapan el calor dentro del sistema de la tropósfera terrestre (IPCC, 2007). Debido a estos gases, la temperatura de la tierra se ha elevado en las últimas décadas. Los principales gases asociados al fenómeno del calentamiento global son  $CO_2$ ,  $CH_4$  y  $N_2O$ , los cuales han aumentado su concentración en la atmósfera desde algunos registros en 1970 hasta la fecha (Climate Change, 2014: Mitigation of Climate Change). Diversas son las fuentes de las cuales estos gases emanan; sin embargo, podemos clasificarlas en dos grandes ramas, las emisiones antropogénicas, es decir, las derivadas por actividades humanas, como cambio de uso de suelo, quema de combustibles fósiles, ganadería, etcétera y las naturales. Muchos estudios se han enfocado en las emisiones por sistemas antropogénicos, dejando de lado a los sistemas naturales; sin embargo, éstos también juegan un papel crucial en la generación de estos tres GEI. Por ejemplo, el 25-45% del metano liberado a la atmósfera proviene de fuentes naturales (Wuebbles y Hayhoe 2002; Turner et al., 2015), es decir, casi un tercio del metano global, por lo que, al buscar procesos que supriman su emisión, debemos primero entender la dinámica de emisión y elucidar los procesos biogeoquímicos involucrados en estos nichos.

Esta investigación está enfocada en el segundo y tercer gas de importancia ambiental, es decir, el  $CH_4$  y el  $N_2O$ . A pesar de que sus concentraciones no son del orden de la del  $CO_2$ , es preocupante debido a que tienen un potencial de calentamiento global de 28 y 278 veces más que éste (IPCC, 2007), como se puede

apreciar en la Tabla 1. Es decir, un incremento significativo de su concentración en la atmósfera traería efectos más intensos a los ya conocidos como la ruptura prematura de hielo en ríos y lagos, la reducción de glaciares, entre otros (climate.nasa.gov, 2017). Además, de manera indirecta, los ciclos biogeoquímicos en los que se involucran, se ven alterados por factores externos, de manera puntual en los sistemas acuáticos en donde el ciclo del nitrógeno se ve alterado por el uso de fertilizantes nitrogenados (Vitousek, P. M., 1994). El N<sub>2</sub>O podría ser incrementado, ya sea en lagos o humedales, aunado a esto hay que recordar que tanto lagos como humedales son reservorios de sedimentos ricos en materia orgánica.

**Tabla 1.** Tiempo de vida, eficiencia radiativa directa (excepto para metano) y Potenciales de calentamiento global relativos al CO<sub>2</sub> en un horizonte de 100 años.

Potencial de calentamiento global para un horizonte de tiempo dado (Años)							
Designación industrial o nombre común	Fórmula química	Tiempo de vida (Años)	Eficiencia radiativa (W m <sup>-2</sup> ppb <sup>-1</sup> )	SAR ‡ (100-años)	20	100	500
Dióxido de carbono	CO <sub>2</sub>	<i>Ver pie</i>	b 1.4x10 <sup>-5</sup>	1	1	1	1
Metano	CH <sub>4</sub>	12	3.7x10 <sup>-4</sup>	21	72	25	7.6
Óxido nitroso	N <sub>2</sub> O	14	3.03x10 <sup>-3</sup>	310	289	298	153

**a=**La función de respuesta al CO<sub>2</sub> utilizada en este informe se basa en la versión revisada del modelo del ciclo del carbono de Bern utilizado en el capítulo 10 de este informe (Bern2.5CC, Joos et al., 2001) utilizando un valor de concentración de CO<sub>2</sub> de fondo de 378 ppm.

## 2.2 Ecosistemas acuáticos emisores de GEI

Las emisiones de CH<sub>4</sub> y N<sub>2</sub>O por ecosistemas naturales, particularmente humedales y lagos, son sitios claves en el fenómeno de cambio climático; por lo tanto, si se pretende desarrollar estrategias que lleven a su mitigación, es necesario evaluar el contexto en el que se producen. Sin embargo, esto requiere de conocer a fondo el cuerpo de agua del cual emanan y los procesos fisicoquímicos que ahí se suscitan. Debido a que la liberación de estos gases por sistemas naturales es el

resultado entre la interacción suelo-microorganismo-gas, es necesario ampliar el panorama de estos factores que influyen en el proceso. (Sahoo SK et al., 2010). Varios son los factores que están relacionados con la producción y emisión de gases como CO<sub>2</sub>, CH<sub>4</sub> y N<sub>2</sub>O provenientes de cuerpos acuáticos hacia la atmósfera, uno de ellos es la materia orgánica, así como las propiedades físicas de los gases, como la solubilidad y difusión (Yang et al., 2015).

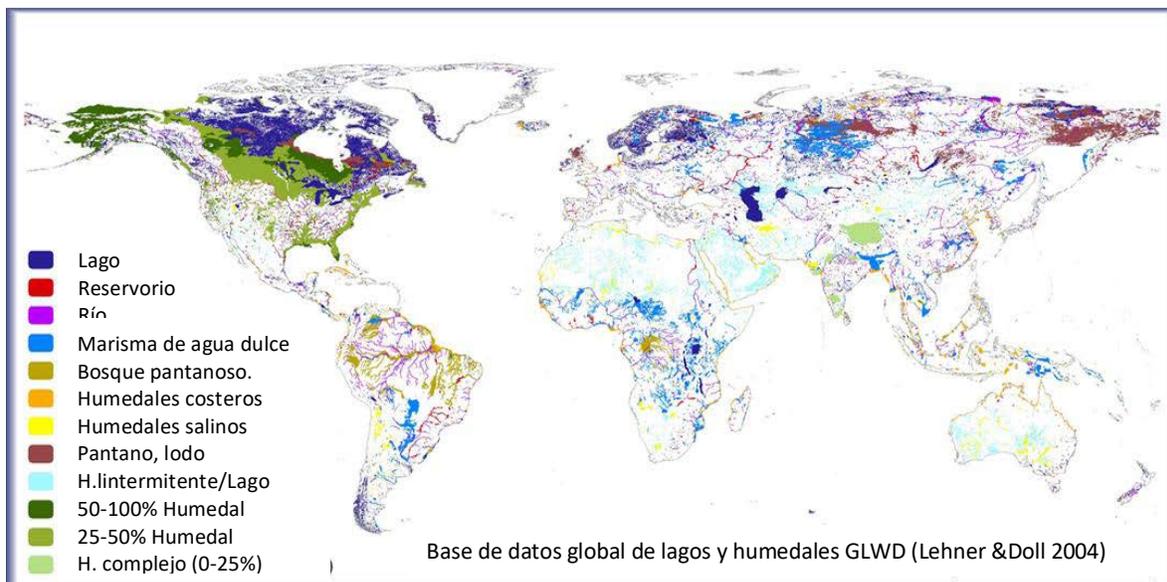
### **2.3 Humedales**

Los humedales son zonas en donde el agua es el principal factor que controla el ambiente, así como la vegetación y la fauna característica de estos sitios (Ramsar-CONANP, 2017). Según la Ley de Aguas Nacionales, los humedales son zonas de transición entre los sistemas acuáticos y terrestres, que son parcial o temporalmente inundados y sujetas o no a la influencia de mareas. La Convención Ramsar (La Convención sobre los Humedales) incluye dentro de los ecosistemas del tipo humedal a pantanos, marismas, lagos, ríos, turberas, oasis, estuarios, deltas, y zonas marinas próximas a las costas cuya profundidad en marea baja no exceda los seis metros, incluyendo manglares y arrecifes de coral (Ramsar-CONANP, 2017). Estos ecosistemas cubren del 5-8% de la superficie de la tierra. Su distribución geográfica es muy amplia, ya que pueden encontrarse desde los trópicos hasta la tundra ocupando un área global de ~ 530-570 Mha. Esto se puede apreciar en la Figura 1 (Matthews et al., 1987; Aselmann et al., 1989). De manera particular, el área global de los humedales costeros es de 48.9 Mha (Pendleton et al., 2012).

De acuerdo a reportes del IPCC (2007), los humedales contribuyen con hasta el 39% de las emisiones globales de metano, es decir, contribuyen con alrededor de un tercio de metano liberado a la atmósfera a nivel global (Singh et al., 2000).

Una característica que se debe resaltar de estos ecosistemas complejos es que, albergan cantidades de materia orgánica sustancialmente alta en sus sedimentos, de alrededor de 350-535 Gt C, es decir casi una cuarta parte de C orgánico del suelo a nivel mundial, (Woodwell et al., 1995) por lo que los lleva a ser la fuente natural

principal de emisión de metano, liberando a la atmósfera alrededor de 100-231 teragramos (Tg) CH<sub>4</sub> cada año (Chen & Prinn, 2006; Denman et al., 2007; Bastviken et al., 2011).



**Figura 1.** Distribución global de lagos y humedales Ehner, B., & Döll, P. (2004)

## 2.4 Metano (CH<sub>4</sub>)

El metano es el alcano más simple, su estructura está compuesta por un carbono central unido a cuatro hidrógenos por enlaces covalentes. Es un gas inoloro, incoloro, con un peso molecular de 16.043 g/mol y una solubilidad de 22 mg/L a 25°C (Pubchem-ncbi, 2017). Es el segundo gas más importante dentro de los gases de efecto invernadero, después del CO<sub>2</sub>; esto debido a su concentración de 1830 ppb en 2015 (GCP, 2016) y a su potencial de calentamiento global, el cual es 28 veces mayor que el del CO<sub>2</sub> (IPCC, 2013) y, además, es un componente crucial del ciclo global del carbono.

Este gas contribuye al direccionamiento del 30% del forzamiento radiativo antropogénico neto total con 1,6 W m<sup>-2</sup> (IPCC, 2008). Knittel y Boetius (2009) estimaron que el metano contribuye con 20% al calentamiento global. Las concentraciones atmosféricas de CH<sub>4</sub> han aumentado un 150% desde la era industrial (IPCC, 2013). La emisión global de metano es de 500-600 Tg CH<sub>4</sub> por

año; este flujo liberado a la atmósfera es el resultado del balance entre la producción (metanogénesis) y el consumo (metanotrofía) (Dutaur y Verchot, 2007), es decir, de la oxidación del metano ya sea por vía aerobia o anaerobia. Gran parte de esta cantidad es emitida por sistemas naturales (Wuebbles y Hayhoe, 2002; Turner et al., 2015) específicamente por procesos microbianos, uno de ellos es la actividad de las arqueas metanogénicas en humedales, campos de arroz y sistemas digestivos de rumiantes y termitas (Conrad, R., 2009).

Como se ha descrito en secciones anteriores, la fuente natural principal de emisiones de metano son los humedales, esto a través de la descomposición de materia orgánica almacenada. Otras fuentes naturales, como procesos geológicos, lagos, ríos, actividad metabólica de termitas, son también importantes pero, no son muy bien comprendidas (Global carbón atlas, 2017).

Dentro de los sistemas acuáticos de tipo humedal, hay que considerar la composición en la vegetación, el pH, el tipo de suelo, la química del agua, la hidrología y el clima, son factores que varían en los humedales y repercuten en el flujo de metano liberado a la atmósfera (Kayranli B et al., 2010; Bridgham SD et al., 2013).

En sistemas acuáticos, la mayor parte del CH<sub>4</sub> se genera en sedimentos anóxicos por descomposición microbiana de compuestos orgánicos (metanogénesis) una vez que los oxidantes se han agotado (Bastviken et al., 2004). En los sedimentos, donde el oxígeno es limitado, los principales actores de llevar al metano hasta su oxidación en lagos boreales podrían ser el sulfato y el oxihidróxido de hierro (Clayer F. et al., 2016). Sin embargo, debido a las grandes cantidades de materia orgánica natural, se elevan las posibilidades de que ocurra la oxidación anaerobia de metano acoplada a SH (Valenzuela et al. 2017).

## **2.5 Metanotrofía anaerobia**

Los sumideros de metano se pueden dividir por su naturaleza química o biológica. A través de reacciones de oxidación en la tropósfera, el metano es removido en un 85 % a través de la interacción con radicales OH (Lelieveld et al., 1998). Por otro lado, existen los sumideros de metano a través de procesos

biológicos, a este tipo de proceso se le denomina metanotrofia, el cual puede ser sustentado con oxígeno como aceptor final de electrones (oxidación aerobia de metano). Sin embargo, este proceso también puede llevarse a cabo en ausencia de oxígeno, es decir, utilizando un aceptor de electrones distinto al  $O_2$  (oxidación anaerobia de metano, OAM). Bajo estas condiciones, el metano es consumido por microorganismos metanótrofos, los cuales usan a este gas como fuente de carbono y energía (Hanson and Hanson, 1996), este proceso fue documentado por vez primera en perfiles de sedimentos geológicos en 1974 (Martens y Berner, 1974), en el cual el sulfato fungía como aceptor final de electrones.

Hasta la fecha, se ha documentado la OAM por procesos microbianos ligados a la reducción de sulfato (Boetius et al. 2000), nitrato (Islas-Lima et al., 2004), nitrito (Raghoebarsing et al., 2006), óxidos de hierro y sustancias húmicas (Valenzuela et al., 2017). La importancia de la metanotrofia radica en que debido a ella se suprimen cantidades importantes de metano. Se estima que estos procesos consumen más del 90% del metano producido en ambientes marinos (Bridgham et al. 2013).

La AOM ligada a la reducción de sulfato consume casi todos los flujos ascendentes de metano en sedimentos marinos e impide su liberación a la atmósfera. Este proceso típicamente involucra consorcios microbianos de arqueas y bacterias afiliadas con metanógenos del tipo *Metanosarcinaea* y bacterias sulfato reductoras (Boetius et al., 2000). De la misma manera, dos grupos filogenéticos de arqueas (ANME-1 y ANME-2) son capaces de llevar a cabo la oxidación anaerobia de metano, las cuales poseen una relación sintrófica con bacterias sulfato reductoras (Valentine, D. L., 2002).

Este tipo de procesos se ha documentado en diferentes ambientes; por ejemplo, Valenzuela et al., (2017) presentaron evidencia de oxidación anaerobia de metano acoplada a reducción de materia orgánica natural en sedimentos de un humedal costero Mexicano, con lo cual estimaron la cantidad de metano consumido por oxidación anaerobia de metano en este ecosistema en particular, que fue de 1,331.5 Tg  $CH_4$  por año. Sin embargo, también ha sido evidenciada en ambientes hipersalinos, (Avrahamov et al., 2014) y sedimentos de canales en Holanda donde acoplaron la AOM a la desnitrificación (Raghoebarsing et al., 2006).

Este proceso es de suma importancia ya que alrededor de 70 a 300 Tg CH<sub>4</sub> por año proveniente de las emisiones oceánicas es consumido por metanótrofos (Conrad, 2009). De manera particular, diversas investigaciones se han centrado en el estudio de microorganismos que llevan a cabo la oxidación anaerobia de metano acoplada a la desnitrificación denominados n-DAMO por sus siglas en inglés, quienes apuntan a este proceso como uno de los principales sumideros de metano en sistemas de agua dulce contemplado la disponibilidad de nitrato en zonas anóxicas.

Algunas investigaciones, como la de Price y Sowers (2004) sugieren que no hay una temperatura mínima para la actividad metanotrófica. Ellos probaron que aún por debajo del punto de congelación, el agua líquida dentro del hielo y el permafrost está disponible para el metabolismo. Aunado a esto, se sabe que algunas cepas de metanótrofos son psicrófilas y por lo tanto son capaces de oxidar el CH<sub>4</sub> a bajas temperaturas (Hanson y Hanson., 1996). Esto nos da mayores bases para asociar actividad metanotrófica en condiciones anóxicas en los sedimentos boreales que se analizarán en esta investigación.

## **2.6 Óxido nitroso (N<sub>2</sub>O)**

El óxido nitroso es el tercer gas de efecto invernadero de mayor importancia, esto debido a su potencial de calentamiento global, el cual es 298 veces mayor con respecto al CO<sub>2</sub> en un horizonte de 100 años (IPCC, 2007); además, es el principal responsable de que las concentraciones de ozono estratosférico decaigan (Ravishankara *et al.*, 2009). Otra característica a resaltar del N<sub>2</sub>O es su larga vida en la atmósfera ~116 (Prather *et al.*; 2015), además aporta el 6.24% al forzamiento radiativo global (WMO, 2010; Forster *et al.*, 2007).

Las fuentes de este gas son tanto de origen antropogénico como natural, su producción de manera natural es debido principalmente a procesos metabólicos microbianos como la desnitrificación (Ramulu *et al.*, 2008) y nitrificación (Kowalchuk y Stephen, 2001).

Es sabido que las emisiones globales de óxido nitroso son de alrededor de 17.7 teragramos de nitrógeno (Tg N) por año; de esta cantidad, la nitrificación microbiana y la desnitrificación en suelos con uso antropogénico y naturales contribuyen con un

70 por ciento a las emisiones mundiales (Syakila A. et al., 2011; Braker G et al., 2011) y el 30 % restante ~6.7 Tg N por año, se atribuye a actividades humanas. De manera particular, los océanos contribuyen con ~ 3.8 Tg N al año y los suelos ubicados en los trópicos aportan ~ 6.6 Tg N al año (S. Solomon et al., 2007)

Procesos microbianos como la desnitrificación que ocurre en suelos saturados, humedales, estuarios y lagos, se ve afectada por las condiciones fisicoquímicas, incluyendo el pH y la temperatura (Myrstener et al., 2016).

De manera particular, sistemas acuáticos como los lagos pueden ser una fuente neta de  $N_2O$ , sin embargo, hay pocas estimaciones de la dinámica de este gas en las regiones boreales (Yang et al., 2015). Algunos estudios realizados en lagos templados (Huttunen et al., 2003b; Liikanen et al., 2003; Tremblay et al., 2005; Kortelainen et al., 2013) describen a la temperatura, disponibilidad de oxígeno y concentración de nitratos como factores clave en la producción de  $N_2O$ .

Los procesos en los que está involucrada la formación de óxido nitroso en suelos se enlistan a continuación.

- ✓ Descomposición química de la hidroxilamina durante la fase autotrófica y nitrificación heterotrófica
- ✓ Quimiodenitrificación del nitrito del suelo y descomposición abiótica de nitrato de amonio en presencia de luz, humedad y superficies que reaccionan.
- ✓ Nitrificación-desnitrificación dentro del mismo microorganismo nitrificante.
- ✓ Nitrificación-desnitrificación acoplada por microorganismos distintos.

## **2.7 Reducción de $N_2O$ por medios biológicos**

En secciones anteriores se habló sobre quiénes son los microorganismos responsables de emitir  $N_2O$ , así como de las vías metabólicas involucradas en su producción y finalmente en que ecosistemas se pueden encontrar, pero ¿Existen sumideros de este gas? De manera biológica, el único sumidero conocido hasta el momento es a través de la reducción de  $N_2O$  a la forma más simple  $N_2$  gas, llevándose a cabo en el último paso de la desnitrificación. Se conoce que esta

catálisis es mediada por la enzima óxido nitroso reductasa ( $N_2OR$ ) quien es codificada por el gen *nosZ* (Hallin, Philippot, Löffler, Sanford, & Jones, 2017). Esta enzima cataliza la reducción de  $N_2O$  a  $N_2$  (Jung et al., 2013). Este proceso es altamente exergónico, pues la energía libre de Gibbs es de  $\Delta G = -340$  kJ/mol (Zumft y Kroneck, 2007).

Algunos estudios presentan evidencia sobre el crecimiento de *Wolinella succinogenes* y *Campylobacter fetus* con  $N_2O$  como único aceptor de electrones (Payne, W.J. et al., 1982; Simon, J. et al. 2004). Avances a nivel filogenético demuestran que la diversidad de genes *nosZ* puede dividirse en dos grandes grupos denominados Clado I y Clado II (Sanford, R.A. et al., 2012; Jones, C.M. et al., 2013). Estas diferencias se fundamentan en la asociación con otros genes de la desnitrificación y la ruta de translocación de la proteína codificada por este gen. A la fecha, no está totalmente comprendida la composición de la comunidad microbiana que posee estas características, algunos estudios apuntan a que el Clado I consiste casi en su totalidad en Alfa, Beta y Gamma Proteobacteria (Hallin et al., 2017). Aunque falta mucho por explorar distintos ambientes y elucidar su composición y ecología.

Otra diferencia dentro de éstos dos clados que se maneja en la literatura, es a nivel de aprovechamiento de la energía. Particularmente en términos de producción de biomasa, se ha documentado que los microorganismos del Clado I llegan a producir alrededor de 50-80% más biomasa por mol de  $N_2O$  reducido. Análisis moleculares demuestran que los microorganismos del Clado I son ligeramente más abundantes en humedales, lagos boreales y lagunas eutrofizadas (Saarenheimo, J. et al., 2015; Highton, M. et al., 2016). Esta evidencia nos da la pauta para continuar con las muestras provenientes del humedal Sisal, mismo que podría presentar características como las descritas anteriormente actividad de microorganismos desnitrificantes que metabolizan  $N_2O$  en estas condiciones y ser un posible sumidero de óxido nitroso que hasta la fecha no ha sido documentado.

## 2.8 Sustancias húmicas

La materia orgánica que se acumula en el suelo gracias a la descomposición de material vegetal se denomina humus (Martinez *et al.*, 2013). Las SH representan el más grande reservorio de carbono en la biósfera con  $1600 \times 10^{15}$  g C. Como materia orgánica disuelta en cuerpos acuáticos de naturaleza de agua dulce, ésta puede estar presente desde un 50 hasta un 80% (Thurman, 1985). Generalmente, las sustancias húmicas se caracterizan por ser de color oscuro y poseer una estructura muy compleja, la cual es el producto de reacciones secundarias de polimerización; sin embargo, su núcleo central se representa por un polifenol condensado con grupos quinonas (Stevenson, 1994). Otros autores como Piccolo y Conthe (2000) las describen como asociaciones supramoleculares heterogéneas, lo que les confiere características como un alto peso molecular y además, pueden alcanzar tiempos de residencia en el ambiente de miles de años (Stevenson, 1994). Las SH cumplen un rol esencial en el ambiente, ya que debido a su estructura molecular compleja, pueden formar complejos con metales (Stevenson, 1994) además contiene grupos funcionales variables, dentro de ellos los grupos quinona, los cuales actúan como transportadores de electrones en procesos de óxido-reducción (redox).

Los grupos quinona de estas macromoléculas se han descrito como piezas fundamentales en los procesos redox. Field y Cervantes (2005) les adjudican un rol especial en la conversión anaerobia de contaminantes orgánicos e inorgánicos.

Lovley *et al.*, (1996) describió a las SH con la capacidad de aceptar electrones de la respiración microbiana, mientras que Aranda-Tamuara (2007) presenta evidencia de que un análogo de las SH, la antraquinona-2,6-disulfonato (AQDS), en su forma reducida, podría servir como donador de electrones para la reducción de  $N_2O$  a  $N_2$ . Diversos autores han descrito esta capacidad redox de las sustancias húmicas ((Scott, Mcknight, Blunt-Harris, Kolesar, & Lovley, 1998; Aeschbacher, Sander, & Schwarzenbach, 2010) comoceptoras de electrones, ya sea en procesos ambientales. Por otro lado, pocos estudios evidencian su re oxidación y el papel que desempeñarían en sistemas acuáticos como donadoras de electrones, tal es el caso de (Klüpfel, Piepenbrock, Kappler, & Sander, 2014) quien evidenció el reciclaje

de sustancias húmicas a través de entradas de oxígeno, a diferencia de nuestro estudio, este grupo de trabajo realizó experimentos con una cepa pura (*Shewanella oneidensis* MR-1) y cuatro sustancias húmicas disueltas, evaluando de manera electroquímica la capacidad de intercambio de electrones. A partir de esta aseveración, se puede plantear lo siguiente, si los grupos con actividad redox, como las quinonas de las SH, entran a un ciclo de oxidación-reducción podría mitigar emisiones de alrededor de 190,000 mol CH<sub>4</sub> por kilómetro cuadrado al año (Klöpffel *et al.*, 2014). Este hallazgo en particular sobre la actividad de grupos quinona de oxidarse y reducirse fungiendo como mediadores redox en ciclos biogeoquímicos, fundamenta la hipótesis propuesta en esta investigación.

### **2.9 Microorganismos reductores y oxidadores del humus**

Existen trabajos como el de Coates, J. (1998) en el cual presentan evidencia de que los microorganismos reductores del humus pueden provenir de varios ambientes como lagos y humedales, además muestran que éstos son capaces de oxidar acetato y reducir un análogo de las SH (AQDS) en condiciones anóxicas, encontrándose que estos microorganismos son pertenecientes a la familia *Geobacteraceae*.

La mayoría de los microorganismos reductores del humus son bacterias hierro reductoras y arqueas, aunque también se incluyen microorganismos desnitrificadores, sulfatoreductores, fermentativos, e inclusive metanogénicos (Martinez *et al.*, 2013).

## **3. JUSTIFICACIÓN**

Los ciclos naturales del nitrógeno y carbono han sido alterados por actividades antropogénicas, como la quema de combustibles fósiles y el uso desmedido de fertilizantes nitrogenados, lo que ha repercutido, entre otras cosas, en incrementos en la emisión de gases de efecto invernadero, como CH<sub>4</sub> y N<sub>2</sub>O, a la atmósfera, siendo este último la principal amenaza para la reducción de la capa de ozono. A pesar de que ambos gases son actores clave en el fenómeno de calentamiento

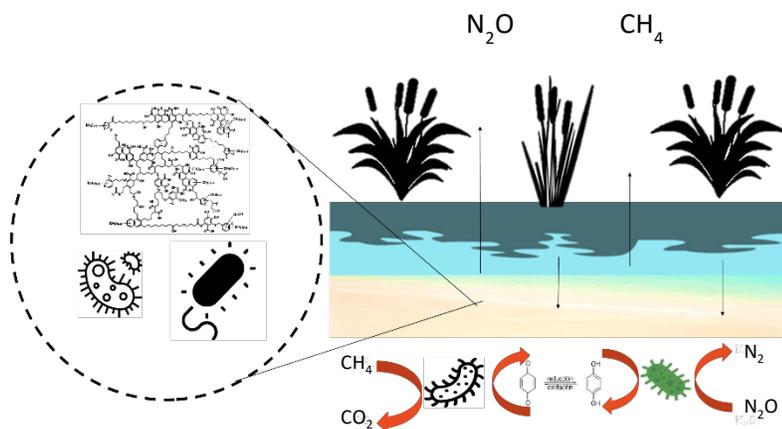
global, la mayor parte de investigaciones se centra sólo en disminuir las concentraciones de CO<sub>2</sub> o de CH<sub>4</sub> de manera singular sin tomar en cuenta al N<sub>2</sub>O. Actualmente, existe poca evidencia acerca de procesos microbianos que contribuyan a su disminución de manera simultánea, específicamente en ambientes acuáticos. En este contexto, los sedimentos de humedales, presentan alta relevancia ecológica con respecto a la disminución de metano y óxido nitroso hacia la atmósfera, ya que debido a la ubicuidad de las sustancias húmicas en estos sitios, éstas podrían formar parte de la respiración microbiana y contribuir en el desarrollo de relaciones sintróficas entre metanótrofos (consumidores de metano) y microorganismos reductores de óxido nitroso, creando una posibilidad no explorada, como potencial sumidero de ambos gases.

Hasta la fecha, no está del todo comprendido, cómo estos procesos microbianos de sedimentos, son capaces de fungir como sumideros de ambos gases utilizando el potencial redox de las sustancias húmicas. Además, se desconoce qué comunidades microbianas estarían involucradas en esta nueva vertiente, por lo que se abre un nicho de conocimiento no explorado.

Al lograr los objetivos de esta investigación, se brindará información acerca de qué cantidad de CH<sub>4</sub> y N<sub>2</sub>O es suprimida por la actividad microbiana de ambientes anóxicos en cuerpos de agua utilizando una fracción de las sustancias húmicas, por otro lado, este sería el primer estudio en su tipo que involucre el acoplamiento de reacciones de óxido reducción de GEI (CH<sub>4</sub> y N<sub>2</sub>O) a través de sustancias húmicas.

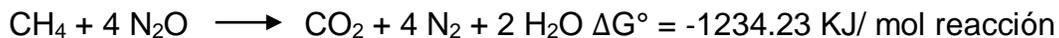
#### **4. HIPÓTESIS**

Microorganismos metanótrofos y desnitrificantes que coexisten en sedimentos de humedales, poseen la capacidad de utilizar a las sustancias húmicas como transportadoras de electrones entre estas dos comunidades microbianas, regenerándolas para llevar a cabo, por un lado, la oxidación anaerobia de metano (OAM) y por el otro, la reducción del óxido Nitroso. Es decir, existe una relación sintrófica de energía entre ambas comunidades. Proceso descrito por una reacción química representada en la ecuación 1.



**Figura 2.** Esquema general de un humedal y sus componentes físicos, químicos y biológicos. En la parte baja de los humedales se encuentra la mayor concentración de sustancias húmicas, las que en conjunto con minerales, restos vegetales y otros componentes, forman el sedimento, fungiendo éstos como fuentes de nutrientes y nichos de diferentes comunidades microbianas.

**Ecuación 1.**



**5. OBJETIVOS**

**5.1 Objetivo general**

Evaluar el impacto de las sustancias húmicas como mediadores redox en la oxidación anaerobia de metano acoplada a la reducción de óxido nitroso por la microbiota presente en sedimentos colectados de un humedal costero.

**5.2 Objetivos específicos**

- I. Evaluar la capacidad de la comunidad microbiana del sedimento Sisal para utilizar sustancias húmicas como mediadores redox durante el proceso sintrófico de oxidación anaerobia de metano y reducción de óxido nitroso.
- II. Elucidar la composición de la comunidad microbiana involucrada en el proceso reducción de óxido nitroso.

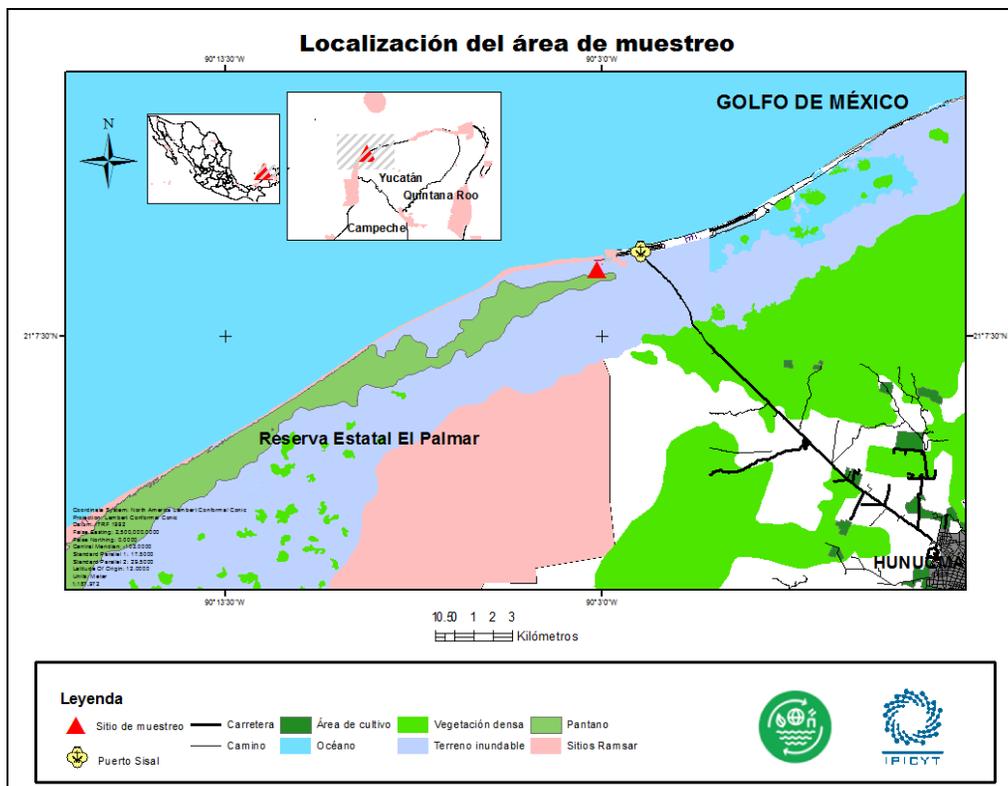
## 6. MATERIALES Y MÉTODOS

### 6.1 Sedimento

Para el desarrollo de esta tesis fueron utilizados cuatro sedimentos acuáticos, los cuales fueron colectados de los siguientes sitios (Ver Tabla 2). Para su recolección se utilizaron nucleadores, extrayendo las muestras de aproximadamente 0.7m de profundidad, trayendo consigo sedimento y agua, los cuales fueron almacenaron en bolsas herméticamente selladas y puestas en refrigeración hasta su uso en el laboratorio. En la Figura 3 se aprecia la ubicación del humedal sisal en la península de Yucatán, siendo de este sitio, los sedimentos utilizados a lo largo de esta tesis, para los ensayos en lote y en los análisis moleculares.

**Tabla 2.** Ubicación de sedimentos utilizados.

Ubicación del Sitio		Descripción del sitio	Coordenadas °N - °O
Lago Kilarney,	Alaska	Lago boreal	64.8698 -147.902
Siberia		Lago boreal	67.513476 86.591
<b>Sisal,</b>	<b>Yucatán,</b>	Humedal costero	21.160 -90.043
<b>Mex.</b>			
San Quintín, Baja	California, Mex.	Costa	30.75 -116.000



**Figura 3.** Localización del área de muestreo de sedimentos de Sisal Yucatán. Se observa en el mapa el sitio de muestreo en el humedal de Sisal, del cual sus sedimentos dieron resultados positivos en esta tesis.

## 6.2 Medio basal

El medio basal empleado en la aclimatación, pre incubación y en los ensayos en lote, fue el descrito por Cervantes et al. (2000) con modificaciones. El cual está compuesto en g/L de (0.3)  $\text{NH}_4\text{Cl}$ ; (0.2)  $\text{K}_2\text{HPO}_4$ ; (0.03)  $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  y (0.1)  $\text{CaCl}_2$ . Además, 1ml/L de solución de elementos traza fue agregado al medio. Composición en g/L:  $\text{FeCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$  (2000);  $\text{H}_2\text{BO}_3$  (50);  $\text{ZnCl}_2$  (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);  $\text{Na}_2\text{SeO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$  (162);  $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24}$  (500); EDTA (1000);  $\text{Na}_2\text{WO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$  (100) y 1 mililitro de HCl al 36%.

Para los ensayos en lote, se burbugeó una corriente de  $\text{N}_2:\text{CO}_2$  (80 %:20 %) en el medio durante 10 minutos, antes de ser utilizados.

### **6.3 Sustancias húmicas.**

Para estudiar el impacto de las sustancias húmicas como mediadores redox, éstas fueron adicionadas a los ensayos en lote a una concentración de 2 g/L. Para este objetivo, sustancias húmicas estándar denominadas Pahokee Peat 1S103H (PP, abreviatura utilizada a partir de este momento), se adquirieron en la Sociedad Internacional de Sustancias Húmicas, IHSS por sus siglas en inglés.

En los ensayos en lote, éstas fueron agregadas al medio y puestas en agitación por 20 minutos hasta su disolución antes de ser inoculadas con sedimento.

### **6.4 Aclimatación del sedimento**

Antes de realizar los ensayos en lote, la aclimatación del sedimento fue llevada a cabo. Para esta etapa, fueron utilizadas botellas serológicas con una capacidad de 25 mL de volumen, las cuales se inocularon con 1g de sedimento fresco más 15 ml de medio basal descrito en la sección 6.2 Con el fin de obtener una atmósfera anaerobia en los microcosmos, el espacio de cabeza fue remplazado por una atmósfera de gas Argón dejando pasar una corriente del mismo por alrededor de 3.5 minutos por microcosmo. Además, los medios y soluciones empleadas fueron saturados con una mezcla de gas CO<sub>2</sub>:N<sub>2</sub> (20% / 80 %) por 15 minutos antes de ser utilizados. Posteriormente, las botellas fueron aseguradas con arillos metálicos y tapones de goma. Finalmente, se incubaron a una temperatura de 28°C en un cuarto oscuro, sin agitación y alrededor de 1 mes. A estas incubaciones se les adicionó 0.1g/L de sulfuro de sodio (Na<sub>2</sub>S) al medio basal para eliminar cualquier traza de O<sub>2</sub>.

### **6.5 Diseño experimental**

Para evaluar el impacto de sustancias húmicas en la cinética de consumo de metano y óxido nitroso por comunidades microbianas del sedimento de Sisal, se hizo un diseño experimental equilibrado contemplando 2 condiciones, una que contempló la presencia de sustancias húmicas y otra sin sustancias húmicas. Además, cada condición tuvo 5 niveles, es decir 5 tratamientos basados en combinaciones de los gases a evaluar. Finalmente se tuvo un total de 10 tratamientos con un número de réplicas de 3 por tratamiento. El desglose del diseño

se puede apreciar en la **Tabla 3**. Los tratamientos estériles se obtuvieron después de tres ciclos de autoclave (121° C por 20 minutos) y adicionando 10% vv de cloroformo anhidro.

**Tabla 3.** Diseño experimental usando Pahokee Peat (PP) como sustancias húmicas externas.

<b>Tratamiento</b>	<b>Descripción</b>	<b>n</b>	<b>Objetivo</b>
1	Sed-PP+ $^{13}\text{CH}_4$ + $^{15}\text{N}_2\text{O}$	3	Reducción de óxido nitroso y oxidación de metano mediada por humus
2	Sed-PP+ $^{13}\text{CH}_4$	3	Oxidación anaerobia de metano acoplada a la reducción de humus
3	Sed-PP + $^{15}\text{N}_2\text{O}$	3	Reducción de óxido nitroso con humus reducido como donador de electrones
4	Sed-PP	3	Control endógeno con humus: producción de $\text{CO}_2$ ó $\text{N}_2$ por donadores y aceptores que no son $\text{N}_2\text{O}$ ni $\text{CH}_4$
5	Sed-PP + $^{15}\text{N}_2\text{O}$ + $^{13}\text{CH}_4$ + Autoclave	3	Control estéril
6	Sed + $^{15}\text{N}_2\text{O}$ + $^{13}\text{CH}_4$	3	Reducción de óxido nitroso y oxidación de metano no mediada por humus
7	Sed + $^{13}\text{CH}_4$	3	Oxidación anaerobia de metano por material no humico
8	Sed + $^{15}\text{N}_2\text{O}$	3	Reducción de óxido nitroso por donadores de electrones que no son del humus
9	Sed	3	Control endógeno
10	Sed+ $^{15}\text{N}_2\text{O}$ + $^{13}\text{CH}_4$ Autoclave	3	Control estéril

## 6.6 Ensayos en lote

Los ensayos en lote fueron llevados a cabo en 2 ciclos experimentales. La Tabla 3 enlista los tratamientos evaluados. Se utilizaron 3 microcosmos de las pre incubaciones (n=3) como se describió en la Sección 6.5. A estas botellas se les realizó cambio de medio y atmósfera con las condiciones descritas anteriormente. Además, se adicionó una concentración de sustancias húmicas de 2 g/L denominadas Pahokee Peat (PP). Finalmente, a los microcosmos ya sellados y dependiendo del tratamiento, 2 mL de gas  $^{13}\text{CH}_4$  marcado isotópicamente con carbono 13, (Sigma Aldrich, 99 atom %  $^{13}\text{C}$ , ~0.67 atm) y 4 mL de gas  $^{15}\text{N}_2\text{O}$  marcado con nitrógeno 15, (Sigma Aldrich, 99 atom %  $^{15}\text{N}$ , ~0.67 atm) fueron inyectados con una jeringa desechable. Para obtener los tratamientos con la condición de esterilidad, los microcosmos (previamente sellados) fueron autoclavados en tres ocasiones a  $121^\circ\text{C}$  por 20 minutos, de forma posterior, 10% v/v de cloroformo anhidro ( $\geq 99\%$ ) fueron también inyectados

## 6.7 Cuantificación de gases $^{13}\text{CH}_4$ , $^{15}\text{N}_2\text{O}$ , $^{13}\text{CO}_2$ , $^{15}\text{N}_2$

La cuantificación de las concentraciones de los gases marcados utilizados en los ensayos en lote, fue llevada a cabo por el método analítico de Cromatografía de Gases acoplada a Espectrometría de Masas (GC/MS, por sus siglas en inglés): Para este objetivo, se empleó un equipo de Cromatografía de gases (Agilent Technologies 7890B) equipado con una columna HP-PLOT/Q con una fase estacionaria de poliestireno-divinilbenceno: 30 m x 320  $\mu\text{m}$  x 20  $\mu\text{m}$  (Agilent Technologies 19091P-QO4) utilizando helio como gas acarreador. La temperatura del puerto de inyección fue  $250^\circ\text{C}$  y 2.1499 psi de presión, mientras que la temperatura del horno inició en  $70^\circ\text{C}$  con una rampa de  $20^\circ\text{C}/\text{min}$  durante 3 minutos. Todo el método anterior se acopló a un sistema de detección de masas (Agilent Technologies 5977A MSD). Brevemente, de cada microcosmos se extrajo una muestra con un volumen de 20  $\mu\text{L}$  de gas proveniente del espacio de cabeza, una vez por día durante nueve días, y se inyectó de manera manual. Para la cuantificación de todos los gases y sus productos, se realizaron curvas de calibración empleando los mismos gases marcados utilizados para los ensayos en

lote, dichas curvas se realizaron bajo las mismas condiciones de temperatura, volumen y presión.

### **6.8 Composición elemental**

Para conocer la composición a nivel elemental, 2 g de sedimentos fueron digeridos en medio ácido utilizando agua regia ( $\text{HNO}_3$ :  $\text{HCL}$ ). El resultado de esta digestión fue analizado por Espectroscopía de emisión óptica de Plasma de Acoplado Inductivamente, usando un flujo del nebulizador de 0.75 L/min, potencia de 1kw, tiempo de lavado de 10 segundos y a una velocidad en la bomba de 15 rpm (ICP-OES, Varian 730-ES). Finalmente, cada muestra fue evaluada por triplicado. El mismo análisis fue realizado en el agua de poro, para este objetivo, 10 mL de agua fueron centrifugados de los sedimentos.

### **6.9 Carbono orgánico total**

Para medir el contenido de materia orgánica presente en el sedimento de estos sitios, se determinó el carbono orgánico total (COT). El cual fue analizado en el equipo TOC- $V_{\text{CSN}}$  (TOTAL ORGANIC CARBON ANALYZER de SHIMADZU), equipado con un módulo de muestreo para sólidos (SSM-5000 A) y líquidos (ASI-V, SHIMADZU). 1 g de sedimento seco fue procesado a 900°C utilizando  $\text{O}_2$  como gas acarreador. Las muestras fueron analizadas por triplicado para tener mayor certeza de los resultados.

### **6.10 Determinación de Sulfato**

El sulfato fue cuantificado en agua de poro. Brevemente, un volumen de 10 mL de sedimento fue centrifugado quedándose con la fase líquida, posteriormente ésta fue filtrada a través de membranas de nitrocelulosa con un tamaño de poro de 0.22 micrómetros y finalmente se cuantificó por un sistema de Electroforesis capilar (Agilent 1600 A).

### **6.11 Determinación de sulfuro disuelto**

La concentración de sulfuro disuelto fue determinada por el método propuesto por Cord-Ruwish (1985). Brevemente, 100 microlitros de la fase líquida de cada botella serológica en fase experimental se hizo reaccionar con cuatro mililitros de una solución ácida de  $\text{CuSO}_4$  e inmediatamente se midió la absorbancia en un espectrofotómetro UV-VIS a 480 nm.

### **6.12 Sólidos Totales, Volátiles y fijos**

Para conocer la cantidad de sólidos volátiles y fijos se procesarán las muestras de acuerdo a la metodología dictada por APHA (1998). Brevemente se pesa 1g de muestra por triplicado y se depositan en cápsulas de porcelana a peso constante. Se secan a 105 °C por 24 horas, registrando peso y finalmente calcinando a 550°C en mufla (Cole-Palmer) por 2 horas y se registra nuevamente el peso final.

### **6.13 Determinación de Hierro**

Para conocer la concentración de Hierro disuelto en los microcosmos (hierro ferroso producto de la reducción de citrato férrico) éste fue cuantificado mediante la técnica de Ferrozina (Stookey, 1970).

### **6.14 Determinación de la reducción de ácidos húmicos**

La cantidad de electrones aceptados por las SH serán cuantificados de manera indirecta por la técnica de la ferrozina según la metodología propuesta por Lovley y col. (1996) donde los grupos quinona se medirá mediante un método espectrométrico reportado por Cervantes y col. (2001) en una cámara anaerobia con una atmósfera H<sub>2</sub>:N<sub>2</sub> (5%:95%).

### **6.15 Grupos funcionales de las sustancias húmicas y sitios redox**

Para demostrar cualitativamente si hubo diferencias entre tratamiento, se analizó el patrón de bandeo, específicamente para grupos quinona presentes en las sustancias húmicas, las cuales han sido consideradas como grupos participantes en procesos redox por microorganismos. Para este objetivo, muestras extraídas de los ensayos en lote, al final del segundo ciclo de incubación, fueron secadas a temperatura ambiente en una cámara anaerobia y trituradas con un mortero de ágata para su posterior análisis por espectroscopia infrarroja por transformada de Fourier (FTIR).

### **6.16 Nitrato, nitrito y amonio**

El nitrito, nitrato y amonio fueron evaluados a través de técnicas espectrofotométricas. El nitrito se determinó a través de técnicas estándares en

medio ácido a 275 nm y el valor obtenido se corrigió al medir la materia orgánica disuelta a 220 nm. El nitrato fue evaluado a través de la formación de un color rojizo-púrpura al formarse un complejo a través de la reacción con sulfanilamida y N-(1-Naftil) etilendiamina diclorhidrato, este compuesto se midió a una longitud de onda de 543 nm. Estas determinaciones fueron realizadas en un espectrofotómetro (UV-VIS, aqumate de Thermo Scientific). Finalmente, el amonio fue cuantificado a través del indofenol, el cual es formado por la reacción de amonio, hipoclorito y fenol, catalizados por nitroprusiato de sodio, esta mezcla se dejó reaccionar al menos 1 hora en obscuridad para su posterior medición a 640 nm en el equipo uv-Vis GENESYS 10 uv-vis, de Thermo Scientific.

### **6.17 Análisis moleculares de Sedimentos**

Para conocer la composición de la comunidad microbiana que sustentó la reducción de N<sub>2</sub>O en los microcosmos, se extrajo DNA genómico de los sedimentos. Para evaluar si microorganismos reductores de óxido nitroso, se encontraban presentes en el sedimento de los ensayos en lote, se optó por el empleo de primers reportados en la bibliografía para la amplificación, clonación y secuenciación del gen *nosZ*

Posterior a la secuenciación, las muestras fueron analizadas, procesadas y alineadas a través de un BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) desde el servidor del Centro Nacional Para la Información Biotecnológica (NCBI por sus siglas en inglés).

### **6.18 Extracción DNA**

Al final del segundo ciclo de los ensayos en lote, todos los microcosmos fueron almacenados a -80°C en ultra congelación (Revco) para conservar la condición a la cual se encontraban. Los microcosmos de todos los tratamientos (excepto la condición de esterilidad con o sin sustancias húmicas) fueron seleccionados para extraer DNA genómico.

El DNA fue extraído de un volumen de 0.5 ml con un kit comercial (DNA Power soil de MoBio). De manera breve, se extrajo el volumen antes mencionado de los microcosmos con una jeringa desechable para obtener de esta manera fase sólida y líquida. Antes de proceder con el protocolo descrito por el fabricante, tres lavados

con buffer fosfato salino (PBS al 1%) y centrifugaciones a trece mil revoluciones por minuto (rpm) fueron realizados. Para el control positivo del gen *nosZ* se utilizó biomasa de una columna desnitrificante incubada por 3 meses a 28°C. Al ser biomasa pura, se pesaron 0.5 g del lodo desnitrificante para su extracción.

### **6.19 PCR 16s rRNA**

Para comprobar que se realizó con éxito la extracción de ADN, se cuantificó la calidad y concentración en un nanodrop (NANODROP-1000, de Thermo Scientific) a una longitud de onda de 260/230. Posteriormente, se corrió una PCR amplificando el gen 16s rRNA. La reacción se llevó a un volumen de 25 µl y utilizando los primers 27F y 1492R. Las condiciones para el PCR fueron 94°C, 10 minutos; 94°C 1 minuto, 54°C 1 minuto, 72°C 2.5 minutos por 30 ciclos y f 72°C 5 minutos. Finalmente, los productos de PCR fueron visualizados en un gel de agarosa 1% con buffer TAE 1X para la corrida en la cámara de electroforesis a 40 minutos y 90 volts.

### **6.20 PCR convencional del gen *nosZ***

Para evaluar si se encontraba presente el gen que codifica la enzima para reducir el óxido nitroso a nitrógeno molecular, se amplificó el gen *nosZ*. Recordemos que este gen ha sido dividido en dos grandes clados, denominados como clado I y clado II. En este trabajo, ambos clados fueron considerados para ser amplificados. Con el objetivo de eliminar cualquier molécula que inhibiera la reacción de PCR, las extracciones de DNA de las tres réplicas por tratamiento, fueron reunidas y eluídas a través de columnas para su limpieza con el kit OneStep PCR Inhibitor Removal de Zymo Research.

Los primers empleados fueron: para el clado I, *nosZI* 1840F y 2090R (Henry et al., 2006) y para el clado II, *nosZ-II-F* y *nosZ-II-R* (Jones et al., 2013). Estos últimos, corresponden a la posición 1162-1178 y 1889-1907 del gen *nosZ* de *P. denitrificans* PD1222. Las condiciones evaluadas de PCR para el gen *nosZI* fueron las descritas por Conthe et al. (Conthe et al., 2018) . Para el caso del gen *nosZII*, éstas fueron establecidas en este trabajo; sin embargo, se tomaron como base las reportadas por Jones et al., (2013) las cuales se describen a continuación; 95°C por 5 minutos,

40 ciclos de 95°C por 30 segundos, 48°C por 60 segundos, 72°C 60 segundos y una etapa final de 72°C por 10 minutos.

Finalmente, los productos amplificados fueron visualizados en un gel de agarosa al 1.5-2 % esperando un producto de ~ 750 pb.

### 6.21 Clonación

Los productos de PCR amplificados, específicamente para el clado II, fueron purificados con el sistema Wizard SV gel and PCR Clean-up System (Promega).

Para llevar a cabo la ligación, una vez que los productos del gen nosZII quedaron limpios, fueron ligados al vector pGEM-T Easy (Promega) con una T4 DNA ligasa, ver componentes de la ligación en **Tabla 4**. La reacción fue llevada durante toda la noche a 4°C. Finalmente, los productos de esta ligación se limpiaron con cloroformo como lo describe el protocolo para pJET. Una vez procesadas las muestras, éstas fueron utilizados para la transformación de la línea celular *E.coli* DHA5 (células químicamente competentes) mediante la técnica de electroporación llevada a cabo en un electroporador ECM 630 bajo las siguientes condiciones; Voltage 2500 V, Resistor 0200  $\Omega$ , capacitor 0025 $\mu$ F.

**Tabla 4.** Componentes de la racción de ligación.

Componente	Reacción ( $\mu$ L)
Buffer de ligación (2x)	8
pGEM®-T Easy Vector (50ng)	1
Producto de PCR	10
T4 DNA Ligasa (3 Weiss units/ $\mu$ l)	1
Agua libre de nucleasas	0

Las células transformadas fueron sembradas por la técnica de extensión en placa en medio LB, el cual contenía el antibiótico carbenicilina [100 mg/ml], 1 microlitro por mililitro de medio, X-GAL [40 mg/ml] del cual agregamos 20 microlitros por caja

petri e IPTG [100mmol] agregando 100 microlitros por caja. Posterior a este paso, todos los cultivos fueron puestos en incubación a una temperatura de 37°C por 18 horas. Las colonias que resultaron positivas, es decir que contenían el inserto (colonias blancas), fueron seleccionadas para una extracción de DNA plasmídico, la cual se desarrolló bajo el método descrito por Maniatis et al. (1989) y se verificó mediante PCR con los primers universales M13F y M13R. La reacción de PCR se llevó a cabo con las siguientes condiciones; si el inserto se encontraba presente, se procedía a una purificación por precipitación con hidróxido de potasio, para finalmente cuantificar y observar la calidad y pureza del DNA extraído a través de las longitudes de onda 260/230 en un nano drop.

### **6.22 Secuenciación y procesamiento**

Las muestras fueron secuenciadas con el método de dideoxinucleótidos en secuenciadores automatizados 3130 y 3500 Series Genetic Analyzer (Applied Biosystems).

Para el procesamiento y posterior alineamiento de las secuencias, éstas fueron limpiadas, es decir, se eliminaron las secuencias pertenecientes a regiones del vector que aun estuvieran presentes en las lecturas, este procedimiento fue llevado a cabo de manera manual y apoyada en la herramienta VecScreen de la plataforma NCBI. Por último, las secuencias entre 690 y 720 pares de bases fueron alineadas en el BLASTX, para comparar con las bases de datos en NCBI. Todas las secuencias problema traducidas a nivel de proteína, más las secuencias con mayor similitud arrojadas por BLASTX, fueron utilizadas para un análisis filogenético en el programa MEGA7.

### **6.23 Análisis Estadísticos**

En el caso de la correlación entre microorganismos identificados y el tratamiento evaluado, o su condición, un NMDS con el índice de Jacard fue llevado a cabo.

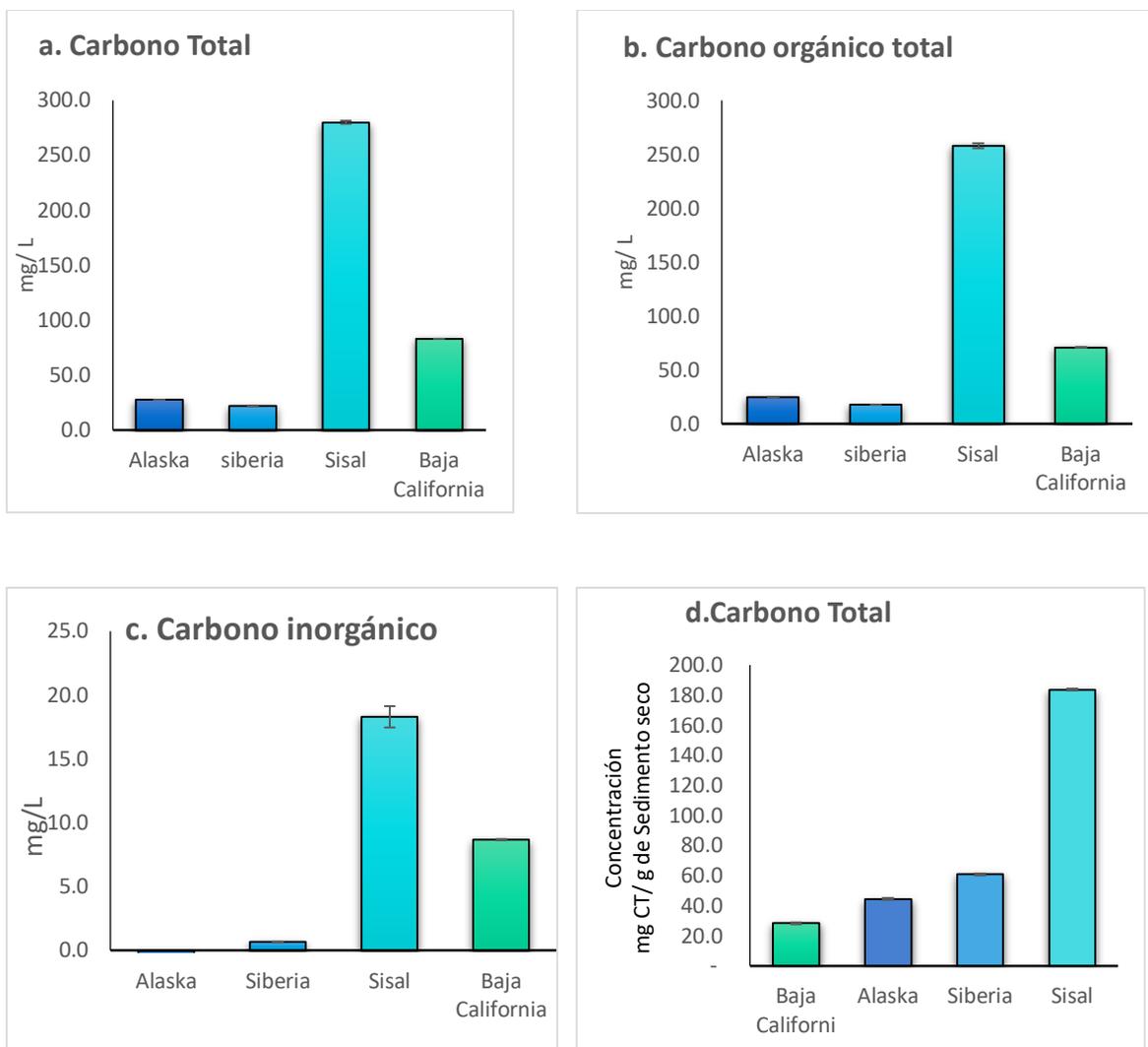
## 7. RESULTADOS

### 7.1 Caracterización de sedimentos: Carbono en agua y sedimentos

Cuatro sedimentos de sistemas acuáticos, dos provenientes de lagos boreales, Alaska y Siberia, un humedal costero, Sisal, y sedimento de las playas de San Quintín en Baja California, fueron caracterizados.

El carbono total, orgánico e inorgánico, fue evaluado en muestras sólidas y líquidas. El panel (a) de la Figura 4 representa la concentración de carbono total presente en el agua de poro. Bajo este parámetro cuantificado, el humedal de Sisal presenta la mayor concentración con 279.73 mg /L seguido de Baja California (82.91 mg/L) y finalmente, los cuerpos de agua boreales, los lagos de Alaska y Siberia 27.67 y 22 mg /L, respectivamente. Es evidente que debido a la saturación de agua que presentan los humedales y el desplazamiento de oxígeno de espacios intersticiales, se favorezca la acumulación de C debido a que la velocidad de descomposición de la materia orgánica es menor (Hernández, 2010).

El panel (b y c) muestran las concentraciones de carbono orgánico e inorgánico evaluados en agua de poro, de igual forma que para el panel (a). En el caso del carbono orgánico total, se sigue la misma tendencia del panel (a). El humedal Sisal presenta la mayor concentración, seguido de Baja California, Alaska y Siberia (Ver datos en Tabla 4 y 5). El panel (c) representa las concentraciones de carbono inorgánico y los valores pueden apreciarse en la Tabla 4 y 5. Finalmente, en el panel (d) se presenta el carbono total de muestras de sedimento seco, como era de esperarse por su naturaleza, el sitio con mayor concentración de C fue Sisal, seguido de los lagos boreales de Siberia y Alaska y finalmente el sedimento marino de Baja California, 183.77, 60.96, 44.66 y 28.43  $mg\ g_{Sedim. Seco}^{-1}$ . Estos resultados concuerdan con lo descrito por Hernández (2010), quien evidencia que la concentración de carbono en los suelos de humedales de Norteamérica, entre 470 y 2902 Mg C ha<sup>-1</sup>.



**Figura 4.** Carbono total, orgánico e inorgánico presente en el agua de poro (a, b y c) y carbono total presente en sedimento de los 4 sitios estudiados (d). Cada barra representa el promedio de mediciones por triplicado. Las barras de error representan la desviación estándar entre réplicas.

**Tabla 5.** Carbono orgánico total y carbono total en agua de poro.

Sitio	CT	COT	CI	% COT /CT
	mg / L	mg / L	mg / L	
Alaska	27.67	24.76	0.49	89.47
Siberia	22.00	17.94	0.65	81.56
Sisal	279.73	258.00	18.30	92.23
B.California	82.91	70.85	8.66	85.45

CT, carbono total; COT, carbono orgánico total; CI, carbono inorgánico

**Tabla 6.** Concentración de Carbono total en sedimento

<b>Sitio</b>	<b>mg CT/ g sedimento seco</b>	<b>% C/ g sedimento seco</b>
B. California	28.43 ± 0.5	2.84
Alaska	44.46 ± 1.59	4.44
Siberia	60.96 ± 1.91	6.09
Sisal	183.77 ± 0.08	18.38

## **7.2 Caracterización de sedimentos**

Las Tablas 7 Y 8, muestran un resumen de la caracterización fisicoquímica de sedimentos y agua de poro de los diferentes sitios empleados hasta ahora en esta investigación. Los valores presentados son el promedio de mediciones hechas por triplicado y las desviaciones entre sus réplicas.

Un hallazgo importante es la presencia de nitratos en los 4 sitios, lo cual nos indica que este compuesto podría estar entrando en el ciclo del carbono, a través de la oxidación anaerobia de metano acoplada a nitrato (n-damo). Por otro lado, la presencia de nitrito sólo fue observada en el agua de poro del humedal Sisal. Este hallazgo nos da pauta para pensar en que el proceso de desnitrificación está siendo llevado a cabo. Por otro lado, en el agua de poro de Alaska, Siberia y Baja California, el nitrato no fue detectado, esto puede ser ocasionado por factores como el oxígeno disuelto, la temperatura, la relación carbono nitrógeno y el pH quienes inhiben la desnitrificación inclusive a nivel enzimático.

**Tabla 7.** Caracterización fisicoquímica de agua de poro y sedimento de Alaska, USA y Siberia, Rusia.

Parámetro	Alaska		Siberia	
	Agua de poro	Sedimento	Agua de poro	Sedimento
Georreferencia (latitud longitud)	64.8698, -147.902		67.513476, 86.591353	
CT (mg g <sub>Sedim.</sub> Seco <sup>-1</sup> )	n.a	44.46 ± 0.59	n.a	60.96
CT (mg l <sup>-1</sup> )	27.67 ± 0.04	n.a	22.00 ± 0.04	n.a
COT (mg l <sup>-1</sup> )	24.75 ± 0.03	n.a	17.94 ± 0.06	n.a
CIT (mg l <sup>-1</sup> )	4.87 ± 0.02	n.a	6.02 ± 0.01	n.a
Fe <sub>T</sub> (mg ml <sup>-1</sup> ) (mg g <sub>sedim.</sub> seco <sup>-1</sup> )	1.48 ± 1.9	6.69 ± 0.8	0.04 ± 0.01	16.35 ± 3.03
Mn <sub>T</sub> (mg ml <sup>-1</sup> ) (mg g <sub>sedim.</sub> seco <sup>-1</sup> )	4.63 ± 0.03	0.38 ± 0.33	0.0 ± 0.0	0.32 ± 0.06
NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> (mg l <sup>-1</sup> )	5.27 ± 0.01	n.a	5.70 ± 0.02	n.a
NO <sub>2</sub> <sup>-</sup> (mg l <sup>-1</sup> )	0.0 ± 0.0	n.a	0.0 ± 0.0	n.a
NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> (mg l <sup>-1</sup> )	0.15 ± 0.01	n.a	0.0 ± 0.0	n.a
pH	7.54	n.a	6.73	n.a
Sulfuro (mM)	0.0 ± 0.0	n.a	0.35 ± 0.2	n.a
SO <sub>4</sub> <sup>2-</sup> (mg l <sup>-1</sup> )	1305.64 ± 140.12	n.a	104.94 ± 26.57	n.a
Temperatura (°C)	<b>4.8</b>	<b>n.a</b>	<b>4.3</b>	<b>n.a</b>

n.a. No aplica la medición.

Otro hallazgo importante es la concentración de hierro, medida como hierro total en sedimento y agua de poro, en este caso la mayor concentración se presentó en el sedimento del lago de Alaska con 16.35 ± 3.03 mg/g-sed el cual, al ser un elemento muy dinámico, puede prevalecer tanto en su forma oxidada F (III) o reducida F (II) y participar en procesos microbianos o reacciones abióticas.

**Tabla 8.** Caracterización fisicoquímica de agua de poro y sedimento de Sisal, Yucatán, Mex. y Baja California, Mex.

Parámetro	Sisal		Baja California	
	Agua de poro	Sedimento	Agua de poro	Sedimento
Georreferencia (latitud longitud)	21.1572222 -90.0525		30.75 -116.00016	
CT (mg g <sub>Sedim. Seco</sub> <sup>-1</sup> )	n.a	183.77 ± 0.08	n.a	28.43 ± 0.58
CT ( mg l <sup>-1</sup> )	279.73 ± 1.3	n.a	82.91 ± 0.11	n.a
COT ( mg l <sup>-1</sup> )	257.99 ± 2.21	n.a	70.85 ± 0.27	n.a
CIT (mg l <sup>-1</sup> )	23.66 ± 0.8	n.a	14.03 ± 0.5	n.a
Fe <sub>T</sub> (mg ml <sup>-1</sup> ) (mg g <sub>Sedim. seco</sub> <sup>-1</sup> )	0.48 ± 0.3	1.01 ± 1.0	0.03 ± 0.03	6.24 ± 0.01
Mn <sub>T</sub> (mg ml <sup>-1</sup> ) (mg g <sub>Sedim. seco</sub> <sup>-1</sup> )	0.02 ± 0.01	0.03 ± 0.03	0.33 ± 0.1	0.16 ± 0.01
NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> (mg l <sup>-1</sup> )	11.58 ± 0.03	n.a	6.76 ± 0.01	n.a
NO <sub>2</sub> <sup>-</sup> (mg l <sup>-1</sup> )	0.14 ± 0.0	n.a	0.0 ± 0.0	n.a
NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> (mg l <sup>-1</sup> )	0.14 ± 0.0	n.a	0.08	n.a
pH	7.2	n.a	8	n.a
Sulfuro (mM)	0.0 ± 0.0	n.a	0.0 ± 0.0	n.a
SO <sub>4</sub> <sup>2-</sup> (mg l <sup>-1</sup> )	6618.51 ± 63.25	n.a	19967 ± 72.183	n.a
Temperatura (°C)	-	na	28.9	n.a

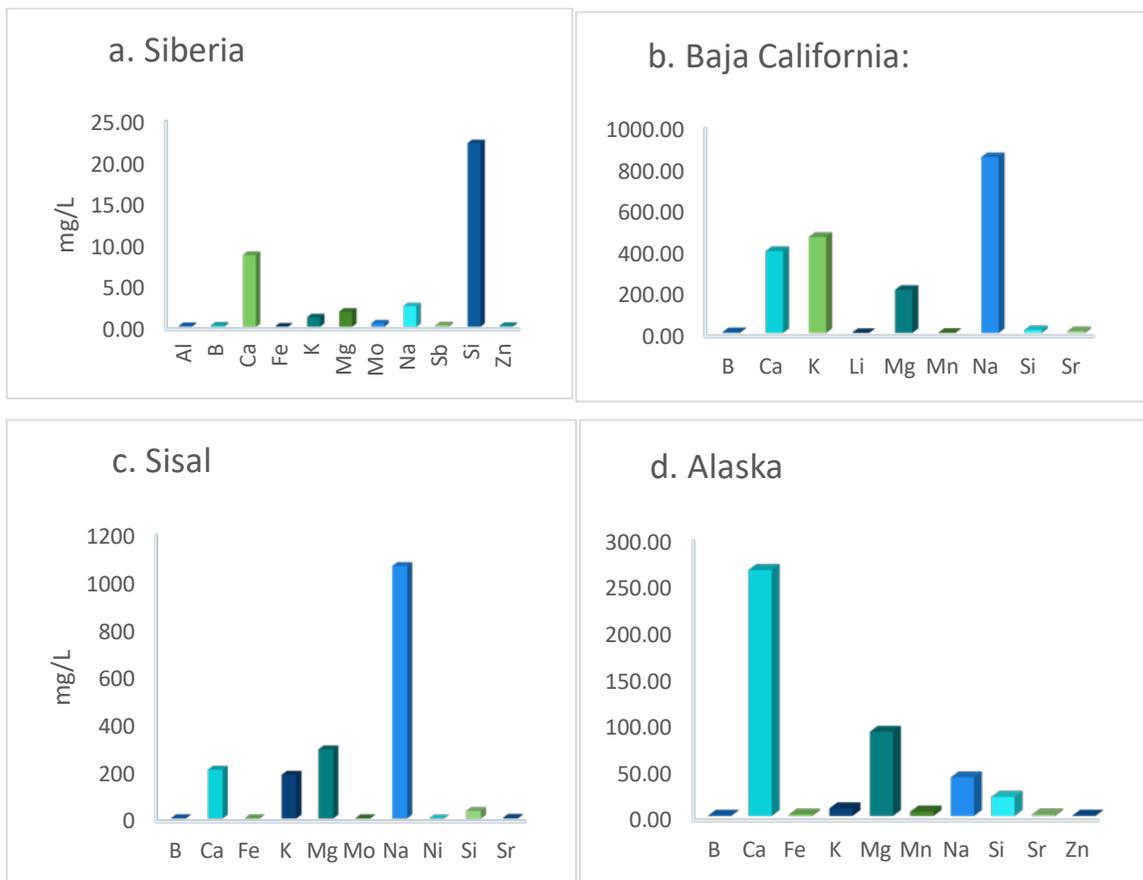
n.a= No aplica la medición

### 7.3 Barrido elemental por ICP-OES

Se analizó la composición elemental de cada sitio a través de una extracción ácida y una lectura por ICP-OES. Los elementos explorados se muestran a continuación.

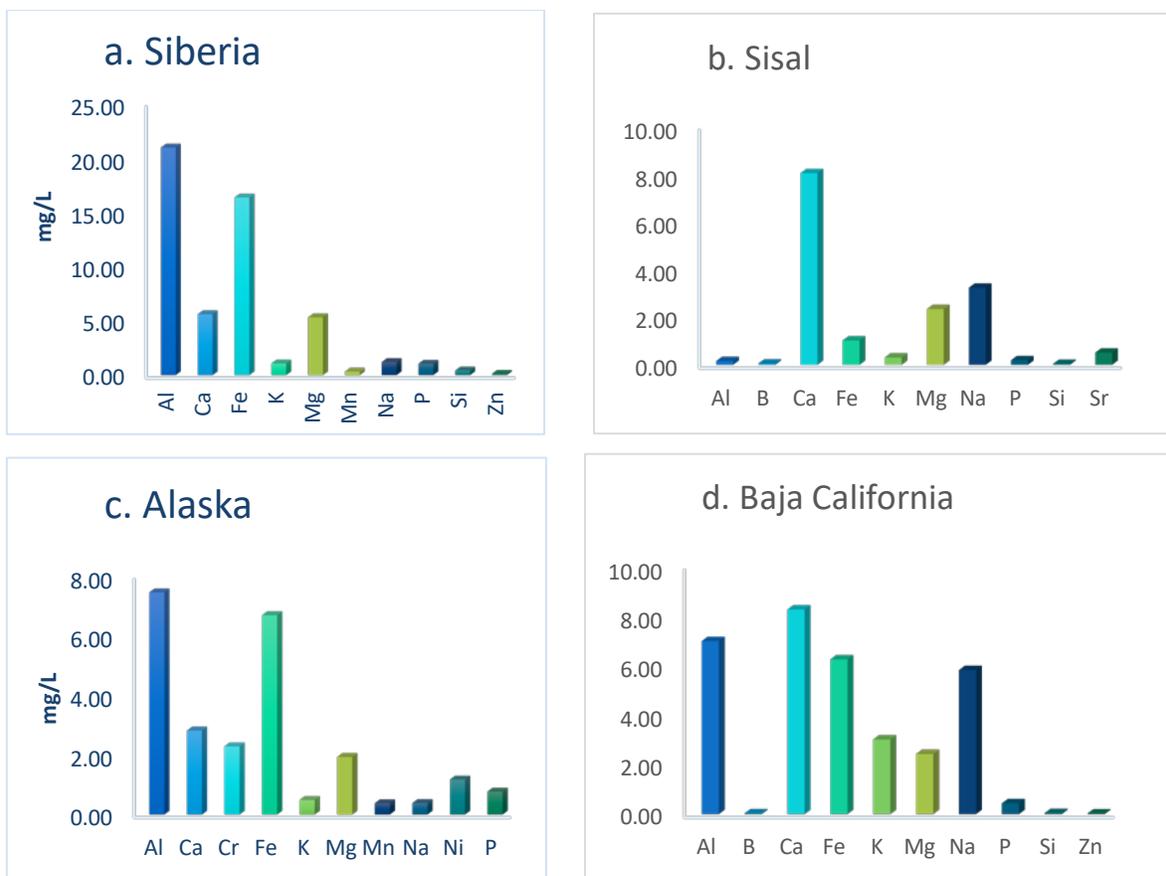
**Tabla 9.** Elementos analizados en agua de poro y sedimento de los cuatro sitios

Ag	Al	As	B	Ba	Be	Ca	Cd	Co	Cr
Cu	Fe	K	Li	Mg	Mn	Mo	Na	Ni	P
Pb	Sb	Se	Si	Sn	Sr	Tl	V	Zn	



**Figura 5.** Composición elemental evaluada en agua de poro por ICP-OES de los 4 sitios. Las barras representan el promedio de mediciones por duplicado. En los 4 paneles sólo se muestran los elementos más abundantes del total de 29 analizados para cada sitio.

La composición elemental entre sitios es variada; sin embargo, concuerda con la naturaleza del sitio, como se puede apreciar en el panel b y c (Muestras de agua de poro) la composición de  $\text{Na}^{2+}$  es mayor (1000 y 800 mg/l), debido a que el humedal de Sisal tiene entradas de corrientes marinas y en el caso de Baja California era de esperarse debido a que es una muestra tomada en costa. Lo destacable de los sitios boreales es la alta concentración de Ca en Alaska y de sílice en Siberia. El primero podría estar presente dado el equilibrio de los carbonatos y estarse acumulado como carbonato de calcio, información que aún es preliminar puesto que hasta que no se haga un análisis de minerales por XRD, no se sabrá en qué estado se encuentran tales elementos.



**Figura 6.** Composición elemental evaluada en sedimentos secos por ICP-OES de los 4 sitios. Las barras representan el promedio de mediciones por duplicado. En los 4 paneles sólo se muestran los elementos más abundantes del total de 29 analizados para cada sitio

Es importante destacar la presencia de Aluminio y hierro en los suelos de lagos boreales (panel a) de Siberia con 16.35 de Fe y 20.97 de Al y Alaska (panel c) 7.46 Fe y 6.69 Al mg/L, ya que estos elementos podrían estar en forma de hidróxidos, no disponibles del todo para los microorganismos hierro-reductores; sin embargo, la presencia de materia orgánica, *humus*, podría hacer posible este fenómeno. Además, se destaca la presencia de Mn en concentraciones de 0.32 y 0.38 mg/L en los mismos sitios, lo cual podría competir (dependiendo del estado de oxidación en el que se encuentre) en las reacciones de complejación con otros elementos o incluso la materia orgánica, (datos de los demás elementos no se muestran en este documento).

A través de esta breve caracterización y un primer experimento de exploración de metanotrofia de los 4 sitios (datos no mostrados) los candidatos para evaluar la capacidad de la comunidad microbiana de utilizar a las SH como mediadores redox, fueron por parte de los lagos boreales, el de Alaska por contener una mayor cantidad de Carbono en su sedimentos el cual fungiría como materia orgánica natural y podría participar en las reacción propuesta en esta tesis, además de que fue el único lago que presento una ligera actividad al incubar microcosmos a 4°C , sin embargo, el desconocimiento total del sitio repercute en redoblar esfuerzos, reflejados en tiempo, para encontrar las condiciones óptimas a las cuales el proceso sea llevado a cabo. Por otro lado, el humedal Sisal, ya explorado con anterioridad por el grupo de trabajo, es un sitio donde se ha demostrado existen microorganismos con la capacidad de metabolizar CH<sub>4</sub> sustentado por SH y materia orgánica natural (MON), por lo que este hecho determinó que el humedal Sisal, fuera elegido para el propósito de esta tesis.

## **7.4 Cinéticas de oxidación de metano y reducción de óxido nitroso**

### 7.4.1 Pre incubación y selección de sedimentos a evaluar

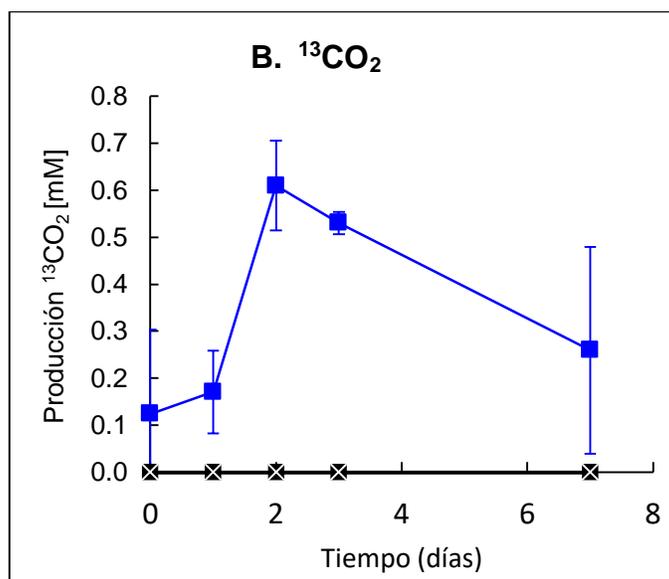
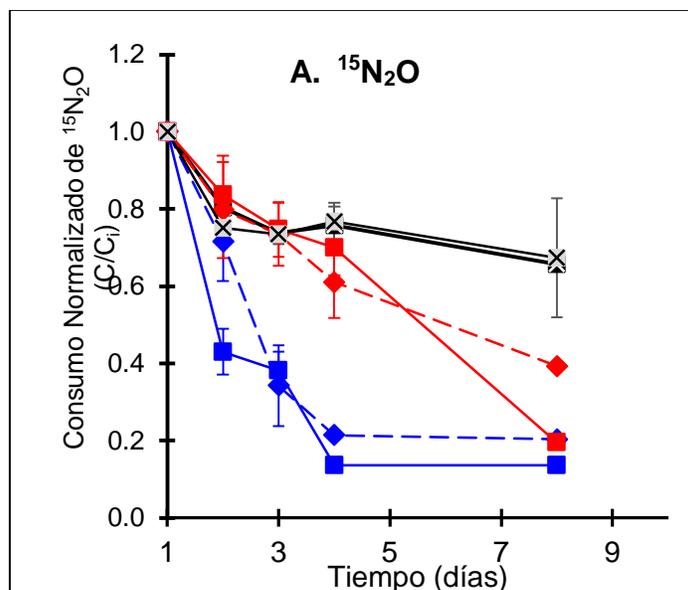
Como se observó en la Sección anterior, 4 sedimentos provenientes de diferentes cuerpos acuáticos se caracterizaron. Dentro de todos ellos, una propiedad a resaltar es el contenido de carbono total medida en sedimento y agua de poro, la cual fue encontrada en mayor concentración en el sedimento proveniente del humedal Sisal. Además, los primeros ensayos en lote realizados para 3 de los cuatro sedimentos (Excepto para el de Baja California) no mostraron evidencia contundente, hasta ese momento, en el consumo de metano y óxido nitroso. Debido a estas dos características, se optó por trabajar sólo con la muestra del humedal Sisal, la cual anteriormente ya ha sido reportada con la capacidad de oxidar metano de manera anaerobia (Valenzuela et al., 2017; 2019). Por lo que, a partir de este momento, todos los resultados (cinéticas y análisis moleculares) corresponden sólo a este sitio.

Las cinéticas de oxidación de metano y reducción de óxido nitroso fueron evaluadas en dos ciclos. Los ciclos comenzaron después de una aclimatación de los

microcosmos a 28°C por alrededor de un mes. Durante este periodo no fueron agregados SH ni tampoco gases marcados. Posterior a este evento, los microcosmos fueron abiertos y se realizó cambio de medio y atmósfera como se describió en la Sección 6.4. Previo al inicio de los ensayos en lote, un ciclo de pre incubación de los microcosmos (con inyección de 2 mL de metano, 2 mL de óxido nitroso marcados y 2 g/L de sustancias húmicas PP) fue realizado, con el objetivo de definir el tiempo de muestreo durante los ensayos, arrojándonos que en un tiempo máximo de 4 días (Datos no mostrados en este trabajo), ya no era posible detectar el  $^{15}\text{N}_2\text{O}$  en fase gaseosa. De esta manera se estableció que la duración de cada ciclo sería dependiente del consumo total del  $^{15}\text{N}_2\text{O}$ , es decir, el final de cada ciclo se estableció al no detectar en fase gas el espectro de  $^{15}\text{N}_2\text{O}$  en el cromatógrafo de gases acoplado a masas, debido a que este gas se comportó como el sustrato limitante.

#### 7.4.2 Ensayos en lote: Ciclo I

Como se puede apreciar en la Figura 7, específicamente en el panel a) los tratamientos con sustancias húmicas (presentes en color azul), de manera general, muestran velocidades de consumo y consumo neto mayores con respecto a los demás tratamientos (en color rojo los tratamientos sin SH y en color negro los controles estériles); por ejemplo, a través de una regresión lineal y el cálculo de la pendiente en el periodo máximo de consumo, el tratamiento 1, que es la condición que tratamos de probar en este estudio, presentó un consumo neto de 13.18 mmol al día 3, de los 14.2 mmol ingresados al sistema, es decir, alrededor del 93% fue metabolizado a una velocidad máxima de consumo de 4.03 mmol  $^{15}\text{N}_2\text{O}$  / día g-sed. Se puede observar que la adición de SH impactó sobre la velocidad de consumo, sin embargo, el mecanismo por el cual este fenómeno se presentó, no fue descrito en esta investigación pero, probablemente intervengan propiedades como la solubilidad o la difusividad de gases en líquidos. Por otro lado, la condición similar pero sin SH, es decir el tratamiento 6, corrobora este hallazgo, pues la velocidad máxima alcanzada fue ~ 4 veces menor 1.05 mmol  $^{15}\text{N}_2\text{O}$  / día g-sed que el tratamiento 1.



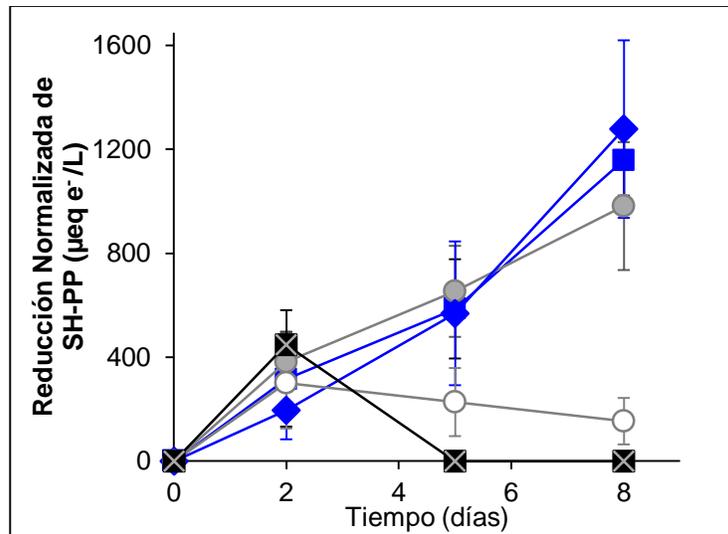
**Figura 7.** Cinética de metano y óxido nitroso con y sin sustancias húmicas durante el ciclo 1. Los tratamientos con sustancias húmicas se indican en color azul y los que no contienen sustancias húmicas en color rojo A) Reducción de  $^{15}\text{N}_2\text{O}$ , B) Producción de  $^{13}\text{CO}_2$ . Los símbolos corresponden a: (-■-) Sed +  $^{13}\text{CH}_4$  +  $^{15}\text{N}_2\text{O}$ ; (-◇-) Sed +  $^{15}\text{N}_2\text{O}$ ; (-■-) Sed-PP +  $^{13}\text{CH}_4$  +  $^{15}\text{N}_2\text{O}$ ; (-◇-) Sed-PP +  $^{15}\text{N}_2\text{O}$ ; (-■x-) Sed-PP +  $^{13}\text{CH}_4$  +  $^{15}\text{N}_2\text{O}$  + Estéril; (-■x-) Sed +  $^{13}\text{CH}_4$  +  $^{15}\text{N}_2\text{O}$  + Estéril.

En este ciclo hay que destacar el corto periodo de tiempo (3 días) en el que el óxido nitroso fue consumido, además en el panel B) de la Figura 7 se puede apreciar que, al día 4, este consumo coincide con el aumento de la mineralización de metano expresado como 0.53 mmol de  $^{13}\text{CO}_2$ . que para el día 3 alcanzaron valores de

Hasta este momento, este es el primer hallazgo, aportado por esta tesis de que las sustancias húmicas promueven el consumo de dos GEI y además, hay que destacar, que se comprueba de manera contundente que el proceso es llevado a cabo por la microbiota presente en el sedimento, debido a que en los controles estériles (color negro) no se detectó actividad metanotrófica relacionada a la producción de  $^{13}\text{CO}_2$  ni desnitrificante  $^{15}\text{N}_2$

#### 7.4.3 Capacidad aceptora de electrones de las sustancias húmicas, ciclo I

Durante el periodo de la cinética de oxidación y reducción, de manera paralela fue medida la capacidad aceptora de electrones de las SH de manera indirecta como la cantidad de hierro ferroso producido por la oxidación de citrato férrico. Como se aprecia en la Figura 8. La tendencia de los tratamientos hace sentido con las condiciones provistas en cada microcosmos y las mediciones de oxidación y reducción de metano y óxido nitroso; por ejemplo, se puede observar que el tratamiento que contenía sólo sedimento y SH, no muestra un incremento a través del tiempo en la reducción de SH, debido a que no existen factores externos que la promuevan, por otro lado el tratamiento completo pero en condiciones de esterilidad presenta un desempeño aún menor al antes mencionado, lo que demuestra la efectividad del proceso de esterilidad y que los procesos microbianos de transferencia de energía no están ocurriendo.



**Figura 8.** Reducción de sustancias húmicas por el sedimento del humedal Sisal, determinada por el método de la ferrozina, durante el ciclo I. Reducción de sustancias húmicas por método de la ferrozina, ciclo II. Los símbolos representan los siguientes tratamientos: (-■-) SH-PP + <sup>13</sup>CH<sub>4</sub> + <sup>15</sup>N<sub>2</sub>O; (○) Sed + <sup>13</sup>CH<sub>4</sub>; (-◆-) Sed-PP + <sup>15</sup>N<sub>2</sub>O; (○) SH-PP; (-■-) Sed-PP + <sup>13</sup>CH<sub>4</sub> + <sup>15</sup>N<sub>2</sub>O + Estéril

Caso contrario se observa para los tratamientos 1, 2 y 3 quienes conforme pasa el tiempo van aumentando su capacidad de reducción, sin embargo, no existe ninguna diferencia entre ellos por lo que es difícil apuntar si este efecto es debido a la presencia de algún gas en el sistema o se está enmascarando por la gran cantidad de materia endógena. En la Tabla 10, se enlistan las velocidades de reducción de las sustancias húmicas calculadas a través de una regresión lineal.

**Tabla 10.** Velocidades de reducción de las SH-PP, ciclo 1

Velocidades de reducción de las SH-PP ( $\mu\text{mol L}^{-1} \text{day}^{-1}$ )	
SH-PP + <sup>15</sup> N <sub>2</sub> O + <sup>13</sup> CH <sub>4</sub>	138.71 +- 54.53
SH-PP + <sup>13</sup> CH <sub>4</sub>	136.58 +- 72.75
SH-PP + <sup>15</sup> N <sub>2</sub> O	161.49 +- 85.54
SH-PP	33.95
Estéril ( <sup>15</sup> N <sub>2</sub> O + <sup>13</sup> CH <sub>4</sub> )	10.44 +- 2.34

Si observamos específicamente en el día 5, se aprecia como el hecho de que exista un donador externo, en el caso del metano (círculo gris) este va a fungir como el principal proveedor de electrones para las sustancias húmicas, sin embargo las desviaciones de los datos son tan grandes que no es evidente esta posibilidad. por lo que las hace tener un mayor número de electrones para donar después de ser reducidas.

### **7.5 Ensayos en lote: Ciclo II.**

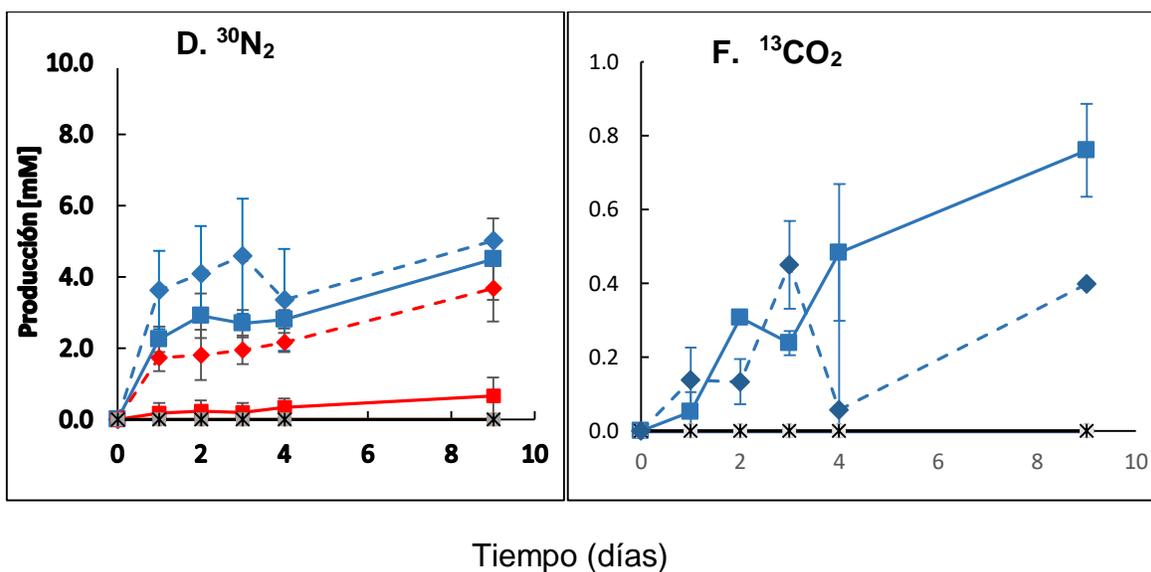
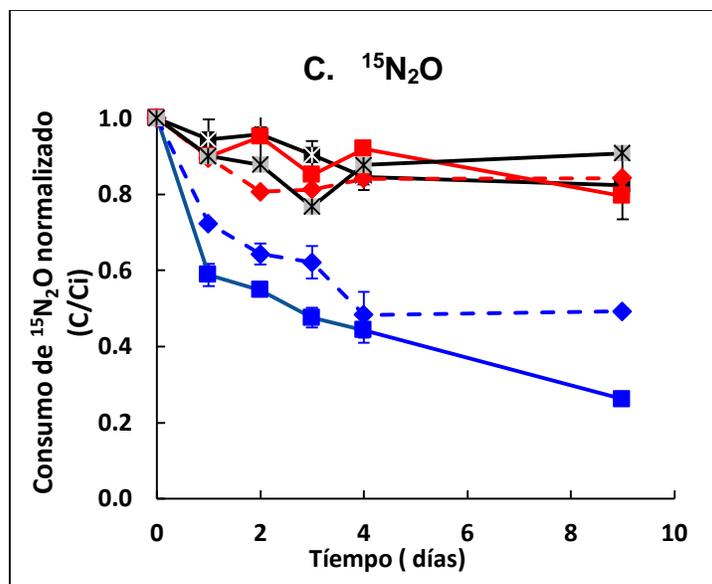
Para el segundo ensayo, los microcosmos utilizados en el primer ciclo fueron reutilizado; sin embargo, se desacopló la cinética con respecto al ciclo previo; es decir, se renovó la atmósfera y el medio, además el volumen de inyección de  $^{15}\text{N}_2\text{O}$  fue de 4 mL, mientras que el volumen de metano se mantuvo como en ciclo anterior (2 ml). De igual manera, las concentraciones de ambos gases y sus productos fueron medidas diariamente durante nueve días por GC-MS.

#### 7.5.1 Reducción de Óxido Nitroso

Todos los tratamientos incubados en presencia de sustancias húmicas mostraron un efecto positivo (significativo) en el consumo del óxido nitroso, independientemente del tratamiento. Una evidencia contundente del uso de sustancias húmicas como mediador redox, se observó en la tasa de consumo de óxido nitroso en el tratamiento completo (Tratamiento 1), fenómeno presentado con anterioridad en el ciclo I. Sin embargo, en este caso, el gas fue consumido en un 73 % y de este total un 81 % se encontró en forma de  $^{15}\text{N}_2$ . La cantidad de  $^{15}\text{N}_2\text{O}$  consumida observada en este ciclo, fue menor comparada con el ciclo I (~93% de consumo), lo cual es un hallazgo muy interesante, debido a que muy posiblemente en el ciclo I, aún existían donadores de electrones intrínsecos que pudieran estar sustentando el proceso, por lo que el ciclo II representa una prueba más clara del aporte del donador de electrones (metano) sin sobrestimar la capacidad de metabolizar  $^{15}\text{N}_2\text{O}$ .

La Tabla 11 muestra los valores de las velocidades máximas de reducción de metano y de óxido nitroso, con estos hallazgos es posible decir que el comportamiento con respecto a la velocidad de consumo de  $^{15}\text{N}_2\text{O}$  en los tratamientos con SH-PP fue similar al ciclo I. De manera particular, la velocidad máxima de consumo de  $^{15}\text{N}_2\text{O}$  en el tratamiento 1 fue ~ de 13 veces mayor con respecto a su contraparte el tratamiento 6. La tasa máxima de reducción calculada fue de  $1.69 \text{ mmol } ^{15}\text{N}_2\text{O} / \text{día g-sed}$  y un consumo neto de  $5.53 \text{ mmol}$  en nueve días. Por otro lado, su contraparte (Tratamiento 6) alcanzó una tasa de  $0.13 \text{ mmol } ^{15}\text{N}_2\text{O} / \text{día g-sed}$ . En esta etapa, el impacto en la velocidad de consumo sobre el  $^{15}\text{N}_2\text{O}$  fue aún as marcada entre los tratamientos que en ciclo anterior. A pesar de que en la fase gas ya no fue posible detectar el  $^{15}\text{N}_2\text{O}$ , su producto generado, es decir  $^{15}\text{N}_2$ , sólo se pudo cuantificar en un 81%, por lo que se asume que el otro porcentaje restante pudo haber sido asimilado como biomasa.

Estos hallazgos nos dieron pauta para proseguir dentro de las etapas de esta investigación, es decir, por métodos moleculares, amplificar el gen funcional *nosZ*, que hasta la fecha es el responsable del único sumidero de óxido nitroso.



**Figura 9.** Cinética de metano y óxido nitroso con y sin sustancias húmicas durante el ciclo II. En los 3 paneles se muestran los tratamientos con sustancias húmicas en color azul y los que no contienen sustancias húmicas en color rojo. Las gráficas corresponden al segundo ciclo de incubación. Los símbolos corresponden a: (-■-) Sed +  $^{13}\text{CH}_4$  +  $^{15}\text{N}_2\text{O}$  ; (-◇-) Sed +  $^{15}\text{N}_2\text{O}$  ; (-■-) Sed-PP +  $^{13}\text{CH}_4$  +  $^{15}\text{N}_2\text{O}$  ; (-◇-) Sed-PP +  $^{15}\text{N}_2\text{O}$  ; (-■x-) Sed-PP +  $^{13}\text{CH}_4$  +  $^{15}\text{N}_2\text{O}$  + Estéril ; (-■x-) Sed +  $^{13}\text{CH}_4$  +  $^{15}\text{N}_2\text{O}$  + Estéril.

**Tabla 11.** Balances de 13-Carbono y 15-Nitrógeno en el ciclo II. En esta tabla sólo se enlistan los tratamientos con sustancias húmicas.

Tratamiento	concentración inicial (mmol)		concentración final (mmol)		Velocidad máxima de reducción (mmol)	Velocidad máxima de oxidación (mmol)
	<sup>13</sup> CH <sub>4</sub>	<sup>15</sup> N <sub>2</sub> O	<sup>13</sup> CO <sub>2</sub>	<sup>30</sup> N <sub>2</sub>	<sup>15</sup> N <sub>2</sub> O día <sup>-1</sup> g-sed <sup>-1</sup>	<sup>13</sup> CH <sub>4</sub> día <sup>-1</sup> g-sed <sup>-1</sup>
Sed-PP + <sup>15</sup> N <sub>2</sub> O + <sup>13</sup> CH <sub>4</sub>	5.31	8.97	0.76	4.5	1.69 +- 0.003	0.071 +- 0.005
Sed-PP + <sup>13</sup> CH <sub>4</sub>	5.85	--	0	0	--	0.08 +- 0.004
Sed-PP + <sup>15</sup> N <sub>2</sub> O	--	10.62	0.4	5.02	1.47 +- 0.01	--
Sed-PP	--	--	0	0	--	--
Sed-PP+ <sup>15</sup> N <sub>2</sub> O + <sup>13</sup> CH <sub>4</sub> + Estéril	5.36	7.75	0	0	0.13 +-0.01	0.037+- 0.02

**Tabla 12.** Balances de 13-Carbono y 15-Nitrógeno en el ciclo II. En esta tabla sólo se enlistan los tratamientos sin sustancias húmicas

Tratamiento	concentración inicial (mmol)		concentración final (mmol)		Velocidad máxima de reducción (mmol)	Velocidad máxima de oxidación (mmol)
	<sup>13</sup> CH <sub>4</sub>	<sup>15</sup> N <sub>2</sub> O	<sup>13</sup> CO <sub>2</sub>	<sup>30</sup> N <sub>2</sub>	<sup>15</sup> N <sub>2</sub> O día <sup>-1</sup> g-sed <sup>-1</sup>	<sup>13</sup> CH <sub>4</sub> día <sup>-1</sup> g-sed <sup>-1</sup>
Sed + <sup>15</sup> N <sub>2</sub> O + <sup>13</sup> CH <sub>4</sub>	5.09	6.33	0	0.67	0.13 +-0.01	0.022 +- 0.04
Sed + <sup>13</sup> CH <sub>4</sub>	4.86	--	0	0	--	0.004 +- 0.003
Sed + <sup>15</sup> N <sub>2</sub> O	--	8.20	0	3.67	0.7 +- 0.29	--
Sed-PP	--	--	0	0	--	--
Sed + <sup>15</sup> N <sub>2</sub> O + <sup>13</sup> CH <sub>4</sub> + Estéril	5.49	7.54	0	0	0.50 +- 0.15	0.047 +- 0.01

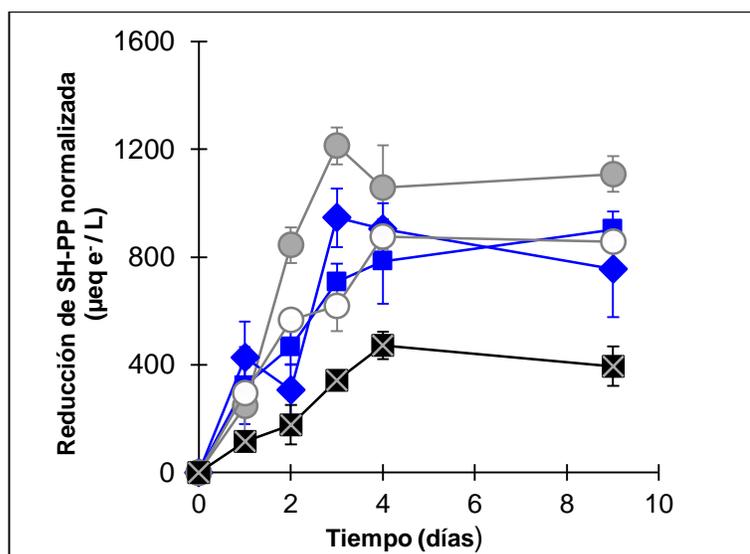
La más alta velocidad de consumo de óxido nitroso bajo el tratamiento sin metano, puede deberse a donadores intrínsecos presentes en el sedimento. Un resultado interesante es el alto valor de consumo de metano ~ 3.02 milimoles por parte del tratamiento 2 enlistado en la Tabla 2. Sin embargo, al hacer su seguimiento hasta dióxido de carbono, éste no fue detectado. Es posible que debido a su elevada concentración, entró en equilibrio con los carbonatos presentes y posteriormente permaneció precipitado con calcio, al ser uno de los elementos más abundantes de este sedimento ~8 (mg L<sup>-1</sup>) formando CaCO<sub>3</sub> o con hierro, formando FeCO<sub>3</sub>.

A la fecha, sólo existe un reporte sobre la oxidación anaerobia de metano acoplada a la reducción de óxido nitroso. Sin embargo, a diferencia de nuestro estudio, no se utilizaron sustancias húmicas externas y el sedimento provenía de un humedal artificial. En este trabajo, se argumenta que el óxido nitroso por un lado, estimula la vía intra aerobia de consumo de metano reflejando en un aumento en el número de enzimas de la cadena de transporte de electrones y por el otro, inhibiendo la comunidad de microorganismos metanógenos (Cheng et al., 2019). Debido a que hasta este momento, no se cuenta con la información a detalle del mecanismo de acoplamiento, se especula que este proceso podría estar llevándose a cabo en nuestro sistema de igual forma, sin embargo se requiere verificar con herramientas moleculares.

#### 7.5.1 Capacidad aceptora de electrones de las sustancias húmicas, ciclo II

El la Figura 10 se aprecia cómo, al pasar los días de incubación, la reducción de las sustancias húmicas fue en aumento (Ver Tabla 13). En este ciclo se observó una tendencia en cuanto a la capacidad de reducción de las SH, de acuerdo a la condición fijada en cada tratamiento, es decir, el tratamiento que sólo contenía metano, propiciaría aún más la reducción de las SH, debido a que era una fuente donadora de electrones extra en el sistema, fenómeno que posteriormente se confirmó al calcular la máxima pendiente alcanzada, que para este caso en particular fue de 402.8 µmol L<sup>-1</sup> día, el doble que la del tratamiento 1 donde al estar en contacto un donador y un aceptor externos, los sitios activos redox de las SH estarían en contaste cambio de estado de oxidación. Por otro lado, también se

observa reducción de sustancias húmicas en el tratamiento donde no hay donadores externos (en ausencia de metano), lo cual nos indica que los donadores endógenos del sitio como nitratos, sulfatos o hierro propiciaron la reducción de los grupos quinona de las sustancias húmicas.



**Figura 10.** Reducción de sustancias húmicas por método de la ferrozina, ciclo II. Los símbolos representan los siguientes tratamientos: (○) SH-PP + <sup>13</sup>CH<sub>4</sub> + <sup>15</sup>N<sub>2</sub>O; (□) Sed + <sup>13</sup>CH<sub>4</sub>; (◆) Sed-PP + <sup>15</sup>N<sub>2</sub>O; (■) Sed-PP + <sup>13</sup>CH<sub>4</sub> + <sup>15</sup>N<sub>2</sub>O + Estéril

Este hallazgo sugiere que es necesario más ciclos incubación para minimizar la actividad endógena. Este hecho apoya la reducción tan alta de óxido nítrico en ausencia de metano (Ver Tabla 2). Finalmente, el control estéril tiene una tendencia mucho menor a reducirse (ver tabla 13), pero aun así se encuentra presente, esto podría ser posible a gracias a una interacción química y no biológica.

T

**Tabla 13.** Velocidades de reducción de SH. PP, ciclo II.

<b>Velocidades de reducción de SH-PP (<math>\mu\text{mol L}^{-1} \text{ día}^{-1}</math>)</b>	
HS-PP/ $^{13}\text{CH}_4$	402.86 29.04
HS-PP / $^{15}\text{N}_2\text{O}$	232.74 +- 35
HS-PP	206.01 +- 8.14
HS-PP / $^{13}\text{CH}_4$ / $^{15}\text{N}_2\text{O}$	195.40 +-26.44
HS-PP -Estéril	117.10- 17.58

### 7.6 Biotransformación simultánea mediada por SH: Porcentaje de $^{15}\text{N}_2\text{O}$ explicado por la mineralización de metano

Con los datos obtenidos hasta el momento, es posible enlazar la OAM dependiente de óxido nitroso. El balance de miliequivalentes de electrones (meqv  $e^-$ ) con respecto al  $^{15}\text{N}_2\text{O}$  consumido y el  $^{13}\text{CO}_2$  producido fue calculado con la ecuación 2. Los datos empleados fueron los obtenidos al día 4 para el ciclo I y al día 9 para el ciclo II. Para este procedimiento fueron corregidos los valores de  $^{13}\text{CO}_2$ , sustrayendo el observado proveniente de las SH-PP en el ciclo II tratamiento 3 y el óxido nitroso consumido del tratamiento que no contenía metano pero si SH-PP. Hay que recordar que la oxidación completa de un mol de metano hasta dióxido de carbono, dona 8 equivalentes reductores y la reducción de óxido nitroso a nitrògeno molecular requiere de 2 equivalentes reductores.

Por lo tanto;

$$\text{meqv } e^- \text{ donados} = {}^{13}\text{CO}_2 \text{ producido} \left( \frac{\text{mmol}}{\text{L}} \right) \times \left( \frac{8 \text{ meqv } e^-}{\text{mmol } {}^{13}\text{CO}_2} \right)$$

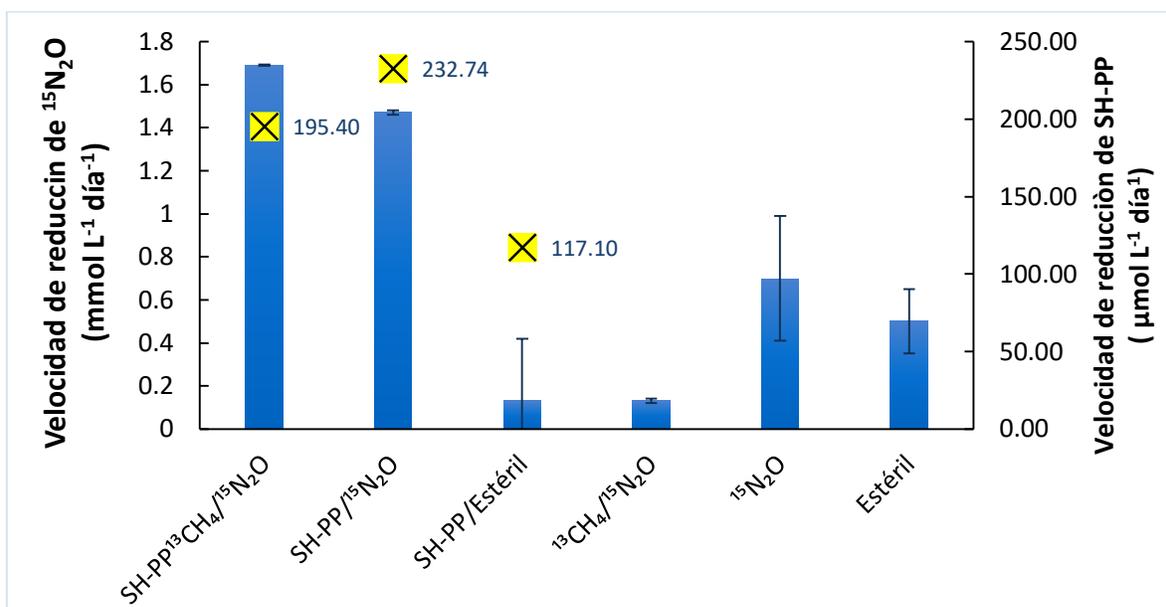
$$\text{meqv } e^- \text{ recuperados} = {}^{15}\text{N}_2\text{O} \text{ consumido} \left( \frac{\text{mmol}}{\text{L}} \right) \times \left( \frac{2 \text{ meqv } e^-}{\text{mmol } \text{N}_2\text{O}} \right)$$

Finalmente se dividen los electrones utilizados, en este caso para la reducción de óxido nitroso entre los donados por el  $^{13}\text{CO}_2$

Con respecto al ciclo I, se obtiene que sólo el 39% de metano mineralizado pudo responder por la reducción de  $^{15}\text{N}_2\text{O}$  observada, como lo mencionaba en secciones anteriores, este bajo porcentaje se debe a que, hasta este momento, no se habían agotado los donadores de electrones ingtrínsecos, por lo que estos estaban siendo utilizados en lugar del gas metano.

Para el caso del ciclo II, se logró un balance del 100% es decir, la cantidad de metano mineralizado (fuente donadora de electrones) fue suficiente para la reducción de  $^{15}\text{N}_2\text{O}$  observada en el tratamiento 1.

Con estos datos evidenciamos por vez primera el acoplamiento de ambos gases mediado por SHPP. Ya que como se puede observar en la Figura 11. A mayor velocidad de reducción de  $^{15}\text{N}_2\text{O}$ , converge la tasa de reducción de SH-PP.

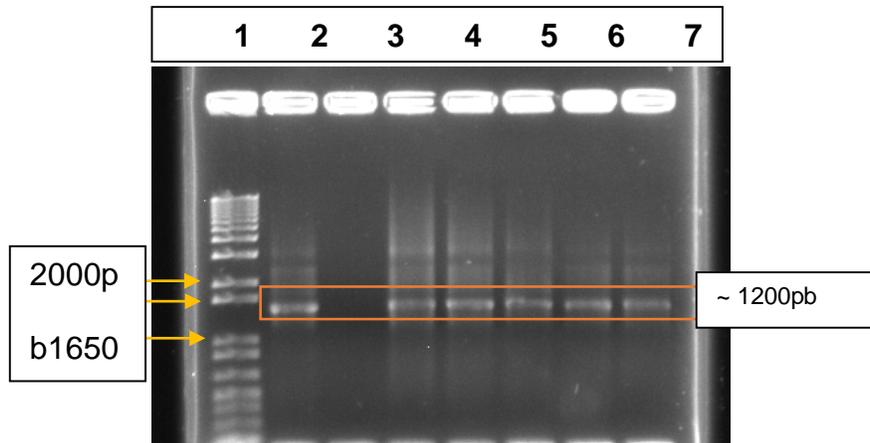


**Figura 11.** Correspondencia de la velocidad de reducción de óxido nitroso (barras azules) y la capacidad reductora de las SH (cuadros amarillos).

## 7.6 Extracción de DNA y PCR basado en 16s rRNA

La extracción de DNA se llevó a cabo como se describió previamente en la sección de materiales y métodos. Las 24 muestras provenientes de los 8 tratamientos fueron amplificadas por PCR convencional para el gen 16s rRNA y

posteriormente de éstas, sólo 3 muestras (tratamiento, 1, 2, y 3) y tres controles (Geobacter, control desnitrificante y control metanogénico) fueron corridas en un gel de agarosa 1X para visualizar los productos de PCR. Como se puede observar en la Figura 6, la banda del producto de amplificación esperado ~ 1200pb se hizo presente, lo cual nos indicó que las extracciones fueron correctas y el DNA era viable para seguir con los pasos posteriores de los análisis moleculares.



**Figura 12.** Productos de amplificación del gen 16s rRNA en gel de agarosa 1X y tinción con bromuro de etidio. Los pozos contienen la muestra en el siguiente orden: 1, Marcador de peso molecular 1kb Plus DNA Ladder; 2, Control positivo con Geobacter; 3, control negativo; 4, control metanogénico; 5, control desnitrificante; 6, tratamiento 1; 7, tratamiento 2; 8, tratamiento 3. La Bandas fueron visualizadas en un transiluminador bajo luz UV.

Las muestras de todos los tratamientos fueron evaluadas también de manera visual en geles de agarosa (No mostrados en este documento).

### 7.5 Detección del gen funcional *nosZ*

Se decidió evaluar si en las muestras de ADN extraídas del sedimento Sisal, se encontraba el gen funcional *nosZ* Clado I y II. Grandes esfuerzos fueron hechos para lograr la amplificación por PCR convencional para el clado I de este gen. Sin embargo, después de cuantiosas combinaciones de metodologías (cambios en la temperatura de alineación, uso de reactivos, taq. Polimerasas, condiciones en el

termociclador, concentración y limpieza de éstas) éste fue amplificado en solamente en 2 ocasiones por lo que al no seguir un patrón constante de visualización, se optó por no seguir con esta exploración. Las condiciones de operación a las que se pudo llevar a cabo fueran las descritas por Conthe et al., (2018). El gel de agarosa al 2% puede ser visualizado en la sección de anexos como evidencia.

Para el caso del Clado II, existieron las mismas problemáticas acerca de la amplificación; sin embargo, es sabido que las propiedades que presente la muestra ambiental impactan directamente en el grado de dificultad y eficiencia en términos de extracción y la purificación del DNA (Roose-Amsaleg et al., 2001). Por ejemplo, en nuestro caso, el periodo de extracción, limpieza, amplificación y clonación fue extenso, alrededor de cuatro meses; sin embargo, esto se debió a 2 hechos claves que se deben tomar a consideración: 1) el alto contenido de materia orgánica de nuestra muestra, ya que ésta proviene de sedimentos de humedales y, como se dijo anteriormente, estos sistemas acuáticos son los principales reservorios de carbono en la biósfera y una alta fracción es humus, el cual está compuesto de polifenoles, que son inhibidores en las reacciones de PCR.

2) No es biomasa, sino una muestra ambiental compleja que sólo fue puesta en incubación alrededor de 2.5 meses. Este periodo de tiempo es corto y más si en procesos biológicos se encuentran involucradas arqueas o bacterias con tiempos de duplicación muy bajos por lo que es muy compleja su detección al no encontrarse de manera abundante en la composición de la comunidad.

Otras posibles causas por las cuales no se logró la amplificación puede ser porque la concentración del ADN de las muestras fue muy baja. Por ejemplo, de manera convencional, en un PCR deben utilizarse de 80 a 100 ng/μL de muestra y, al evaluar las concentraciones en las muestras del presente estudio, estaban muy por debajo de este número (~10 ng/μL) y llevarlas a esta concentración, implicaba aumentar el volumen de trabajo y por ende los inhibidores presentes en la muestra. Para solucionar este problema, se acudió a extraer el agua de nuestras muestras por evaporación para concentrar el ADN, pero los resultados no nos favorecieron.

En este caso, para aminorar el efecto de los inhibidores y maximizar el rendimiento del DNA extraído, fueron empleados lavados de PBS antes del protocolo de extracción (Descrito en la sección de materiales y métodos) y, posterior a éste, una limpieza y precipitación con Fenol, Cloroformo y alcohol isoamílico y (Sambrook, J.; Fritsch, E. F. and Maniatis, 1989)

## 7.6 Clonación y secuenciación

Después de obtener las mejores condiciones para la amplificación del clado II del gen *nosZ*, éste fue clonado en el vector pGEM t easy de promega, células de *E.coli* químicamente competentes fueron transformadas (línea celular DH5α) y cultivadas en medio LB (ver mapa del vector y cultivos en placa en sección de anexos) y para finalmente ser secuenciadas como se describió en la sección 6.21

Este suceso tuvo baja probabilidad de éxito, por lo que después de un esfuerzo de muestreo de alrededor de 70 muestras por tratamiento (verificación del inserto en las clonas, ver imágenes en anexos) se decidió fijar una n=10 respecto a las clonas positivas como población representativa de cada tratamiento y alcanzado este número se enviaron a secuenciación. A pesar de esto, en el tratamiento completo, el número tuvo mayores dificultades para su clonación y el esfuerzo de muestreo fue de alrededor de 100 clonas verificadas.

Las secuencias obtenidas fueron procesadas para eliminar fragmentos de vector restantes, esto a través de la herramienta VecScreen, y finalmente se realizó un alineamiento a través de BLAST. Para determinar el % de similitud con secuencias de microorganismos que contienen en su genoma esa enzima.

## 7.7 Comunidad microbiana basada en el clado II del gen *nosZ*

Las secuencias evaluadas, fueron agrupadas en varios filos. En la Tabla 9 se puede apreciar que el tratamiento tuvo una influencia sobre la población, pues dependiendo de éste se observó la estructura en la comunidad microbiana. Cabe destacar que un alto número de secuencias codificó para la proteína **óxido nítrico reductasa**, lo que sustenta aún más nuestros resultados.

Hasta este momento, el filo predominante y presente en todos los tratamientos fue Bacteroidetes, con una especie en particular *Arenibacter algicola*. Otra particularidad fue que en el tratamiento 1, se encontró una mayor diversidad de especies, que en ningún caso se comparten con los demás tratamientos, resulta interesante este hallazgo, debido a que se amplía el panorama sobre la estructura de la comunidad. Sin embargo, a pesar de que el número de especies fue mayor en el tratamiento 1, el 50 % pertenece a *Arenibacter algicola*, lo que nos indica que esta especie tiene una preferencia de nicho.

La termodinámica describe el comportamiento y la funcionalidad de un sistema y en los sistemas biológicos la transferencia y aprovechamiento de energía es vital para el mantenimiento y generación de Biomasa. Autores sugieren, la posible estructuración de una comunidad bacteriana debida a un gradiente eco termodinámico, donde los metabolitos o productos originados por una comunidad y dependiendo de su potencial redox, impactan directamente en la composición de la comunidad subsecuente, favoreciendo el desequilibrio energético de ambientes donde la oxidación de los sustratos tiene bajos rendimientos energéticos un ejemplo para redox  $\text{CO}_2/\text{CH}_4$  CON UN  $E^\circ = -240 \text{ mV}$  con recursos limitados; además datos moleculares obtenidos de apuntan que este tipo de microorganismos participan en los ciclos del sulfuro y nitrógeno. (Hawley A. et al., 2017) creando relaciones simbióticas para maximizar el rendimiento energético. Este fenómeno puede suceder en este tipo de ecosistemas de donde proviene el sedimento Sisal, debido a que los gradientes de óxido reducción delimitan zonas claramente dentro de la columna de agua, las cuales pudieran estar asociados a comunidades

En este caso, encontramos secuencias que se relacionan con bacterias ya reportadas y sus velocidades de consumo para el óxido nitroso, la cual dependerá de la concentración del sustrato. Es decir, en un ambiente donde los recursos son limitados, hablando del caso del óxido nitroso, la estrategia de crecimiento de los microorganismos estará definida por la constante de afinidad por el sustrato ( $K_s$ ), por ejemplo, si  $K_s$  es baja, indica mayor preferencia por éste, pero implica una menor velocidad de consumo, o viceversa, si existen entradas altas de N al sistema.

La característica que guiará a la composición de la comunidad microbiana será una velocidad máxima ( $V_{max}$ ) de consumo de sustrato, independiente de la  $K_s$ . En este estudio (Yoon, S. et al., 2016) no se evaluaron incubaciones con distintas concentraciones de sustrato, por lo que no se puede hacer una comparación en ese aspecto, pero las secuencias de microorganismos encontrados se encuentran muy cercanas a aquellas reportadas con valores bajos de  $K_s$ , como es el caso de *D. Denitrificans*, es decir, las especies encontradas podrían comportarse como las especies clave en sistemas acuáticos como sumideros de  $15N_2O$  con bajas entradas de N.

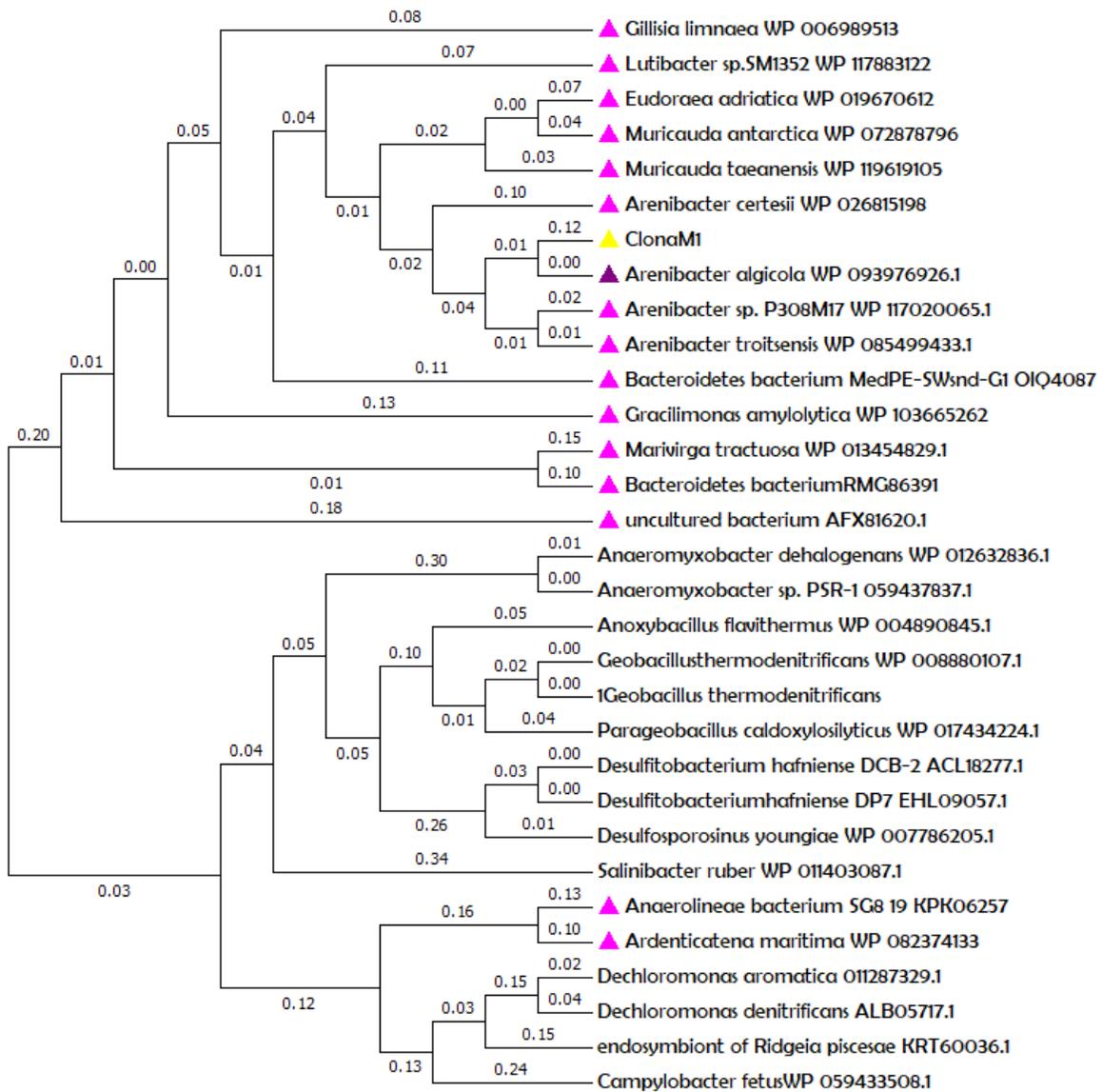
La abundancia del clado II ha sido evidenciada en varios estudios; por ejemplo, (Juhanson, Hallin, Söderström, Stenberg, & Jones, 2017) reportaron que a través de un muestreo en 44 hectáreas de cultivo, a 10 cm del suelo, la abundancia del clado II fue superior y se correlacionó con factores ambientales, como la cantidad de carbón disuelto, Cu, contenido de fósforo y agua. Sin embargo, lo más destacado de este hallazgo fue la composición de la comunidad microbiana, la cual dentro del clado II, se encontró que la mayoría de lecturas, alrededor de un 45 % fueron del filo de Gemmatimonadetes y sólo un 12% pertenecientes a Bacteroidetes. Estos hallazgos, apoya los resultados obtenidos en esta tesis a nivel de filo, si bien no se evaluó toda la comunidad, se destaca la presencia del filo Bacteroidetes como predominante y con presencia del gen *nosZ II*

De manera general, algunos autores describen que el clado I de *nosZ* es predominante en varios ambientes, debido a que estos microorganismos se agrupan dentro de los desnitrificantes convencionales. Por otro lado, se ha documentado que el clado II es mucho menor en sedimentos costeros (Wittorf et al., 2016) (Dini-Andreote, Brossi, van Elsas, & Salles, 2016), pero puede tener mayor relevancia en cuanto a la capacidad de definir si un sitio funge como sumidero de  $N_2O$  en sistemas acuáticos.

En otros trabajos como el de Jones, C.M. y colaboradores (2014) sugieren que la capacidad de un suelo de actuar como sumidero de  $N_2O$  se ve incrementada

términos de abundancia del clado II con respecto al Clado I. Factores como la relación C/N, textura del suelo, Ph y siendo este último un factor que influye en mayor medida en la abundancia del Clado II, además, un análisis filogenético de 47 suelos, sobre el gen *nosZ* arrojó que del total de muestras analizadas, el 40% eran similares a secuencias de *nosZ* del filo *Bacteroidetes*, lo que apoya los resultados de esta tesis, aunque necesitaríamos mapear toda la población y no sólo dirigirnos al gen funcional para, tomar este dato como referencia, sin embargo está claro que este filo destaca dentro del nicho de bacterias reductoras de óxido nitroso, al menos en nuestro sistema.

Finalmente, debido al tiempo requerido para la obtención de clones, en este trabajo no fueron incluidos los genes *pmoA* y *mcr* mismo que son marcadores para describir comunidades metanotróficas, por lo tanto, esta vertiente nos deja la incertidumbre de quiénes podrían estar participando en este sistema cometabólico propuesto.



**Figura 13.** Relaciones evolutivas de los taxones basadas en el clado II del gen *nosZ*\*.

\*La historia evolutiva se infirió utilizando el método de unión de vecinos [1]. Se muestra el árbol óptimo con la suma de la longitud de rama = 4.26273573. (junto a las ramas). Las distancias evolutivas se calcularon utilizando el método de corrección de Poisson [2] y están en unidades del número de sustituciones de aminoácidos por sitio. El análisis involucró 31 secuencias de aminoácidos. Se eliminaron todas las posiciones que contienen huecos y datos faltantes. Hubo un total de 209 posiciones en el conjunto de datos final. Los análisis evolutivos se realizaron en MEGA7 [3].

## 7.8 Relaciones evolutivas

Se secuenciaron un total de 80 clonas, con las cuales se obtuvieron los resultados desglosados de la Tabla 11. A partir de las secuencias obtenidas por secuenciación, fue posible hacer un análisis comparativo a nivel de proteína, con base en el gen nosZII, construyéndose el árbol filogenético mostrado en la Figura 12 con el Software MEGA 7.

La Figura 11, muestra las relaciones filogenéticas a nivel de la proteína de las clonas aisladas de cada tratamiento. Todas las secuencias presentaron similitud con la proteína óxido nitroso reductasa dependiente de Sec o TAT reportada en la base de datos del NCBI, con 653 a 655 a.a. Esta proteína es la encargada de catalizar la reacción de  $\text{N}_2\text{O}$  a  $\text{N}_2$ , la cual a través del dominio TAT o Sec, será traslocada a la periferia de la membrana celular para su llevar a cabo su función. Las secuencias de las proteínas encontradas en esta investigación fueron alineadas a través de BLAST<sub>x</sub> y las especies encontradas que contenían una secuencia similar al menos en un 80% de identidad con la nuestra muestra, fueron seleccionadas y se encuentran marcadas con un círculo en color azul e. Las demás especies son cepas encontradas en la literatura que se han reportado como portadoras del gen nosz II y posibles candidatas del sumidero de  $\text{N}_2\text{O}$  como el caso de *A. dehalogenes* que ha sido previamente caracterizada y crecida en  $\text{N}_2\text{O}$  como única fuente de energía.

**Tabla 14.** Caracterización filogenética de la composición de muestras de sedimento por tratamiento.

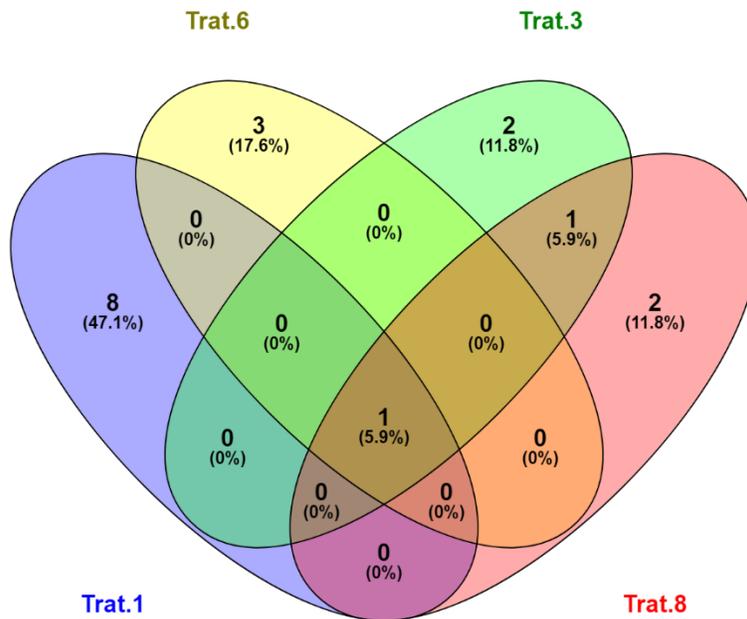
TRATAMIENTO	Filo	Familia	Género	Especie	No. de especies
<b>Sed-PP+<sup>13</sup>CH<sub>4</sub> + <sup>15</sup>N<sub>2</sub>O</b>	Bacteroidetes	Flavobacteriaceae	Arenibacter	<i>Arenibacter algicola</i>	8
	Bacteroidetes	Flavobacteriaceae	Gillisia	<i>Gillisia limnaea</i>	1
	Bacteroidetes	Flavobacteriaceae	Ludibacter	<i>Lutibacter sp. SM1352</i>	1
	Bacteroidetes	Flavobacteriaceae	Arenibacter	<i>Eudoraea adriatica</i>	1
	Bacteroidetes	Flavobacteriaceae	Arenibacter	<i>Arenibacter certesii</i>	1
	Bacteroidetes	.----	.-----	<i>Bacteroidetes bacterium MedPE-SWsnd-G1</i>	1
	Bacteroidetes	Flavobacteriaceae	Muricauda	<i>Muricauda taeanensis</i>	1
	Bacteroidetes	Flavobacteriaceae	Muricauda	<i>Muricauda antarctica</i>	1
<b>Sed+PP + <sup>15</sup>N<sub>2</sub>O</b>	Bacteroidetes	Flavobacteriaceae	Arenibacter	<i>Arenibacter sp. P308M17</i>	1
	Bacteroidetes	Flavobacteriaceae	Arenibacter	<i>Arenibacter algicola</i>	6
	Bacteroidetes	Flavobacteriaceae	Aequorivita	<i>Aequorivita aquimaris_</i>	1
	Bacteroidetes	Flammeovirgaceae	Marivirga	<i>Marivirga tractuosa</i>	1
<b>Sed+PP</b>	.-----	.-----	.-----	<i>uncultured bacterium</i>	1
	.-----	.-----	.-----	<i>uncultured bacterium</i>	1
	Bacteroidetes	Flavobacteriaceae	Arenibacter	<i>Arenibacter algicola</i>	8

**Tabla 14. Continuación.**Caracterización filogenética de la composición de muestras de sedimento por tratamiento.

TRATAMIENTO	Filo	Familia	Género	Especie	No. de especies
<b>Sed+<sup>13</sup>CH<sub>4</sub> +<sup>15</sup>N<sub>2</sub>O</b>	Bacteroidetes	Flavobacteriaceae	Arenibacter	<i>Arenibacter algicola</i>	5
	Chloroflexi	Ardenticatenaceae	Ardenticatena	<i>Ardenticatena maritima</i>	1
	Bacteroidetes	.-----	.-----	<i>Bacteroidetes bacterium</i>	1
	Balneolaeota	Balneolaceae	Gracilimonas	<i>Gracilimonas amylolytica</i>	1
	Bacteroidetes	.-----	.-----	<i>Bacteroidales bacterium 6E</i>	1
<b>Sed+<sup>15</sup>N<sub>2</sub>O</b>	Cyanobacteria	Synechococcaceae	Synechococcus	<i>Synechococcus</i> sp. <i>PCC 7335</i>	1
	Bacteroidetes	Flavobacteriaceae	Arenibacter	<i>Arenibacter algicola</i>	6
	Bacteroidetes	Flavobacteriaceae	Arenibacter	<i>Arenibacter troitsensis</i>	1
	.-----	.-----	.-----	<i>uncultured bacterium</i>	1
	Bacteroidetes	Paludibacteraceae	Paludibacter	<i>Paludibacter</i> sp. SCN 50-10	1
<b>Sedimento</b>	Bacteroidetes	Flavobacteriaceae	Arenibacter	<i>Arenibacter algicola</i>	2
	Chloroflexi	No clasificada Anaerolineae	No Clasificada	<i>Anaerolineae bacterium</i> <i>SG8_19</i>	1
	.-----	Bacteria clasificada	Bacteria no clasificada (miscellaneous)	<i>Bacterium I07</i>	1
	Bacteroidetes	Bacteroidales	No clasificada Bacteroidales (miscellaneous)	<i>Bacteroidales bacterium</i> <i>36-12</i>	2

## 8 Diagrama de Venn

El diagrama de Venn es la muestra gráfica, práctica y representativa de evidenciar lo que ya se había descrito en secciones anteriores, que la especie *Arenibacter algicola* se presentó en todas las condiciones evaluadas para el gen *nosZII* a las que expusimos los microcosmos. Este hallazgo está representado a través de la Figura 14. Donde, para esta evaluación, sólo los tratamientos 1, 3, 8 y 6 se designaron como un todo, para que de esta manera contemplar qué elemento, en este caso especie dentro de la población, se comparte entre ellos.



**Figura 14.** Diagrama de Venn que contempla dos tratamientos con SH (tratamiento 1 y 3) y dos sin SH (tratamiento 6 y 8), donde cada objeto representa el número de especies encontradas por muestreo dentro de cada tratamiento.

En este caso a través del diagrama de Venn y con base en las teorías de conjuntos se observa indudablemente que un sólo un objeto, la bacteria *Arenibacter algicola*, representada por un bajo porcentaje (5.9%). Si contemplamos sólo el sistema

utilizado en esta tesis, pudiera decirse que *A. algicola* podría desempeñarse como una especie generalista, es decir, que a pesar de las fluctuaciones del sistema, (cambio de atmósfera, fuente de carbono, SH externas o adición de metano y óxido nitroso) ésta siempre va a estar presente debido a su versatilidad en el aprovechamiento de recursos. Muy posiblemente, el hecho de que se encuentre en diferentes condiciones, pueda deberse a su amplio espectro nutricional, al momento, se ha reportado que esta especie es capaz de metabolizar sustratos como glucosa, arabinosa, m-inositol, fructuosa, Tween 20, glicerol, D-sorbitol, dextrina entre otros. Además, es capaz de crecer con sustratos como fenol, naftaleno y fenantreno pertenecientes al grupo de hidrocarburos poli cíclicos aromáticos, aunado presenta ligera halotolerancia, creciendo hasta en una concentración de 6% de NaCl (Gutierrez, T. et al., 2014) lo que apoya la presencia de la especie en este sedimento, ya que este humedal es costero y tiene presencia de entradas oceánicas al sistema.

Finalmente, los factores ambientales, especialmente edáficos en ambientes acuáticos, juegan un rol importante dentro del ensamblaje y diferenciación de nicho de las comunidades. Las características dinámicas como, fluctuaciones de temperatura, reciclaje de nutrientes, salinidad, pueden ejercer presión sobre la diferenciación en la estructura de la población microbiana haciéndolas por un lado especies generalistas, fenómeno observado en comunidades bacterianas de las costas, quienes son capaces de metabolizar una vasta cantidad de compuestos orgánicos, o especialistas formando redes sintróficas (Mou, X. et al., 2008).

En esta investigación es complicado definir el rol que juega la bacteria *A. algicola*, debido a que no conocemos el resto de la estructura de la población pero, hasta este momento, esta es la primera evidencia que apunta a esta especie como probable candidata para actuar como sumidero de N<sub>2</sub>O en humedales costeros Mexicanos.

## 9. CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS

La evidencia analítica (mineralización de metano y reducción de óxido nitroso) demuestra que la adición de SH externas, permitió aumentar la velocidad de consumo de óxido nitroso hasta 4 veces con respecto al tratamiento sin SH, en la condición de supresión simultánea de metano y óxido nitroso. Por lo que, hasta la fecha, este es el primer reporte que muestra el papel que podrían desempeñar las SH en este tipo de ecosistemas enlazando a través de estos gradientes energéticos a dos comunidades especialistas en su nicho.

Finalmente, a través del ciclo II se puede deducir que el óxido nitroso es transformado en un 81% a nitrógeno gas y a través la mineralización del metano el proceso fue 100% sustentado. Por otro lado, es posible que en ambientes con estas características, ese alto porcentaje de  $N_2O$  sea suprimido en el sitio antes de ser liberado a la atmósfera.

Hallazgos importantes en función del gen *nosZ* del clado II se hicieron evidentes, éste fue observado en los sedimentos del humedal Sisal en todos los tratamientos evaluados, los datos arrojados nos evidencian que las especies no presenta diversidad dentro de nuestro sistema, sino que apunta a *A. algicola* como una posible especie generalista y reductora de  $N_2O$ .

A la fecha solo existe un reporte sobre la oxidación anaerobia de metano dependiente de óxido nitroso, la cual fue llevada a cabo en microcosmos similares a los descritos en esta tesis y derivada de actividad de sedimentos de un humedal artificial, dicha investigación sugiere que a través de datos meta genómicos, es posible que una especie microbiana no identificada sea la responsable por la oxidación de metano.

## 9.1. Perspectivas

- Para tener una mayor certeza del proceso complejo que se quiere evaluar, es necesaria un mayor número de muestras del sitio para que los resultados puedan ser más cercanos a la realidad. Por lo que un mayor número de muestras debe ser contemplada.
- Debido a la complejidad del sedimento, no se pudo detectar el gen funcional nosZI, el cual complementaría la información acerca de la comunidad microbiana. En este sentido, se sugiere explorar más métodos de limpieza de muestras con alto contenido de materia orgánica o probar con otro diseño de primers, ya sean reportados en la bibliografía o diseñar los propios.
- Conocer la composición de la comunidad microbiana a mayor escala, es un reto clave para entender la dinámica de este tipo de sistemas complejos, por lo que el estudio meta genómico del sedimento Sisal través de PCR cuantitativa, nos arrojaría resultados contundentes sobre su papel como sumidero o emisor.
- Experimentos en dos fases, primero de oxidación de metano y al finalizar, inyectar el óxido nitroso, debieron ser evaluados para esclarecer el grado de reducción u oxidación de las sustancias húmicas, en este sentido, valdría la pena explorar técnicas fisicoquímicas más finas como voltamperometrías.
- Por otro lado, la exploración de minerales en los sedimentos, nos brindará una mayor comprensión de la disponibilidad de los elementos para los microorganismos y como los ciclos biogeoquímicos del C y N pueden llegar a unirse. Para esta etapa los análisis de XRD y XPS serán necesarios.

## 10 BIBLIOGRAFÍA

- Aeschbacher, M., Sander, M., & Schwarzenbach, R. P. (2010). Novel electrochemical approach to assess the redox properties of humic substances. *Environmental Science and Technology*, 44(1), 87–93. <https://doi.org/10.1021/es902627p>
- APHA, AWWA, WEF, Standard Methods for the examination of water and wastewater, 20th ed. American Public Health Association, Washington, DC, USA, 1998.
- Aranda-Tamaura, C., Estrada-Alvarado, M. I., Texier, A.-C., Cuervo, F., Gómez, J., & Cervantes, F. J. (2007). Effects of different quinoid redox mediators on the removal of sulphide and nitrate via denitrification. *Chemosphere*, 69(11), 1722-1727. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2007.06.004>
- Aselmann, I., & Crutzen, P. J. (1989). Global distribution of natural freshwater wetlands and rice paddies, their net primary productivity, seasonality and possible methane emissions. *Journal of Atmospheric chemistry*, 8(4), 307-358
- Avrahamov, N., Antler, G., Yechieli, Y., Gavrieli, I., Joye, S. B., Saxton, M., ... & Sivan, O. (2014). Anaerobic oxidation of methane by sulfate in hypersaline groundwater of the Dead Sea aquifer. *Geobiology*, 12(6), 511-528.
- Bastviken D, Cole J, Pace M, Tranvik L (2004) Methane emissions from lakes: dependence of lake characteristics, two regional assessments, and a global estimate. *Global Biogeochemical Cycles*, 18, GB4009, doi: 10.1029/2004GB002238
- Bastviken D, Tranvik LJ, Downing JA, Crill PM, Enrich-Prast A (2011) Freshwater methane emissions offset the continental carbon sink. *Science*, 331, 50
- Boetius, A., Ravensschlag, K., Schubert, C. J., & Rickert, D. (2000). A marine microbial consortium apparently mediating anaerobic oxidation of methane. *Nature*, 407(6804), 623.

- Braker G, Conrad R. 2011 Diversity, structure, and size of N<sub>2</sub>O-producing microbial communities in soils—what matters for their functioning? *Adv. Appl. Microbiol.* 75, 33–70. (doi:10.1016/B978-0-12-387046-9.00002-5)
- Bridgham SD, Cadillo-Quiroz H, Keller JK, Zhuang Q. 2013. Methane emissions from wetlands: biogeochemical, microbial, and modeling perspectives from local to global scales. *Glob Chang Biol* 19:1325–1346. <http://dx.doi.org/10.1111/gcb.12131>
- Bussmann, I., 2005. Methane Release through Resuspension of Littoral Sediment. *Biogeochemistry* 74 (3), 283–302.
- Butterbach-Bahl K, Baggs EM, Dannenmann M, Kiese R, Zechmeister-Boltenstern S. 2013 Nitrous oxide emissions from soils: how well do we understand the processes and their controls? *Phil Trans R Soc B* 368: 20130122. <http://dx.doi.org/10.1098/rstb.2013.0122>
- Cervantes, C., Campos-García, J., Devars, S., Gutiérrez-Corona, F., Loza-Tavera, H., Torres-Guzmán, J. C., & Moreno-Sánchez, R. (2001). Interactions of chromium with microorganisms and plants. *FEMS microbiology reviews*, 25(3), 335-347.
- 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.
- Cheng, C., Shen, X., Xie, H., Hu, Z., Pavlostathis, S. G., & Zhang, J. (2019). Coupled methane and nitrous oxide biotransformation in freshwater wetland sediment microcosms. *Science of the Total Environment*, 648, 916–922. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2018.08.185>
- Chen YH, Prinn RG (2006) Estimation of atmospheric methane emissions between 1996 and 2001 using a three-dimensional global chemical transport model. *Journal of Geophysical Research*, 111, D10307, doi: 10.1029/2005JD006058.

- Chen, H.B., Liu, Y.W., Ni, B.J., Wang, Q.L., Lopes, F., Viollier, E., Thiam, A., Michard, G., Abril, G., Groleau, A., Prévot, F., Carrias, J. F., Albéric, P., Jézéquel, D., 2011. Biogeochemical modelling of anaerobic vs. aerobic methane oxidation in a meromictic crater lake (Lake Pavin, France). *Appl. Geochem.* 26 (12), 1919–1932.
- Christensen, T. R., I. C. Prentice, J. Kaplan, A. Haxeltine, and S. Sitch (1996), Methane flux from northern wetlands and tundra—An ecosystem source modelling approach, *Tellus Series B Chem. Phys. Meteorol.*, 48(5), 652–661.
- Clayer, F., Gobeil, C., & Tessier, A. (2016). Rates and pathways of sedimentary organic matter mineralization in two basins of a boreal lake: Emphasis on methanogenesis and methanotrophy. *Limnology and Oceanography*, 61(S1).
- Climate Change 2007: Working Group I: The Physical Science Basis:[https://www.ipcc.ch/publications\\_and\\_data/ar4/wg1/en/ch2s2-10-2.html](https://www.ipcc.ch/publications_and_data/ar4/wg1/en/ch2s2-10-2.html)  
29
- Climate Change 2014: Mitigation of Climate Change. Intergovernmental Panel on Climate Change
- 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.
- Cole, J., et al. (2007), Plumbing the global carbon cycle: Integrating inland waters into the terrestrial carbon budget, *Ecosystems*, 10, 172–185.
- Conrad, R. (2009) The global methane cycle: recent advances in understanding the microbial processes involved. *Environmental Microbiology Reports*, 1, 258-292.
- Conthe, M., Wittorf, L., Kuenen, J. G., Kleerebezem, R., Van Loosdrecht, M. C. M., & Hallin, S. (2018). Life on N<sub>2</sub>O: Deciphering the ecophysiology of N<sub>2</sub>O respiring bacterial communities in a continuous culture. *ISME Journal*, 12(4), 1142–1153. <https://doi.org/10.1038/s41396-018-0063-7>

- Denman KL, Brasseur G, Chidthaisong A et al. (2007) Couplings between changes in the climate system and biogeochemistry. In: *Climate Change 2007: The Physical Science Basis. Contribution of Working Group I to the Fourth Assessment Report of the Intergovernmental Panel on Climate Change* (eds Solomon S, Qin D, Manning M, Chen Z, Marquis M, Averyt KB, Tignor M, Miller HL), pp. 501–587. Cambridge University Press, Cambridge, UK and New York, NY
- Dini-Andreote, F., Brossi, M. J. de L., van Elsas, J. D., & Salles, J. F. (2016). Reconstructing the genetic potential of the microbially-mediated nitrogen cycle in a salt marsh ecosystem. *Frontiers in Microbiology*. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.00902>
- Dutaur, L. and Verchot, L. V.: A global inventory of the soil CH<sub>4</sub> sink, *Global Biogeochem. Cy.*, 21, GB4013, doi:10.1029/2006gb002734, 2007.
- Eaton A.D., Clescheri A.D. y A.E. Greenberg. 1998. *Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater*, American Public Health Association, Washington.
- Gutierrez, T., Rhodes, G., Mishamandani, S., Berry, D., Whitman, W. B., Nichols, P. D., ... & Aitken, M. D. (2014). Polycyclic aromatic hydrocarbon degradation of phytoplankton-associated *Arenibacter* spp. and description of *Arenibacter algicola* sp. nov., an aromatic hydrocarbon-degrading bacterium. *Applied and environmental microbiology*, 80(2), 618-628.
- Hawley, A. K., Nobu, M. K., Wright, J. J., Durno, W. E., Morgan-Lang, C., Sage, B., ... & Mewis, K. (2017). Diverse Marine microbia bacteria may mediate coupled biogeochemical cycles along eco-thermodynamic gradients. *Nature communications*, 8(1), 1507.
- Forster P et al. 2007 Changes in atmospheric constituents and in radiative forcing. In *Climate change 2007: the physical science basis. Contribution of working group I to the fourth assessment report of the intergovernmental panel on*

- climate change (eds S Solomon, D Qin, M Manning, Z Chen, M Marquis, KB Averyt, M Tignor, HL Miller). Cambridge, UK: Cambridge University Press.
- Hallin, S., Philippot, L., Löffler, F. E., Sanford, R. A., & Jones, C. M. (2017). Genomics and ecology of novel N<sub>2</sub>O-reducing microorganisms. *Trends in Microbiology*.
- Hanson, R. S. and Hanson, T. E.: Methanotrophic bacteria, *Microbiol. Molecular Biol. Rev.*, 60, 439–471, 1996.
- Hernández, M. E. (2010). Suelos de humedales como sumideros de carbono y fuentes de metano. *Terra Latinoamericana*, 28(2), 139-147.
- Highton, M. et al. (2016) Physical factors correlate to microbial community structure and nitrogen cycling gene abundance in a nitrate fed eutrophic lagoon. *Front. Microbiol.* 7, 1691
- Huttunen JT, Juutinen S, Alm J, Larmola T, Hammar T, Silvola J, Martikainen PJ (2003b) Nitrous oxide flux to the atmosphere from the littoral zone of a boreal lake. *J Geophys Res Atmos* 108:D14. doi:10.1029/2002JD002989
- IPCC 2007. Qin, D., Chen, Z., Averyt, K. B., Miller, H. L., Solomon, S., Manning, M., ... & Tignor, M. (2007). IPCC, 2007: Summary for Policymakers.
- IPCC 2014. Edenhofer, O., Pichs-Madruga, R., Sokona, Y., Farahani, E., Kadner, S., Seyboth, K., ... & Kriemann, B. (2014). IPCC, 2014: summary for policymakers. *Climate change*.
- Islas-Lima, S., Thalasso, F., & Gomez-Hernandez, J. (2004). Evidence of anoxic methane oxidation coupled to denitrification. *Water Research*, 38(1), 13-16.
- Jones, C. M., Graf, D. R. H., Bru, D., Philippot, L., & Hallin, S. (2013). The unaccounted yet abundant nitrous oxide-reducing microbial community: A potential nitrous oxide sink. *ISME Journal*, 7(2), 417–426. <https://doi.org/10.1038/ismej.2012.125>
- Jones, C. M., Spor, A., Brennan, F. P., Breuil, M. C., Bru, D., Lemanceau, P., ... &

- Philippot, L. (2014). Recently identified microbial guild mediates soil N<sub>2</sub>O sink capacity. *Nature Climate Change*, 4(9), 801.
- Juhanson, J., Hallin, S., Söderström, M., Stenberg, M., & Jones, C. M. (2017). Spatial and phyloecological analyses of nosZ genes underscore niche differentiation amongst terrestrial N<sub>2</sub>O reducing communities. *Soil Biology and Biochemistry*. <https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2017.08.013>
- Jung, J., Choi, S., Jung, H., Scow, K. M., & Park, W. (2013). Primers for amplification of nitrous oxide reductase genes associated with Firmicutes and Bacteroidetes in organic-compound-rich soils. *Microbiology*, 159(2), 307-315
- Kayranli B, Scholz M, Mustafa A, Hedmark Å. 2010. Carbon storage and fluxes within freshwater wetlands: a critical review. *Wetlands* 30:111–124. <http://dx.doi.org/10.1007/s13157-009-0003-4>.
- Klüpfel, L., Piepenbrock, A., Kappler, A., & Sander, M. (2014). Humic substances as fully regenerable electron acceptors in recurrently anoxic environments. *Nature Geoscience*, 7(3), 195–200. <https://doi.org/10.1038/ngeo2084>
- Knittel, K., & Boetius, A. (2009). Anaerobic oxidation of methane: progress with an unknown process. *Annual review of microbiology*, 63, 311-334.
- Kortelainen P, Rantakari M, Pajunen H, Huttunen JT, Mattsson T, Juutinen S, Larmola T, Alm J, Silvola J, Martikainen PJ (2013) Carbon evasion/accumulation ratio in boreal lakes is linked to nitrogen. *Glob Biogeochem Cycle* 27(2):363–374. doi:10.1002/gbc.20036
- Kowalchuk, G. A. and Stephen, J. R.: Ammonia-oxidizing bacteria: A model for molecular microbial ecology, *Annu. Rev. Microbiol.*, 55, 485–529, 2001.
- Kumar S., Stecher G., and Tamura K. (2015). MEGA7: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 7.0 for bigger datasets. *Molecular Biology and Evolution* (submitted).
- Lehner, B., & Döll, P. (2004). Development and validation of a global database of

- lakes, reservoirs and wetlands. *Journal of Hydrology*, 296(1), 1-22.
- Li, H., Guo, J., Lian, J., Zhao, L., Xi, Z., Du, H., & Yang, J. (2013). Effective and characteristics of anthraquinone-2, 6-disulfonate (AQDS) on denitrification by *Paracoccus versutus* sp. GW1. *Environmental technology*, 34(17), 2563-2570.
- Liikanen A, Huttunen JT, Murtoniemi T, Tanskanen H, Vaisanen T, Silvola J, Alm J, Martikainen PJ (2003) Spatial and seasonal variation in greenhouse gas and nutrient dynamics and their interactions in the sediments of a boreal eutrophic lake. *Biogeochemistry* 65(1):83–103
- 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
- Martens, C. S., & Berner, R. A. (1974). Methane production in the interstitial waters of sulfate-depleted marine sediments. *Science*, 185(4157), 1167-1169.
- 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.
- Matthews, E. and Fung, I., Methane emissions from natural wetlands: Global distribution, area and environmental characteristics of sources. *Global Biogeochem. Cycles*, 1987, 1, 61–86.
- Mou, X., Sun, S., Edwards, R. A., Hodson, R. E., & Moran, M. A. (2008). Bacterial carbon processing by generalist species in the coastal ocean. *Nature*, 451(7179), 708.
- Myrstener, M., Jonsson, A., & Bergström, A. K. (2016). The effects of temperature and resource availability on denitrification and relative N<sub>2</sub>O production in boreal lake sediments. *Journal of Environmental Sciences*, 47, 82-90.
- NASA GLOBAL CLIMATE CHANGE. <https://climate.nasa.gov/effects/>. The consequences of climate change. (2017) Revisado, septiembre 2015.
- National Center for Biotechnology Information. PubChem Compound Database;

CID=297, <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/297> (accessed Sept. 27, 2017).

Oliveros, J.C. (2007-2015) Venny. An interactive tool for comparing lists with Venn's diagrams. <http://bioinfogp.cnb.csic.es/tools/venny/index.html>

Payne, W.J. et al. (1982) Nitrogen-oxidoreduction in *Wolinella succinogenes* and *Campylobacter* species. *J. Bacteriol.* 152, 915–918

Pendleton, L., Donato, D. C., Murray, B. C., Crooks, S., Jenkins, W. A., Sifleet, S., ... & Megonigal, P. (2012). Estimating global “blue carbon” emissions from conversion and degradation of vegetated coastal ecosystems. *PloS one*, 7(9), e43542. 31

Prather, M. J., Hsu, J., DeLuca, N. M., Jackman, C. H., Oman, L. D., Douglass, A. R., ... & Isaksen, I. S. (2015). Measuring and modeling the lifetime of nitrous oxide including its variability. *Journal of Geophysical Research: Atmospheres*, 120(11), 5693-5705.

Price, P. B., and T. Sowers. 2004. Temperature dependence of metabolic rates for microbial growth, maintenance, and survival. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 101: 4631–4636. doi:10.1073/pnas.0400522101

Raghoebarsing, A. A., Pol, A., Van de Pas-Schoonen, K. T., Smolders, A. J., Ettwig, K. F., Rijpstra, W. C., ... & Strous, M. (2006). A microbial consortium couples anaerobic methane oxidation to denitrification. *Nature*, 440, 918-921.

Ramulu S, Sahoo SK, Baral SS, Das SN, Swamy YV, Chaudhury GR (2008) Estimation of nitrous oxide emission from pulse cultivation in rain fed uplands. *Curr Sci* 95:584–585

Ravinshakara AR, Daniel JS, Portmann RW. 2009 Nitrous oxide (N<sub>2</sub>O): the dominant ozone-depleting substance emitted in the 21st century. *Science* 326, 123–125. (doi:10.1126/science.1176985)

Reeburgh, W. S.: Rates of biogeochemical processes in anoxic sediments. *Ann. Rev.*

- Earth Planet. Sci. 11, 269–298 (1983). Rev. Geophys. 33, 365–381 (1995).
- Roose-Amsaleg, C. L., Garnier-Sillam, E., & Harry, M. (2001). Extraction and purification of microbial DNA from soil and sediment samples. *Applied Soil Ecology*, 18(1), 47-60
- Saarenheimo, J. et al. (2015) Genetic and environmental controls on nitrous oxide accumulation in lakes. PLoS One 10, e0121201
- Sahoo SK, Ramulu TS, Kumar M, Chaudhury GR, Das SN (2010) Emission of N<sub>2</sub>O from farmers' field during black gram cultivation and incubation experiments in laboratory. *Toxicol Environ Chem* 92:1043–1052
- Saitou N. and Nei M. (1987). The neighbor-joining method: A new method for reconstructing phylogenetic trees. *Molecular Biology and Evolution* 4:406-425.
- Sambrook, J.; Fritsch, E. F. and Maniatis, T. (1989). Molecular cloning: A laboratory manual. 2nd Edition. *Cold Spring Harbor Laboratory Press*. <https://doi.org/10.1039/b813545b>
- Sanford, R.A. et al. (2012) Unexpected nondenitrifier nitrous oxide reductase gene diversity and abundance in soils. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 109, 19709–19714
- 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 humics-reducing microorganisms. *Environmental Science and Technology*. <https://doi.org/10.1021/es980272q>
- Simon, J. et al. (2004) The unprecedented nos gene cluster of *Wolinella succinogenes* encodes a novel respiratory electron transfer pathway to cytochrome c nitrous oxide reductase. *FEBS Lett.* 569, 7–12
- Solomon, S., Qin, D., Manning, M., Averyt, K., & Marquis, M. (Eds.). (2007). *Climate change 2007-the physical science basis: Working group I contribution to the fourth assessment report of the IPCC* (Vol. 4). Cambridge university press.

- Stevenson FJ (1994) Humus chemistry: genesis Syakila A, Kroeze C. 2011 The global nitrogen budget revisited. *Greenhouse Gas Meas. Manage.* 1, 17–26. (doi:10.3763/ghgmm.2010.0007)
- Tremblay A, Therrien J, Hamlin B, Wichmann E, LeDrew LJ (2005) GHG emissions from boreal reservoirs and natural aquatic ecosystems. In: Tremblay A, Varfalvy L, Roehm C, Garneau M (eds) *Greenhouse gas emissions: fluxes and processes hydroelectric reservoirs and natural environments*. Springer, Berlin, pp 209–232
- Valentine, D. L. (2002). Biogeochemistry and microbial ecology of methane oxidation in anoxic environments: a review. *Antonie van Leeuwenhoek*, 81(1), 271-282.
- Valenzuela, E. I., Avendaño, K. A., Balagurusamy, N., Arriaga, S., Nieto-Delgado, C., Thalasso, F., & Cervantes, F. J. (2019). Electron shuttling mediated by humic substances fuels anaerobic methane oxidation and carbon burial in wetland sediments. *Science of The Total Environment*, 650, 2674–2684. <https://doi.org/10.1016/J.SCITOTENV.2018.09.388>
- Valenzuela, E. I., Prieto-Davó, A., López-Lozano, N. E., Hernández-Eligio, A., Vega-Alvarado, L., Juárez, K., ... Cervantes, F. J. (2017). Anaerobic methane oxidation driven by microbial reduction of natural organic matter in a tropical wetland. *Applied and Environmental Microbiology*, 83(11), 1–15. <https://doi.org/10.1128/AEM.00645-17>
- Vitousek, P. M. (1994), Beyond Global Warming: Ecology and Global Change. *Ecology*, 75: 1861–1876. doi:10.2307/1941591
- Wittorf, L., Bonilla-Rosso, G., Jones, C. M., Bäckman, O., Hulth, S., & Hallin, S. (2016). Habitat partitioning of marine benthic denitrifier communities in response to oxygen availability. *Environmental Microbiology Reports*. <https://doi.org/10.1111/1758-2229.12393>
- Woodwell, G. M., & Mackenzie, F. T. (Eds.). (1995). *Biotic feedbacks in the global climatic system: will the warming feed the warming?*. Oxford University Press

on Demand.

World Meteorological Organization. 2010 WMO Greenhouse gas bulletin: the state of greenhouse gases in the atmosphere based on observations through 2009. <http://www.wmo.int/gaw/>.

Yang, H., Andersen, T., Dörsch, P., Tominaga, K., Thrane, J. E., & Hessen, D. O. (2015). Greenhouse gas metabolism in Nordic boreal lakes. *Biogeochemistry*, 126(1-2), 211-225.

Yoon, S., Nissen, S., Park, D., Sanford, R. A., & Löffler, F. E. (2016). Nitrous oxide reduction kinetics distinguish bacteria harboring clade I versus clade II NosZ. *Applied and environmental microbiology*, AEM-00409.

Zuckerkindl E. and Pauling L. (1965). Evolutionary divergence and convergence in proteins. Edited in *Evolving Genes and Proteins* by V. Bryson and H.J. Vogel, pp. 97-166. Academic Press, New York.

Zumft, W. G., Kroneck, P. M. H. 1990. Metabolism of nitrous oxide, p.37–55. *In* N. P. Revsbech and J. Soerensen (ed.), *Denitrification in soil and sediment*. Plenum Press, New York.

## 11 Anexos

### Anexo I Resumen de mineralización de metano reflejado como $^{13}\text{CO}_2$ en milimoles

TRATAMIENTO	CICLO 1		CICLO 2	
	día 4		día 9	
	Consumo $^{13}\text{CH}_4$	Producción $^{13}\text{CO}_2$	Consumo $^{13}\text{CH}_4$	Producción $^{13}\text{CO}_2$
SH-PP + $^{15}\text{N}_2\text{O}$ + $^{13}\text{CH}_4$	1.24	0.53	0.54	0.76
SH-PP + $^{13}\text{CH}_4$	0.13	0.00	0.69	0.00
SH-PP + $^{15}\text{N}_2\text{O}$	0	0.00	0.00	0.40
SH-PP	0	0.00	0.00	0.00
SH-PP + $^{15}\text{N}_2\text{O}$ + $^{13}\text{CH}_4$ (ESTÉRIL)	0.13	0.00	0.29	0.00
SEDIMENTO + $^{15}\text{N}_2\text{O}$ + $^{13}\text{CH}_4$	0.07	0.00	0.21	0.00
SEDIMENTO + $^{13}\text{CH}_4$	1.25	0.00	0.05	0.00
SEDIMENTO + $^{15}\text{N}_2\text{O}$	0	0.00	0	0.00
SEDIMENTO	0	0.00	0	0.00
SEDIMENTO + $^{15}\text{N}_2\text{O}$ + $^{13}\text{CH}_4$ (ESTÉRIL)	0.34	0.00	0.56	0.00

En la tabla anterior se reportan los valores de metano y dióxido de carbono obtenidos al día 4 para el ciclo I y al día 9 para el ciclo II. Observándose que sólo dos tratamientos llegaron hasta la mineralización, por un lado el tratamiento que contenía ambos gases y sustancias húmicas externas. (Tratamiento1) y por otro

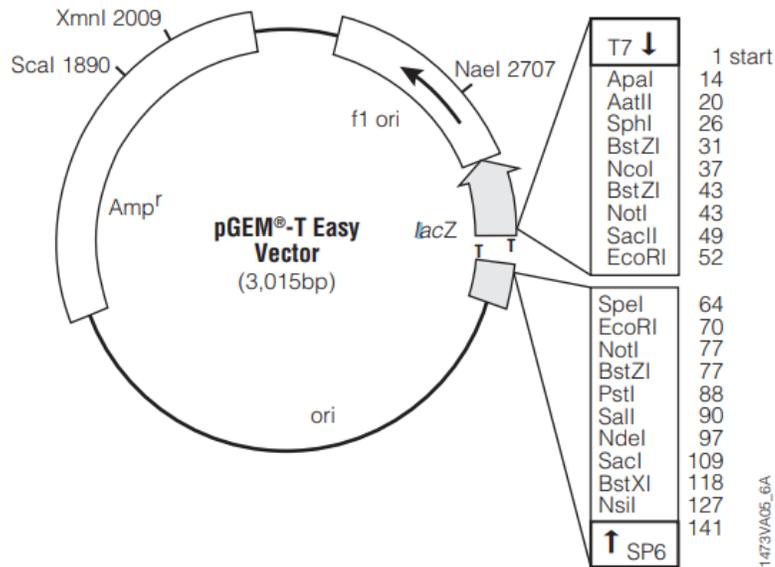
lado, el tratamiento 3, quien no presentó adición de me metano marcado, por lo que este dióxido marcado es derivado de la fracción lábil de las sustancias húmicas.

**Anexo II.** Resumen de la reducción de  $^{15}\text{N}_2\text{O}$  reflejada como  $^{15}\text{N}_2$  en milimoles

Tratamiento	CICLO 1		CICLO 2	
	día 4		día 9	
	consumo $^{15}\text{N}_2\text{O}$	Producción $^{15}\text{N}_2$	consumo $^{15}\text{N}_2\text{O}$	Producción $^{15}\text{N}_2$
SH-PP + $^{15}\text{N}_2\text{O}$ + $^{13}\text{CH}_4$	13.18	8.32	5.53	4.50
SH-PP + $^{13}\text{CH}_4$	0.02	0.68	0.01	-0.66
SH-PP + $^{15}\text{N}_2\text{O}$	7.78	8.12	4.23	5.03
SH-PP	0.00	0.68	0.00	0.00
SH-PP + $^{15}\text{N}_2\text{O}$ + $^{13}\text{CH}_4$ (estéril)	2.19	0.68	1.24	0.00
Sedimento + $^{15}\text{N}_2\text{O}$ + $^{13}\text{CH}_4$	3.16	1.80	1.25	0.66
Sedimento + $^{13}\text{CH}_4$	0.00	0.68	0.02	0.00
Sedimento + $^{15}\text{N}_2\text{O}$	3.56	4.86	-0.92	3.70
Sedimento	0.00	0.68	0.01	0.01
Sedimento + $^{15}\text{N}_2\text{O}$ + $^{13}\text{CH}_4$ (estéril)	1.56	0.68	0.65	0.00

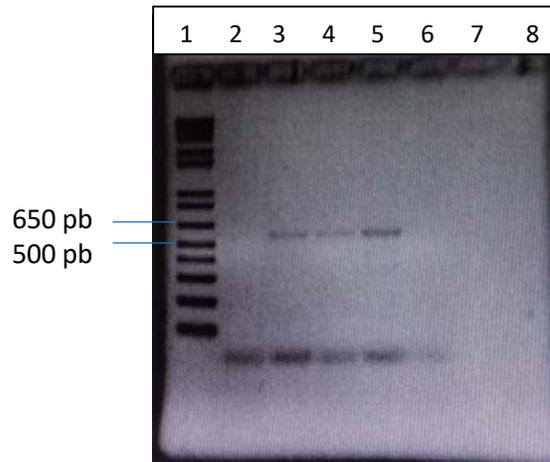
Se reportan los valores de consumo de óxido nitroso y producción de nitrógeno para el día 4 en la caso del ciclo I y al día 9 para el ciclo II.

### Anexo III. Vector pGEM T easy.



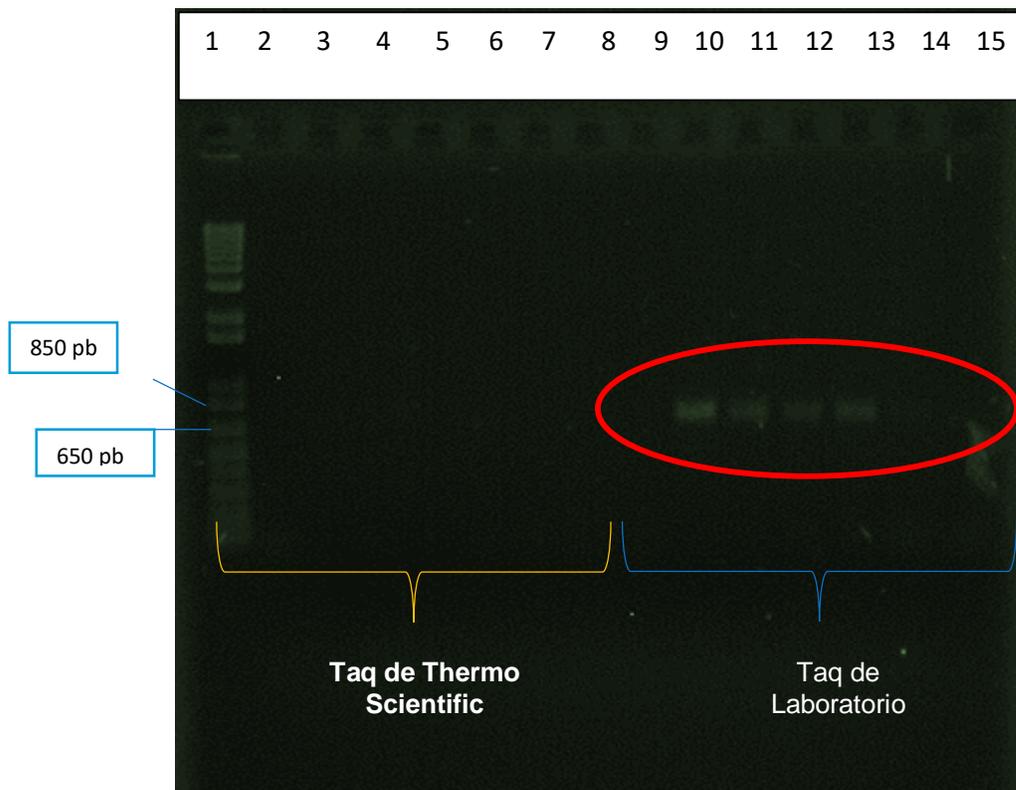
**Figura A1.** Mapa del vector pGEM-T Easy utilizado para la transformación de la línea celular *E. coli* DH5 $\alpha$ . En la imagen es posible observar el sitio múltiple de clonación (10-128 pb), el promotor de la SP6 RNA polimerasa (139-158), El sitio de unión al oligo reverso para secuenciación pUC/M13 (176-197) el codón de iniciación de *lacZ* (180), el sitio de unión al oligo delantero para secuenciación (2949–2972), así como el gen de resistencia a ampicilina *Amp<sup>r</sup>*.

## Anexo IV Evidencia de la amplificación del gen funcional *nosZ* clado I y II

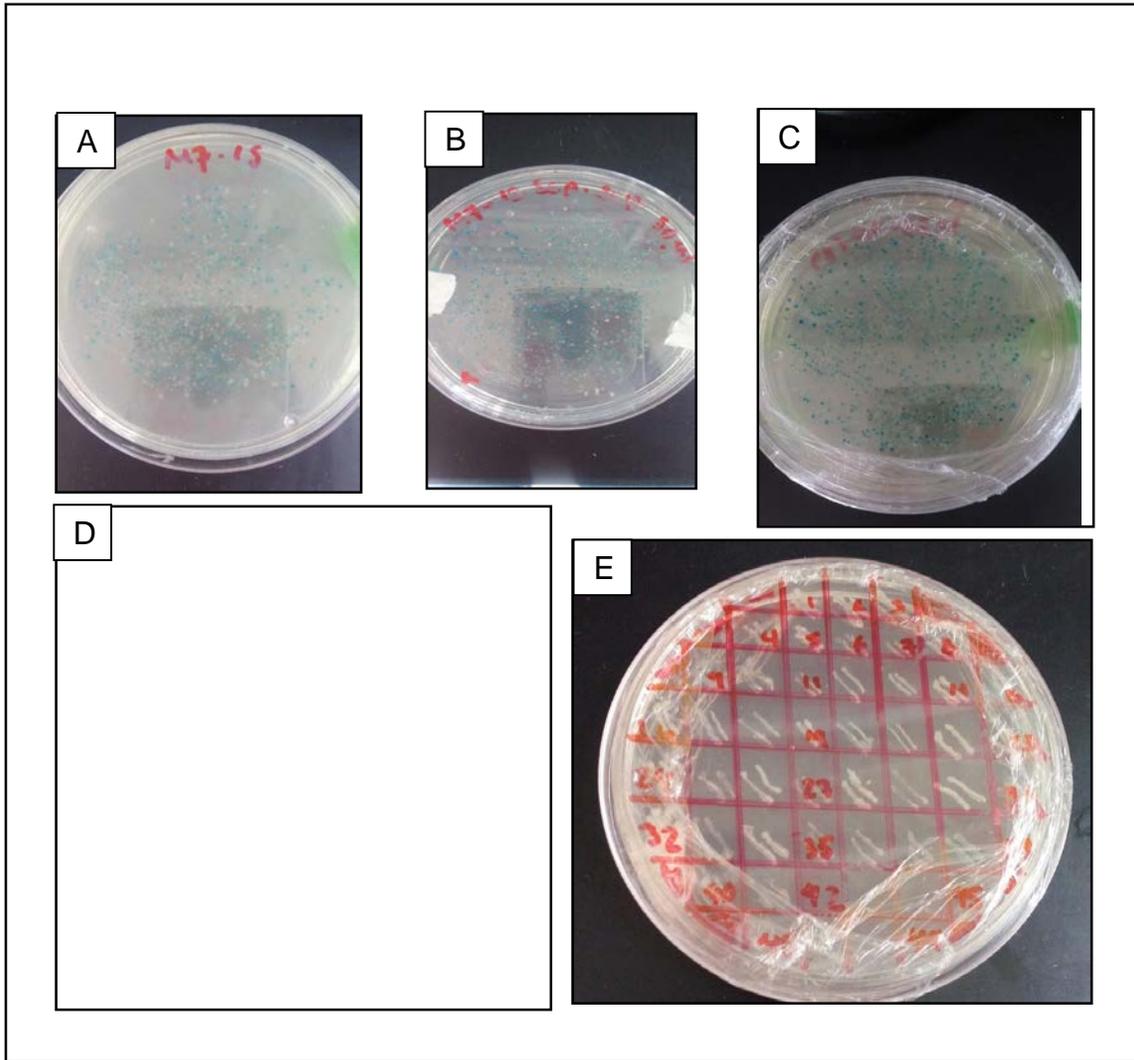


**Figura A2.** Productos de amplificación de PCR para el gen *nosZ*I. Las bandas se visualizaron en un gel de agarosa al 2% teñido con bromuro de etidio. Los pozos están en el siguiente orden: 1- Marcador de peso molecular 1kb plus; 2-control negativo; 3- Sed-HS+  $^{13}\text{CH}_4 + ^{15}\text{N}_2\text{O}$ ; 4- Sed-HS+ $^{15}\text{N}_2\text{O}$ ; 5- Sed +  $^{13}\text{CH}_4 + ^{15}\text{N}_2\text{O}$ ; 6- Sed + $^{15}\text{N}_2\text{O}$

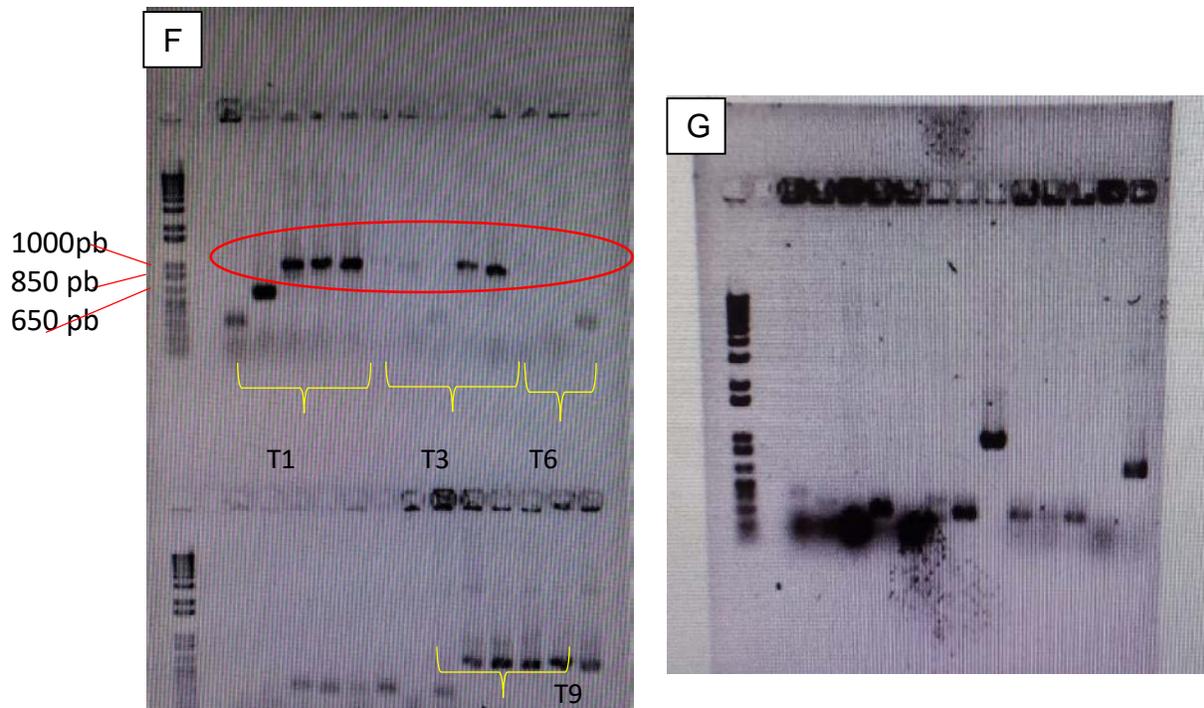
- ✓ Geles de agarosa al 1.5 y 2% donde se aprecia la visualización de productos *nosZ*I y *nosZ*II



**Figura A1.** Visualización del gen nosZII con un tamaño de banda esperado de ~ 750 pb en gel de agarosa 1.5 %. Los pozos contenían lo siguiente: 1; Marcador de peso molecular 1Kb plus, 2; control negativo 3; tratamiento 1, 4; tratamiento 2, 5; tratamiento3, 6;tratamiento 4, 7;tratamiento5; 8;tratamiento6, 9;control negativo, 10;trat-1, 11;trat-2, 12;trat-3, 13;trat-4, 14;trat-5, 15;trat-6.



**Figura A2.** Cajas de cultivo de células químicamente competentes DHA5 en medio Lb y. En la imagen A), B) y C) se aprecia la presencia de clones positivos (En color blanco) y clones negativos (color azul). Las imágenes D) y F) son los archivos que contenían la selección de clones supuestamente positivas a simple vista, sin embargo en la imagen D) se aprecian marcas en color verde, designadas a clones positivos tras la comprobación del inserto a través de PCR con los primers universales M13R y M13F.



**Figura A3.** Verificación del inserto por visualización del producto de PCR clonado con primers M13R y M13F. En ambas imágenes se puede apreciar que el éxito de clonación era baja, por ejemplo en el panel F, se muestran 5 muestras de los tratamientos 1, 3, 6 y 9 observándose en algunos casos sólo 1 o 2 insertos. En el panel G se muestran 13 muestras provenientes del tratamiento 1, donde sólo se obtuvo una clona positiva de 13 analizadas, situación que fue determinante para alcanzar el número de clonas propuestas para secuenciar que se fijó en 10 por tratamiento. Por lo que el esfuerzo de muestreo en particular para el tratamiento 1 fue de alrededor de 100 colonias para alcanzar un total de 10 y enviar a secuenciación para su identificación. Tamaño esperado ~ 850 -1000 pb