



UNIVERSIDAD
DE LA REPUBLICA
URUGUAY



FACULTAD DE
CIENCIAS
UDELAR | fcien.edu.uy

Metanogénesis en lagos de la Antártida marítima

Eliana Valentina Machin Olivera

Programa de Posgrado en Ciencias Biológicas
Facultad de Ciencias, Universidad de la República
Marzo, 2022



UNIVERSIDAD
DE LA REPUBLICA
URUGUAY



FACULTAD DE
CIENCIAS
UDELAR | fcien.edu.uy

Metanogénesis en lagos de la Antártida marítima

Eliana Valentina Machin Olivera

Tesis de Maestría presentada al Programa de Posgrado en Ciencias Biológicas, Facultad de Ciencias de la Universidad de la República, como parte de los requisitos necesarios para la obtención del título de Magíster en Ciencias Biológicas

Director de tesis:

Profesor adjunto Dr. Javier Menes

INTEGRANTES DEL TRIBUNAL DE DEFENSA DE TESIS

Dra. Léa Cabrol

Dra. Clauda Etchebehere

Prof. Titular Dra. Silvana Vero

Agradecimientos

Apoyo financiero

Quiero agradecer a la Agencia Nacional de Investigación e Innovación (ANII) por haberme otorgado una beca de apoyo de estudios de maestría en el período de marzo 2019-2021, como también a la Comisión Académica de Posgrado (CAP) por haber financiado una beca de finalización de estudios de posgrado. Estas dos becas fueron un elemento fundamental a lo largo de este proceso. Varias actividades experimentales de gran relevancia para el proceso de esta investigación no hubiesen sido posible sin el apoyo financiero de la Comisión Sectorial de Investigación Científica (CSIC), quien financió el proyecto “Potencial de generación de metano en sedimentos de lagos antárticos” bajo el marco de Inciación a la investigación (Modalidad 2-2020, ID: 372) y del cual soy responsable. Por último, agradecer al Programa de de Desarrollo de las Ciencias Básicas (PEDECIBA) opción Biología por el apoyo económico brindado en los primeros dos años como estudiante de su programa.

Apoyo Académico

Primero, agradecer a mi tutor Dr. Javier Menes por haberme dado la oportunidad de realizar un posgrado y realizar esta tesis bajo su orientación. Gracias por la dedicación, disponibilidad y todo el conocimiento brindado, no solo en esta etapa sino desde mis comienzos en este laboratorio.

Quisiera darle las gracias también a todo el equipo de trabajo del Laboratorio de Ecología Microbiana Medioambiental (LEMM). A Ana, Lucia y Silvana quienes fueron las primeras personas en brindarme la oportunidad de ingresar a este maravilloso laboratorio para que yo pudiera hacer mi tesis de licenciatura para obtener mi título de grado. A Andrea, Cecilia, Luciana, Sofia y Diego quienes fueron unos compañeros de oro a lo largo de esta tesis, tanto a nivel académico como personal, quienes siempre compartieron todo su conocimiento conmigo e hicieron más ameno el ingreso a la investigación de un nuevo tema.

Agradecer también al tribunal por su tiempo y dedicación a la evaluación de esta tesis. Gracias a las Dra. Léa Cabrol, Dra. Claudia Etchebehere y Prof. Titular Dra. Silvana Vero.

Apoyo técnico

Agradecer al Instituto Antártico Uruguayo (IAU) por el apoyo brindado al proyecto “Ciclo biogeoquímico del metano en sedimentos antárticos”, del cual formo parte, y facilitar el muestreo.

Apoyo personal

Quiero agradecer nuevamente a mis compañeros de laboratorio por su aguante a nivel personal por los ricos almuerzos y meriendas donde supimos descargar nuestras frustraciones y alegrías. Especialmente a Ceci y Lupe, quienes fueron pilares importantes al largo del desarrollo de esta tesis y de mi vida, gracias por su apoyo, consejos y por haber compartido tanto mis alegrías como sufrimientos.

Gracias a mis amigas de la carrera y de la vida, gracias Belu, Cari y Fer por esos momentos de distracción y de risas, por estar en las buenas y en las no tan buenas.

Gracias a Fede, quien me ha hecho el aguante en estas últimas instancias de escritura. Quien está aprendiendo lo que es tener una novia cuasicientífica que puede llegar a dedicarles largas horas a estar frente a una computadora. Gracias por tu paciencia, ayuda y cariño.

Gracias a mi familia, mamá, hermanas, cuñado, sobrinos y en especial a mi padre, quien siempre me alentó a seguir estudiando, quien estaría orgulloso leyendo esta tesis y quien, por causas de la vida que todavía me cuesta aceptar, no está más presente con nosotros... conmigo.

¡Muchas gracias a todos!

Resumen

El constante aumento de las concentraciones atmosférica de gases de efecto invernadero como el metano, es la principal causa impulsora del calentamiento global. En los ambientes fríos, principalmente regiones polares, es donde más se evidencia los efectos del calentamiento. En particular, en la Antártida se ha observado un aumento de la temperatura de aproximadamente 3,4 °C en los últimos 50 años. Además, se ha demostrado que los lagos en esta región responden más rápido que otras regiones antárticas a los cambios climáticos registrando aumentos significativos en la temperatura del agua. Por lo tanto, es de crucial interés obtener información del comportamiento de las bacterias involucradas en el ciclo del metano con la temperatura en estos ecosistemas. El objetivo de esta tesis fue evaluar los principales factores asociados a los procesos de producción biológica de metano en sedimentos de agua dulce de la Antártida marítima (Isla Rey Jorge). Para esto se evaluó el efecto de la temperatura (5, 10, 15 y 20 °C) y sustratos metanogénicos sobre la velocidad de producción de metano. Se cuantificó metanógenos viables mediante el método de NMP y metanógenos totales a través de la determinación de la abundancia de genes. Se utilizó secuenciación masiva de genes ARNr 16S y *mcrA* para el análisis de la estructura de la comunidad de arqueas *in situ* y bajo los efectos de la temperatura y adición de sustratos metanogénicos. Por último, se realizaron test estadísticos para encontrar correlaciones entre las diferentes variables ambientales medidas *in situ* y la actividad metanogénica, así como también la composición de la comunidad de arqueas.

Entre los resultados obtenidos en esta tesis, se observó que el incremento de la temperatura aumentó significativamente la actividad metanogénica mostrando un máximo de producción de metano a 20 °C. Además, las velocidades de producción de metano endógeno obtenidas se correlacionaron positivamente con la cantidad de carbono orgánico total y el nitrógeno total presente en el sedimento. Por otra parte, la estimulación de la metanogénesis por los sustratos metanogénicos como acetato e H₂/CO₂, dio como resultado un aumento de las velocidades de producción de metano de hasta 30 y 19 veces más, respectivamente. Sin embargo, la cuantificación de poblaciones viables de metanógenos acetoclásticos e hidrogenotróficos no fue exitosa a temperaturas cercanas a la *in situ*. Mientras que la determinación de genes *mcrA* en estos sedimentos mostró una abundancia de hasta 9,08x10⁷ copias de *mcrA* por gramo de sedimento seco. El estudio de secuencias génicas mostró que metanógenos pertenecientes a los géneros *Methanosarcina*, *Methanoregula*, *Methanobacterium*, *Methanosphaerula* y *Methanosaeta* fueron las más abundantes en la mayoría de los sitios de estudio. Además, se determinó que la comunidad de arqueas sufre una reestructuración frente al aumento de la temperatura e ingreso precursores metanogénicos.

En conclusión, esta tesis brinda información de gran relevancia sobre el comportamiento de la arqueas metanogénicas frente a un cambio de temperatura y precursor metanogénico. Asimismo, profundiza en el conocimiento de la estructura y composición de la comunidad de arqueas presentes en sedimentos de lagos de agua dulce en la Antártida marítima. En esta tesis se demostró que el aumento de la temperatura tiene gran influencia en la metabolización de la materia orgánica por parte de la comunidad microbiana y sobre todo en la actividad metanogénica. Las vías de producción de metano acetoclástica e hidrogenotrófica están presentes en los sitios de estudio y que, a altas temperaturas, la vía hidrogenotrófica sería la que contribuya más a las emisiones de metano. Nuestros resultados también sugieren que, frente a un escenario de aumento de temperatura y posible ingreso de materia orgánica, los géneros metanogénicos *Methanosaeta* y *Methanosarcina* sean los principales metanógenos involucrados en la producción de metano en estos lagos.

Palabras claves

Calentamiento global, Antártida, lagos, metano, arqueas metanogénicas, secuenciación masiva ARNr 16S, *mcrA*

Tabla de contenidos

Agradecimientos	v
Resumen.....	vii
Capítulo 1. Introducción.....	12
1.1 Cambio climático	12
1.2 Gas metano.....	12
1.3 Metanogénesis: aspectos generales	13
1.4 Rutas metabólicas y la enzima clave en la metanogénesis.....	16
1.5 Metanogénesis en ambientes fríos.....	18
1.6 Diversidad y taxonomía de las arqueas metanogénicas	20
1.7 Sitio de estudio.....	24
1.7.1 Isla Rey Jorge y Península Fildes.....	25
1.7.2 Lagos en la Península Fildes	26
1.8 Problema de investigación	27
Capítulo 2. Objetivos	28
2.1 Objetivo general	28
2.2 Objetivos específicos.....	29
Capítulo 3. Materiales y métodos.....	29
3.1 Isla Rey Jorge, Archipiélago Shetland del Sur, Antártida.....	29
3.1.1 Lagos muestreados en el año 2019.....	29
3.1.2 Lagos muestreados en el año 2020.....	30
3.2 Actividad metanogénica y cinética de producción de metano	32
3.2.1 Ensayo en microcosmos	32
3.2.2 Determinación de la velocidad de producción de metano.....	33
3.2.3 Determinación de la energía de activación (E_a)	33
3.3 Determinación de contenido total de nitrógeno y carbono orgánico total en los sedimentos	33
3.4 Cuantificación de arqueas metanogénicas viables mediante cultivo dependiente	33
3.4.1 Procedimiento.....	34
3.5 Extracción de ADN genómico	34
3.6 Cuantificación de arqueas metanogénicas por qPCR.....	35

3.6.1 Curva de calibración.....	35
3.6.2 Procedimiento.....	35
3.7 Caracterización molecular de la comunidad por secuenciación masiva del gen ARNr 16S de arqueas.....	37
3.8 Caracterización molecular de la comunidad metanogénica por secuenciación masiva del gen funcional <i>mcrA</i>	37
3.9 Cálculo de diversidad alfa y diversidad beta.....	38
3.9.1 Diversidad alfa	38
3.9.2 Diversidad beta.....	39
3.10 Análisis estadístico de los datos	39
3.11 Análisis de la reestructuración de la comunidad de arqueas en microcosmos con agregado de sustratos metanogénicos y/o temperatura	40
Capítulo 4. Resultados.....	41
4.1 Datos ambientales.....	41
4.2 Actividad metanogénica en sedimentos lacustres antárticos.....	43
4.2.1 Medición de velocidad de producción de metano en sedimentos recolectados en el año 2019.....	43
4.2.2 Medición de velocidad de producción de metano en sedimentos recolectados en el año 2020.....	45
4.3 Abundancia de arqueas totales y arqueas metanogénicas en sedimentos lacustres antárticos.....	52
4.3.1 Abundancia de arqueas totales: gen ARNr 16S.....	53
4.3.2 Abundancia de arqueas metanogénicas: gen <i>mcrA</i>	55
4.4 Cuantificación de arqueas metanogénicas viables por Número más probable.....	56
4.5 Composición y estructura de la comunidad de arquea por secuenciación masiva del gen ARNr 16S	58
4.5.1 Influencia de las variables ambientales en las comunidades de <i>Archaea</i>	63
4.5.2 Diversidad beta.....	64
4.6 Análisis de la comunidad de arqueas metanogénicas mediante secuenciación masiva del gen <i>mcrA</i>	67
4.7 Efecto de la temperatura y cambio de sustrato metanogénico en la estructura y composición de la comunidad de arqueas.....	70
Capítulo 5. Discusión	77
5.1 Efecto de la temperatura sobre la actividad metanogénica potencial	77
5.2 Efecto del sustrato metanogénico	78

5.3 Cuantificación de arqueas metanogénicas viables y totales en lagos antárticos	80
5.4 Composición de la comunidad de arqueas en sedimentos lacustres antárticos	81
5.5 Reestructuración de la comunidad de arqueas en respuesta al sustrato metanogénico y/o temperatura.....	85
6. Conclusiones	89
7. Perspectivas.....	90
Referencias bibliográficas	91
Apéndices	101
Apéndice 1. Abundancia de arqueas totales y arqueas metanogénicas en sedimentos lacustres antárticos	101
Apéndice 2. Composición y estructura de la comunidad de arquea por secuenciación masiva del gen ARNr 16S	103
Apéndice 3. Diversidad beta	113
Apéndice 4. Análisis de la comunidad de arqueas metanogénicas mediante secuenciación masiva del gen <i>mcrA</i>	117

Capítulo 1. Introducción

1.1 Cambio climático

Los gases de efecto invernadero (GEI) son gases atmosféricos que absorben y emiten radiación infrarroja (Easterbrook, 2016). El efecto natural de estos gases es necesario para la vida tal como la conocemos ya que mantienen la temperatura de la superficie de la Tierra en un promedio de 15-33 °C más cálido de lo que sería en su ausencia. Debido a que los GEI pueden absorber la radiación infrarroja, los cambios en sus concentraciones atmosféricas pueden alterar el balance energético del sistema climático (Environmental Protection Agency, 2010).

El vapor de agua, dióxido de carbono (CO₂), metano (CH₄), óxido nitroso (N₂O) y ozono (O₃) son los principales GEI presentes en la atmósfera (Easterbrook, 2016). El aumento en las concentraciones de estos gases en la atmósfera produce un aumento neto en la absorción de energía por parte de la Tierra, lo que lleva a un cambio climático como el calentamiento en la superficie de esta, como se ha observado en las últimas décadas (Environmental Protection Agency, 2010).

En los ambientes fríos, sobre todo en regiones polares, es donde más se observa este efecto de calentamiento. A medida que las crecientes concentraciones de dichos gases aumentan la temperatura de la Tierra, la nieve y las capas hielo comienzan a derretirse. Este derretimiento revela grandes superficies de tierra y agua (que se encontraban debajo del hielo) que absorben más calor del Sol causando más calentamiento, lo que causa más deshielo y así sucesivamente provocando un “*feedback* positivo”. Este circuito de retroalimentación, conocido como “retroalimentación del hielo-albedo”, amplifica el calentamiento inicial causado por el aumento de los niveles de GEI (Solomon *et al.*, 2007).

1.2 Gas metano

El CH₄ es uno de los principales gases que contribuye al cambio climático. Luego del CO₂, es el segundo compuesto de carbono más abundante en la atmósfera (Conrad, 2007). A pesar de que las emisiones de CH₄ son 200 veces más bajas que las emisiones de CO₂ y su vida media en la atmósfera es más corta (Easterbrook, 2016), el potencial de calentamiento global del CH₄ supera las emisiones de CO₂ en un factor de 28 en un rango de tiempo de 100 años y en un factor de 84 en un rango de tiempo de 20 años (Myhre *et al.*, 2013). El CH₄ también puede afectar la abundancia de otros gases de efecto invernadero en la atmósfera debido a su importante rol en la química atmosférica. Primero, la oxidación del CH₄ conduce a la formación fotoquímica del gas O₃. En segundo lugar, en la estratosfera, la oxidación del CH₄ produce vapor de agua y el correspondiente aumento de vapor de

agua estratosférico contribuye al forzamiento radiactivo. Finalmente, después de la oxidación, el átomo de carbono de la molécula de CH₄ original termina en CO₂, el principal gas de efecto invernadero antropogénico (Dean *et al.*, 2018).

Existen tres principales fuentes de emisión de gas CH₄ a la atmósfera: (1) CH₄ biótico o biogénico de orígenes naturales. Estas emisiones son provocadas por microorganismos productores de CH₄ y comprenden ambientes anaerobios como humedales naturales y arrozales, reservorios de agua dulce pobres en oxígeno, sistemas digestivos de rumiantes y termitas y depósitos de desechos orgánicos (Kirschke *et al.*, 2013). (2) El CH₄ termogénico, formado durante millones de años a través de procesos geológicos que se emiten desde el subsuelo a la atmósfera a través de características naturales (como filtraciones terrestres, marinas y volcanes de lodo) y mediante la explotación de combustibles fósiles (explotación de carbón, petróleo y gas natural). (3) El CH₄ pirogénico se produce por la combustión incompleta de biomasa y carbono del suelo durante incendios forestales, de biocombustibles y combustibles fósiles (Kirschke *et al.*, 2013).

La mayor parte del CH₄ biogénico se origina por las emisiones de fuentes naturales y antropogénicas, donde las fuentes naturales están dominadas por humedales, pero hay también una contribución significativa por parte de sistemas de agua dulce, donde el CH₄ es un componente clave del ciclo del carbono. Se estima que la contribución de las fuentes naturales a las emisiones de CH₄ a la atmósfera está entre el 33 y el 54 %, mientras que las fuentes antropogénicas representan entre el 46 y el 67 % (Kirschke *et al.*, 2013). En estos entornos, el CH₄ es producido exclusivamente por microorganismos productores de CH₄. Por lo tanto, estos microorganismos contribuyen de forma significativa a la cantidad de CH₄ emitido a la atmósfera (Conrad, 2007).

1.3 Metanogénesis: aspectos generales

La producción biológica de metano se denomina metanogénesis y es realizada por un grupo específico de arqueas, denominadas las arqueas metanogénicas. La metanogénesis es la etapa final de un proceso microbiano de degradación de materia orgánica bajo condiciones anaerobias estrictas y en ausencia de aceptores externos de electrones como sulfato, metales oxidados y nitrato (Hedderich y Whitman, 2013). La degradación anaerobia de la materia orgánica involucra un complejo consorcio microbiano que consiste en bacterias hidrolíticas, fermentadoras, sintróficas y homoacetogénicas, las cuales son capaces de metabolizar los sustratos orgánicos disponibles en el ambiente produciendo acetato, hidrógeno (H₂), formiato y CO₂. Luego, estos productos son utilizados por las arqueas metanogénicas como fuente de energía para la producción de metano.

Las arqueas metanogénicas no pueden utilizar sustratos orgánicos complejos y por lo tanto dependen de la presencia del consorcio microbiano nombrado anteriormente. La metanogénesis se produce en diversos hábitats tales como en el sedimento de lagos de agua dulce, plantaciones de arroz, rumen de rumiantes, digestores de aguas residuales, entre otros. Este proceso de degradación comienza cuando microorganismos fermentadores presentes en la comunidad microbiana excretan enzimas que hidrolizan polisacáridos orgánicos complejos a azúcares simples (como glucosa), los cuales son subsecuentemente fermentados en una fermentación primaria a varios alcoholes, ácidos grasos volátiles (AGV) e H_2 (Conrad, 1999) (Figura 1). El acetato o el H_2/CO_2 principalmente, son sustratos adecuados para microorganismos metanogénicos, por lo que se denominan sustratos metanogénicos y son convertidos a $CH_4 + CO_2$ y $CH_4 + H_2O$, respectivamente (Ferry, 1993). Otros productos de la fermentación primaria, como los ácidos grasos, no pueden ser consumidos directamente por los microorganismos metanogénicos, pero pueden ser convertidos a acetato, CO_2 e H_2 en una fermentación secundaria, la cual es llevada a cabo por microorganismos sintróficos (Ferry, 1993).

El H_2 es el intermediario clave en este proceso. Bajo condiciones estándar (cuando la presión parcial de H_2 es 1 atm.) las fermentaciones de AGV y alcoholes a acetato e H_2 son termodinámicamente desfavorables, por lo tanto, los microorganismos que catalizan estas reacciones no pueden crecer y los niveles de AGV acumulados en el ambiente resultan tóxicos. Sin embargo, si las arqueas metanogénicas están presentes, el H_2 es rápidamente metabolizado y la presión parcial es mantenida por debajo de 10^3 - 10^4 atmósferas (Hedderich y Whitman, 2013). Bajo estas condiciones, las fermentaciones de AGV y alcoholes son termodinámicamente favorables, ellos son rápidamente metabolizados, y sus concentraciones son mantenidas por debajo de los niveles tóxicos. Esta interacción entre los organismos productores de H_2 y los metanógenos consumidores de H_2 es un claro ejemplo de transferencia de hidrógeno interespecies entre microorganismos sintróficos y metanógenos. Alternativamente, en la comunidad también pueden existir un tipo de bacterias fermentadoras llamadas bacterias homoacetogénicas (Conrad, 2007). Estas bacterias están involucradas en la reducción del CO_2 con H_2 (por la ruta de la acetil-CoA), que resulta en la formación de acetato como único producto, que es luego utilizado por microorganismos metanogénicos para su metabolismo (Ye *et al.*, 2014).

Gran parte del metano producido durante la metanogénesis en ecosistemas naturales como humedales puede ser oxidado luego a CO_2 antes de ser liberado a la atmósfera, por microorganismos denominados metanótrofos mediante un proceso aerobio o anaerobio (Whiticar, 2020). Sin embargo, a menudo una proporción significativa de metano escapa hacia la atmósfera donde ejerce su efecto como GEI (Ferry, 1992).

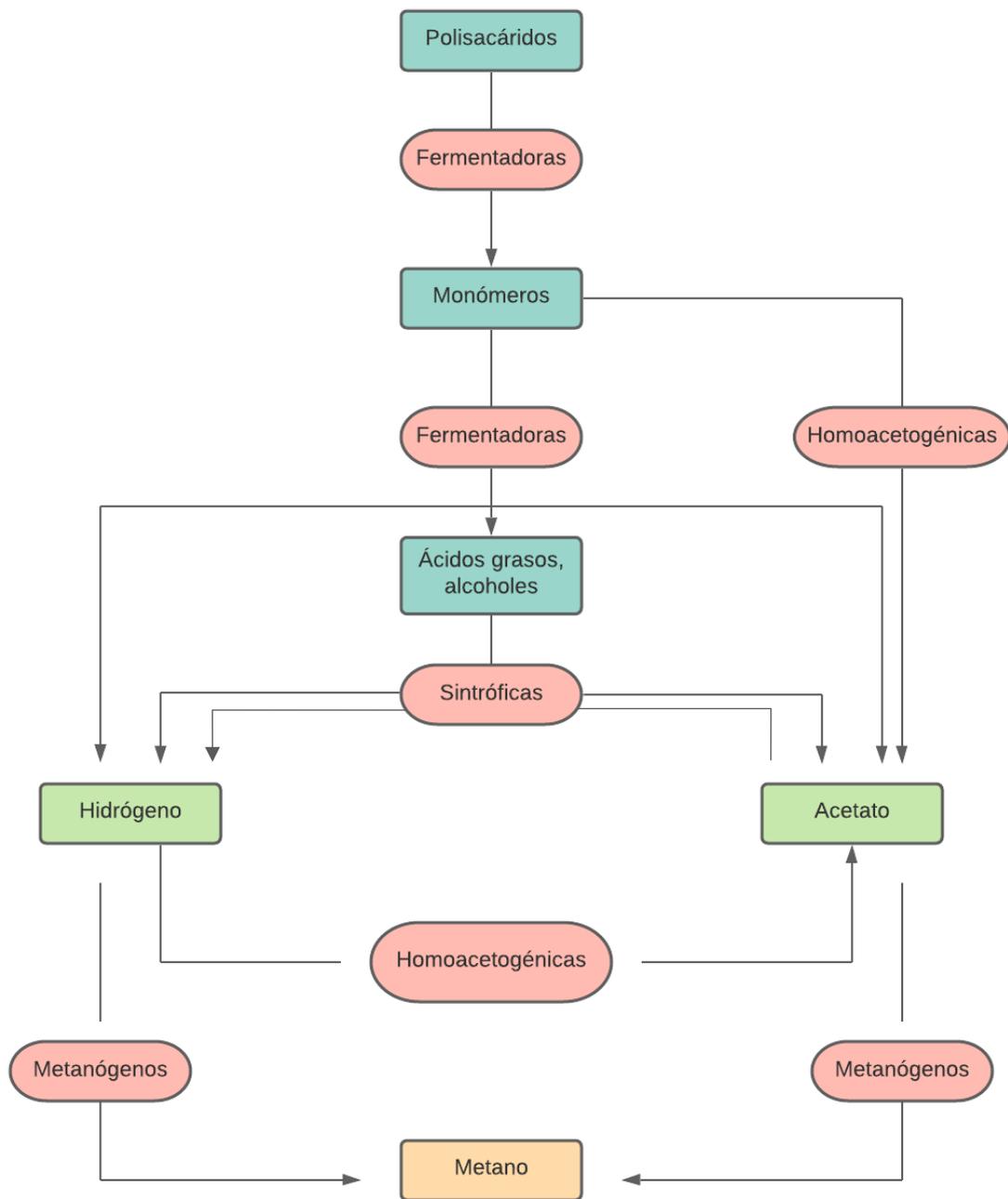


FIGURA 1. Esquema resumido del proceso de degradación anaerobia de la materia orgánica (polisacáridos) hasta metano. Los productos intermedios se muestran en recuadros mientras que los microorganismos en óvalos. Imagen extraída y adaptada de Conrad, 2007.

1.4 Rutas metabólicas y la enzima clave en la metanogénesis

Las arqueas metanogénicas solo pueden obtener su energía metabólica de la conversión de un número limitado de sustratos en metano. Como se mencionó, los sustratos metanogénicos pueden ser el acetato, H_2/CO_2 , formiato, CO, etanol y alcoholes secundarios, los cuales son oxidados para permitir la reducción de CO_2 a metano. Alternativamente, se puede producir metano también a través de compuestos metilados como metanol, monometilamina, dimetilamina, trimetilamina, tetrametilamonio entre otros (Conrad, 2007).

Existen tres vías de producción de CH_4 , la vía hidrogenotrófica, acetoclástica y metilotrófica. En ambientes donde la descomposición de la materia orgánica en anaerobiosis es significativa, la hidrogenotrofia (reducción de CO_2 con H_2 por las metanogénicas hidrogenotróficas) y la acetotrofia (uso del acetato como sustrato por las metanogénicas acetoclásticas) son las vías principales de producción de CH_4 . Por otra parte, en sedimentos marinos e hipersalinos ricos en sulfatos la metilotrofia es la vía principal de producción de metano. En este tipo de ambientes, se producen compuestos metilados (como metanol, trimetilamina y dimetilsulfuro que sirven como sustratos metanogénicos no competitivos para las arqueas metanogénicas, mientras que el acetato y el hidrógeno son degradados por procesos no metanogénicos (por ejemplo, reducción de sulfato) (Conrad, 2020). A continuación, se realiza una breve descripción de las tres vías de producción de CH_4 :

METANOGENESIS HIDROGENOTRÓFICA: es la vía que más presente está entre los metanógenos conocidos y se ha sugerido que representa la forma ancestral de producción de metano (Berghuis *et al.*, 2019). Es también la vía más comúnmente utilizada y contribuye en gran parte a la producción de metano en muchos ambientes tales como sedimentos de lagos de agua dulce (Borrel *et al.*, 2011). Por esta vía metabólica los metanógenos clasificados como hidrogenotróficos reducen el CO_2 a CH_4 . Esta vía no solo depende de H_2 como donador de electrones, ya que muchos metanógenos hidrogenotróficos pueden usar formiato, monóxido de carbono (CO), o algunos alcoholes (como por ejemplo etanol, 2-propanol, etc.) como sustratos para la metanogénesis (Conrad, 2020).

METANOGENESIS ACETOCLÁSTICA: en esta vía el acetato se activa con ATP para formar acetil-coenzima A (o acetil-CoA) (Figura 2 b). La acetil-CoA se divide para formar grupos metilo y carbonilo unidos a enzimas. Luego, el grupo metilo se transfiere a H_4MPT o H_4SPT , donde sigue los dos últimos pasos de la vía de reducción de CO_2 . El grupo carbonilo se oxida a CO_2 con ferredoxina como aceptor de electrones, proporcionando equivalentes de reducción para la reducción del heterodisulfuro después de la reacción catalizada por metil-coenzima M reductasa (Lyu *et al.*, 2018).

METANOGÉNESIS METILOTRÓFICA: en esta vía el grupo metilo de los compuestos metilados ($\text{CH}_3\text{-R}$) se transfiere primero a una proteína corrinoide afín y luego a la CoM-SH, se requieren metiltransferasas específicas de sustrato (Figura 2 c). Cuando el H_2 está presente, el $\text{CH}_3\text{-S-CoM}$ se reduce directamente a metano. En ausencia de un donante de electrones externo, el $\text{CH}_3\text{-S-CoM}$ también se puede oxidar por la vía inversa de la reducción de CO_2 . Este proceso en lagos de agua dulce se espera que sea bajo, ya que los precursores de compuestos metilados no son abundantes. Sin embargo, la metanogénesis metilotrófica se observó en varios sedimentos de lagos de agua dulce y fue hecha principalmente por *Methanomethylovans hollanica* y especies metanogénicas cercanas (Borrel *et al.*, 2011). Aunque la metanogénesis metilotrófica puede ser la fuente predominante de producción de metano en ciertos ambientes, su contribución a las emisiones globales de metano probablemente sea pequeña (Lyu *et al.*, 2018).

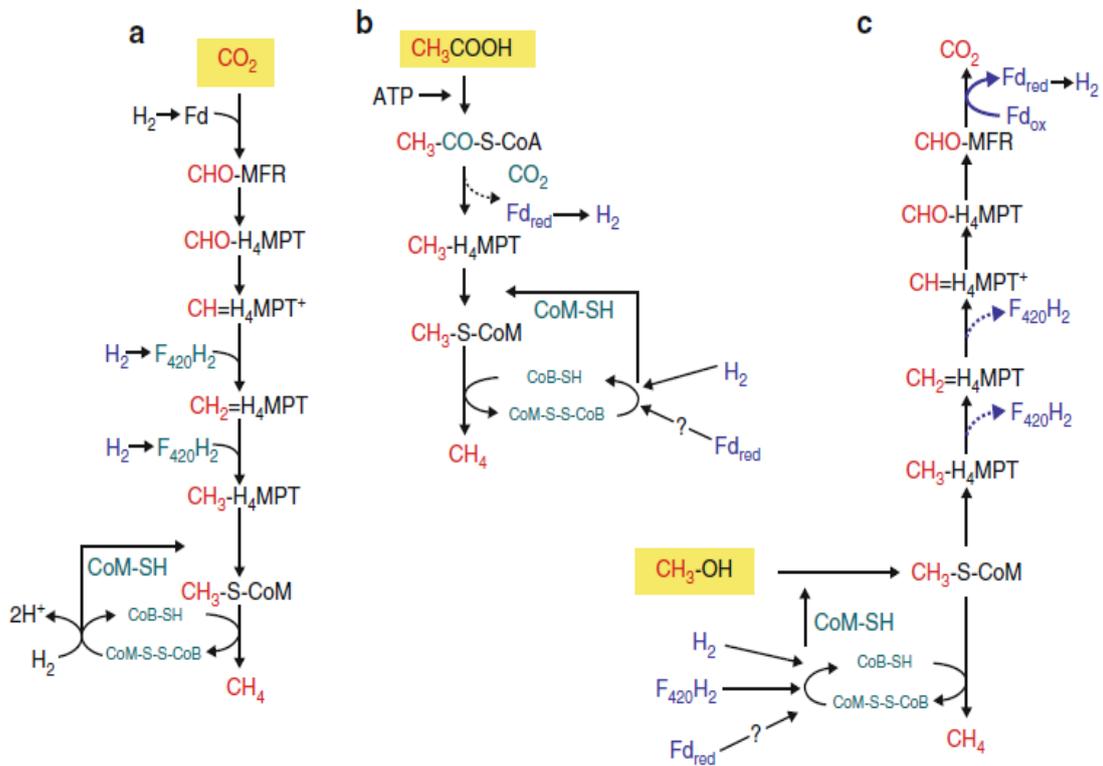


FIGURA 2. Representación gráfica de las tres rutas metabólicas de la metanogénesis a partir de a. H_2/CO_2 , b. acetato y c. metanol. Aunque las tres vías parten de sustratos diferentes comparten una enzima clave: la metil-coenzima M ($\text{CH}_3\text{-S-CoM}$). Imagen extraída de Hedderich y Whitman, 2013.

A pesar de que todas las vías de producción de metano parten de sustratos metanogénicos diferentes, todas ellas comparten el mismo paso enzimático final, el cual se encuentra catalizado por la metil-coenzima M reductasa ($\text{CH}_3\text{-S-CoM}$) (MCR por sus siglas en inglés). En este paso, la metil-coenzima M es reducida por una segunda coenzima tiol, llamada “coenzima B” (CoB-SH) (Lyu *et al.*, 2018b).

El producto final de esta reacción es el metano y una mezcla disulfuro de coenzima M y coenzima B (también llamada “heterodisulfuro”, CoM-S-SCoB) (Figura 3).

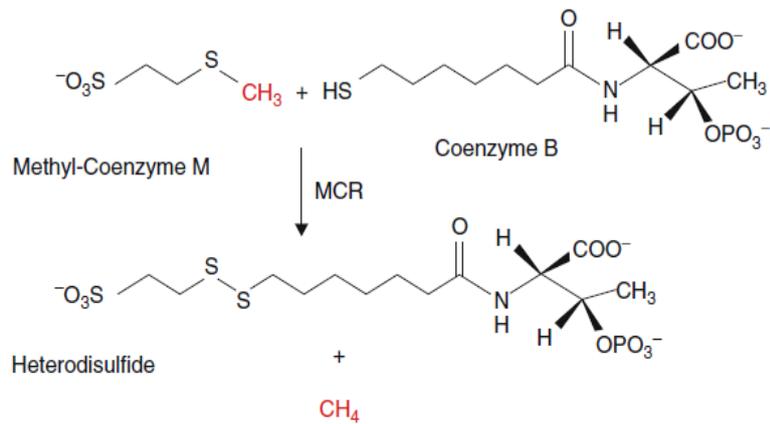


FIGURA 3. Representación gráfica de la reacción que cataliza la Metil-Coenzima M en las tres rutas metabólicas de la metanogénesis a partir de los sustratos hidrógeno, acetato y metanol. Imagen extraída de Hedderich y Whitman, 2013.

La MCR está formada por tres componentes: A, C y un pequeño cofactor B. El componente C es el sitio donde se da la metil-reducción y está conformado por tres sub-unidades: α , β y γ , los cuales son codificados por los genes *mcrA*, *mcrB* y *mcrG*, respectivamente (Earl *et al.*, 2003). Estos genes forman parte del operón *mcrBDCGA*, el cual es bien sabido que todos los genomas conocidos de las arqueas metanogénicas codifican al menos una copia del mismo (Alvarado *et al.*, 2014). El gen funcional *mcrA*, al ser característico y único de las arqueas metanogénicas, con la excepción de la arqueas oxidante de metano, es ideal para utilizarlo como blanco para detectar y cuantificar a estas poblaciones microbianas específicas dentro de un ecosistema determinado. Además, se ha visto que el gen *mcrA* muestra una filogenia mayoritariamente congruente con el gen del ARNr 16S, lo que permite que el análisis de la secuencia del *mcrA* se utilice junto con análisis basados en el gen ARNr 16S o de forma independiente (Steinberg y Regan, 2009).

1.5 Metanogénesis en ambientes fríos

Varios estudios han demostrado que la producción biológica de metano puede ocurrir a bajas temperaturas (5-10 °C), ya sea en sedimentos de lagos (Ellis-Evans, 1984; Franzmann *et al.*, 1991; Schulz y Conrad, 1996; Nozhevnikova *et al.*, 1997), permafrost (Kotsyurbenko *et al.*, 2004;

Anisimov, 2007; Wagner *et al.*, 2007; Metje y Frenzel, 2007) y sedimentos subglaciares (Boyd *et al.*, 2010; Stibal *et al.*, 2012; Ma *et al.*, 2018). Esto indica que las bajas temperatura no son un impedimento para que comunidades metanogénicas produzcan metano a partir de la materia orgánica circundante. Aunque la metanogénesis puede ser activa a bajas temperaturas, hasta el momento solo se han caracterizado muy pocos metanógenos psicrófilos, clasificados así aquellos microorganismos con temperatura óptima de crecimiento $< 20\text{ }^{\circ}\text{C}$ (Dong y Chen, 2012). El primer cultivo puro de una arquea metanogénica de este tipo fue realizado por Zhilina y Zavarzin (1991) según se informa en Simankova *et al.*, (2003), aunque para esta arquea metanogénica psicrófila no se tiene registro de su descripción (Nozhevnikova *et al.*, 2001). La especie psicrófilas *Methanococoides burtonii* y *Methanogenium frigidum* aisladas por Franzmann *et al.*, 1992 en el lago Ace en la Antártida, es capaz de crecer dentro de un rango de temperatura que abarca los $0\text{-}18\text{ }^{\circ}\text{C}$, siendo $15\text{ }^{\circ}\text{C}$ la temperatura óptima de crecimiento. *Methanolobus psychrophilus* R15 (Dong y Chen, 2012), aislada de un humedal frío en el Tíbet, es otra especie que se ha descrito como metanogénica psicrófila con un rango de crecimiento que va desde los $0\text{ a }25\text{ }^{\circ}\text{C}$ y con un crecimiento óptimo a $18\text{ }^{\circ}\text{C}$.

En general la temperatura óptima de los microorganismos involucrados en la metanogénesis en ambientes fríos parece ser más alta que la temperatura de los ambientes donde se encuentran (Schulz y Conrad, 1996). Aparentemente, en diferentes ecosistemas terrestres, tanto en los que se encuentran en condiciones de frío permanente como en los que experimentan fluctuaciones de temperatura, las comunidades de metanógenos psicrotolerantes estarían más involucradas en la producción de metano que las comunidades metanogénicas psicrófilas (Simankova *et al.*, 2003). En ambientes fríos, como sedimentos de permafrost y de lagos de Siberia, donde la temperatura varía entre los $-10\text{ y }0\text{ }^{\circ}\text{C}$, se ha logrado aislar las especies metanogénicas *Methanobacterium veterum* (Krivushin *et al.*, 2010) y *Methanolobus psychrotolerans* (Chen *et al.*, 2018), respectivamente. A pesar de la temperatura *in situ*, éstas fueron clasificadas como psicrotolerantes, donde *Methanobacterium veterum* presentó un rango de temperatura de crecimiento entre $10\text{-}46\text{ }^{\circ}\text{C}$ (con una temperatura óptima a $28\text{ }^{\circ}\text{C}$) y *Methanolobus psychrotolerans* entre $0\text{-}37\text{ }^{\circ}\text{C}$ (con un crecimiento óptimo entre $30\text{-}37\text{ }^{\circ}\text{C}$). Las especies metanogénicas *Methanococoides alaskense* (Singh *et al.*, 2005), *Methanogenium marinum* (Chong *et al.*, 2002) y *Methanosarcina báltica* (Von Klein *et al.*, 2002), aisladas a partir de sedimentos marinos permanentemente fríos (temperatura *in situ* entre $1\text{-}6\text{ }^{\circ}\text{C}$) ubicados en Skan Bay (Alaska) fueron clasificadas también como psicrotolerantes. Simankova *et al.*, (2003) también logró aislar y caracterizar cinco nuevas cepas de arqueas metanogénicas a partir de cuatro ambientes naturales y artificiales que presentaban condiciones de bajas temperaturas periódicos o permanentes ($4\text{-}6\text{ }^{\circ}\text{C}$). A pesar de haber aislado estas nuevas especies metanogénicas a partir de ambientes fríos, las mismas no fueron clasificadas como psicrófilas, sino como psicrotolerantes al presentar un amplio rango de temperatura de crecimiento (obteniéndose un crecimiento óptimo entre los $25\text{-}30\text{ }^{\circ}\text{C}$). Esto

le permitió corroborar la observación de que la mayoría de los microorganismos presentes en ambientes permanentemente fríos suelen ser psicotolerantes y no psicrófilos. Por lo tanto, el aumento de la temperatura tendría un papel significativo en la producción de CH₄ por el incremento en el crecimiento de arqueas productoras de metano. En varios estudios en los que se han incubado sedimentos a diferentes temperaturas (2-70 °C), las tasas más altas de producción de metano siempre han ocurrido en el rango de temperaturas mesofílicas (Zeikus y Winfrey, 1976; Nozhenikova *et al.*, 1997; Blake *et al.*, 2015). Lo que conduce a la hipótesis de que la metanogénesis es realizada por comunidades microbianas psicotolerantes o mesofílicas aún activas a bajas temperaturas. Otros factores como la calidad y cantidad de materia orgánica pueden interferir también en la producción de dicho gas.

1.6 Diversidad y taxonomía de las arqueas metanogénicas

Todos los microorganismos metanogénicos se ubican dentro del dominio *Archaea*, dentro de tres phyla primarios, *Euryarchaeota*, *Halobacterota* y *Thermoplasmata* (Tabla 1), pero la ubicación exacta de los órdenes dentro de estas phyla no se ha resuelto por completo (Lyu *et al.*, 2018). En el phylum *Euryarchaeota* se ubican los órdenes *Methanococcales*, *Methanopyrales* y *Methanobacteriales*. Dentro de *Halobacterota* se incluyen a los órdenes *Methanomicrobiales*, *Methanocellales*, *Methanonatronarchaeales* y *Methanosarcinales*. Finalmente, el phylum *Thermoplasmata* se encuentra formado por un único orden denominado *Methanomassiliicoccales*. Además, mediante el uso de la tecnología de la metagenómica, recientemente se han propuesto algunos potenciales nuevos taxones metanogénicos. Estos nuevos taxones inferidos a partir de metagenomas pertenecen a *Candidatus* como “Methanofastidiosales” y “Methanoflorentacea” dentro de las phyla *Euryarchaeota* y *Halobacterota*, respectivamente. Los *Candidatus* metanogénicos “*Methanomethylicia*” (también conocido como “*Verstraetearchaeota*”) y “*Bathyarchaeia*” se podrían ubicar dentro de un cuarto phylum denominado *Crenarchaeota*. Estos taxones *Candidatus* se han observado en secuencias metagenómicas de muestras ambientales, pero nunca fueron aisladas en cultivo, por lo que aún se necesitan cultivos puros para confirmar estos hallazgos (Lyu *et al.*, 2018).

En cada orden se pueden encontrar una variedad de especies con características fisiológicas y morfológicas muy variables (Baptiste *et al.*, 2005). Como se mencionó, existen tres vías de producción de metano, hidrogenotrófica, acetilclástica y metilotrófica. La vía hidrogenotrófica se encuentra en casi todos los microorganismos metanogénicos, mientras que las otras dos vías de producción se encuentran limitadas al orden *Methanosarcinales*, *Methanomassiliicoccales*, *Methanonatronarchaeia* (Singh *et al.*, 2005; Chong *et al.*, 2002). Esto puede explicarse por los

cambios en las energías libres para la metanogénesis, donde la reacción más favorable es la reducción de CO₂ por H₂ y la menos favorable es la reacción acetoclástica (Tabla 2). Esto hace que la presión de la selección natural haya conducido a la evolución de muchas más especies hidrogenotróficas que especies acetoclásticas. El hecho de que la vía hidrogenotrófica se encuentre ampliamente distribuida dentro de la mayoría de los microorganismos metanogénicos sugiere que la metanogénesis a partir de H₂/CO₂ puede ser la forma ancestral de producción biológica de metano (Bapteste *et al.*, 2005).

TABLA 1. Clasificación taxonómica (hasta género) de arqueas metanogénicas y su principal sustrato metabolizable

Orden	Familia	Género	Sustrato
<i>Methanococcales</i>	<i>Methanococcaceae</i>	<i>Methanococcus</i>	H ₂ /CO ₂
		<i>Methanothermococcus</i>	
	<i>Methanocaldococcaceae</i>	<i>Methanocaldococcus</i>	
		<i>Methanotorris</i>	
<i>Methanopyrales</i>	<i>Methanopyraceae</i>	<i>Methanopyrus</i>	
<i>Methanobacteriales</i>	<i>Methanobacteriaceae</i>	<i>Methanobacterium</i>	
		<i>Methanothermobacter</i>	
		<i>Methanosphaera</i>	
		<i>Methanobrevibacter</i>	
	<i>Methanothermaceae</i>	<i>Methanothermus</i>	
<i>Methanomicrobiales</i>	<i>Methanomicrobiaceae</i>	<i>Methanomicrobium</i>	H ₂ /CO ₂
		<i>Methanolacinia</i>	
		<i>Methanogenium</i>	
		<i>Methanoculleus</i>	
		<i>Methanoplanus</i>	
		<i>Methanofollis</i>	
	<i>Methanocorpusculaceae</i>	<i>Methanocorpusculum</i>	
	<i>Methanospirillaceae</i>	<i>Methanospirillum</i>	
	<i>Methanoregulaceae</i>	<i>Methanolinea</i>	
<i>Methanoregula</i>			
<i>Methanosphaerula</i>			
<i>Methanocellales</i>	<i>Methanocellaceae</i>	<i>Methanocella</i>	
<i>Methanonatronarchaeales</i>	<i>Methanohalarchaeaceae</i>	<i>Methanohalarchaeum</i>	Compuestos metilados
	<i>Methanonatronarchaeaceae</i>	<i>Methanonatronarchaeum</i>	
<i>Methanosarcinales</i>	<i>Methanosarcinaceae</i>	<i>Methanosarcina</i>	Acetato H ₂ /CO ₂ Compuestos metilados

TABLA 1. Clasificación taxonómica (hasta género) de arqueas metanogénicas y su principal sustrato metabolizable

<i>Methanosarcinales</i>	<i>Methanosarcinaceae</i>	<i>Methanolobus</i>	Compuestos metilados
		<i>Methanococcoides</i>	
		<i>Methanohalophilus</i>	
		<i>Methanosalsus</i>	
		<i>Methanohalobium</i>	
		<i>Metanimicrococcus</i>	
		<i>Methanomethylovorans</i>	
	<i>Methanosaetaceae</i>	<i>Methanosaeta</i>	Acetato
<i>Methanomassiliicoccales</i>	<i>Methanomassiliicoccaceae</i>	<i>Methanomassiliicoccus</i>	Compuestos metilados

Euryarchaeota

Halobacterota

Thermoplasmatota

El orden *Methanobacteriales* comprende dos familias de metanógenos, *Methanobacteriaceae* y *Methanothermaceae*. Los metanógenos ubicados en este orden crecen principalmente por reducción del CO₂ (Ferry, 1992). La familia *Methanobacteriaceae* es una familia diversa que consta de cuatro géneros: *Methanobacterium*, *Methanothermobacter*, *Methanosphaera* y *Methanobrevibacter*. Al contrario, la familia *Methanothermaceae* consta de un solo género, denominado *Methanothermus*, el cual consta de dos especies extremadamente termófilas aisladas de manantiales volcánicos, *M. fervidus* y *M. sociabilis* (Garcia *et al.*, 2000; Ferry, 1992).

En el orden *Methanococcales* se ubican metanógenos con morfología de cocos y principalmente aislados de ambientes marinos (Ferry, 1992) Este orden está conformado por dos familias y cuatro géneros, todos ellos utilizan H₂/CO₂ como fuente de energía. La primera familia descrita en este orden se denominó *Methanococcaceae* y contiene a los géneros *Methanococcus* y *Methanothermococcus*. Recientemente se ha propuesto la familia *Methanocaldococcaceae* en donde se incluye dos géneros termofílicos, *Methanocaldococcus* y *Methanotorris* (Baptiste *et al.*, 2005; Garcia *et al.*, 2000).

El orden *Methanomicrobiales* comprende cuatro familias y 11 géneros de metanógenos hidrogenotróficos. En la familia *Methanomicrobiaceae* se ubican seis géneros con una variedad de diferentes morfologías. Casi todas las cepas pueden usar formiato y algunos alcoholes secundarios además del H₂/CO₂ como fuente de energía (Lyu y Liu, 2019) Dichos géneros son

Methanomicrobium, *Methanolacinia*, *Methanogenium*, *Methanoculleus*, *Methanoplanus*, *Methanofollis*. La segunda familia ubicada en este orden se denomina *Methanocorpusculaceae*, esta familia solo contiene un género, *Methanocorpusculum*, con cuatro especies de metanógenos mesofílicos. Todos ellos pueden oxidar H₂, formiato, algunas especies pueden usar 2-propanol/CO₂ y reducir CO₂ para producir metano. La familia *Methanospirillaceae*, la cual solo contiene un género metanogénico llamado *Methanospirillum*, son metanógenos mesófilos y la especie tipo utiliza H₂/CO₂ y formiato, algunas especies también son capaces de utilizar ciertos alcoholes como 2-propanol y 2-butanol como dadores de hidrógeno para la producción de metano a partir del CO₂ (Bapteste *et al.*, 2005). La última familia dentro de este orden es *Methanoregulaceae*, donde se ubican los géneros *Methanolinea*, *Methanoregula* y *Methanosphaerula* (Lyu y Liu, 2019).

En el orden *Methanosarcinales* se ubican todos los metanógenos acetoclásticos y/o metilotróficos dispuestos en tres familias. La familia *Methanosarcinaceae* contiene ocho géneros, dentro de éstos se encuentra el género *Methanosarcina*, el cual representa a los metanógenos acetoclásticos los cuales predominan en muchos ecosistemas anaeróbicos donde la materia orgánica es completamente degradada a metano y CO₂. Se los puede encontrar en sedimentos de agua dulce y marinos, suelo anóxico, digestores anaerobios, etc. Dentro de *Methanosarcina* se pueden hallar los metanógenos más versátiles en términos nutricionales ya que además de acetato, algunos son capaces de usar H₂/CO₂ y compuestos metilados (tales como metanol y metilaminas) (García *et al.*, 2000). Los restantes siete géneros pertenecientes a la familia *Methanosarcinaceae* son *Methanolobus*, *Methanococcoides*, *Methanohalophilus*, *Methanosalsus*, *Methanohalobium*, *Metanimicrococcus* y *Methanomethylovorans*, siendo todos ellos metanógenos metilotróficos obligados, es decir, que solo son capaces de utilizar compuestos metilados como metanol y metilaminas como sustratos para la metanogénesis (Bapteste *et al.*, 2005; García *et al.*, 2000). La familia *Methanosaetaceae* agrupa a todos los metanógenos acetoclásticos obligados dentro de un solo género denominado *Methanosaeta*, el cual se encuentra formado por cuatro especies con *M. concilii* como especie tipo. Aunque el acetato solo puede ser utilizado por dos géneros metanogénicos, *Methanosarcina* y *Methanosaeta*, la forma en que es metabolizado por estos géneros es diferente.

El orden *Methanopyrales* se ha propuesto para aquellos metanógenos capaces de crecer a 110 °C y que no se encuentran relacionados con todos los demás metanógenos conocidos hasta el momento. Esta formado por una sola familia, *Methanopyraceae*, la cual contiene un solo género con una única especie, *Methanopyrus kandleri* (Kurr *et al.*, 1991). Esta especie además de caracterizarse por ser hipertermófila, es capaz de producir metano a través de la vía hidrogenotrófica.

El orden *Methanocellales* se encuentra representado por una familia denominada *Methanocellaceae* y un solo género, *Methanocella*. Pueden utilizar H₂/CO₂ para la metanogénesis y algunas especies

pueden utilizar también formiato. Si bien producen metano a partir de la vía hidrogenotrófica, es necesario la presencia de acetato para su crecimiento (Lyu y Liu, 2019).

Por último, el orden *Methanomassiliicoccales* está formado por una única familia y género denominados *Methanomassiliicoccaceae* y *Methanomassiliicoccus*, respectivamente. Los metanógenos ubicados en este grupo solo pueden usar metanol y compuestos metilados para la metanogénesis (Bapteste *et al.*, 2005; Garcia *et al.*, 2000).

TABLA 2. Reacciones metabólicas a partir de diferentes sustratos y cambios en energías libres estándar (ΔG°) para la metanogénesis

Reacción metabólica	ΔG° (KJ/mol CH ₄)
4 H ₂ + CO ₂ → CH ₄ + 2 H ₂ O	-135,6
4 Formiato → CH ₄ + 3 CO ₂ + 2 H ₂ O	-130,1
2 Etanol + CO ₂ → CH ₄ + 2 Acetate	-116,3
Metanol + H ₂ → CH ₄ + H ₂ O	-112,5
4 Metanol → 3CH ₄ + CO ₂ + 2H ₂ O	-104,9
4 Metilamina + 2 H ₂ O → 3 CH ₄ + CO ₂ + 4 NH ₄ ⁺	-75,0
4 Trimetilamina + 6 H ₂ O → 9 CH ₄ + 3 CO ₂ + 4 NH ₄ ⁺	-74,3
2 Dimetilsulfuro + 2 H ₂ O → 3CH ₄ + CO ₂ + H ₂ S	-73,8
2 Dimeetilamina + 2 H ₂ O → 3CH ₄ + CO ₂ + 2NH ₄	-73,2
4 2-Propanol + CO ₂ → CH ₄ + 4 Acetona +2 H ₂ O	-36,5
Acetato → CH ₄ + CO ₂	-31,0

1.7 Sitio de estudio

La Antártida es un continente que se encuentra dividida en tres zonas biogeográficas: la Antártida marítima, la Subantártica y el continente Antártico (Figura 4), siendo esta última zona dividida en parte costal y terrestre y es la más grande en términos de área (Pociecha, 2011). La zona Subantártica se encuentra formada por islas y archipiélagos aislados ubicados en latitudes altas en el océano Austral (u océano Antártico) bajo su fuerte influencia. La Antártida marítima es una región que también se encuentra fuertemente influenciada por el océano Austral pero este impacto es más temporal en la naturaleza y limitado a los cortos periodos de verano antártico (Pociecha, 2011). Las condiciones climáticas de la Antártida marítima son menos extremas que las presentes en el continente Antártico (Amarelle *et al.*, 2019) y debido a las consecuencias del calentamiento global en este último siglo, en la Antártida marítima el clima ha cambiado sustancialmente, donde se observó un incremento en la temperatura promedio anual de unos 3,4 °C en los pasados 50 años (Vega-García *et al.*, 2021).

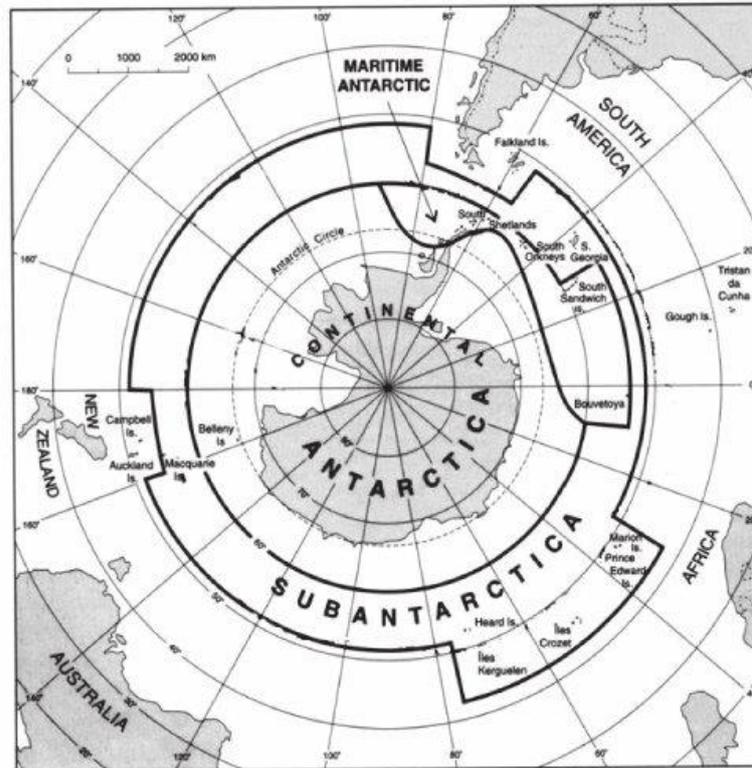


FIGURA 4. Mapa de la Antártida mostrando las tres zonas biogeográficas. Imagen extraída de Pocięcha, 2010.

1.7.1 Isla Rey Jorge y Península Fildes

La Isla Rey Jorge es una de las islas más grande del archipiélago Shetland del Sur, presente en la región de la Antártida marítima (Figura 5). Se encuentra ubicada entre $61^{\circ}54'$ - $62^{\circ}16'S$ y $57^{\circ}35'$ - $59^{\circ}02'O$ frente al sector noroeste de la Península Antártica y cuenta con un área superficial de 1.310 Km^2 (Kejna y Sobota, 2013). Topográficamente, la isla se puede subdividir en una gran capa de hielo y varios sistemas glaciares independientes más pequeños (Braun y Saurer, 2014). Las Islas Shetland del Sur, y con ella la Isla Rey Jorge, se encuentran en el centro del área de influencia del frente polar del hemisferio sur. La posición de las islas en el medio del océano también es una causa de su clima marítimo. Como resultado, las islas están marcadas por cambios climáticos frecuentes y rápidos, con temperaturas suaves y altos niveles de precipitación según los estándares antárticos, junto con fuertes vientos predominantemente del oeste (Peter *et al.*, 2008).

Hacia el suroeste de la Isla Rey Jorge se ubica la Península Fildes ($62^{\circ}08'$ - $62^{\circ}14'S$ y $59^{\circ}02'$ - $58^{\circ}51'O$), la mayor área libre de hielo de la isla con unos 7 km de longitud aproximadamente. La península se encuentra bordeada al noreste por el Glaciar Collins, al noroeste por el Pasaje Drake, hacia el sureste por la bahía de Maxwell, el cual es una extensión del estrecho de Bransfield, y hacia el sur por el

estrecho de Fildes (Peter *et al.*, 2008). El clima en la península de Fildes es típicamente frío, húmedo, con una temperatura anual de $-2,1\text{ }^{\circ}\text{C}$. En verano, la temperatura media diaria alcanza entre $2\text{ y }3\text{ }^{\circ}\text{C}$, mientras que en invierno la temperatura media mensual a largo plazo puede descender por debajo de los $-7\text{ }^{\circ}\text{C}$ (Carrizo *et al.*, 2019).

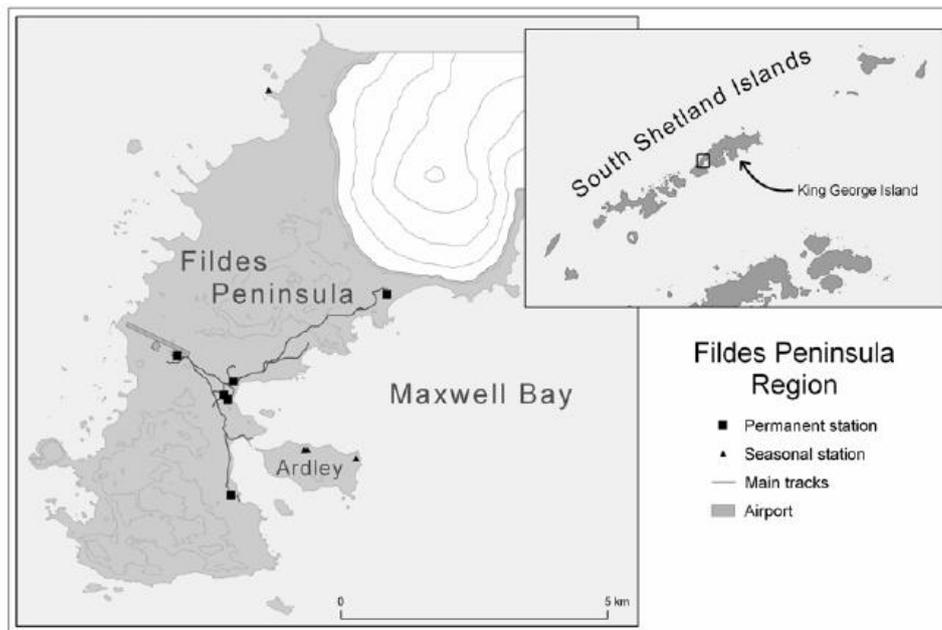


FIGURA 5. Isla Rey Jorge y la Península Fildes ubicados en la Antártida marítima. Imagen extraída de Peter *et al.*, 2008.

1.7.2 Lagos en la Península Fildes

Las zonas libres de hielo de la Península Fildes exhiben una gran cantidad de lagos. De acuerdo con la base de datos SCAR KGIS presenta 109 lagos aproximadamente (Figura 6) (Peter *et al.*, 2008). Éstos suelen ser una fuente principal de agua dulce para las estaciones polares durante todo el año o durante el verano. La mayoría de los lagos en la península son estanques endorreicos pequeños y poco profundos ubicados en depresiones formadas por desglaciación. Sin embargo, también existen lagos grandes y profundos (Shevnina y Kourzeneva, 2017). Los lagos solo se encuentran descubiertos de hielo durante los cortos meses de verano y se alimentan principalmente de los flujos de agua de deshielo de las capas de nieve circundante. Algunos lagos en la parte más al norte de la península también son alimentados por agua del deshielo proveniente del glaciar Collins. La lluvia y el agua del deshielo de la capa activa del permafrost también contribuyen al mantenimiento de los niveles de agua en los lagos. De esta forma, los lagos, que son alimentados en gran medida por el agua de

deshielo, están controlados tanto por los ritmos diarios del clima en los meses de verano como por la cantidad de nieve durante los meses de invierno y otoño o el derretimiento de los glaciares a largo plazo (Peter *et al.*, 2008).

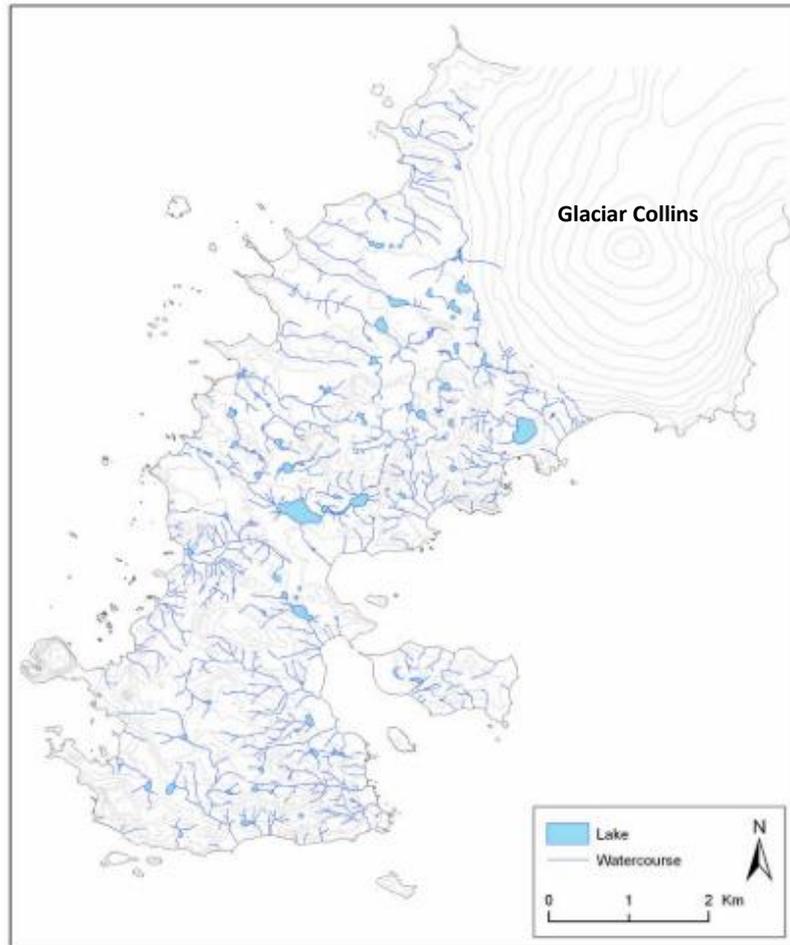


FIGURA 6. Lagos y pasajes de agua presentes en la Península Fildes de acuerdo con la base de datos SCAR KGIS. Imagen extraída de Peter *et al.*, 2008.

1.8 Problema de investigación

El constante aumento de la concentración atmosférica de gases de efecto invernadero como el metano, es la principal causa impulsora del cambio climático. Esto es una problemática que afecta a todo el planeta debido al aumento de la temperatura y lo que este efecto conlleva. En los ambientes fríos, principalmente regiones polares, es donde más se evidencia el calentamiento. En la Antártida se ha observado un aumento de la temperatura de aproximadamente 3,4 °C en los últimos 50 años. En particular, en el año 2020 en la base Esperanza, la estación de investigación científica de Argentina, ubicada en el extremo norte de la Península Antártica, se alcanzó la temperatura más alta

hasta el momento. El Servicio Meteorológico Nacional de Argentina registró una temperatura de 18,2 °C, rompiendo el récord anterior de 17,5 °C establecido el 24 de marzo del año 2015 (Poggi *et al.*, 2020). La principal consecuencia del aumento de la temperatura en este tipo de ambientes es el derretimiento de los hielos que deja al descubierto vastas superficies que podrían convertirse rápidamente en una posible fuente importante de emisión de metano hacia la atmósfera. El aumento en el volumen del material orgánico disponible junto con las temperaturas más altas del suelo podría conducir también a una mayor emisión de gases de efecto invernadero como el metano.

La mayoría de los trabajos de investigación sobre emisión y consumo de este gas en ambientes permanentemente fríos han sido dirigidos a lagos y permafrost del hemisferio norte (Schulz y Conrad, 1996; Kotsyurbenko *et al.*, 2004; Anisimov, 2007; Metje y Frenzel, 2007; Wagner *et al.*, 2007). En la Antártida en particular los datos que se conocen de emisión de metano son principalmente de ecosistemas subglaciales que han mostrado un alto potencial de producción de dicho gas (Wadham *et al.*, 2008; Boyd *et al.*, 2010; Stibal *et al.*, 2012, Ma *et al.*, 2018). Mientras que las investigaciones dirigidas al estudio de la velocidad de producción de metano en sedimentos lacustres son menos abundantes (Ellis-Evans, 1984 y Franzmann *et al.*, 1991). Teniendo en cuenta, además, que se ha demostrado que los lagos en esta región responden más rápido que otras regiones antárticas a los cambios climáticos registrando aumentos significativos en la temperatura del agua (Quayle *et al.*, 1995), es de crucial interés obtener información del comportamiento de las bacterias involucradas en el ciclo del metano con la temperatura en estos ecosistemas. Dado que se pronostica un aumento de temperatura en las zonas polares para los próximos 100 años, se podría esperar como consecuencia una mayor emisión de metano causado por el derretimiento de las capas de hielo y el aumento en la actividad de las arqueas metanogénicas. Por lo tanto, la Antártida marítima (en especial la Isla Rey Jorge) es una zona ideal para el estudio de emisión de metano ya que posee un gran número de lagos y durante el verano se generan además abundantes lagunas temporales alimentadas por el agua del deshielo.

Capítulo 2. Objetivos

2.1 Objetivo general

Estudiar los principales factores asociados a los procesos de producción biológica de metano en diferentes sedimentos de agua dulce de la Antártida marítima (Isla Rey Jorge).

2.2 Objetivos específicos

- Determinar el efecto de la temperatura en la velocidad potencial de producción de metano endógena en sedimentos de agua dulce de la Antártida.
- Evaluar qué vía de producción de metano es estimulada con el cambio de temperatura.
- Determinar la abundancia de poblaciones viables y totales de microorganismos metanogénicos en cada sedimento.
- Conocer la diversidad de arqueas metanogénicas presentes en ese ecosistema frío.
- Analizar la relación entre las variables fisicoquímicas y la estructura de la comunidad de las arqueas metanogénicas para cada sedimento.

Capítulo 3. Materiales y métodos

3.1 Isla Rey Jorge, Archipiélago Shetland del Sur, Antártida

El presente trabajo de investigación se divide en dos muestreos en diferentes años, 2019 y 2020, durante los meses febrero y marzo que corresponden a la temporada de verano. En ambos años se muestrearon un total de 11 lagos con distinta ubicación geográfica dentro de la Isla Rey Jorge, Archipiélago Shetland del Sur, Antártida.

3.1.1 Lagos muestreados en el año 2019

El primer muestreo se realizó en el mes de febrero del año 2019, donde se recolectaron muestras de sedimentos a partir de 4 lagos: Kitezkh ($62^{\circ}11'36''$ S, $58^{\circ}57'58''$ O) (Figura 7 a), Long ($62^{\circ}12'18.2''$ S, $58^{\circ}57'58.9''$ O) (Figura 7 b), Mondsee ($62^{\circ}10'40''$ S, $58^{\circ}55'50''$ O) (Figura 7 c) y Slalom ($62^{\circ}11'33.3''$ S, $58^{\circ}57'03''$ O) (Figura 7 d).

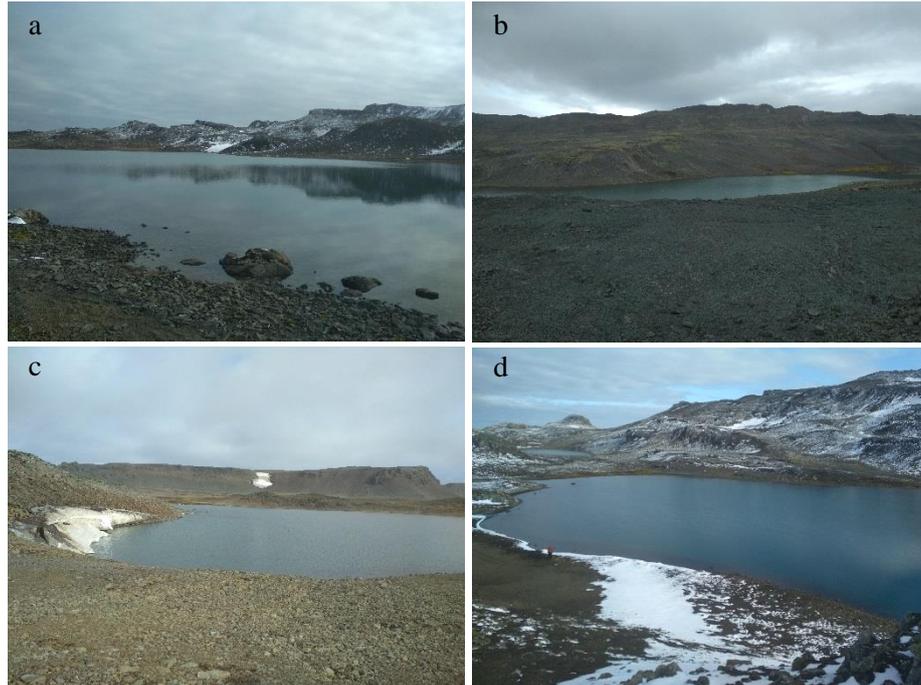


FIGURA 7. Se muestran los lagos muestreados en el mes de febrero del año 2019. a. Lago Kitez, b. Lago Long, c. Lago Mondsee, d. Lago Slalom.

3.1.2 Lagos muestreados en el año 2020

Al igual que en el año 2019, este segundo muestreo se volvió a realizar durante la temporada de verano. En esta oportunidad, se recolectaron muestras de sedimento a partir de siete lagos: China ($62^{\circ}13'16''$ S, $58^{\circ}57'26''$ O) (Figura 8 a), Drake 1 ($62^{\circ}10'37''$ S, $58^{\circ}55'16''$ O) (Figura 8 b), Drake 2 ($62^{\circ}10'20''$ S, $58^{\circ}55'21''$ O) (Figura 8 c), Drake 3 ($62^{\circ}10'8''$ S, $58^{\circ}55'34''$ O) (Figura 8 d), Green ($62^{\circ}10'52''$ S, $58^{\circ}54'28''$ O) (Figura 8 e), Oil Tank ($62^{\circ}11'31''$ S, $58^{\circ}56'27''$ O) (Figura 8 f) y Uruguay ($62^{\circ}11'6''$ S, $58^{\circ}54'40''$ O) (Figura 8 g). La mayoría de los lagos muestreados no tienen nombre oficial asignado y se identificaron con los nombres antes descritos a lo largo de este trabajo.

Para ambos años, 2019 y 2020, el procedimiento de recolección de sedimento fue el mismo. Las muestras de sedimento de cada lago se obtuvieron por la toma de 10 cm de profundidad a partir de la capa superior de sedimento y se dispensaron en frascos de boca ancha con adecuada capacidad. Además, para cada uno de los lagos muestreados se registraron medidas de profundidad del lago, oxígeno disuelto (OD), pH y conductividad, medidos en el momento de toma de muestra. Una vez obtenidos los sedimentos, se guardaron en una zona refrigerada ($2-8^{\circ}\text{C}$) hasta su posterior traslado al laboratorio de Ecología Microbiana Medioambiental en Facultad de Química donde fueron procesados.



FIGURA 8. Se muestran los lagos muestreados en el mes de febrero del año 2020. a. Lago China, b. Lago Drake 1, c. Lago Drake 2, d. Lago Drake 3, e. Lago Green, f. Lago Oil Tank, g. Uruguay.

3.2 Actividad metanogénica y cinética de producción de metano

3.2.1 Ensayo en microcosmos

Para determinar los efectos de la temperatura en la velocidad de producción biológica de metano se realizaron por triplicado ensayos en microcosmos (Figura 9) a cuatro temperaturas (5, 10, 15 y 20 °C). Para realizar los microcosmos, primero se realizó una suspensión al 20% (p/v) de cada sedimento. Estas suspensiones se realizaron con agua anaerobia con tampón pH 7,2 aproximadamente (esto se logró con el agregado 3,15 g/l de HEPES). Una vez realizada la suspensión del sedimento, se dispensó 10 ml de suspensión en viales de 60 ml previamente gaseados con N₂ libre de oxígeno. Finalmente, cada vial fue sellado con tapón de butilo (impermeable al gas) y precinto metálico. Se suministraron principalmente dos tipos de fuente de carbono: acetato de potasio (5 mM) e H₂/CO₂ (a 1 atm.). Por otra parte, se suministró también metanol (5 mM) a aquellos sedimentos en los que por su proximidad al mar se podría esperar arqueas metanogénicas metilotróficas. Las soluciones de acetato de potasio y metanol fueron realizadas bajo estrictas condiciones de anaerobiosis y esterilizadas mediante filtros de jeringa de alto flujo Minisart® con membrana de polietersulfona (PES) y con un tamaño de poro de 0,22 µm. Para evaluar la velocidad de producción de metano endógeno, se realizó el mismo ensayo pero sin agregado de ningún tipo de sustrato exógeno. Una vez realizados los microcosmos se dejaron incubando a sus respectivas temperaturas de incubación.



FIGURA 9. A modo de ejemplo se muestra algunos de los microcosmos realizados en el año 2020.

3.2.2 Determinación de la velocidad de producción de metano

La producción de gas metano en cada vial se midió por tomas de alícuotas de 0,5 ml de la fase gaseosa (o *headspace*) con jeringa y válvula *gas-tight* e inyección en un cromatógrafo de gas GC-2014 (Shimadzu Scientific, Kyoto, Japan) equipado con columna Porapak Q y un detector de ionización de llama (GC-FID). Se utilizó N₂ de alta pureza (99,999 %) como *gas carrier* con un flujo de 30 ml/min y a 160 kPa aproximadamente, la temperatura del inyector y de la columna fue de 55 °C. Finalmente el metano fue detectado mediante el detector FID a una temperatura de 140 °C. A partir de cada medida se graficó los micromoles de metano en función del tiempo de incubación. Se realizó la corrección por la solubilidad del metano a cada temperatura por la ley de Henry y la ecuación de van't Hoff. Por último, se determinó la zona de regresión lineal con un coeficiente de regresión ($R^2 \geq 0,95$) y de allí se extrajo la velocidad de producción de metano en cada vial expresado en $\mu\text{moles de CH}_4 \cdot \text{g}^{-1} \cdot \text{d}^{-1} \cdot \text{g}^{-1}$ de sedimento seco.

3.2.3 Determinación de la energía de activación (E_a)

La energía de activación (E_a) se calculó a partir de la pendiente de la ecuación de Arrhenius donde k , el ln de la velocidad de producción de metano, se representó frente a $1/\text{temperatura absoluta}$ (Kelvin) y luego se multiplicó por la constante universal de gas ($R = 8,314472 \text{ J} \cdot \text{K}^{-1} \cdot \text{mol}^{-1}$) (Lofton *et al.*, 2013).

3.3 Determinación de contenido total de nitrógeno y carbono orgánico total en los sedimentos

El contenido de nitrógeno total (TN %) y carbono orgánico total (TOC %) se midió con un analizador elemental (HT Flash, Thermo Fisher Scientific).

3.4 Cuantificación de arqueas metanogénicas viables mediante cultivo dependiente

Para cuantificar el número de microorganismos metanogénicos viables presentes en los diferentes sedimentos se realizó la estimación por Número Más Probable (NMP). Se utilizó el medio líquido anaerobio BCYT (Touzel y Albagnac, 1983) con la siguiente composición: KH₂PO₄ 0,30 g/l, NaCl 0,60 g/l MgCl₂ x 6.H₂O 0,10 g/l, CaCl₂ x 2.H₂O 0,08 g/l, solución de trazas minerales 10 ml/l, solución de vitaminas 10 ml/l, NH₄Cl 1,0 g/l, extracto de levadura 0,50 g/l, peptona 0,50 g/l, resazurina 1,0 mg/l, KHCO₃ 2,0 g/l, cisteína-HCl x H₂O 0,30 g/l, Na₂S x 9.H₂O 0,30 g/l. El medio

se realizó disolviendo todos los componentes (excepto las vitaminas, la cisteína y el sulfuro) en agua anaerobia y bajo atmósfera anaerobia (mezcla de gas 80 % N₂-20 % CO₂). Se dispensó en viales bajo la misma atmósfera (gaseando con mezcla de 80% N₂-20 % CO₂) y se esterilizaron mediante autoclave (a 121 °C por 15 minutos). Luego de esterilizados los viales se le agregó las vitaminas, cisteína y sulfuro a partir de soluciones estériles anaerobias preparadas bajo ambiente anaerobio con gaseado de 100 % N₂. El agregado de cisteína y sulfuro en sus respectivas concentraciones se realiza para alcanzar las condiciones necesarias para el crecimiento de los microorganismos metanogénicos. En sus hábitats naturales, generalmente dependen de las bacterias fermentativas para producir las fuertes condiciones reductoras necesarias para el crecimiento y la producción de metano. En el laboratorio, simplemente excluir el oxígeno de los medios de crecimiento no es suficiente para cultivar estas bacterias, por lo que es de gran importancia agregar agentes reductores como la cisteína y el sulfuro para reducir el potencial redox a un valor lo suficientemente bajo para permitir el crecimiento. Para lograr la cuantificación de metanogénicos acetoclásticos e hidrogenotróficos viables por separado, la cuantificación se realizó agregando al medio líquido BCYT mencionado anteriormente los sustratos, acetato y H₂/CO₂, respectivamente. Estos sustratos fueron adicionados a partir de soluciones estériles y anaerobias.

3.4.1 Procedimiento

Para la estimación de arqueas metanogénicas por el NMP se realizaron diluciones 1:10 y se sembraron series de tres replicados por dilución. Todas las diluciones necesarias se realizaron en agua anaerobia estéril. La primera dilución se realizó partiendo de 10 g de sedimento en 90 ml de agua estéril anaerobia. A partir de esta primera dilución se realizaron cinco diluciones sucesivas más, completando un total de seis diluciones. Luego de inoculadas las diferentes diluciones, se agregaron los sustratos en sus respectivas concentraciones, acetato de potasio en una concentración final de 5 mM ó H₂/CO₂ a una presión de 1 atm. Al finalizar, todas las diluciones se incubaron a 5 °C. Se tomaron como resultados positivos aquellos viales donde se detectó la presencia de gas metano en la atmósfera en una proporción mayor al 10 % de la cantidad teórica de sustrato agregado.

3.5 Extracción de ADN genómico

El ADN fue extraído a partir de alícuotas de 0,25 g (peso húmedo) de sedimento. La extracción se realizó por duplicado y con el kit comercial Power Soil DNA (Mobio) de acuerdo con las instrucciones del proveedor. El ADN obtenido fue visualizado en un gel de agarosa al 1 % (p/v) con buffer TBE (Tris-Borato-EDTA) 0,5X. La medida de concentración se realizó con el kit Qubit

dsDNA HS assay kit (Invitrogen) siguiendo las instrucciones del proveedor. Luego el ADN se mantuvo a -70 °C hasta su procesamiento.

3.6 Cuantificación de arqueas metanogénicas por qPCR

3.6.1 Curva de calibración

Se realizó la cuantificación de la comunidad de arqueas y metanógenos en los sedimentos mediante la amplificación (por qPCR) de los genes ARNr 16S y *mcrA*, respectivamente. Para ambas cuantificaciones se generaron curvas de calibración usando los estándares específicos para el gen ARNr 16S y *mcrA* (Angel *et al.*, 2011) como ADN molde para la cuantificación de arqueas totales y metanógenos, respectivamente. Para la curva de calibración de arqueas totales, se realizaron diluciones sucesivas 1:10 en agua bidestilada para generar series de diluciones del estándar correspondiente en el intervalo de $1,27 \times 10^6$ a $1,27 \times 10^2$ copias/ μ l y así poder estimar el número de copias de genes ARNr 16S de arqueas en cada uno de los sedimentos. En cambio, para la cuantificación del gen *mcrA* para metanógenos, la curva de calibración se realizó a partir de series de diluciones 1:10 del estándar en el intervalo de $3,4 \times 10^5$ a 3,4 copias/ μ l.

3.6.2 Procedimiento

La amplificación de genes ARNr 16S de arqueas y *mcrA* de metanógenos fue realizada con los sets de cebadores 364aF y ARC915r, *mlas-mod-F* y *mcrA-rev-R*, respectivamente (Tabla 3). Todas las mezclas de reacción (tanto para la curva de calibración como para las muestras de sedimento en la cuantificación de los genes ARNr 16S y *mcrA*) fueron realizadas en un volumen final de 10 μ l, incluyendo 5 μ l de 2x Master Mix del kit Rotor-Gene® SYBR® Green (Quiagen), 2 μ l de cebador *forward*s (0,5 μ M) y 2 μ l de cebador *reverse* (0,5 μ M) y 1 μ l de ADN molde. La reacción fue realizada en el equipo Rotor-Gene 3000 *Corbett Life Science* con las siguientes condiciones de amplificación: una etapa inicial a 95 °C por 5 minutos, seguido de 40 ciclos de desnaturalización a 95 °C por 5 segundos e hibridación-extensión a 60 °C por 10 segundos. La señal de fluorescencia se midió al final de cada ciclo a 80 °C durante 1 segundo para evitar la señal de los dímeros de primers que se puedan formar a 60 °C. Por cada corrida de qPCR, se usó un control negativo (sin ADN molde). La ausencia de productos no-específicos o dímeros de primers fue confirmado por la observación de un único pico de fusión (o *melting* en inglés) en el análisis de la curva de *melting*. Esta curva fue generada por el incremento de la temperatura de 60 a 94 °C en incrementos de 1 °C en cada paso.

TABLA 3. Información detallada de los cebadores utilizados en la cuantificación de los genes *mcrA* y ARNr 16S de arqueas

Grupo microbiano	Gen	Tamaño del fragmento (pb)	Información de los cebadores				Concentración final	Información del estándar Copias del gen.µl ⁻¹
			Nombre	Secuencia	Referencia			
Arqueas metanogénicas	<i>mcrA</i>	496	mlas-mod-F mcrA-rev-R	5'-GG YGG TGT MGG DTT CAC MCA RTA-3' 5'- CGT TCA TBG CGT AGT TVG GRT AGT-3'	Steinberg y Regan, 2008	0,5 µM	3,40x10 ⁹	
Arqueas totales	ARNr 16S	551	364aF ARC915r	5'-CGG GGY GCA SCA GGC GCG AA-3' 5'-GTG CTC CCC CGC CAA TTC CT-3'	Burggraf <i>et al.</i> , 1997 Stahl y Amann, 1991	0,5 µM	1,27 x10 ¹⁰	

3.7 Caracterización molecular de la comunidad por secuenciación masiva del gen ARNr 16S de arqueas

La estructura y diversidad de todas las arqueas de la comunidad se estudió mediante secuenciación masiva del gen ARNr 16S dirigidas al dominio *Archaea*. La región variable V4 del gen de ARNr 16S de arqueas se amplificó usando los cebadores 349F (5'-GYGCASCAGKCGMGAAW-3') y 806R (5'-GGACTACVSGGGTATCTAAT-3') (aproximadamente 380 nt) (Takai y Horikoshi, 2000). La secuenciación del amplicón ARNr 16S se realizó por tecnología Illumina de segunda generación MiSeq (2 extremos emparejados de 300 pb) en el servicio *Molecular Research* Mr. DNA (Texas, EE. UU.). Los cebadores y *barcodes* fueron removidos desde las secuencias sin procesar con la aplicación libre “*Fastq Processor*” (en www.mrdnafreesoftware.com). El software FastQC se utilizó para verificar la calidad de los reads obtenidos en la secuenciación Illumina antes de su análisis. El procesamiento de los datos de secuencia de MiSeq obtenidos se realizó utilizando software R (versión 4.1) y el paquete de código libre “*Divisive Amplicon Denoising Algorithm*” o DADA2 (Callahan *et al.*, 2016). Las secuencias fueron verificadas, filtradas y recortadas a una longitud ~ 250 pb (las secuencias *forwards*) y ~ 200 pb (las secuencias *reverse*). Brevemente, después del control de calidad, el pipeline DADA2 desreplica las secuencias, aprende las tasas de error, elimina las secuencias que pueden contener errores, fusiona las lecturas de los extremos emparejados como contigs, examina los contigs en busca de desajustes para reducir errores, construye una tabla de abundancia de la variante de secuencia de amplicones (ASV por su sigla en inglés), elimina las secuencias quiméricas (usando el método “*bimera*”), ejecuta la clasificación taxonómica de los ASV usando la base de datos de referencia SILVA (versión SILVA 138). En el paso de recorte y filtrado de calidad, se seleccionó el parámetro “puntuación de calidad de truncamiento igual a dos ($\text{truncQ} = 2$)” y las lecturas con errores máximos esperados superiores a cinco se descartaron como medida de filtrado de calidad (utilizando el parámetro “ $\text{maxEE} = 5$ ”). Las bibliotecas de secuencias iniciales se filtraron aún más utilizando Phyloseq (v. 1.32.0) para excluir las variantes de la secuencia de amplicón que se clasificaron taxonómicamente como secuencias de bacterias y secuencias sin ninguna clasificación taxonómica.

3.8 Caracterización molecular de la comunidad metanogénica por secuenciación masiva del gen funcional *mcrA*

La estructura y diversidad de todas de la comunidad de arqueas metanogénicas se estudió mediante secuenciación masiva de los genes *mcrA* de la comunidad. El gen *mcrA* se amplificó usando los

cebadores *mcrAF* (5'-TAYGAYCARATHHTGGYT-3') y *mcrAR* (5'-ACRTTCATNGCRTARTT-3') (Springer *et al.*, 1995). La secuenciación del amplicón *mcrA* se realizó por tecnología Illumina de segunda generación MiSeq (2 extremos emparejados de 300 pb) en el servicio Molecular Research Mr. DNA (Texas, EE. UU.) para los sedimentos de los lagos China, Drake 1, Drake 2, Drake 3, Oil Tank, Green y Uruguay. Los cebadores y *barcodes* fueron removidos desde las secuencias sin procesar con la aplicación libre “Fastq Processor” (en www.mrdnafreesoftware.com). El software FastQC se utilizó para verificar la calidad de los reads obtenidos en la secuenciación Illumina antes que se analizaran con el pipeline DADA2. El procesamiento de los datos de secuencia de MiSeq obtenidos se realizó de la misma forma que para el gen ARNr 16S (ver punto 3.7) con algunas excepciones. Para el análisis del gen *mcrA* mediante DADA2 solo se utilizaron las secuencias *forwards*, las cuales fueron verificadas, filtradas y recortadas a una longitud ~ 290 pb (las secuencias *forwards*). La clasificación taxonómica de los ASV se realizó usando la base de datos para *mcrA* de Yang *et al.*, 2014 (última actualización en marzo del 2019). En el paso de recorte y filtrado de calidad, se seleccionó el parámetro $truncQ = 2$ y $maxEE = 2$.

3.9 Cálculo de diversidad alfa y diversidad beta

3.9.1 Diversidad alfa

Para el análisis de diversidad alfa, se evitó un submuestreo de los datos (normalización por rarefacción). En este análisis se buscó determinar la riqueza y diversidad máxima presente en los sitios de estudio y si bien, la normalización por rarefacción es bastante popular en los análisis de microbiomas, este método requiere la omisión de datos válidos (McMurdie y Holmes, 2014). En el análisis de la diversidad alfa se calcularon diferentes índices de diversidad, ya que lo mismos brindan información importante sobre la composición de la comunidad y simultáneamente también tienen en cuenta las abundancias relativas de diferentes especies. Se calcularon diversos índices de diversidad: la riqueza observada (S_{obs}), el índice de equitatividad del inverso de Simpson (D) y el índice de equitatividad de Shannon-Weaver (H). Además, para calcular la equitatividad del número de taxones en estas comunidades, se utilizó el índice de Pielou (J'), donde si una taxa es fuertemente dominante, J' es cercano a 0. Se empleó el software R Studio para realizar las curvas de rarefacción y estimar los índices mencionados anteriormente para cada uno de los lagos.

La riqueza observada es equivalente al número de ASV y los índices Simpson y Shannon se estimaron como se detalla a continuación:

$$Simpson = 1 - D$$

$$D = \sum_{i=1}^S p_i^2$$

Donde p_i es la abundancia proporcional de un ASV i

El índice de Shannon se calculó como:

$$H = - \sum p_i \ln(p_i)$$

El índice de Pielou se calculó como:

$$J' = \frac{H}{\ln(S)}$$

Donde H es el índice de Shannon y S el máximo número de ASV observado en la muestra.

3.9.2 Diversidad beta

Para el análisis de la diversidad beta de la comunidad de arqueas entre los diferentes lagos se realizó la normalización de los datos con el paquete “microbial” utilizando el método “log2” en el software Rstudio (versión 4.1). La composición de la comunidad de arqueas entre los diferentes lagos se evaluó mediante análisis de coordenadas principales (PCoA) utilizando el paquete “phyloseq” en el software Rstudio (versión 4.1). Los diagramas de Venn, gráfico de flor y la lista de taxones compartidos entre los diferentes lagos, se realizaron utilizando el software libre EVen (Chen *et al.*, 2021).

3.10 Análisis estadístico de los datos

Todos los análisis estadísticos se realizaron utilizando el software R Studio (versión 4.1) utilizando diferentes paquetes. Para evaluar diferencias significativas entre las velocidades de producción de metano se realizaron ANOVA de una vía con un $\alpha = 0,05$. La significancia entre los diferentes tratamientos se evaluó mediante el test de Tukey y el test de Dunnett se realizó para encontrar diferencias significativas entre la velocidad de producción de metano endógeno y a partir de sustratos metanogénicos. El PCA fue realizado utilizando el paquete “factoextra”, los datos de las diferentes variables fisicoquímicas (Tabla 4) y las velocidades de producción de metano endógeno obtenidos a

diferentes temperaturas de incubación (5, 10, 15, 20 °C). El test no paramétrico de correlación de Spearman (ρ) se utilizó en aquellos análisis donde las variables a evaluar no presentaban una distribución normal (evaluado mediante el test de Shapiro-Wilk). Por lo que este test no paramétrico se realizó en la evaluación de la correlación entre variables fisicoquímicas y velocidades de producción de metano antes mencionadas utilizando el paquete “ggpubr”. Así como también para evaluar la existencia de correlaciones entre arqueas y dichas variables. En cambio, cuando se evaluaban variables con distribución normal (por ejemplo, número de copias del gen *mcrA*), se utilizó el test paramétrico de Pearson para evaluar correlaciones. De esta forma se realizó este test para evaluar la correlación presente entre el número de copias de *mcrA* y las velocidades de producción de metano obtenidas a nivel endógeno a partir de sustratos metanogénicos y 5, 10, 15 y 20 °C.

3.11 Análisis de la reestructuración de la comunidad de arqueas en microcosmos con agregado de sustratos metanogénicos y/o temperatura

Para evaluar si existía algún tipo de cambio en la estructura de la comunidad a nivel de arquea, se realizó la secuenciación masiva del gen ARNr 16S dirigido al dominio *Archaea* a partir del ADN genómico extraído de microcosmos realizados en la sección 4.2. Para este análisis se eligieron aquellos microcosmos de lagos que presentaron una velocidad de producción de metano mayor a $0,1 \mu\text{moles CH}_4 \cdot \text{g}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$.

Para evaluar el efecto de la temperatura en la comunidad de arqueas en microcosmos sin agregado de sustratos, se utilizaron los microcosmos realizados a partir de los sedimentos de los lagos China y Drake 2, ya que fueron los lagos donde se obtuvieron producción de metano endógeno. Además, se eligió evaluar la comunidad principalmente a dos temperaturas de incubación, 5 y 20 °C, ya que las mismas fueron donde se presentaron las mayores diferencias significativas entre las velocidades de producción de metano.

Para evaluar el efecto del sustrato metanogénico acetato sobre la comunidad de arqueas, se utilizaron microcosmos a partir de los sedimentos de los lagos China, Drake 2, Drake 3, Green y Oil Tank, ya que fue a partir de estos sedimentos donde se obtuvo mayor actividad metanogénica. Una vez más, el efecto de la temperatura sobre estos microcosmos se determinó a dos temperaturas, 5 y 20 °C al presentar mayor diferencia significativa entre las velocidades de producción de metano obtenidas entre ambas temperaturas. Por otra parte, para evaluar el efecto del H_2/CO_2 en la comunidad, solo se evaluó en microcosmos realizados a partir de los sedimentos de los lagos China y Drake 2 a 5 y 20 °C, ya que se obtuvieron actividades metanogénicas altas a ambas temperaturas de incubación. Sin embargo, en los lagos Drake 3, Green y Oil Tank solo se evaluó en microcosmos incubados a

20 °C. No se evaluó el efecto del H₂/CO₂ en la comunidad de estos sedimentos a 5 °C ya que la velocidad de producción de metano en estos microcosmos fue menor a 0,1 μmoles CH₄. g⁻¹.d⁻¹.

Una vez finalizada las incubaciones, es decir, cuando las curvas cinéticas alcanzan una meseta, se extrajo el sedimento de cada microcosmos y se centrifugó a 13,000 x g durante 5 minutos para extraer todo el líquido. Cuando se obtuvo el sedimento de cada réplica de microcosmos para cada condición, se realizó un *pool* entre los sedimentos de las réplicas de los microcosmos con valores de velocidad de producción de metano semejantes (error estándar menor al 20 %). Se extrajo ADN genómico a partir del *pool* de sedimento como se describe en la sección 3.5 y la secuenciación masiva del gen ARNr 16S para la caracterización molecular de la comunidad se realizó como se describe en la sección 4.2.

Capítulo 4. Resultados

4.1 Datos ambientales

Los diferentes datos fisicoquímicos ambientales obtenidos a partir de los sedimentos evaluados se detallan en la Tabla 4. Los lagos China, Kitezh, Long y Uruguay, fueron donde se halló mayor porcentaje de carbono orgánico total (dentro del rango de 1,19 a 5,01 %), siendo el lago China donde se observó el mayor porcentaje (5,01 %). En cambio, en el resto de los lagos los porcentajes de carbono orgánico total fueron hallados en valores menores al 1,0 %. La misma tendencia se observó en cuanto al porcentaje de nitrógeno total, donde los valores más altos entre el total de los lagos se hallaron en los lagos China, Kitezh, Long y Uruguay. El oxígeno disuelto se halló dentro del rango de 10,65 mg/l (Uruguay) a 13,16 mg/l (China) y los valores de pH obtenidos estuvieron dentro del rango de pH 6,72 (Uruguay) y 8,05 (Drake 1), los cuales se hallaron cercanos a la neutralidad, excepto en los lagos Kitezh (pH 7,96) y Drake 1.

TABLA 4. Datos ambientales obtenidos a partir de los sedimentos evaluados. Datos como oxígeno disuelto (OD), pH, conductividad y profundidad, fueron obtenidos al momento del muestreo.

Lagos	TOC (%) [*]	TN (%) [*]	Relación C:N	OD (mg/l)	pH	Conductividad (μS/cm)	Profundidad (m)
Kitezh	3,62	0,25	14,48	11,99	7,96	185	15
Long	2,10	0,20	10,50	12,50	7,38	303	4,0
Mondsee	0,51	0,04	12,75	12,80	6,97	162	4,0
Slalom	0,97	0,05	19,4	11,77	7,09	150	4,0
China	5,01	0,55	9,03	12,98	7,20	215	3,0
Drake 1	0,14	0,01	11,84	11,87	8,05	196	1,5
Drake 2	0,49	0,05	8,94	13,16	7,50	100	1,5
Drake 3	0,42	0,04	9,89	11,99	7,11	125	2,0
Green	0,34	0,04	9,45	11,92	7,25	113	3,0
Oil Tank	0,78	0,09	8,79	12,56	7,77	162	3,5
Uruguay	1,19	0,12	10,20	10,65	6,72	160	17

^{*}El carbono orgánico total y el nitrógeno total se expresan como % peso seco

En análisis de componentes principales (PCA) (Figura 10), los dos primeros componentes principales explicaron el 62 % de la variabilidad en el conjunto de datos de las variables fisicoquímicas (Tabla 4). En el primer eje donde se representó el 36,6 % de la variación en los datos ambientales, el carbono orgánico total (TOC), nitrógeno total (TN), fueron las variables mejores representadas en este primer eje, mientras que la conductividad fue la variable menor explicada. Este análisis muestra que los lagos China, Kitezh y Long se relacionan en base a las variables TOC, TN y conductividad. Sin embargo, estos lagos se diferencian claramente de los lagos Drake 1, Drake 3, Drake 2, Green, Mondsee y Oil Tank en las variables explicadas en el primer eje.

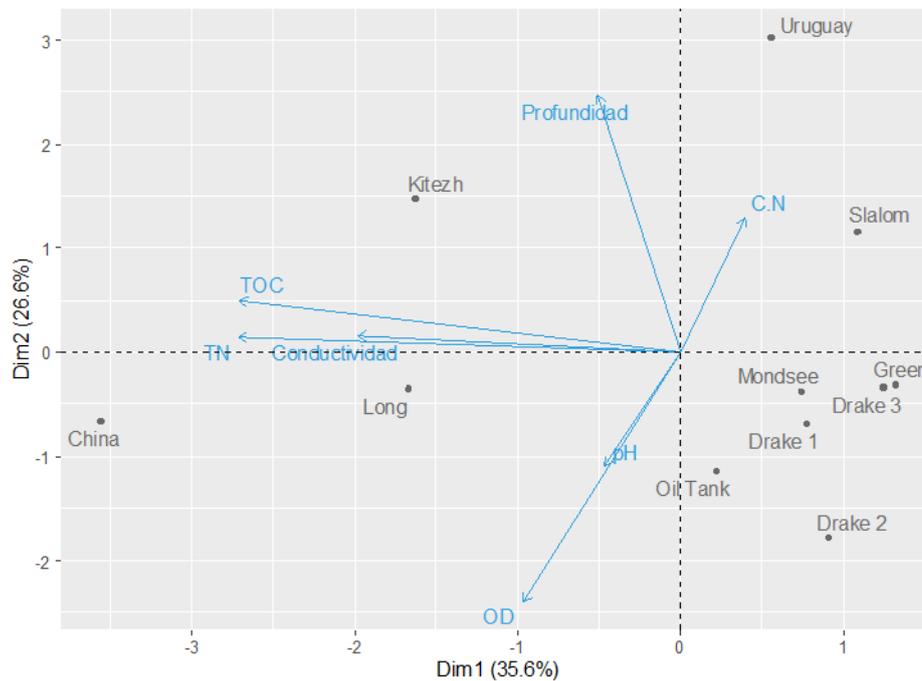


FIGURA 10. Gráfico de análisis de componentes principales de las dos primeras dimensiones basado en todos los datos ambientales combinados recopilados en los sedimentos de los lagos Kitezh, Long, Mondsee, Slalom, China, Drake 1, Drake 2, Drake 3, Green, Oil tank y Uruguay. TOC: carbono orgánico total, TN: nitrógeno total, C:N: relación carbono orgánico total/nitrógeno total, OD: oxígeno disuelto.

4.2 Actividad metanogénica en sedimentos lacustres antárticos

4.2.1 Medición de velocidad de producción de metano en sedimentos recolectados en el año 2019

Se estudió el efecto de la temperatura en la velocidad de producción de metano en sedimentos lacustres antárticos a 5, 10, 15 y 20 °C. La producción de metano endógeno no se detectó durante un período de incubación de 450 días en ninguno de los sedimentos de los lagos Kitezh, Long, Mondsee y Slalom, dentro del rango de temperaturas mencionadas.

Para poder comparar las velocidades de producción de metano a diferentes temperaturas de incubación para distintos grupos tróficos de arqueas metanogénicas, a cada microcosmos se le adicionó un sustrato metanogénico específico como acetato, H_2/CO_2 o metanol. Para esta actividad los resultados obtenidos fueron en su mayoría muy bajos y poco reproducibles. Solo en microcosmos

con el agregado de H₂/CO₂ se logró obtener producción de metano en todas las temperaturas ensayadas (Tabla 6). Como se obtuvo muy baja reproducibilidad entre las réplicas no se pudo aplicar algún tipo de método estadístico que nos permitiera sacar conclusiones válidas sobre esta actividad. Por lo que a continuación solo se mostrarán las velocidades de producción de metano a partir de dichos sustratos para cada sedimento evaluado (Tablas 5, 6 y 7).

TABLA 5. Velocidad de producción de metano a diferentes temperaturas de incubación (5-20 °C) y con agregado de acetato. Los datos se muestran como el promedio ± error estándar

Lago	Velocidad de producción de metano (μmoles CH ₄ .d ⁻¹ .g ⁻¹)			
	5 °C	10 °C	15 °C	20 °C
Kitezsh	0,02 x 10 ^{-1*}	0,29 x 10 ^{-1*}	nd	(0,04 ± 0,03) x 10 ⁻¹
Long	0,03 x 10 ^{-1*}	nd	(0,09 ± 0,02) x 10 ⁻¹	0,33*
Mondsee	nd	0,02 x 10 ^{-1*}	(0,08 ± 0,04) x 10 ⁻²	1,90 ± 0,87
Slalom	(9,52 ± 0,48) x 10 ⁻⁴	(8,96 ± 0,48) x 10 ⁻⁴	(1,48 ± 0,51) x 10 ⁻³	(7,06 ± 4,63) x 10 ⁻³

nd: no detectado

* solo se utilizó una réplica

TABLA 6. Velocidad de producción de metano a diferentes temperaturas de incubación (5-20 °C) y con agregado de H₂/CO₂. Los datos se muestran como el promedio ± error estándar

Lago	Velocidad de producción de metano (μmoles CH ₄ .d ⁻¹ .g ⁻¹)			
	5 °C	10 °C	15 °C	20 °C
Kitezsh	0,011*	(1,28 ± 0,25) x 10 ⁻²	(1,05 ± 0,04) x 10 ⁻²	(1,56 ± 0,15) x 10 ⁻²
Long	(0,23 ± 0,02) x 10 ⁻¹	(0,33 ± 0,05) x 10 ⁻¹	(3,87 ± 0,26) x 10 ⁻²	(3,91 ± 0,20) x 10 ⁻²
Mondsee	(0,23 ± 0,01) x 10 ⁻¹	(0,25 ± 0,01) x 10 ⁻¹	6,17 ± 5,37	19,36 ± 3,08
Slalom	0,45 ± 0,14	(11,10 ± 0,10) x 10 ⁻³	2,99 ± 0,66	4,91 ± 2,90

* solo se utilizó una réplica

TABLA 7. Velocidad de producción de metano a diferentes temperaturas de incubación (5-20 °C) y con agregado de metanol. Los datos se muestran como el promedio ± error estándar

Lago	Velocidad de producción de metano (μmoles CH ₄ .d ⁻¹ .g ⁻¹)			
	5 °C	10 °C	15 °C	20 °C
Kitezsh	nd	nd	nd	(1,73 ± 0,45) x 10 ⁻³
Long	nd	nd	0,48*	2,26*
Mondsee	nd	nd	(1,11 ± 0,12) x 10 ⁻³	5,00 x 10 ^{-3*}
Slalom	nd	nd	8,00 x 10 ^{-3*}	nd

nd: no detectado

* solo se utilizó una réplica

4.2.2 Medición de velocidad de producción de metano en sedimentos recolectados en el año 2020

A diferencia de lo observado en los lagos muestreados en febrero del año 2019, se detectó producción de metano endógeno al cabo de siete días en los lagos China y Drake 2 en todas las temperaturas ensayadas. Mientras que para el lago Drake 3 la producción de metano no se detectó hasta el día 171 luego de largada la actividad y solo en las temperaturas más altas (15 y 20 °C). Para el resto de los lagos, no se detectó producción de metano dentro del rango de temperaturas de incubación evaluadas en 638 días de incubación.

A todas las temperaturas evaluadas (5, 10, 15 y 20 °C), la velocidad de producción de metano obtenida en el lago China a nivel endógeno fue la más alta entre todos los sedimentos muestreados. A partir de este lago se obtuvo una velocidad de producción de metano en el rango de 1,90 a 7,40 $\mu\text{moles CH}_4\cdot\text{g}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$ (Tabla 8) y se hallaron diferencias significativas entre las diferentes temperaturas de incubación (Figura 11). El aumento de la temperatura a 20 °C elevó significativamente la producción de metano cuando lo comparamos con lo obtenido a 5 °C (ANOVA de una vía, $p < 0,05$). También se encontraron diferencias en la producción de metano entre 15 y 20 °C, pero no entre 5 y 10 °C (ANOVA de una vía, $p > 0,05$). En cuanto a los lagos Drake 2 y 3, la producción de metano endógeno fue menor a la obtenida a partir del lago China. A partir del lago Drake 2 se obtuvieron valores de producción de metano que van desde 0,15 hasta 0,74 $\mu\text{moles CH}_4\cdot\text{g}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$ (Tabla 8) y al igual que lo sucedido en el lago China, se observó un aumento significativo en la producción de metano al aumentar la temperatura de incubación, donde la mayor velocidad de producción se obtuvo a 20 °C (ANOVA de una vía, $p < 0,05$). En este lago tampoco se observó diferencia significativa en la producción de metano entre las temperaturas 5 y 10 °C. Por último, en el lago Drake 3 la producción de metano a 5 y 10 °C no pudo ser detectada. En cambio, a 15 y 20 °C los valores obtenidos de metano fueron $1,46 \times 10^{-3}$ y 0,1 $\mu\text{moles CH}_4\cdot\text{g}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$ respectivamente, y no se encontraron diferencias significativas entre los valores obtenidos (ANOVA de una vía, $p > 0,05$).

TABLA 8. Velocidad de producción de metano endógeno a diferentes temperaturas de incubación (5-20 °C). Los datos se muestran como el promedio \pm error estándar

Lago	Velocidad de producción de metano ($\mu\text{moles CH}_4 \cdot \text{g}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$)				E_a (kJmol^{-1})
	5 °C	10 °C	15 °C	20 °C	
China	$1,95 \pm 0,70$	$1,93 \pm 1,10$	$5,85 \pm 0,47$	$7,44 \pm 0,28$	68,9
Drake 1	nd	nd	nd	nd	-
Drake 2	$0,15 \pm 0,03$	$0,15 \pm 0,05$	$0,57 \pm 0,24$	$0,74 \pm 0,33$	82,8
Drake 3	nd	nd	$(1,46 \pm 0,73) \times 10^{-3}$	$(1,00 \pm 0,81) \times 10^{-1}$	-
Green	nd	nd	nd	nd	-
Oil Tank	nd	nd	nd	nd	-
Uruguay	nd	nd	nd	nd	-

nd: no detectado

E_a : Energía de activación

-: no se pudo determinar por falta de datos

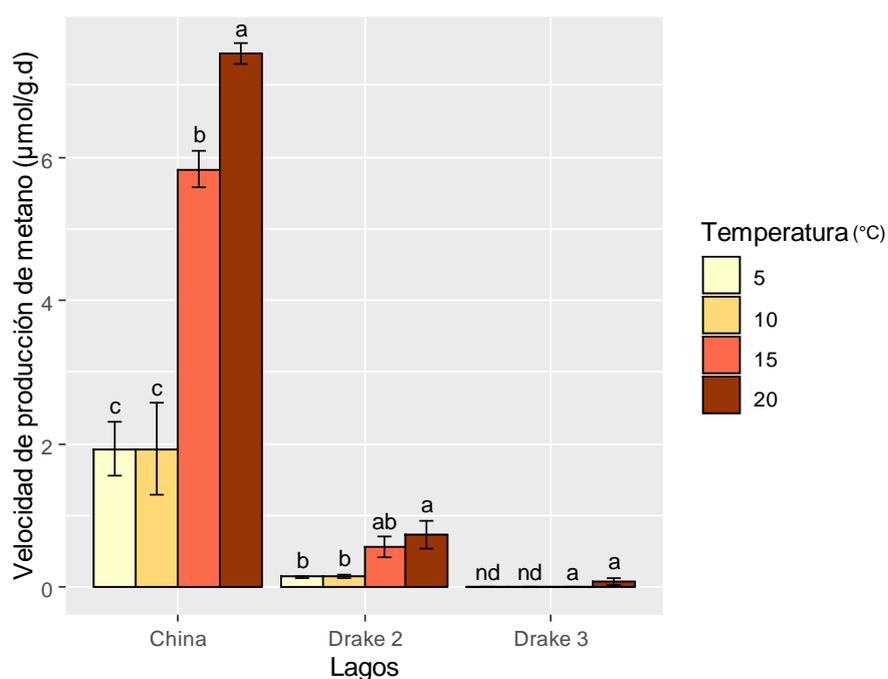


FIGURA 11. Efecto de la temperatura en la velocidad de producción de metano a partir de la materia orgánica propia del sedimento (producción de metano endógeno). Los datos se muestran como el promedio \pm error estándar. Valores con letras diferentes son significativamente diferentes con $p < 0,05$ (ANOVA de una vía + test de Tukey).

Para observar si existe algún tipo de relación entre las velocidades de producción de metano a nivel endógeno obtenidas a las diferentes temperaturas de incubación, a partir de los lagos China, Drake 2 y Drake 3, y las diferentes variables ambientales detalladas en la Tabla 4, se realizó un PCA (Figura 12).

Todas las variables utilizadas en el análisis explicaron el 100 % de la variación total del conjunto de datos. Los vectores correspondientes a las variables de velocidad de producción de metano endógeno a 5, 10, 15 y 20 °C se representan en el mismo sentido, dirección y módulo que los vectores correspondientes a las variables TOC y TN, lo que indican que este conjunto de variables se encuentra fuertemente relacionadas. El coeficiente rho (ρ) de Spearman fue utilizado para confirmar la correlación entre las velocidades de producción de metano obtenidas a diferentes temperaturas y la TOC o TN. Las velocidades de producción de metano a 5, 10, 15 y 20 °C se correlacionaron positivamente tanto con la TOC como con TN (correlación de Spearman, $\rho=1$), lo que sugiere que, a mayor cantidad de materia orgánica y nitrógeno en los sedimentos, mayor velocidad de producción de metano.

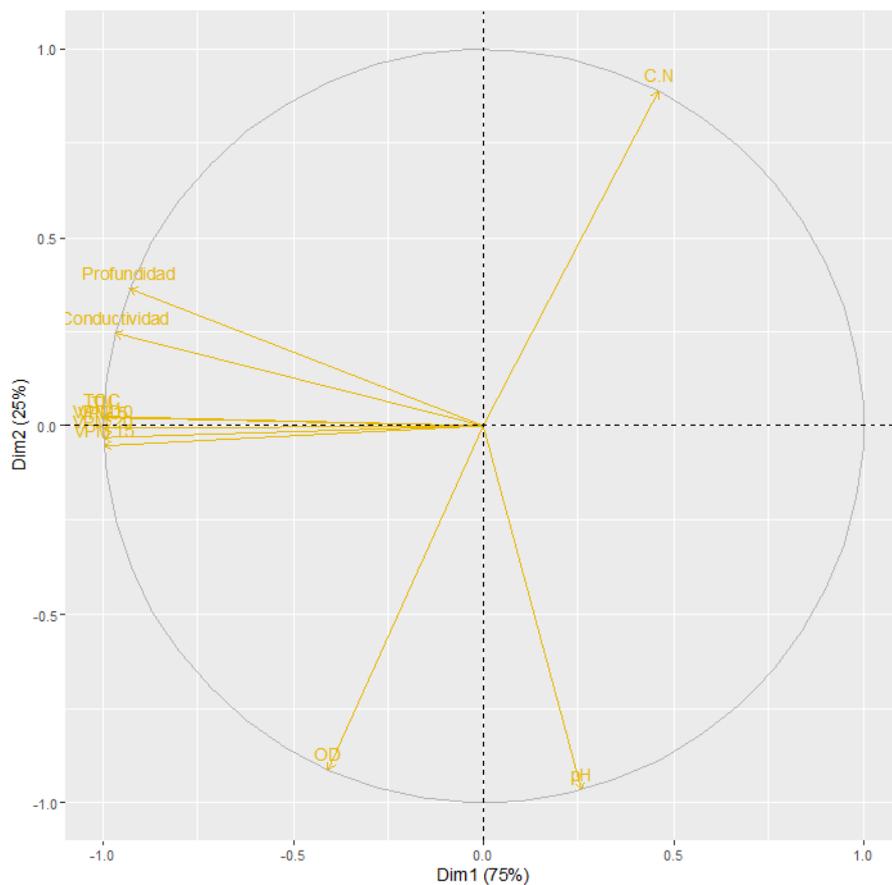


FIGURA 12. Gráfico de análisis de componentes principales de las dos primeras dimensiones basado en las variables fisicoquímicas de los sedimentos y las diferentes velocidades de producción de metano endógeno (VPM) a 5, 10, 15 y 20 °C. TOC: carbono orgánico total, TN: nitrógeno total, C:N: relación carbono orgánico total/nitrógeno total, OD: oxígeno disuelto.

Se realizó, además, una comparación de la velocidad de producción de metano a diferentes temperaturas para diferentes grupos tróficos de arqueas metanogénicas con el agregado de sustratos

metanogénicos específicos como acetato e H₂/CO₂. Las velocidades de producción de metano a partir de dichos sustratos para cada sedimento evaluado, se detalla en las Tablas 9 y 10.

TABLA 9. Velocidad de producción de metano a diferentes temperaturas de incubación (5-20 °C) y con agregado de acetato. Los datos se muestran como el promedio ± error estándar

Lago	Velocidad de producción de metano (μmoles CH ₄ .d ⁻¹ .g ⁻¹)				E _a (kJmol ⁻¹)
	5 °C	10 °C	15 °C	20 °C	
China	30,0 ± 2,0	28,0 ± 3,0	39,0 ± 5,0	49,8 ± 0,5	24,6
Drake 1	0,20 ± 0,10	0,08 ± 0,05	0,39 ± 0,19	1,80 ± 0,20	110,1
Drake 2	4,40 ± 0,10	2,50 ± 0,50	8,60 ± 0,20	10,7 ± 0,2	52,0
Drake 3	3,31 ± 0,14	3,23 ± 0,89	5,19 ± 0,31	6,85 ± 0,32	35,6
Green	0,91 ± 0,38	0,78 ± 0,30	2,28 ± 0,33	2,16 ± 0,26	49,3
Oil Tank	1,08 ± 0,47	1,31 ± 0,12	3,17 ± 0,18	2,99 ± 0,82	53,1
Uruguay	nd	nd	(2,08 ± 0,77) x 10 ⁻³	(5,42 ± 2,29) x 10 ⁻³	-

nd: no detectado

E_a: Energía de activación

-: no se pudo determinar por falta de datos

TABLA 10. Velocidad de producción de metano a diferentes temperaturas de incubación (5-20°C) y con agregado de H₂/CO₂. Los datos se muestran como el promedio ± error estándar

Lago	Velocidad de producción de metano (μmoles CH ₄ .d ⁻¹ .g ⁻¹)				E _a (kJmol ⁻¹)
	5°C	10°C	15°C	20°C	
China	33,0 ± 5,9	30,6 ± 4,2	52,7 ± 0,6	90,7 ± 2,0	47,7
Drake 1	(2,60 ± 0,02) x 10 ⁻³	(2,10 ± 0,03) x 10 ⁻³	2,6 ± 0,5	0,04 ± 0,03	209,4
Drake 2	2,15 ± 0,06	1,90 ± 0,08	4,8 ± 0,9	14,1 ± 0,4	88,0
Drake 3	0,08 ± 0,02	0,030 ± 0,002	0,24 ± 0,09	2,5 ± 2,4	165,8
Green	(0,80 ± 0,50) x 10 ⁻²	(0,30 ± 0,10) x 10 ⁻²	0,69 ± 0,40	17,6 ± 2,7	381,0
Oil Tank	(1,60 ± 0,01) x 10 ⁻²	(0,90 ± 0,40) x 10 ⁻²	1,22 ± 0,88	28,2 ± 0,2	365,0
Uruguay	nd	(3,30 ± 0,14) x 10 ⁻³	0,32 ± 0,14	13,8 ± 0,3	570,5

nd: no detectado

E_a: Energía de activación

Se detectó producción de metano en todos los microcosmos con el agregado de sustrato metanogénico acetato o H₂/CO₂ a las temperaturas evaluadas (5, 10, 15 y 20 °C), con valores que van desde 2,1 x 10⁻³ a 90,7 μmoles CH₄.g⁻¹.d⁻¹ (Tabla 9 y 10). Al igual que lo observado en los sedimentos sin agregado de sustrato, la velocidad de producción de metano fue dependiente de la temperatura de incubación y aumentó a temperaturas más elevadas.

En la mayoría de los lagos, excepto en Drake 2, con agregado de acetato no se observó una diferencia significativa en la producción de metano entre 5 y 10 °C pero si cuando la temperatura es aumentada a 15 °C (ANOVA de una vía, $p < 0,05$). Solo en Drake 2 hubo una disminución significativa en la producción de metano cuando la temperatura pasa de 5 a 10 °C. En todos los sedimentos lacustres con agregado de acetato la máxima velocidad de producción de metano se detectó a 20 °C, excepto para los lagos Green y Oil Tank donde no se observó diferencias significativas en la producción de metano entre 15 y 20 °C (ANOVA de una vía, $p = 0,97$). Como se observa en la Figura 14 en los lagos Oil Tank y Green hay un aumento progresivo en la velocidad de producción de metano cuando se pasa de una temperatura de 5 a 15 °C, pero no se observa un aumento significativo al aumentar la temperatura de 15 a 20 °C.

Con el agregado de H_2/CO_2 la producción de metano fue muy reducida a bajas temperaturas (5 y 10 °C) en la mayoría de los lagos. En Drake 1, Drake 3, Green y Oil Tank se obtuvieron valores por debajo de $0,1 \mu\text{moles } CH_4 \cdot g^{-1} \cdot d^{-1}$ (Tabla 10), mientras que en el lago Uruguay no se logró detectar metano a 5 °C. Semejante a lo sucedido con la adición de acetato al microcosmos, en todos los lagos se observa una mayor producción de metano a 20 °C cuando son incubados con H_2/CO_2 , excepto en el lago Drake 1 donde se observa que la producción de metano es óptima a 15 °C.

Si bien las velocidades de producción de metano aumentaron conforme aumentaba la temperatura de incubación, mostrando un máximo de producción a 20 °C en la mayoría de los lagos con ambos sustratos metanogénicos, los valores obtenidos fueron dependientes del sustrato metanogénico y la temperatura de incubación. Se observaron diferencias significativas entre las velocidades de producción de metano obtenidas a bajas temperaturas con agregado de acetato en comparación con lo obtenido con agregado de H_2/CO_2 . A 5 y 10 °C las velocidades de producción de metano fueron mayores a partir del sustrato acetato en todos los lagos excepto los lagos China (a 5 y 10 °C) y Drake 2 (a 10 °C), en donde no se encontraron diferencias significativas (ANOVA de una vía, $p > 0,05$). Los sedimentos procedentes del lago China y Drake 1 incubados a 15 °C con el sustrato H_2/CO_2 mostraron una velocidad significativamente mayor de producción de CH_4 cuando lo comparamos con las velocidades obtenidas a partir de acetato (ANOVA de una vía, $p < 0,05$) a la misma temperatura. Mientras que lo contrario fue observado en los lagos Drake 2, Drake 3, Oil Tank y Green donde se detectó una mayor velocidad de producción de CH_4 cuando estos sedimentos fueron incubados con acetato. A 20 °C en todos los lagos, excepto Drake 1, los valores de velocidades de producción de metano fueron significativamente más elevados cuando a estos lagos se les agregó H_2/CO_2 comparados con los sedimentos incubados con acetato.

Por otra parte, el efecto del incremento de la temperatura sobre velocidad de producción de metano fue diferente en aquellos microcosmos con agregado de acetato con respecto a los que se le adicionó

H₂/CO₂. La dependencia de la velocidad de producción de metano con la temperatura fue evaluada a partir de la determinación de la energía de activación (E_a). El rango de E_a para los sedimentos fue de 24,6 a 110,1 kJmol⁻¹ (promedio de 54 ± 12 kJmol⁻¹) para acetato y 47,7 a 570,5 kJmol⁻¹ (promedio de 209 ± 57 kJmol⁻¹) para H₂/CO₂ (Tablas 9 y 10). A partir de estos resultados, se observó que la dependencia de la velocidad de producción de metano con la temperatura fue significativamente mayor cuando a los sedimentos se les suministró el precursor metanogénico H₂/CO₂ en comparación con el acetato (ANOVA de una vía, $p < 0,05$).

Como se mencionó, en todas las temperaturas evaluadas en esta investigación, el agregado de los sustratos acetato o H₂/CO₂ en los microcosmos aumentaron significativamente la velocidad de producción de metano en los lagos China y Drake 2 con respecto a los microcosmos sin sustrato (endógeno) (ANOVA de una vía, incubación a 5, 10, 15 y 20 °C, $p < 0,05$). En el lago China la adición de sustrato acetato al sedimento aumentó la velocidad de producción de metano 16 veces más a bajas temperaturas (5 y 10 °C) y 7 veces más a temperaturas mesófilas (15 y 20 °C). Resultados similares se observaron con la adición de H₂/CO₂, cuando se agregó este sustrato a bajas temperaturas la velocidad aumentó 16 veces más mientras que a 15 y 20 °C el efecto fue menor aumentando 9 y 12 veces. En Drake 2 a 5 °C el efecto del agregado de acetato fue más notorio, en estos microcosmos se observó un aumento en la velocidad de producción de 30 veces en comparación con los microcosmos sin sustrato. Además, se observó que a medida que aumenta la temperatura el efecto es menor, a 10 °C solo aumentó 16 veces, a 15 °C 15 veces y 20 °C 14 veces más. Con H₂/CO₂ el aumento fue menor que con respecto a acetato, a bajas temperaturas se aumentó entre 14 y 12 veces a 5 y 10 °C, respectivamente y a temperaturas más altas el efecto fue más pronunciado a 20 °C aumentando 19 veces más y 8 veces más a 15 °C. En el lago Drake 3 a 15 °C solo se observa diferencias con respecto al endógeno cuando al sedimento se le adiciona acetato, pero no cuando se le adiciona H₂/CO₂ (ANOVA de una vía, $p = 0,34$). En cambio, a 20 °C si se observa un aumento en la producción de metano cuando se adiciona H₂/CO₂ o acetato con respecto al endógeno.

Para el caso del lago China, además de evaluar la velocidad de producción de metano con el agregado de los sustratos acetato o H₂/CO₂, también se evaluó la adición del sustrato metanogénico metanol. Si bien se observó producción de metano a todas las temperaturas de incubación (Figura 13 a), se obtuvo que no existe un aumento significativo en la velocidad de producción de metano con el agregado de metanol con respecto a la velocidad de producción de metano endógeno (test de Dunnett, $p > 0,05$). Por lo que la producción de metano observada en aquellos microcosmos con el sustrato metanol, no estaría dada por la metabolización del metanol a metano (por parte de arqueas metilotróficas) si no por la degradación de la materia orgánica propia del sedimento.

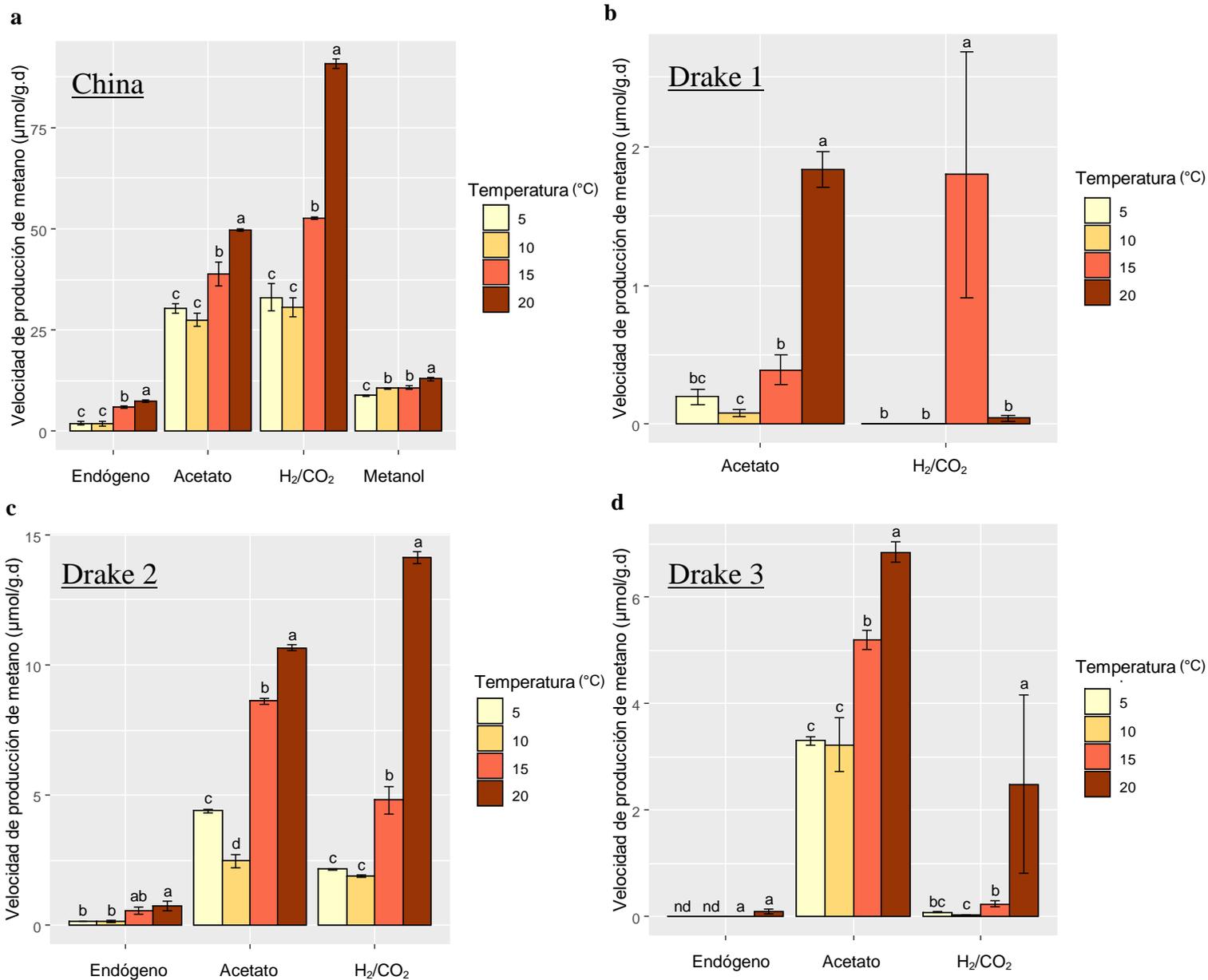


FIGURA 13. Efecto de la temperatura en la velocidad de producción de metano ($\mu\text{moles CH}_4\cdot\text{g}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$) en sedimentos lacustres con agregado de sustrato acetato, H_2/CO_2 y sin sustrato (endógeno); a. Lago China, b. Drake 1, c. Drake 2, d. Drake 3, e. Green, f. Oil Tank y g. Uruguay. En el eje x se grafican los sustratos evaluados en esta actividad y en el eje y los promedios de las velocidades de producción de metano ($\mu\text{moles CH}_4\cdot\text{g}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$) \pm error estándar. Diferencias significativas ($p < 0.05$) entre las velocidades de producción de metano a diferentes temperaturas son indicados por letras.

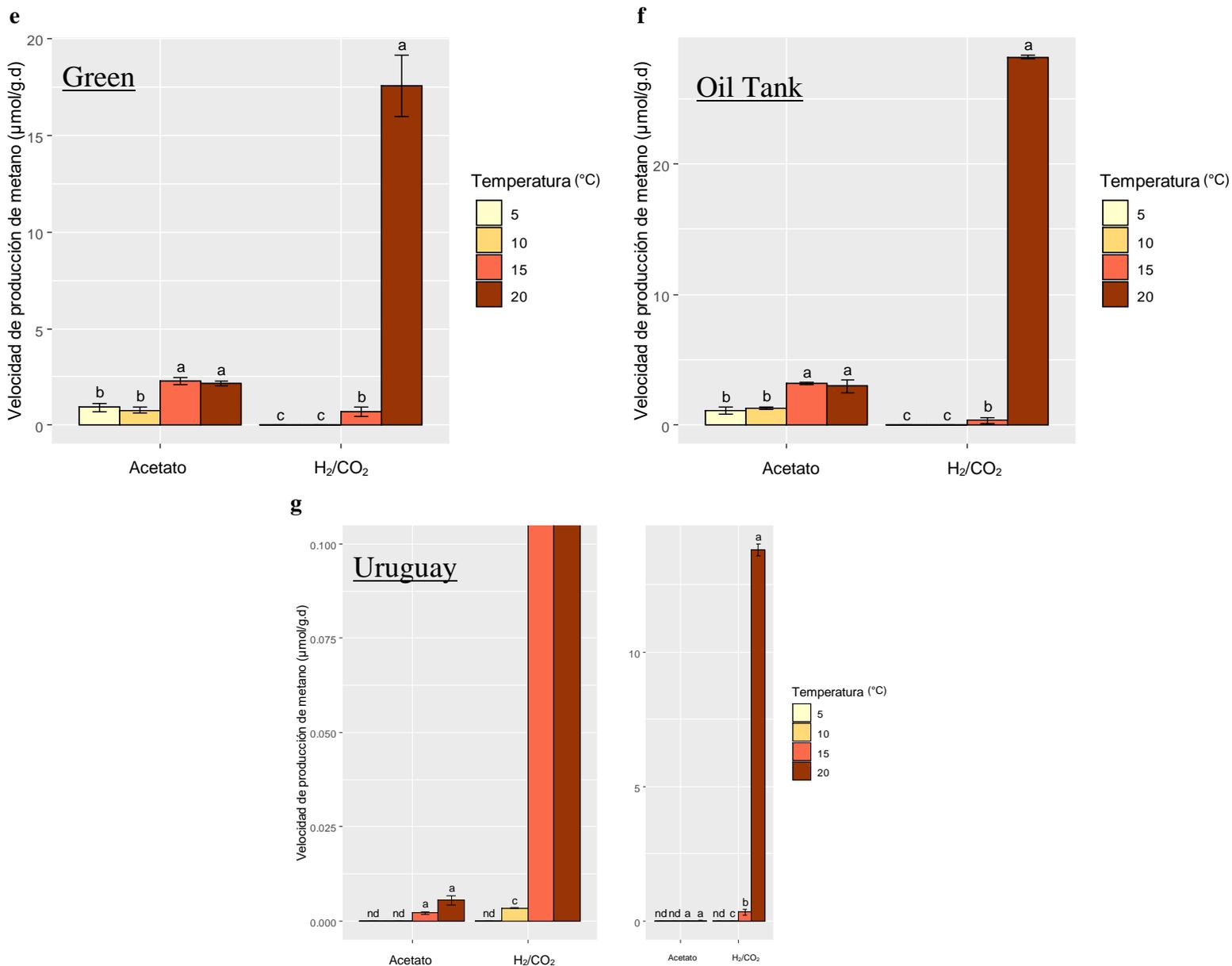


Figura 13. (Continuación) Efecto de la temperatura en la velocidad de producción de metano ($\mu\text{moles CH}_4 \cdot \text{g}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$) en sedimentos lacustres con agregado de sustrato acetato, H_2/CO_2 y sin sustrato (endógeno); a. Lago China, b. Drake 1, c. Drake 2, d. Drake 3, e. Green, f. Oil Tank y g. Uruguay. En el eje x se grafican los sustratos evaluados en esta actividad y en el eje y los promedios de las velocidades de producción de metano ($\mu\text{moles CH}_4 \cdot \text{g}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$) \pm error estándar. Diferencias significativas ($p < 0.05$) entre las velocidades de producción de metano a diferentes temperaturas son indicados por letras.

4.3 Abundancia de arqueas totales y arqueas metanogénicas en sedimentos lacustres antárticos

Para poder conocer la abundancia de la comunidad de arqueas totales y arqueas metanogénicas en cada uno de los sedimentos lacustres se realizó la cuantificación de los genes ARNr 16S y *mcrA*. Las curvas de calibración obtenidas para los genes ARNr 16S y *mcrA* presentaron una linealidad

adecuada ($R^2 \geq 0,99$) y buena eficiencia, 95 % para el gen ARNr 16S y 83 % para el gen *mcrA*. Las curvas *demelting* para cada gen presentaron un único pico, demostrándose así la especificidad de los productos cuantificados (apéndice 1, Figuras 1 b y 2 b, respectivamente). El número de copias para cada gen (Tablas 11 y 12) fue normalizado en base a los gramos de sedimento seco utilizado en la extracción de ADN. Finalmente, para los análisis estadísticos y representaciones gráficas, los datos se sometieron a transformaciones logarítmicas (en base 10).

4.3.1 Abundancia de arqueas totales: gen ARNr 16S

Mediante la técnica de qPCR para el gen ARNr 16S, se logró detectar y cuantificar microorganismos pertenecientes al Dominio *Archaea* presentes en los sedimentos lacustres muestreados. La abundancia de este gen hallada en los lagos Kitezh, Long, Mondsee y Slalom fue desde $(1,64 \pm 0,84) \times 10^4$ a $(2,78 \pm 0,67) \times 10^6$ copias del gen ARNr 16S/g de sedimento seco (Tabla 11). Los lagos Slalom y Long presentaron una abundancia similar en copias de ARNr 16S (no encontrándose diferencias significativas entre los mismos, ANOVA de una vía, $p = 0,96$) y una abundancia de 1 y 2 ordenes de magnitud más alta que los genes de ARNr 16S cuantificados en los lagos Mondsee y Kitezh, respectivamente (Figura 14). Kitezh fue el lago que mostró menor número de arqueas totales con tan solo $(1,64 \pm 0,84) \times 10^4$ copias de ARNr 16S/g sedimento seco. Por otra parte, el lago China fue el lago que presentó mayor abundancia de arqueas totales (Figura 14), donde se encontraron diferencias de hasta 4 ordenes de magnitud más altos que los valores obtenidos para el resto de los lagos evaluados en este trabajo (2019-2020). En este lago la abundancia de genes ARNr 16S hallada fue de $(3,42 \pm 0,59) \times 10^8$ copias/g sedimento seco (Tabla 12). Con respecto a los lagos muestreados en el año 2020, el lago Drake 2 fue el segundo lago que mostró mayor abundancia de dicho gen con $(6,96 \pm 4,43) \times 10^6$ copias del gen 16S ARNr/g de sedimento seco. Abundancias similares se obtuvieron en los lagos Drake 1, Drake 3, Green, Oil Tank y Uruguay, donde no se encontraron diferencias significativas en la cuantificación de copias del gen ARNr 16S.

TABLA 11. Abundancia (en copias del gen.g⁻¹ sedimento seco) de genes ARNr 16S de arquea y *mcrA* en sedimentos lacustres antárticos evaluados en este estudio. Los valores representan los promedios con errores estándar

Lagos 2019	Número de copias de ARNr 16S. g ⁻¹ sedimento seco	Número de copias de <i>mcrA</i> . g ⁻¹ sedimento seco
Kitezh	$(1,64 \pm 0,84) \times 10^4$	$(3,32 \pm 0,73) \times 10^3$
Long	$(2,78 \pm 0,67) \times 10^6$	$(4,94 \pm 1,71) \times 10^5$
Mondsee	$(2,32 \pm 0,13) \times 10^5$	$(4,09 \pm 4,07) \times 10^3$
Slalom	$(1,74 \pm 0,55) \times 10^6$	$(1,57 \pm 0,95) \times 10^3$

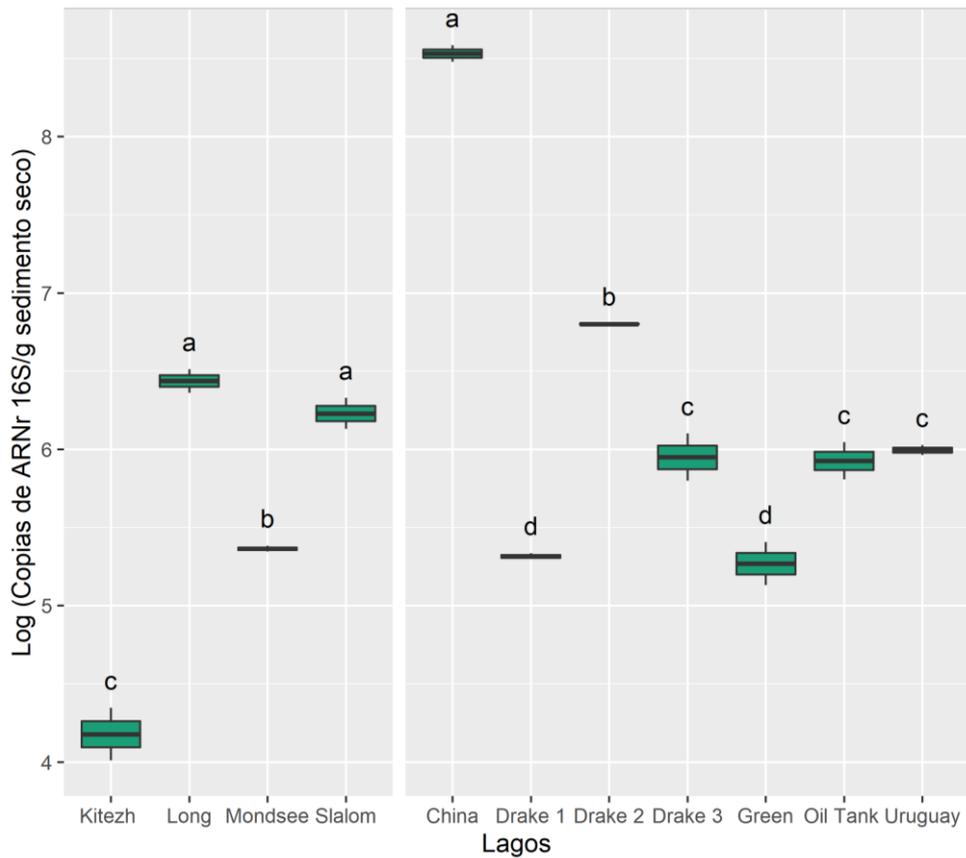


FIGURA 14. Gráfico de cajas de abundancia de genes ARNr 16S de arquea en sedimentos lacustres antárticos evaluados en este estudio. En el eje y se muestran el log10 del número de copias del gen ARNr 16S por gramo de sedimento seco. Valores con letras distintas son significativamente diferentes con $p < 0,05$ (ANOVA de una vía + test de Tukey). Los ANOVA se realizaron para los lagos muestreados en el año 2019 y 2020 por separado.

TABLA 12. Abundancia (en copias del gen.g⁻¹ sedimento seco) de genes ARNr 16S de arquea y *mcrA* en sedimentos lacustres antárticos evaluados en este estudio

Lagos 2020	Número de copias de ARNr 16S. g ⁻¹ sedimento seco	Número de copias de <i>mcrA</i> . g ⁻¹ sedimento seco
China	$(3,42 \pm 0,59) \times 10^8$	$(9,08 \pm 0,85) \times 10^7$
Drake 1	$(2,07 \pm 0,12) \times 10^5$	$(5,90 \pm 1,48) \times 10^3$
Drake 2	$(6,33 \pm 0,05) \times 10^6$	$(6,09 \pm 0,54) \times 10^5$
Drake 3	$(9,43 \pm 4,46) \times 10^5$	$(3,15 \pm 0,09) \times 10^4$
Green	$(1,95 \pm 0,84) \times 10^5$	$(4,98 \pm 0,33) \times 10^3$
Oil Tank	$(8,76 \pm 3,29) \times 10^5$	$(2,35 \pm 0,17) \times 10^4$
Uruguay	$(9,93 \pm 1,03) \times 10^5$	$(1,61 \pm 0,27) \times 10^3$

4.3.2 Abundancia de arqueas metanogénicas: gen *mcrA*

La abundancia de arqueas metanogénicas fue determinada mediante la cuantificación del gen *mcrA*, gen funcional clave en su metabolismo. Al igual que la cuantificación del gen ARNr 16S, fue realizado mediante la técnica de qPCR. El rango de copias de *mcrA* cuantificadas en los lagos Kitezh, Long, Mondsee y Slalom fue entre $(3,32 \pm 0,73) \times 10^3$ a $(4,94 \pm 1,71) \times 10^5$ copias de *mcrA*.g⁻¹ sedimento seco (Tabla 11), siendo Long el lago que mostró una mayor abundancia de metanógenos (hasta 2 ordenes de magnitud más alto) con respecto a los lagos Kitezh, Mondsee y Slalom (Figura 15). Estos últimos lagos mencionados mostraron una abundancia de metanógenos similar entre ellos, no encontrándose diferencias significativas (ANOVA de una vía, $0,68 < p < 0,99$). Por otra parte, en los lagos China, Drake 1, Drake 2, Drake 3, Green, Oil Tank y Uruguay, los valores de copias de *mcrA* obtenidos van desde $(1,61 \pm 0,27) \times 10^3$ a $(9,08 \pm 0,85) \times 10^7$ copias de *mcrA*.g⁻¹ sedimento seco (Tabla 12). Se detectó una abundancia mayor en el sedimento proveniente del lago China, presentando abundancia del gen *mcrA* de 2 a 4 ordenes de magnitud más alta, cuando lo comparamos con el resto de los lagos muestreados el mismo año (ANOVA de una vía, $p < 0,05$) (Figura 15). Seguido al lago China, Drake 2 fue el segundo lago con más abundancias de metanógenos, con una abundancia de $(6,09 \pm 0,54) \times 10^5$ copias de *mcrA*.g⁻¹ sedimento seco y al igual que el lago China, la abundancia fue significativamente diferente al resto de los lagos (ANOVA de una vía, $p < 0,05$) (Figura 15). Por otra parte, se hallaron abundancias similares de metanógenos entre los lagos Drake 3-Oil Tank y Drake 1-Green. Por último, el lago que presentó menor abundancia de metanógenos fue el lago Uruguay con $(1,61 \pm 0,27) \times 10^3$ copias de *mcrA*.g⁻¹ sedimento seco.

La comparación de las abundancias de copias del gen ARNr 16S de arqueas y *mcrA* en todos los sitios de estudio (2019-2020) reveló que en la mayoría de los lagos estudiados la abundancia de genes *mcrA* fue de 1 a 2 órdenes de magnitud más bajos que los genes de ARNr 16S de arquea, excepto en el lago Slalom donde se observó una diferencia de 3 órdenes de magnitud más bajo.

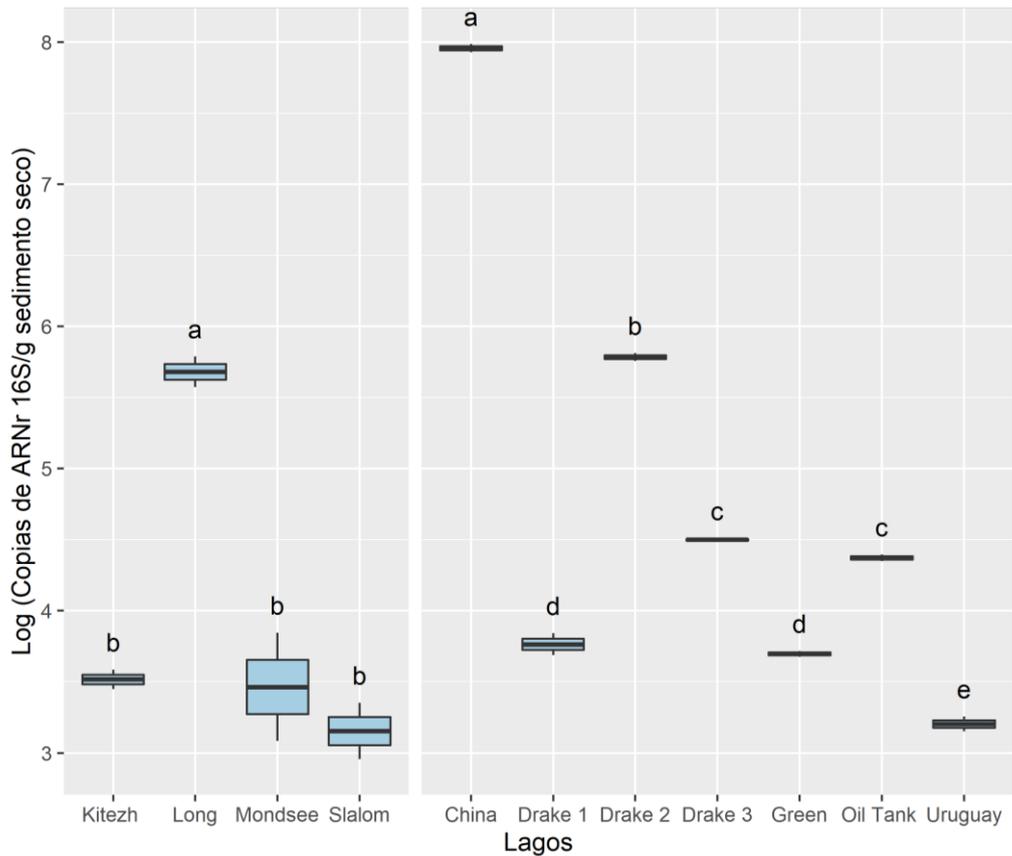


FIGURA 15. Gráfico de cajas de abundancia de genes *mcrA* en sedimentos lacustres antárticos evaluados en este estudio. En el eje y se muestran el \log_{10} del número de copias del gen *mcrA* por gramo de sedimento seco. Valores con letras distintas significativamente diferentes con $p < 0,05$ (ANOVA de una vía + test de Tukey). Los ANOVA se realizaron para los lagos muestreados en el año 2019 y 2020 por separado.

4.4 Cuantificación de arqueas metanogénicas viables por Número más probable

Con el objetivo de obtener el número de arqueas metanogénicas viables en cada uno de los sedimentos estudiados, se realizó la cuantificación por el método de número más probable con la adición del sustrato acetato o H_2/CO_2 al medio de cultivo para lograr así cuantificar arqueas metanogénicas acetoclásticas e hidrogenotrófica, respectivamente e incubados a una temperatura de $5\text{ }^\circ\text{C}$. El resultado de los recuentos de metanógenos acetoclásticos y hidrogenotróficos se muestran en la Tabla 14. En la mayoría de los sedimentos no se pudieron detectar arqueas metanogénicas (valores $< 3,0\text{ NMP g}^{-1}$ sedimento húmedo) con acetato o H_2/CO_2 como sustratos. Se logró cuantificar arqueas metanogénicas acetoclasticas e hidrogenotroficas en el lago China y arqueas metanogénicas acetoclasticas en el lago Drake 3, luego de 274 y 373 días, respectivamente. El lago China presentó

una población de metanogénicas hidrogenotróficas cinco veces mayor (210 NMP.g⁻¹ sedimento húmedo) a las metanogénicas acetoclastica (43 NMP. g⁻¹ sedimento húmedo).

TABLA 13. Número de arqueas metanogénicas viables determinado por el método de NMP con acetato o H₂/CO₂ como sustratos metanogénicos en sedimentos lacustres

Lagos	Sustrato	NMP	
		Arqueas metanogénicas (cel. g ⁻¹) (peso húmedo)	Límite de confianza (95%) Bajo Alto
Kitezh	Acetato	<3,0	- 9,5
	H ₂ /CO ₂	<3,0	- 9,5
Long	Acetato	<3,0	- 9,5
	H ₂ /CO ₂	<3,0	- 9,5
Mondsee	Acetato	<3,0	- 9,5
	H ₂ /CO ₂	<3,0	- 9,5
Slalom	Acetato	<3,0	- 9,5
	H ₂ /CO ₂	<3,0	- 9,5
China	Acetato	43	9 180
	H ₂ /CO ₂	210	40 430
Drake 1	Acetato	<3,0	- 9,5
	H ₂ /CO ₂	<3,0	- 9,5
Drake 2	Acetato	<3,0	- 9,5
	H ₂ /CO ₂	<3,0	- 9,5
Drake 3	Acetato	9,2	1,4 38
	H ₂ /CO ₂	<3,0	- 9,5
Green	Acetato	<3,0	- 9,5
	H ₂ /CO ₂	<3,0	- 9,5
Oil Tank	Acetato	<3,0	- 9,5
	H ₂ /CO ₂	<3,0	- 9,5
Uruguay	Acetato	<3,0	- 9,5
	H ₂ /CO ₂	<3,0	- 9,5

4.5 Composición y estructura de la comunidad de arquea por secuenciación masiva del gen ARNr 16S

La composición y estructura de la comunidad de arqueas fue determinada por secuenciación masiva dirigida al gen ARNr 16S del dominio *Archaea*. La profundidad de secuenciación de los datos brutos obtenidos por tecnología Illumina Miseq del gen ARNr 16S y el número de lecturas por muestra restante después de cada paso del análisis de los datos se detallan en el apéndice 2 (Tabla 1). Las calidades de las lecturas *forward* y *reverse* se muestran en las Figuras 3-5 y 6-8 del apéndice 2, como también los gráficos de índices de aprendizaje de error producidos por DADA2 (apéndice 2, Figura 10 y 11). Luego del procesamiento de las muestras (corte, filtrado y eliminación de quimeras) se generaron 2643 ASV formadas por 674.886 lecturas de alta calidad a partir de las 11 muestras. Una vez realizada la asignación taxonómica se encontró que de las 2643 ASV halladas, 271 ASV pertenecían al dominio *Archaea*, 2368 ASV al dominio *Bacteria*, 2 ASV al dominio *Eukarya* y 2 ASV sin identificar. El hecho de haber obtenido 2368 ASV identificadas como pertenecientes al dominio *Bacteria* indican la baja especificidad de los primers utilizados en este análisis por el gen ARNr 16S del dominio *Archaea*. Aquellos ASV obtenidos que se identificaron como no pertenecientes al dominio *Archaea* fueron eliminados, al igual que aquellos que no se lograron identificar. De esta forma, quedaron 271 ASV pertenecientes al dominio *Archaea*, las cuales se volvieron a filtrar para extraer aquellas ASV que se encontraran representadas por menos de 5 lecturas en todo el set de datos y así evitar errores de secuenciación. Se logró obtener así 477.162 lecturas en total de alta calidad representadas por 256 ASV.

Las gráficas de rarefacción para el conjunto de datos de abundancia de ASV aseguró una profundidad suficiente para la mayoría de los lagos evaluados (apéndice 2 Figura 11). Por otra parte, considerando todos los sitios de muestreo, el rango de riqueza observada varió de 19 a 68. El índice de Shannon varió de 0,68 a 2,48 y el índice de Simpson varió de 0,22 a 0,89 (Tabla 14 y Figura 16). La diversidad de la comunidad, como se refleja en el índice de Shannon, fue más alta en Drake 1 y más baja en Oil Tank.

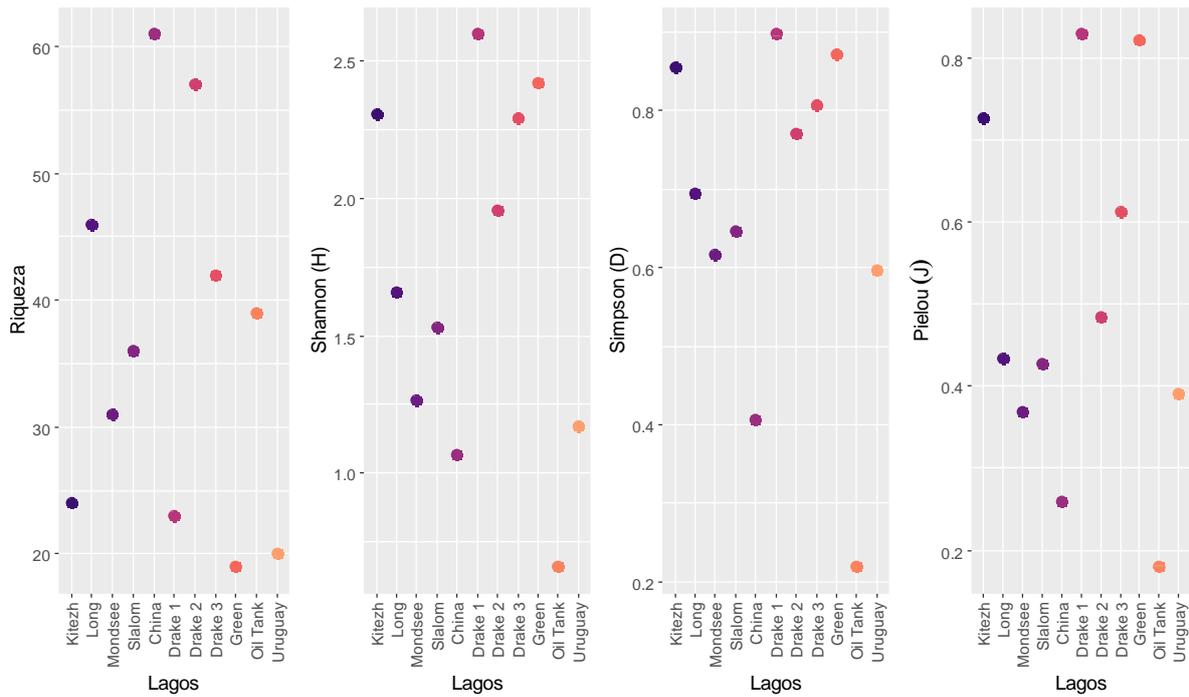


FIGURA 16. Diversidad alfa representada en diferentes índices de diversidad: 1. Riqueza, 2. Shannon (H), 3. Simpon (D) y 4. Pielou (J). Cada punto representa una muestra.

TABLA 14. Diversidad alfa de la comunidad de arqueas en los diferentes sedimentos lacustres estudiados.

Lagos	Riqueza (S)	Shannon (H)	Simpson (1-D)	Pielou (J)
Kitezh	24	2,31	0,85	0,73
Long	46	1,66	0,69	0,43
Mondsee	31	1,27	0,62	0,37
Slalom	36	1,52	0,65	0,43
China	61	1,06	0,41	0,26
Drake 1	23	2,60	0,90	0,83
Drake 2	57	1,96	0,77	0,48
Drake 3	42	2,29	0,81	0,61
Green	19	2,42	0,87	0,82
Oil Tank	39	0,66	0,22	0,18
Uruguay	20	1,17	0,60	0,39

A nivel de phylum en estos sedimentos lacustres se encontraron solamente cinco phyla, *Crenarchaeota*, *Euryarchaeota*, *Halobacterota*, *Nanoarchaeota* y *Thermoplasmata* (Figura 17). Las phyla *Crenarchaeota*, *Halobacterota* y *Nanoarchaeota* fueron las más abundantes en la mayoría de los lagos. Los lagos Kitezh, Long, Mondsee y Slalom exhibieron una composición similar de

arqueas a nivel de phylum donde *Crenarchaeota* fue el phylum más abundantes con abundancias relativas mayores al 50 % en todos los lagos, excepto en Long donde *Nanoarchaeota* ocupó un 65 % de la comunidad de arqueas. Sin embargo, el phylum *Halobacterota* solo se observó en el lago Kitezh con una abundancia de 10 % aproximadamente, mientras que en el resto de los lagos recolectados en el 2019 fue menor a 0,3 %. A diferencia de estos lagos, en los sedimentos provenientes de los lagos China, Drake 1, Drake 2, Drake 3 y Green, la composición de las arqueas fue muy diferente a lo mencionado anteriormente. Se observó una predominancia del phylum *Halobacterota* que fue desde el 44 % (Drake 1) al 98 % (China). En estos lagos también se observa la presencia de las phyla *Euryarchaeota* y *Thermoplasmata* en abundancias menores, a diferencia de lo observado en los lagos muestreados en el 2019, donde estas phyla no fueron encontradas. Por otra parte, los lagos Oil Tank y Uruguay mostraron una composición taxonómica a nivel de phylum muy similar entre si y a lo encontrado en los lagos de 2019, donde se observa una composición de la comunidad de arqueas formada mayormente por las phyla *Crenarchaeota* y *Nanoarchaeota*. El phylum *Crenarchaeota* se presenta en un 89 y 62 % en los lagos Oil tank y Uruguay, respectivamente, mientras que *Nanoarchaeota* ocupa una proporción menor, ocupando solo el 9 y 38 % en las comunidades de arqueas en los lagos Oil Tank y Uruguay, respectivamente.

El phylum *Crenarchaeota* se encontró formado mayormente por géneros pertenecientes a la familia *Nitrosotaleaceae* (abundancias relativas entre 31-57 %) y *Nitrosarchaeum* en abundancias menores (2-5 %) en los lagos Long, Mondsee y Slalom (Figura 18). Mientras que en el Kitezh este phylum se encuentra representado por géneros pertenecientes a la familia *Nitrososphaeraceae* y el género *Candidatus Nitrocosmicus* con abundancias de 43 y 31 %, respectivamente. Por otra parte, el phylum *Nanoarchaeota* estuvo también representado en estos lagos por géneros pertenecientes al orden *Woeseearchaeales*, con abundancias relativas que van desde 15 % (Kitezh) hasta 65 % (Long). A nivel de géneros, el lago Kitezh sigue mostrando una abundancia de la comunidad de arqueas bien diferente a la observada en los lagos Long, Mondsee y Slalom, donde se encontraron los mismos géneros en los tres lagos.

La mayoría de los grupos taxonómicos variaron en abundancia u ocurrencia entre los lagos muestreados en el año 2020 (Figura 18). La comunidad de arqueas en estos lagos se encuentra dominada mayormente por géneros metanogénicos, excepto en los lagos Oil Tank donde estos géneros solo se observaron en un 2 % de la abundancia total y Uruguay donde se encontró una abundancia relativa de géneros metanogénicos menor al 0,1 % (Figura 18). En cambio, en estos dos lagos la composición de la comunidad de arqueas se mostró fuertemente marcada por la presencia de arqueas pertenecientes al género *Nitrosarchaeum* (89 %) y al orden *Woeseearchaeales* (8 %) en el lago Oil Tank y arqueas del género *Candidatus Nitrosotalea* (62 %) y orden *Woeseearchaeales* (38 %) en el lago Uruguay.

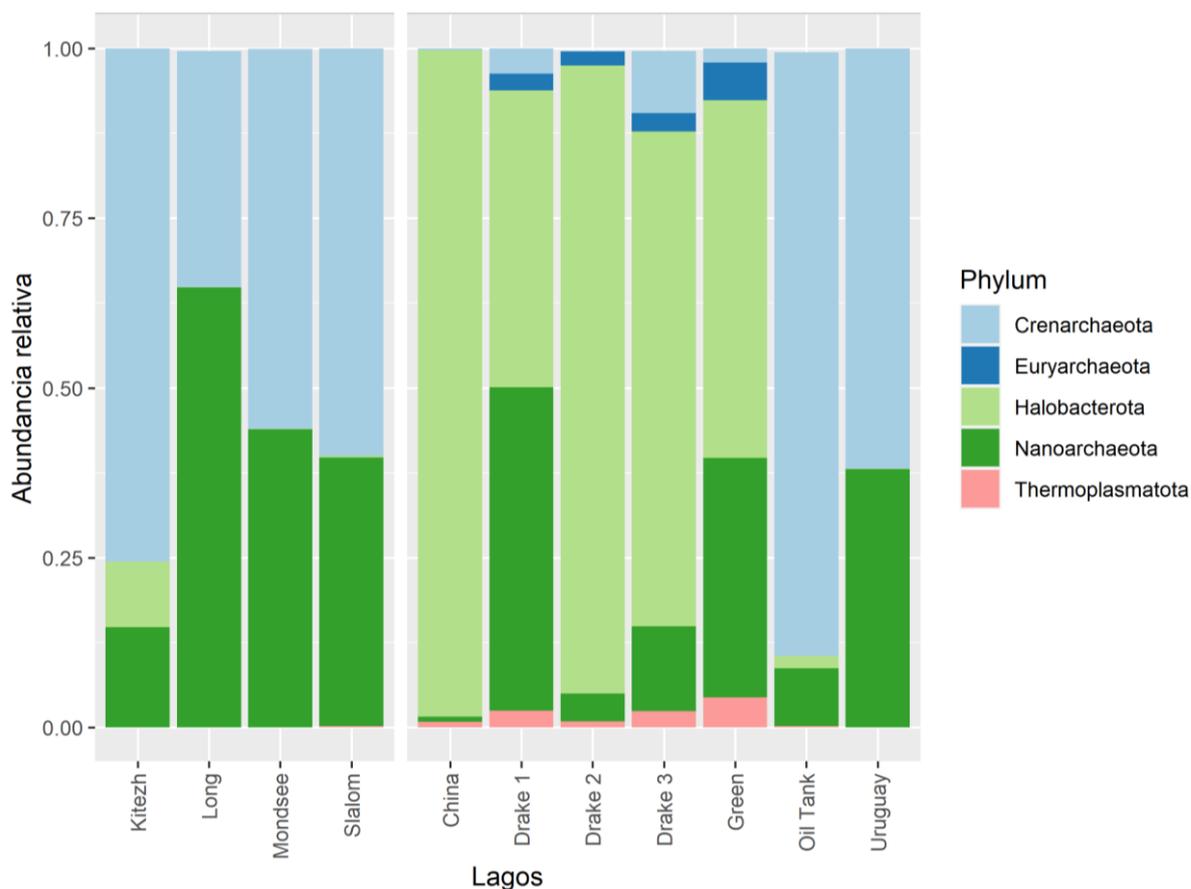


FIGURA 17. Abundancias relativas de arqueas a nivel de phylum en los lagos Kitezh, Long, Mondsee y Slalom en el año 2019, y los lagos China, Drake 1, Drake 2, Drake 3, Green, Oil Tank y Uruguay en el año 2020. No se muestran phyla con abundancias relativas menores al 5%.

Como se mencionó, los géneros metanogénicos fueron los más abundantes en los lagos China, Drake 1, Drake 2, Drake 3 y Green y se encontraron representados por los géneros *Methanosaeta*, *Methanoregula*, *Methanosarcina*, *Methanosphaerula*, *Methanobacterium* y metanogénicos incluidos en la familia *Methanomassiliicoccaceae* (Figura 18). Entre ellos, el género *Methanosaeta* se encontró principalmente en el lago China donde ocupó un 77 % de la abundancia total de la comunidad, seguido por *Methanoregula* con 16% y el restante 6 % fue ocupado por los géneros *Methanosarcina*, *Methanosphaerula* y géneros pertenecientes a la familia *Methanomassiliicoccaceae*. El género hidrogenotrófico *Methanoregula*, fue el género metanogénico más abundante en los lagos Drake 2 y Drake 3 con abundancias próximas al 46 y 36 %, mientras que en los lagos Green y Oil Tank fue menor al 2%. Por otra parte, *Methanosarcina* y *Methanosphaerula* se encontraron en abundancias similares entre los lagos Drake 1 (17 %), Green (18 %), Drake 2 (24 %), Drake 3 (23 %). El género hidrogenotrófico *Methanobacterium*, fue el género metanogénico presente con menor abundancia en los todos los lagos, solo encontrándose en los lagos Drake 1, Drake 2, Drake 3 y Green en una abundancia menor al 6 %. En los lagos Kitezh, Long, Mondsee, Slalom, Oil Tank y Uruguay las arqueas metanogénicas ocuparon menos del 10 % de la abundancia

total de arqueas. El lago Kitez, en comparación con el resto de los lagos muestreados en el mismo año, presentó mayor abundancia de metanógenos. Estos metanógenos se ubicaron dentro del género *Methanosaeta* (8 %) y *Methanoregula* (2 %). Por otra parte, los géneros *Methanoregula* y la familia *Methanomassiliicoccaceae* fueron encontrados en el lago Slalom en una proporción menor al 0,4 % de la abundancia total.

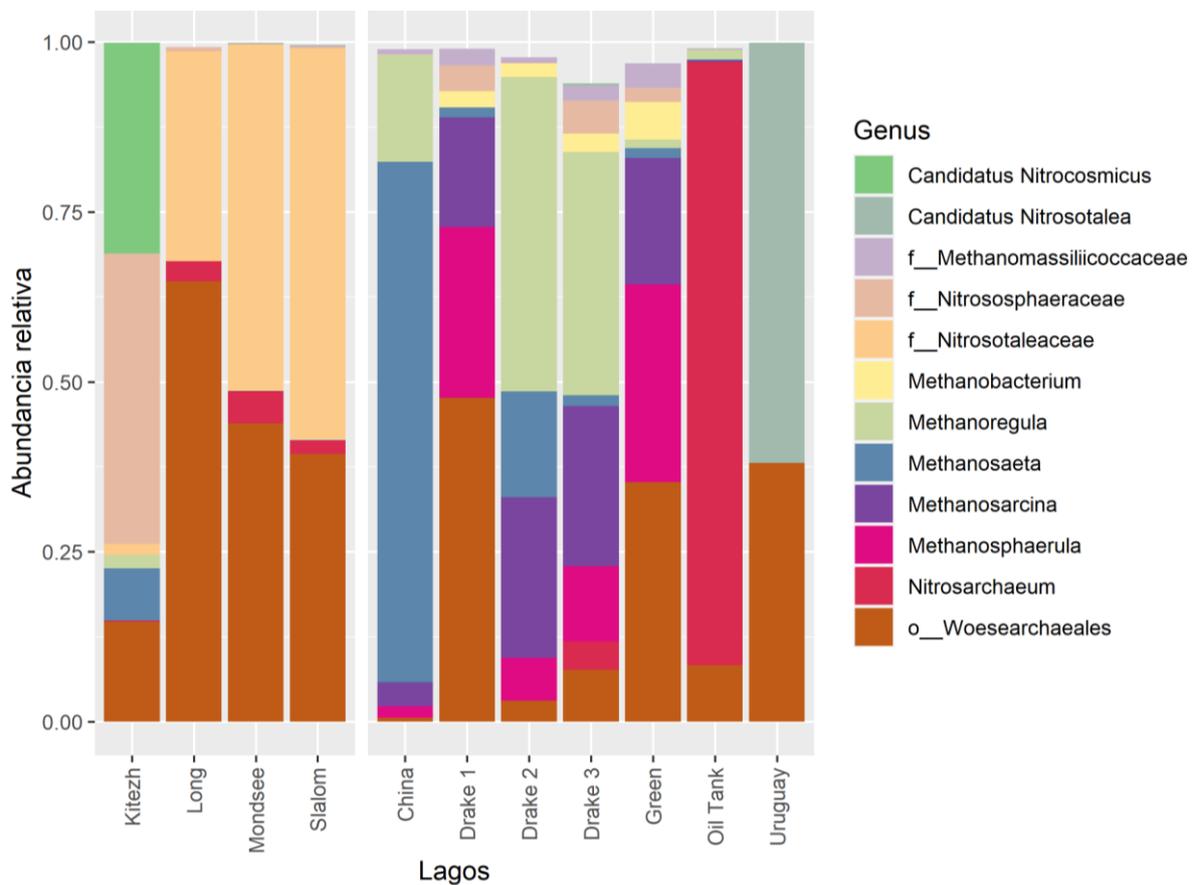


FIGURA 18. Abundancias relativas de arqueas a nivel de géneros en los lagos Kitez, Long, Mondsee y Slalom en el año 2019, y los lagos China, Drake 1, Drake 2, Drake 3, Green, Oil Tank y Uruguay en el año 2020. No se muestran los géneros con abundancias relativas menores al 5%.

Como se observa en el gráfico de burbujas de abundancia relativa a nivel de género (Figura 18), hubo una marcada diferencia entre las abundancias relativas de géneros metanogénicos encontrados entre los lagos muestreados en el año 2019 y los lagos del año 2020. Se observó una mayor abundancia y diversidad de taxones metanogénicos en los lagos China, Drake 1, Drake 2, Drake 3, Green, Oil Tank y Uruguay. En el resto de los cuatro lagos las arqueas metanogénicas fueron representadas por al menos dos ASV diferentes (Figura 19).

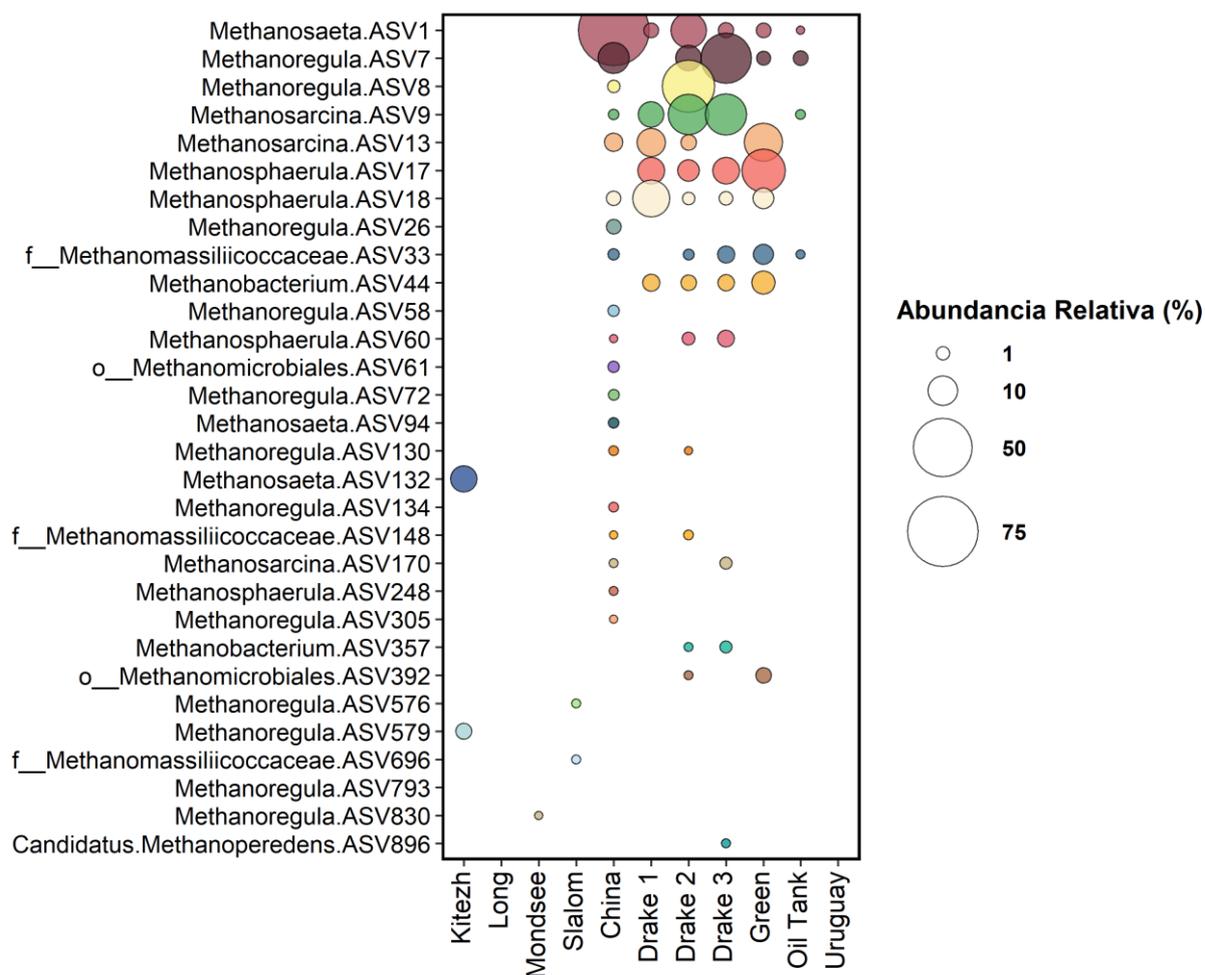


FIGURA 19. Gráfico de burbujas donde se muestran las 30 ASV clasificadas como arqueas metanogénicas a nivel de orden (o__), familia (f__) y género, encontradas en todo el set de datos. El tamaño de los círculos corresponde al porcentaje de abundancia relativa de cada ASV.

4.5.1 Influencia de las variables ambientales en las comunidades de *Archaea*

Se calculó el coeficiente de Spearman (ρ) para evaluar las correlaciones entre las variables ambientales presentes en los sitios de estudio y las arqueas presentes en la comunidad con abundancias mayores al 5 % aglomeradas a nivel de género (Tabla 15). Solo unas pocas variables correlacionaron significativamente. Las arqueas pertenecientes al orden *Woesearchaeales* correlacionaron positivamente con la relación C:N ($p \leq 0,05$), mientras que el género *Methanosarcina* mostró una correlación negativa con este parámetro. Se obtuvieron correlaciones negativas también entre la cantidad de carbono orgánico total y las abundancias relativas de los géneros *Methanobacterium*, *Methanosarcina* y arqueas metanogénicas ubicados dentro de la familia *Methanomassiliicoccaceae*. Además, estos metanógenos también presentaron una correlación negativa con la profundidad del lago, siendo estas correlaciones altamente significativas ($p \leq 0,01$). Por otra parte, el género *Methanosphaerula* y el *Candidatus Nitrosotalea* correlacionaron negativamente con la profundidad del lago, mientras que el género hidrogenotrófico *Methanoregula*

correlacionó positivamente con el OD. Por ultimo, pH y la conductividad mostraron una correlación negativa con los *Candidatus Nitrosotalea* y *Candidatus Nitrocosmicus*.

TABLA 15. Correlaciones de Spearman (ρ) entre las variables ambientales de lagos antárticos y la comunidad de arqueas

Principales géneros de arqueas encontradas	TOC (%)	TN (%)	C:N	OD (mg/l)	pH	Conductividad (μ S/cm)	Profundidad (m)
<i>o__Woesearchaeales</i>	-0,145	-0,303	0,655*	-0,483	-0,045	0,265	0,346
<i>f__Methanomassiliicoccaceae</i>	-0,706*	-0,552	-0,486	-0,087	0,239	-0,060	-0,828**
<i>f__Nitrososphaeraceae</i>	-0,333	-0,359	0,469	-0,311	0,428	-0,275	-0,099
<i>f__Nitrosotaleaceae</i>	0,337	0,101	0,779**	-0,074	-0,253	-0,164	0,555
<i>Methanobacterium</i>	-0,679*	-0,544	-0,387	0,017	0,198	-0,045	-0,814**
<i>Methanoregula</i>	0,059	0,189	-0,483	0,612*	0,164	-0,380	-0,418
<i>Methanosaeta</i>	0,064	0,247	-0,437	0,338	0,396	-0,082	-0,490
<i>Methanosarcina</i>	-0,609*	-0,402	-0,693*	0,203	0,214	-0,058	-0,844**
<i>Methanosphaerula</i>	-0,588	-0,238	-0,238	-0,105	0,191	-0,129	-0,812**
<i>Candidatus Nitrocosmicus</i>	0,162	0,085	0,497	-0,278	0,017	-0,639*	0,217
<i>Candidatus Nitrosotalea</i>	0,139	-0,067	0,451	-0,394	-0,786**	-0,139	0,615*
<i>Nitrosarchaeum</i>	0,191	0,068	0,074	0,298	-0,130	0,178	0,243

*La correlación es significativa al nivel 0,05; **La correlación es significativa a nivel 0,01.

4.5.2 Diversidad beta

Se realizó un análisis de coordenadas principales (PCoA) basado en las distancias Bray-Curtis para visualizar tendencias generales de cuán similares o diferentes eran las comunidades de arqueas presentes en los sedimentos lacustres. En la Figura 20 se observa un claro agrupamiento de los 11 lagos en tres grupos diferentes y podemos observar como los lagos Long, Mondsee y Slalom forman un *cluster* sobre la esquina superior izquierda del gráfico y Kitezkh, Oil Tank y Uruguay forman otro grupo sobre el lado derecho inferior. Por ultimo, los lagos China, Drake 1, Drake 2, Drake 3 y Green forman un tercer grupo sobre la esquina superior derecha.

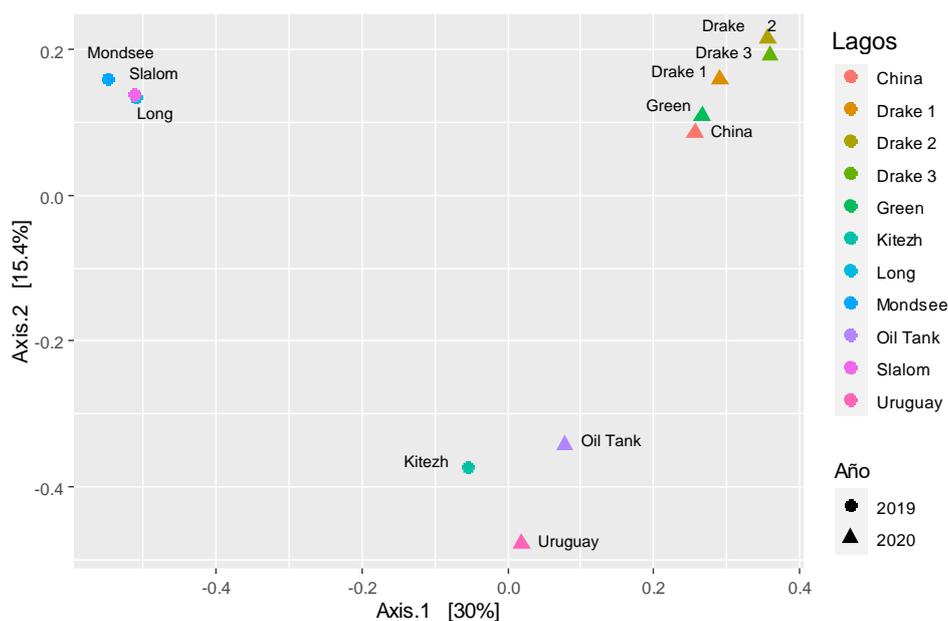


FIGURA 20. Gráfico de análisis de coordenadas principales (PCoA) basado en la distancia de Bray-Curtis. Se indica entre paréntesis, el porcentaje de la varianza total explicada por cada componente principal.

Para elucidar los taxones que son compartidos entre los grupos observados en la Figura 20, se realizaron diagramas de Venn por cada agrupamiento. Como se observa en la Figura 21 a (apéndice 3, Tabla 2), de los 19 ASV presentes entre los lagos Long, Mondsee y Slalom, solo cinco ASV fueron compartidos entre los tres lagos mencionados. Las arqueas representadas en estos cinco ASV fueron clasificadas como pertenecientes a las familias *Nitrosotaleaceae* y *Nitrososphaeraceae*, del orden *Woesearchaeales* y a los géneros *Nitrosarchaeum* y *Methanoregula*. Por otra parte, los lagos Long y Slalom fueron los lagos que presentaron más ASV exclusivas, es decir, presentaron mayor número de taxones diferentes que no fueron observadas en el resto de los lagos evaluados en este estudio (apéndice 3, Tabla 5). En el lago Long se hallaron arqueas pertenecientes a tres taxones diferentes, tales como, el orden *Aenigmarchaeales*, el *Candidatus Nitrososphaera* y arqueas aún sin clasificar de la familia GW2011_GWC1_47_16 (orden *Woesearchaeales*). Mientras que en el lago Slalom, las arqueas que se encuentran exclusivamente allí, fueron ubicadas dentro de una familia y género de arqueas no cultivadas denominadas, GW2011_GWC1_47_19 y AR15, respectivamente (ambos perteneciente al orden *Woesearchaeales*). Por otra parte, se observó que tan solo dos ASV fueron compartidos por los lagos Kitezsh, Oil Tank y Uruguay, los cuales fueron clasificados como pertenecientes al orden *Woesearchaeales* y al género metanogénico *Methanosaeta*. Por último, los lagos China, Drake 1, Drake 2, Drake 3 y Green compartieron seis ASV, los cuales en su mayoría fueron clasificados como arqueas metanogénicas, dentro de los géneros *Methanosaeta*, *Methanosarcina*, *Methanosphaerula* y *Methanobacterium* y la familia *Methanomassiliicoccaceae*.

También se encontró el orden *Woesearchaeales* en común entre los cinco lagos mencionados. Como se mencionó, las arqueas pertenecientes al orden *Woesearchaeales* fueron el taxón en común entre los lagos estudiados y se puede observar en la Figura 22. El gráfico de flores muestra que entre los 11 lagos se encuentra un core conformado por tan solo un ASV en donde se ubican todas las arqueas clasificadas dentro del orden *Woesearchaeales*.

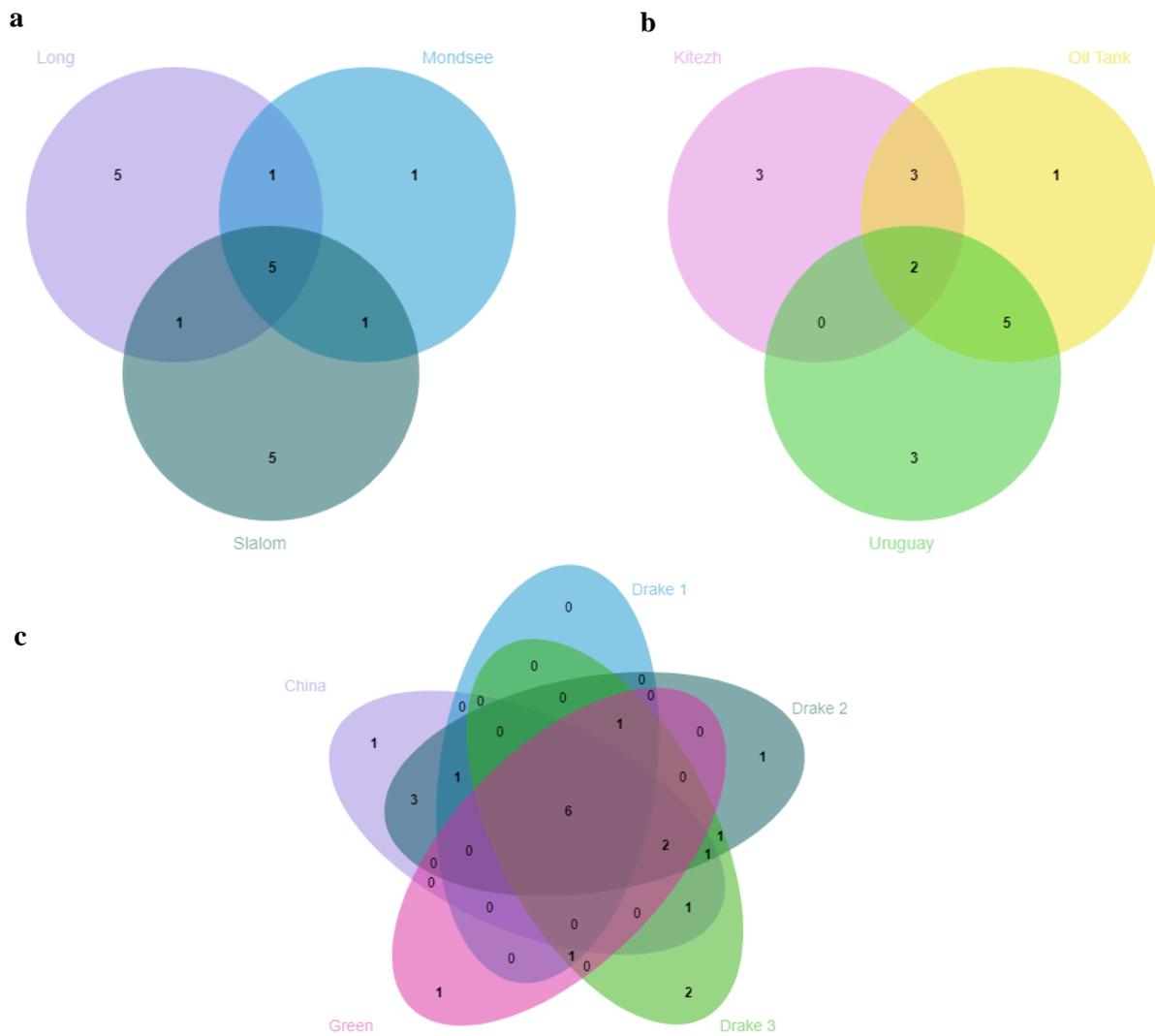
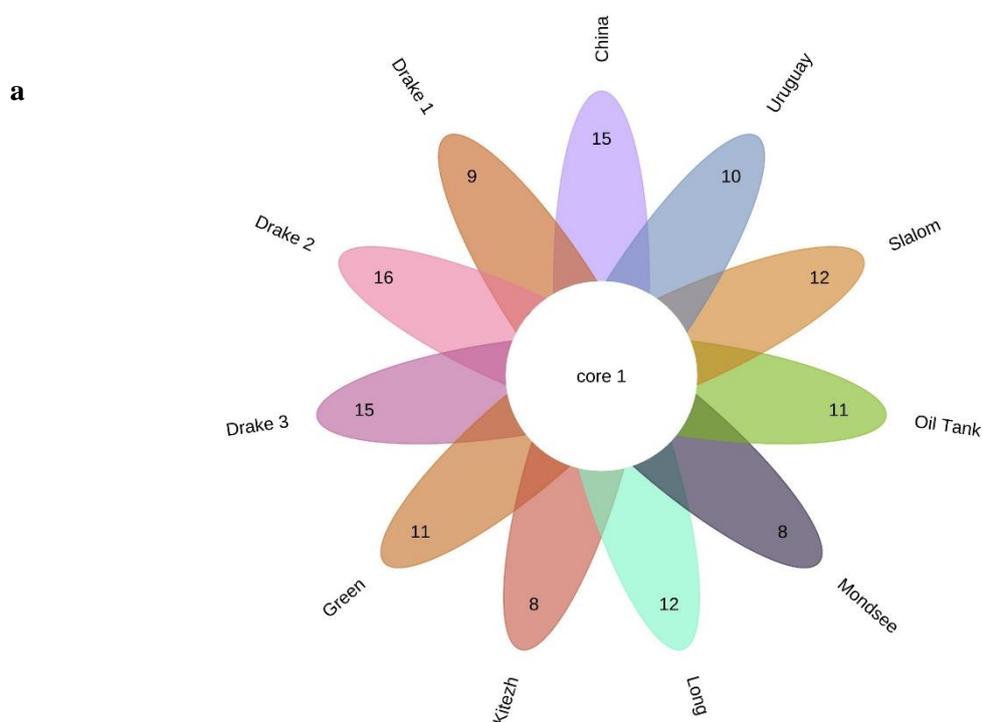


FIGURA 21. Diagramas de Venn de los tres agrupamientos observados en el gráfico de PCoA (Figura 20). a. Lagos Long, Mondsee y Slalom, b. lagos Kitezkh, Oil Tank y Uruguay, y c. lagos China, Drake 1, Drake 2, Drake 3 y Green. Las ASV compartidas entre los lagos se observan en las intersecciones de cada círculo.



b

Lagos	N° de ASV compartidos	Taxonomía
China Drake 1 Drake 2 Drake 3 Green Kitezh Long Mondsee Oil Tank Slalom Uruguay	1	ASV3:o__Woesearchaeales

FIGURA 22. a. Gráfico de flores donde se muestra por cuántos ASV se forma el *core* entre los lagos estudiados y b. Taxonomía del *core* mencionado.

4.6 Análisis de la comunidad de arqueas metanogénicas mediante secuenciación masiva del gen *mcrA*

La diversidad y taxonomía de las arqueas metanogénicas puede ser determinada mediante tanto la evaluación de los genes ARNr 16S como genes *mcrA*, ya que ambos análisis son coherentes. Sin embargo, algunos estudios (Sirohi *et al.*, 2013, Wilkins *et al.*, 2015), han observado que la evaluación de la diversidad de metanógenos utilizando el gen *mcrA* recupera una mayor riqueza de estos. Por lo que, se sugiere que el análisis del gen funcional *mcrA* para evaluar la taxonomía de metanógenos es una buena herramienta como complemento al estudio del gen ARNr 16S, ya que esto permite determinar mejor la diversidad de metanógenos en una comunidad determinada.

Con el objetivo de poder recuperar metanógenos que no se hayan podido obtener mediante el análisis del gen ARNr 16S de arqueas, se estudió la diversidad y estructura de la comunidad de metanógenos en los sedimentos de los lagos China, Drake 1, Drake 2, Drake 3, Green, Oil Tank y Uruguay. Al igual que en el estudio de la comunidad de arqueas totales, se realizó secuenciación masiva dirigida al gen *mcrA* por tecnología Illumina Miseq. Las calidades de las lecturas *forward* se muestran en los Figuras 12 y 13 del apéndice 4 y el gráfico de índices de aprendizaje de error producidos por el pipeline DADA2 se muestra en la Figura 14 del apéndice 4. La gráfica de rarefacción para el conjunto de datos obtenidos a través del estudio del gen *mcrA* nos muestra que la profundidad de secuenciación fue suficiente para poder recuperar toda la diversidad presente en todos los lagos evaluados (apéndice 4, Figura 15).

La composición de la comunidad de metanógenos en los lagos China, Drake 1, Drake 2, Drake 3, Green, Oil Tank y Uruguay a nivel de familia se muestra en la Figura 24. Las secuencias del gen *mcrA* fueron mayormente asignados dentro de un phylum, una clase, tres órdenes y siete familias metanogénicas. *Methanosarcinaceae* fue la familia más abundante, contribuyendo con un 38% de la abundancia relativa promedio de la comunidad metanogénica. Las familias *Methanobacteriaceae*, *Methanosaetaceae*, *Methanoregulaceae* y *Methanocellaceae* fueron detectada en, abundancias relativas promedio 14 %, 10 %, 13 % y 4 %, respectivamente. *Methanosaetaceae* fue la familia más dominante en el lago China (abundancia relativa de 54 %), mientras que *Methanosarcinaceae* fue la más dominante en los lagos Drake 1, Drake 2 y Drake 3 (abundancias relativas de 65, 70 y 45 %). Por otra parte, en el lago Green las abundancias de las familias *Methanobacteriaceae*, *Methanosarcinaceae* y *Methanocellaceae* contribuyeron a un 44, 24 y 22 % de la comunidad metanogénica, respectivamente. Los metanógenos ubicados dentro de la familia *Methanoregulaceae* y el orden Methanomicrobiales dominaron en el lago Oil Tank, ocupando un 68 % de la comunidad. El restante porcentaje de la comunidad lo ocuparon las familias *Methanobacteriaceae*, *Methanosarcinaceae* y la clase Methanomicrobia con abundancias relativas próximas al 18, 11 y 4 %.

En el lago Uruguay se observó que la familia *Methanosarcinaceae* ocupa un 33 % de la comunidad, seguidos por la clase *Methanomicrobiales*, las familias *Methanosaetaceae* y *Methanobacteriaceae* en abundancias menores (9, 6 y 5 %). Particularmente, en este lago se observó que el mayor porcentaje de la comunidad metanogénica (47 %) es ocupada por metanógenos que no fueron capaces de clasificarse más allá del phylum *Euryarchaeota*. Esto mismo también fue observado en los lagos Drake 1 y Drake 3 en abundancias menores al 9 %. Una comparación entre las abundancias relativas de arqueas metanogénicas recuperadas mediante el análisis de genes ARNr 16S y *mcrA*, se muestra en la Figura 25. En este gráfico se observan los diferentes ASV (y sus abundancias relativas) clasificados a nivel de género obtenidos con el gen ARNr 16S (Figura 25 a) y *mcrA* (Figura 25 b).

La diversidad de arqueas metanogénicas fue mejor explicada con el análisis del gen *mcrA*, donde se logró recuperar hasta 18 taxones clasificadas como metanógenos con respecto a los nueve taxones metanogénicas obtenidas con el gen ARNr 16S. El análisis del gen *mcrA* permitió recuperar, por ejemplo, metanógenos pertenecientes a la familia *Methanobacteriaceae* en abundancias que van desde 0,01 % (China) a 20 % (Green), no observada con el análisis del gen ARNr 16S. Además, permitió recuperar metanógenos en los lagos Oil Tank y Uruguay. En estos lagos se logró observar metenógenos pertenecientes al género *Methanobacterium*, orden *Methanomicrobiales*, familia *Methanobacteriaceae*, entre otros.

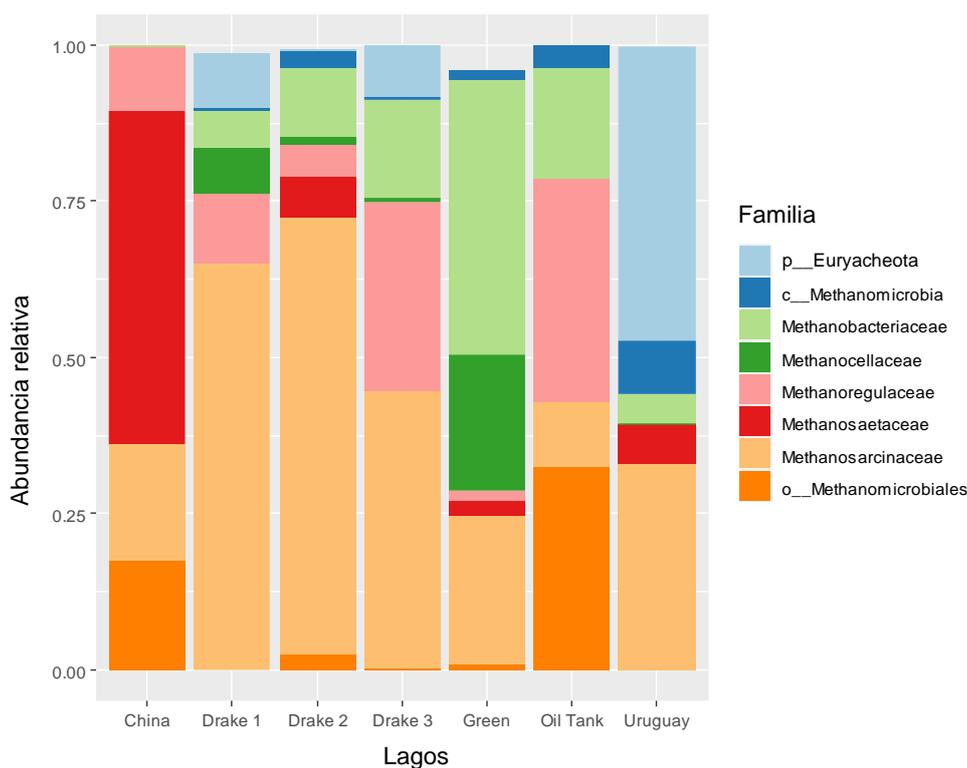


Figura 24. Abundancias relativas de arqueas metanogénicas a nivel de familia en los lagos China, Drake 1, Drake 2, Drake 3, Green, Oil Tank y Uruguay. Familias con abundancias relativas menores al 5% no se muestran.

Por último, se realizó un análisis comparativo entre la diversidad obtenida a partir de secuencias de ARNr 16S y *mcrA* (Tabla 16). En este análisis se observa un mayor número de taxones y diversidad obtenido a partir de secuencias *mcrA*, donde la riqueza de metanógenos fue hasta ocho veces mayor (lagos Green y Uruguay) que lo obtenido con secuencias de ARNr 16S. Sin embargo, la asignación taxonómica a secuencias *mcrA* fue más pobre que con secuencias ARNr 16S, donde la mayoría de los taxones solo lograron identificarse a nivel de phylum, orden o familia.

TABLA 16. Comparación de diferentes índices de diversidad alfa obtenidos mediante análisis de secuencias de ARNr 16S y *mcrA*. Para el análisis del ARNr 16S se realizó un subset de arqueas metanogénicas a partir de la caracterización molecular realizada en la sección 4.5

Lagos	Riqueza (S)		Shannon (H)		Simpson (1-D)	
	ARNr 16S	<i>mcrA</i>	ARNr 16S	<i>mcrA</i>	ARNr 16S	<i>mcrA</i>
China	26	39	0,99	2,12	0,39	0,78
Drake 1	9	38	1,75	2,93	0,78	0,92
Drake 2	23	96	1,72	2,22	0,75	0,71
Drake 3	15	60	1,54	2,18	0,69	0,77
Green	9	74	1,60	3,46	0,73	0,95
Oil Tank	4	29	0,86	2,03	0,44	0,78
Uruguay	4	32	1,29	1,78	0,70	0,73

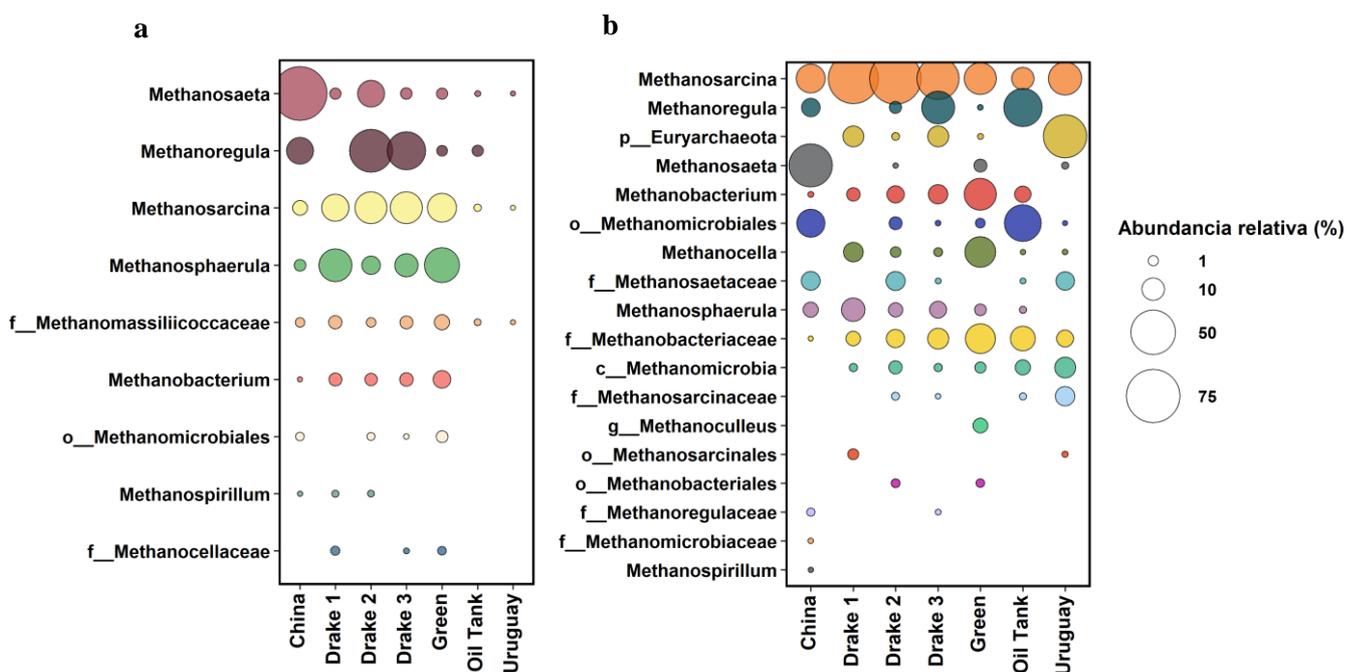


FIGURA 25. Abundancias relativas a nivel de phylum (p__), orden (o__), familia (f__) y género de arqueas metanogénicas obtenidas mediante secuenciación de: a. genes ARNr 16S de arquea y b. gen *mcrA*.

4.7 Efecto de la temperatura y cambio de sustrato metanogénico en la estructura y composición de la comunidad de arqueas

En la mayoría de los lagos existieron claras diferencias entre las abundancias relativas de arqueas obtenidas a partir del sedimento original *in situ* (tiempo cero) y el sedimento con sustratos y a

temperatura 5 y 20 °C. Sin embargo, en el lago China las abundancias relativas entre los microcosmos a 5 y 20 °C, endógeno y con sustratos, fue muy similar al perfil obtenido en el sedimento original *in situ* (tiempo cero). En este lago el género que predominó en todas las condiciones fue *Methanosaeta* ocupando más del 50 % de la abundancia total de arqueas presentes (Figura 26 a). Además, en los microcosmos con acetato y los microcosmos con H₂/CO₂, a 5 y a 20 °C, se observa que la abundancia de secuencias pertenecientes al género *Methanosarcina*, y *Methanoregula* disminuyen por debajo del 1 % cuando lo comparamos con el sedimento *in situ*. En cambio, el género *Methanosphaerula* aumenta su abundancia de 2 % (tiempo cero) hasta 12 % cuando se incubaba a 5 y 20 °C y, además cuando se le adiciona acetato. Por otra parte, el lago Drake 2 presentó similares abundancias relativas en los microcosmos sin sustrato incubados a 5 y a 20 °C, siendo *Methanosaeta* el género metanogénico más abundante dentro de la comunidad (Figura 27). Además, este perfil es muy similar a lo encontrado en microcosmos con acetato, ya sea a 5 y 20 °C, en contraste a lo que se observó en el sedimento original *in situ* (tiempo cero), en donde *Methanoregula* fue el género predominante (Figura 27 a).

En los lagos Drake 3, Green y Oil Tank cuando fueron incubado con acetato y a 5 °C se observa que están dominados por secuencias de ARNr 16S pertenecientes al género *Methanosarcina* con porcentajes de abundancias que van desde 88 % (Drake 3) hasta 99 % (Green). En el lago Drake 3, además de la clara dominancia de *Methanosarcina*, se observó la presencia de los géneros hidrogenotróficos *Methanosphaerula* y *Methanoregula*, con abundancias relativas del 3 y 2 %, mientras que la familia *Methanomassiliicoccaceae* ocupó el 2 % de la comunidad de arqueas en este lago (Figura 28 a). El género *Methanosaeta* por su parte, estuvo menos representado en estos lagos con abundancias relativas que no superaron el 1 % (en Drake 3 y Oil Tank). Cuando a los sedimentos de los lagos Drake 3, Green y Oil Tank se les adicionó acetato y fueron incubados a 20 °C, la estructura de la comunidad se mantiene semejante a lo observado a 5 °C (con adición de acetato) con la excepción que en Oil Tank el género *Methanosaeta* aumenta su abundancia a un 14 % (a 20 °C) (Figura 30 a) y en Drake 3 *Methanosarcina* aumenta su abundancia elevando más aún su dominancia en este lago (88 % a 5°C y 97 % a 20°C) (Figura 28 a).

El análisis de las secuencias ARNr 16S en microcosmos incubados con H₂/CO₂ a 5 (Drake 2) y 20 °C mostró un patrón de distribución y abundancia diferente a lo obtenido en los sedimentos *in situ* (tiempo cero) y a lo obtenido en los microcosmos con acetato en la mayoría de los lagos con la excepción del lago China. En Drake 2 con H₂/CO₂ a 5 °C aumentan las abundancias de *Methanosarcina* (50 %) y el género hidrogenotrófico *Methanobacterium* (15 %) frente al tiempo cero donde se obtuvo abundancias de 16 y 2 %, respectivamente, mientras que el género acetoclástico *Methanosaeta* solo tuvo un leve aumento bajo estas condiciones cuando lo comparamos con lo obtenido al tiempo cero (aumenta de 16 a 21 % su abundancia relativa) (Figura 27 a). Sin embargo,

cuando se eleva la temperatura a 20 °C en estos microcosmos los metanógenos perteneciente al género *Methanosaeta* aumentan su abundancia a un 67 % de la abundancia total (frente al 16 % obtenido a tiempo cero). Además, en estas condiciones se ve favorecido el género *Methanospirillum* con una abundancia relativa de 16 %, género mesófilo e hidrogenotrófico que en el sedimento original fue observado en abundancias menores al 1 % (Figura 27 a). En el lago Green bajo estas condiciones (H₂/CO₂ y a 20 °C) a diferencia de lo observado en el resto de los lagos, hay una clara dominancia de metanógenos hidrogenotróficos pertenecientes al género *Methanobacterium* que ocupan el 90 % de la comunidad de arqueas (Figura 29 a), mientras que en Drake 3 y Oil Tank, el género *Methanosarcina* sigue siendo el género dominante pese al cambio de sustrato (Figuras 28 a y 30 a, respectivamente).

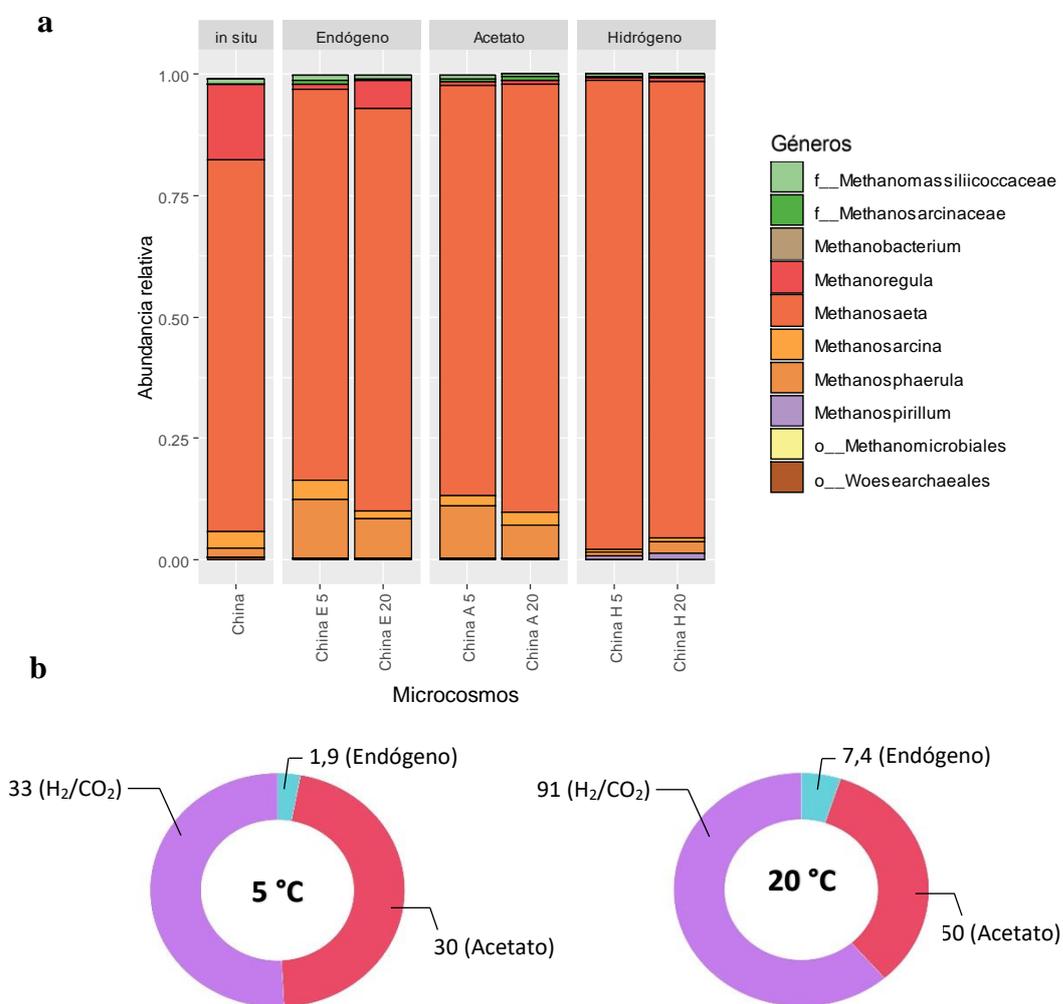


FIGURA 26. a. Cambio en la estructura de la comunidad de arqueas en microcosmos sin y con agregado de sustrato (acetato o H₂/CO₂) a 5 y 20 °C en el lago China. *in situ* hace referencia a la comunidad de arqueas hallada en el sedimento original (tiempo cero). E: endógeno (sin sustrato), A: con acetato, H: con H₂/CO₂, 5: incubación a 5 °C y 20: incubación a 20 °C; b. Comparación en las velocidades de producción de metano (µM CH₄.g⁻¹.d⁻¹) obtenidas a 5 y 20 °C.

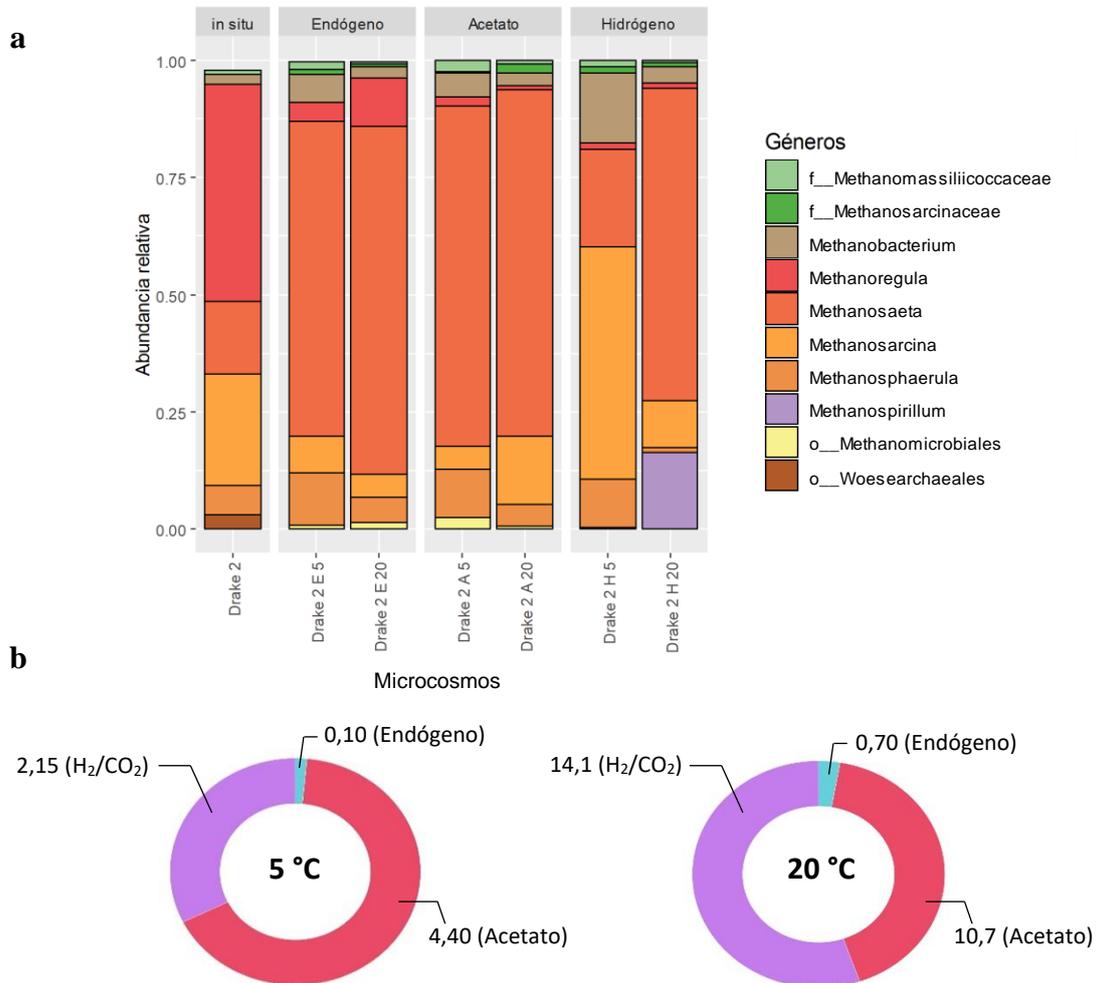


FIGURA 27. a. Cambio en la estructura de la comunidad de arqueas en microcosmos sin y con agregado de sustrato (acetato o H₂/CO₂) a 5 y 20 °C en el lago Drake 2. *in situ* hace referencia a la comunidad de arqueas hallada en el sedimento original (tiempo cero). E: endógeno (sin sustrato), A: con acetato, H: con H₂/CO₂, 5: incubación a 5 °C y 20: incubación a 20 °C; b. Comparación en las velocidades de producción de metano (µmoles CH₄.g⁻¹. d⁻¹) obtenidas a 5 y 20 °C.

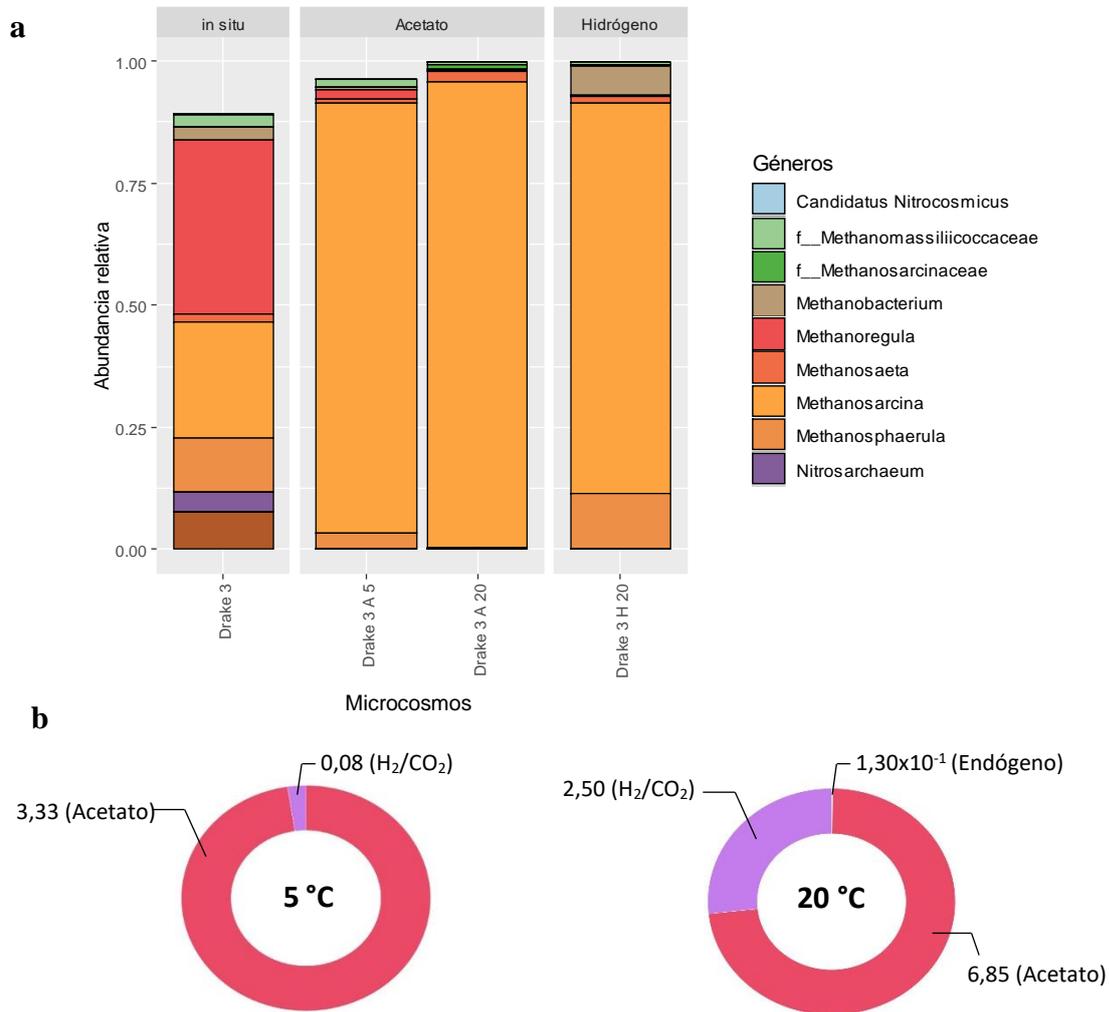


FIGURA 28. a. Cambio en la estructura de la comunidad de arqueas en microcosmos sin y con agregado de sustrato (acetato o H₂/CO₂) a 5 y 20 °C en el lago Drake 3. *in situ* hace referencia a la comunidad de arqueas hallada en el sedimento original (tiempo cero). E: endógeno (sin sustrato), A: con acetato, H: con H₂/CO₂, 5: incubación a 5 °C y 20: incubación a 20 °C; b. Comparación en las velocidades de producción de metano (μmoles CH₄.g⁻¹. d⁻¹) obtenidas a 5 y 20 °C.

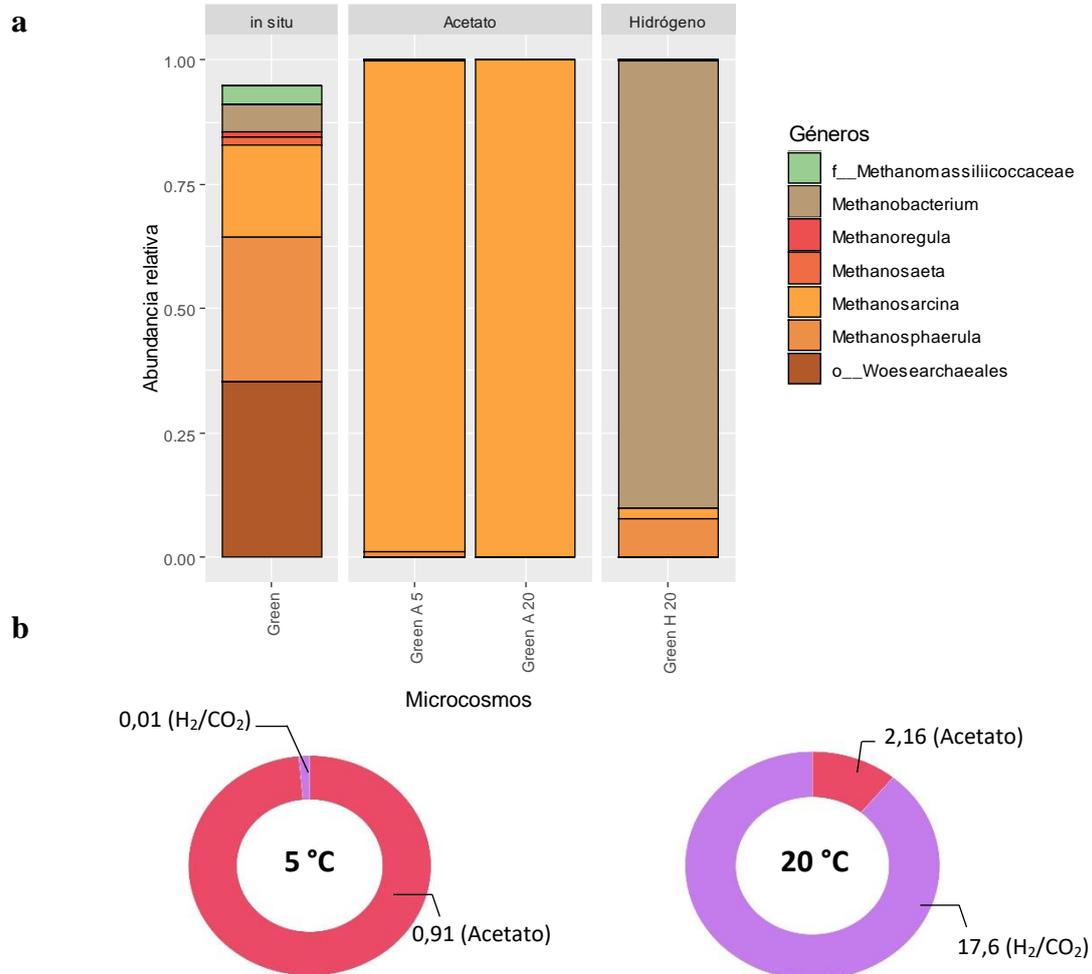


FIGURA 29. a. Cambio en la estructura de la comunidad de arqueas en microcosmos sin y con agregado de sustrato (acetato o H₂/CO₂) a 5 y 20 °C en el lago Green. *in situ* hace referencia a la comunidad de arqueas hallada en el sedimento original (tiempo cero). E: endógeno (sin sustrato), A: con acetato, H: con H₂/CO₂, 5: incubación a 5 °C y 20: incubación a 20 °C; b. Comparación en las velocidades de producción de metano (μmoles CH₄.g⁻¹. d⁻¹) obtenidas a 5 y 20 °C.

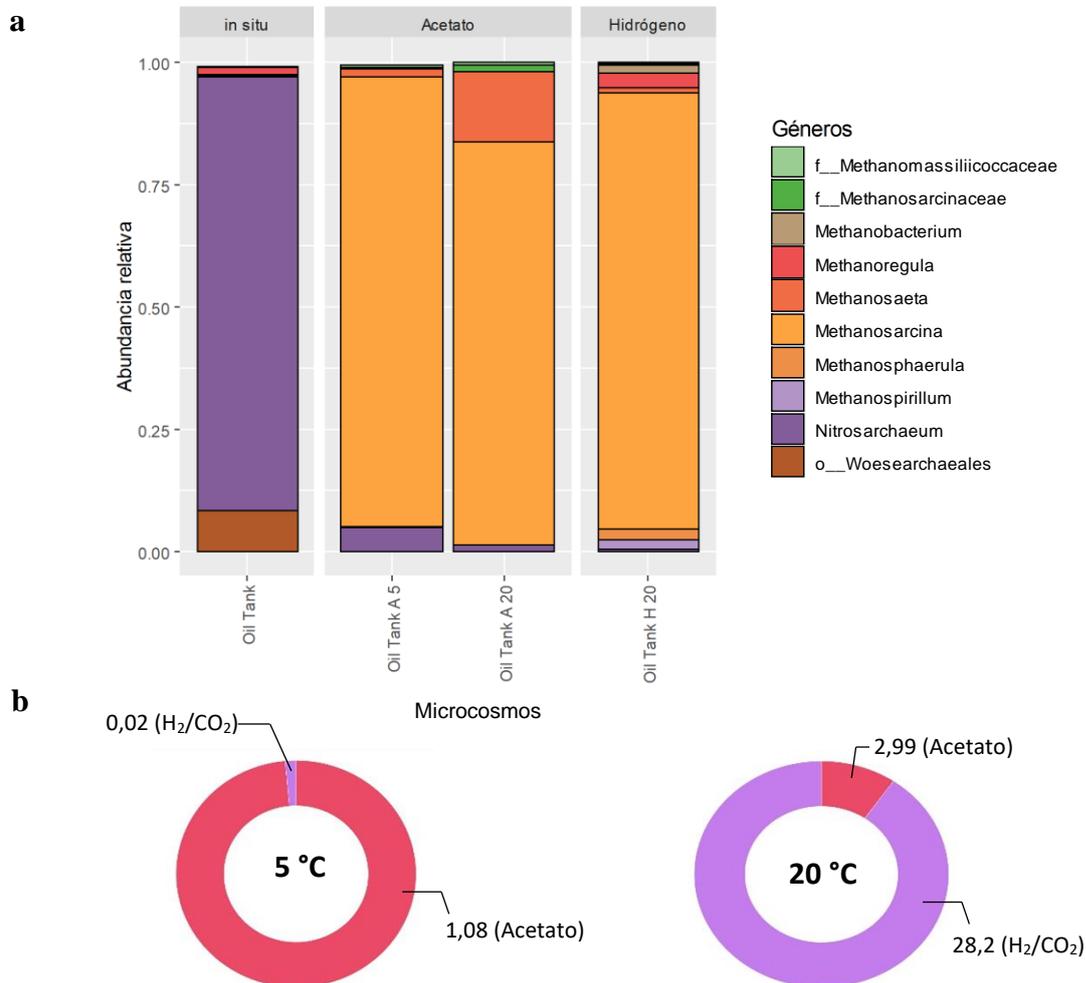


FIGURA 30. a. Cambio en la estructura de la comunidad de arqueas en microcosmos sin y con agregado de sustrato (acetato o H₂/CO₂) a 5 y 20 °C en el lago Oil Tank. *in situ* hace referencia a la comunidad de arqueas hallada en el sedimento original (tiempo cero). E: endógeno (sin sustrato), A: con acetato, H: con H₂/CO₂, 5: incubación a 5 °C y 20: incubación a 20 °C; b. Comparación en las velocidades de producción de metano (μmoles CH₄.g⁻¹. d⁻¹) obtenidas a 5 y 20 °C.

Capítulo 5. Discusión

Los resultados obtenidos en este trabajo han demostrado la existencia de una comunidad metanogénica activa a bajas temperaturas en sedimentos de lagos antárticos. Las diferentes observaciones mostraron que esta comunidad es fuertemente influenciada por la temperatura y la disponibilidad de diferentes sustratos.

5.1 Efecto de la temperatura sobre la actividad metanogénica potencial

En este estudio, a partir del análisis de 11 sedimentos lacustres antárticos, solo se detectó producción de metano endógeno en tres de ellos, China, Drake 2 y Drake 3 en todas las temperaturas evaluadas. Estos valores obtenidos fueron comparables con los reportados en la literatura en ecosistemas fríos como en sedimentos de lagos de agua dulce subantárticos (Lavergne *et al.*, 2021), sedimentos subglaciales (Stibal *et al.*, 2012, Ma *et al.*, 2018) y turba en permafrost subártico (Metje *et al.*, 2007). Las velocidades de producción de metano reportados en este trabajo fueron hasta dos órdenes de magnitud mayores a lo obtenido por Boyd *et al.*, (2010) en sedimentos subglaciales y hasta dos órdenes de magnitud menores a lo reportado por Lofton (2013) en lagos de Alaska. El lago China fue, entre los lagos evaluados, donde se observó la mayor velocidad de producción de metano dentro del rango de temperaturas ensayadas (Tabla 7). Esta variabilidad observada en las velocidades de producción de metano entre los lagos China, Drake 2 y Drake 3 a nivel endógeno estaría siendo impulsada por las diferencias en la concentración de materia orgánica presente en los sedimentos. El hecho de que el lago China sea el lago con mayor concentración de materia orgánica indicaría una mayor disponibilidad de sustratos *in situ*.

Es conocido que la metanogénesis en sedimentos de lagos de agua dulce puede ocurrir dentro de un amplio rango de temperaturas como se demostró por Zeikus y Winfrey (1976) (5 a 60 °C), y Nozhenikova *et al.*, (1997) (2 a 70°C), y que la temperatura tiene un papel crucial sobre la regulación en la actividad metanogénica. Los resultados aquí reportados, muestran un efecto positivo de la temperatura sobre las velocidades de producción de metano. Este comportamiento fue el mismo tanto para el metano endógeno (lagos China, Drake 2 y Drake 3) y el metano a partir de los precursores metanogénicos acetato ó H_2/CO_2 (en todos los lagos), en concordancia con varios trabajos en ambientes fríos (Glissman, 2004; Blake *et al.*, 2015). Sin embargo, las diferencias no significativas en las velocidades de producción de metano detectadas a 5 y 10 °C en la mayoría de los lagos, muestra que los metanógenos presentes en estos sedimentos pueden ser poco sensibles a aumentos en la temperatura dentro de un rango psicrófilo. Se han reportado resultados similares a partir de los trabajos de Ellis-Evans (1983) en lagos antárticos y Zeikus y Winfrey (1976) a partir del lago

Mendota (lago de origen glacial en el sur de Wisconsin), donde estos últimos sugieren que los metanógenos muestran una sensibilidad a la temperatura a partir de los 10 °C y que un cambio de temperatura por debajo de los 10 °C no afectaría la velocidad de producción de metano. El aumento de las velocidades de producción de metano hasta los 20 °C sugiere que la temperatura óptima de crecimiento de los metanógenos en los lagos estudiados puede exceder esa temperatura. Estos resultados podrían indicar que la metanogénesis en la mayoría de los sedimentos aquí estudiados exhibe una temperatura óptima mucho más alta que la temperatura *in situ*, en concordancia con lo que se ha demostrado en otros ambientes fríos donde la producción de metano óptima se observa próximo a los 30 °C (Rivkina *et al.*, 2007, en permafrost; Blake *et al.*, 2015, sedimentos subglaciales). Esta observación puede explicarse por el hecho de que los metanógenos y/o la comunidad microbiana circundante, la cual proporciona los sustratos metanogénicos, puedan tener una temperatura óptima de crecimiento mayor a la observada *in situ*. El análisis de la estructura de la comunidad en el lago China sin agregado de sustrato (Figura 26 a), muestra que la comunidad de metanógenos presentes en este lago no es afectada al aumentar la temperatura de 5 a 20 °C y que la actividad metanogénica a 20 °C es cuatro veces mayor que a 5 °C (Figura 26 b), lo que implica que la comunidad presente se trataría de una comunidad psicrotolerante y no psicrófila.

5.2 Efecto del sustrato metanogénico

Se conoce que la adición de los sustratos metanogénicos potencia la producción de metano en sedimentos de agua dulce (Schulz *et al.*, 1997; Nusslein y Conrad, 2000; Blake *et al.*, 2015; Lavergne *et al.*, 2021). Nuestros resultados concuerdan con lo reportado previamente, ya que la adición de sustrato metanogénico exógeno potenció la producción de metano en todos los sedimentos dentro del rango de temperaturas evaluadas, cuando la comparamos con la producción de metano endógena. En el lago Drake 2, la adición de acetato estimuló la velocidad de producción de metano hasta 30 veces más a 5 °C, mientras que la adición de H₂/CO₂ presentó un mayor estímulo en la velocidad de producción de metano a 20 °C aumentando 19 veces más frente al endógeno.

En el lago China, donde el sedimento desde un inicio ya contiene una mayor concentración de materia orgánica, el estímulo por la adición de sustrato metanogénico fue menor que lo observado en el lago Drake 2. Si bien, en el resto de los lagos evaluados la producción de metano a nivel endógeno no fue detectada (luego de 638 días de incubación), la adición de sustratos metanogénicos también incrementó notablemente la velocidad de producción de metano a todas las temperaturas de incubación. Estos resultados indicarían que, en estos lagos estudiados, la actividad metanogénica estaría fuertemente limitada por la disponibilidad de sustratos metanogénicos en el sedimento. Los cambios en la estructura de la comunidad en los lagos Drake 3, Green y Oil Tank, con sustratos

metanogénicos, junto con los valores de velocidad de producción de metano obtenida a partir de éstos (Figuras 28 b, 29 b y 30 b), confirman aun más que la metanogénesis en estos sitios de estudio esta limitada por la falta de sustratos *in situ*.

Aunque la adición de sustratos metanogénicos tuvo un efecto potenciador en la metanogénesis, la estimulación por el sustrato H_2/CO_2 fue más pronunciado que con acetato, cuando los sedimentos eran incubados a 20 °C. Este comportamiento también fue observado en lagos de agua dulce en los trabajos de Nozhevnikova *et al.*, (2007); Glissman (2004) y Schulz y Conrad (1996). En cambio, cuando los sedimentos eran suplementados con H_2/CO_2 a bajas temperaturas (5 y 10 °C), la velocidad de producción de metano detectada siempre fue significativamente menor a la obtenida con acetato en las mismas condiciones de incubación, con la excepción de los lagos China y Drake 2, en donde no se encontraron diferencias significativas. La mayor sensibilidad de la metanogénesis hidrogenotrófica a la temperatura en relación con la metanogénesis acetoclástica se evidenció por el aumento en la E_a de hasta ocho veces más para la metanogénesis a partir de H_2/CO_2 con respecto a la acetoclástica. El rango de valores de E_a para la metanogénesis acetoclástica obtenidos en este estudio estuvieron apenas por debajo a lo reportado con sedimentos subantárticos (39-131 $kJ.mol^{-1}$; Lavergne *et al.*, 2021). Sin embargo, la metanogénesis hidrogenotrófica presente en la mayoría de los lagos antárticos aquí evaluados (excepto los lagos China y Drake 2) exhibieron una mayor sensibilidad a la temperatura que lo reportado en trabajo de Lavergne *et al.*, 2021, donde se reporta un rango de E_a para la metanogénesis hidrogenotrófica de 113-258 $kJ.mol^{-1}$ frente a lo obtenido en los lagos Drake 1, Drake 3, Green, Oil Tank y Uruguay 165-570 $kJ.mol^{-1}$. La alta sensibilidad de la metanogénesis hidrogenotrófica por la temperatura podría sugerir que, en un escenario de aumento de temperatura en los sitios de estudio y en presencia de H_2/CO_2 *in situ*, el metano producido podría ser generado a partir de la vía hidrogenotrófica.

Por otra parte, en los lagos China y Drake 2 (donde no se obtuvieron cambios significativos en la producción de metano ya sea a partir de acetato o H_2/CO_2 a 5 y 10 °C) se demostró que los metanógenos pertenecientes al género *Methanosaeta* siempre dominaron la comunidad de arqueas, aun cuando los mismos fueron incubados con el sustrato H_2/CO_2 (excepto en Drake 2 a 5 °C) (Figuras 26 y 27). Lo que sugiere que la vía predominante de producción de metano en estos lagos es la metanogénesis acetoclástica. Además, el hecho de que este género solo pueda consumir acetato como precursor metanogénico indicaría que estos metanógenos se encuentran presentes en la comunidad microbiana junto con alguna bacteria capaz de consumir el H_2/CO_2 para dar acetato como producto y éste sea consumido por los acetoclásticos para dar como producto final el metano. Aunque la metanogénesis hidrogenotrófica es más favorable que la acetogénesis quimiolitotrófica (Conrad, 2020), se ha observado que, en condiciones de baja temperatura, las bacterias homoacetogénicas son las principales consumidoras de hidrógeno y por lo tanto son altamente capaces de competir con las

arqueas metanogénicas por dicho sustrato (Kotsyurbenko, 1993; Conrad, 1989). Una de las razones por la cual se da esta acción es por la estructura de la membrana (fosfolípidos con enlace éster) presente en las bacterias con respecto a las arqueas, lo que produce una mejor adaptación a condiciones de baja temperatura y que superen en número a la población metanogénica (Sattley 2007; Conrad, 2020). Además, la adaptación de la estructura de la comunidad de arqueas en Drake 2 obtenida a partir de microcosmos sin sustrato (a 5 y 20 °C), la cual fue muy diferente al sedimento original pero similar a la comunidad del lago China, sugiere que la materia orgánica presente en estos lagos estaría siendo metabólicamente convertida al mismo sustrato, acetato. Posiblemente, esta conversión de la materia orgánica esté dada por las bacterias hidrolíticas, fermentadoras, sintróficas y homoacetogénicas.

5.3 Cuantificación de arqueas metanogénicas viables y totales en lagos antárticos

Aunque la adición de sustrato potenció la actividad metanogénica en todos los lagos evaluados en este trabajo, el crecimiento de arqueas metanogénicas a baja temperatura (5 °C) con el medio de cultivo empleado fue excesivamente lento. La cuantificación por el método de NMP en la mayoría de los sitios de estudio estuvo por debajo del límite de detección de la técnica ($<3,0 \text{ g}^{-1}$ sedimento húmedo) y solo se logró cuantificar el número de arqueas metanogénicas viables en el lago China (acetoclásticas e hidrogenotróficas) y en Drake 3 (acetoclásticas). En estos lagos, la cuantificación de arqueas metanogénicas involucró una fase de crecimiento de aproximadamente seis (China) y 12 meses (Drake 3). Resultados similares han sido reportados en el trabajo de Shulz y Conrad (1996), donde no lograron cuantificar por NMP arqueas metanogénicas (ni acetoclásticas e hidrogenotróficas) a 6 °C. En este trabajo se reporta que al cabo de cuatro meses solo se pudo detectar una pequeña fracción de metano y que este tiempo podría ser demasiado corto para la cuantificación por NMP de metanógenos. El sitio de estudio en el trabajo de Shulz y Conrad (1996) trata de sedimentos del lago Constanza (Alemania), el cual, por su ubicación geográfica, involucra una cantidad de materia orgánica mayor con respecto a nuestros sitios de estudio, lo que sugiere que la fase lag de nuestras incubaciones sería mayor a la observada en este trabajo

La cuantificación de arqueas metanogénicas mediante métodos cultivo-dependiente (como el NMP) es una actividad que puede involucrar mucho más sesgos por las condiciones de cultivo y, por ende, en su lugar se busca estudiar la comunidad a través de métodos cultivo-independiente. La qPCR, técnica cultivo-independiente, es una manera eficaz de determinar el número de copias de un gen particular presente en el ADN extraído de una muestra ambiental (Steinberg y Regan, 2009). La abundancia de arqueas metanogénicas en los lagos estudiados estuvo entre $1,57 \times 10^3$ (Slalom) a $9,08$

x 10^7 (China) copias de *mcrA* por cada gramo de sedimento seco. La abundancia promedio de metanógenos hallada en estos lagos fue similar a lo obtenido en otros sitios de estudio dentro de la Antártida como lo visto en el trabajo de Ma *et al.*, (2018) (sedimentos subglaciales), en sedimentos lacustres y permafrost en Alaska (Matheus Carnevali *et al.*, 2015; Frank-Fahle *et al.*, 2014). En cambio, la abundancia hallada de metanógenos en estos lagos fue hasta dos órdenes de magnitud menor a lo obtenido en sedimentos lacustres y suelos de humedales presentes en Alaska (Dellagnezze *et al.*, 2021) y sedimentos lacustres sub-antárticos (Lavergne *et al.*, 2021).

5.4 Composición de la comunidad de arqueas en sedimentos lacustres antárticos

Para conocer la diversidad, estructura y composición de la comunidad de arqueas en sedimentos de lagos de agua dulce ubicados en la Antártida marítima se utilizó secuenciación masiva basada en los genes ARNr 16S y *mcrA*. Sobre la base de los estimadores de diversidad y riqueza calculados (Tabla 14), los lagos Long, Mondsee y Slalom presentan una comunidad similar en cuanto a riqueza, diversidad de taxones y dominancia, encontrándose dominada por algunos pocos taxones (índices de Pielou $< 0,5$). En cambio, el lago Kitezh presentó una diversidad más alta y con una distribución de taxones más homogénea. Particularmente, el lago China presentó un alto número de riqueza de especies con un valor igual a 68 pero la diversidad en este lago fue baja y como lo indica el índice de Pielou en este lago hay una clara dominancia de algunos taxones, lo cual puede deberse a la alta abundancia del género acetoclástico *Methanosaeta* presente en este lago. En Drake 1, los índices estimados para este lago indican que la comunidad de arqueas es diversa (bajo índice de Simpon, $D = 0,10$) y está bien distribuida, es decir, no presenta dominancia de taxones. Una limitante del presente trabajo fue la comparación verdadera de la diversidad a nivel de arqueas encontradas en los sitios de estudios frente a otros de similares características y/o ubicación geográfica. Existen pocas investigaciones que estudien la comunidad de arqueas con las mismas herramientas moleculares aquí utilizadas. Métodos moleculares como, clonado, t-RFLP, ARDRA y DGGE fueron los más utilizados en años anteriores a la era ómica y no son tan completos en comparación con el análisis que utiliza un método de secuenciación masiva o de alto rendimiento. Este último es capaz de relevar diversidades que se encuentren en bajas proporciones en comparación con otros métodos, donde los clones detectados, por ejemplo, pueden revelar solo los organismos más dominantes. Esto enfatiza aún más la importancia de la realización de este trabajo en esta región extrema. Teniendo esto en cuenta, observamos que la diversidad de arqueas obtenida en este estudio supera la diversidad encontrada en otros lagos antárticos como es el lago Yukidori-Ike en el este de la Antártida, donde realizaron clonado para analizar la diversidad de arqueas. En este lago, se obtuvieron índices de Shannon y riqueza con valores que no superaron el 0,011 y 2, respectivamente (Chaya *et al.*, 2020).

En cambio, los índices de diversidad obtenidos en nuestro estudio fueron muy bajos en comparación con lo hallado en otros trabajos de ecosistemas fríos como, por ejemplo, el estudio de la diversidad de arqueas en los lagos de termokarst formados en el ártico donde se encontró una riqueza promedio de 833 OTU y un índice de Shannon y Simpson promedio de 3,64 y 0,92, respectivamente (De Jong *et al.*, 2018).

El análisis de ASV obtenidas a partir de la secuenciación masiva del gen ARNr 16S de arqueas en los sitios de estudio mostró grandes diferencias en la composición y estructura en la comunidad de arqueas entre los lagos evaluados. Los lagos Kitezh, Long, Mondsse, Slalom, Oil Tank y Uruguay mostraron una composición similar de la comunidad a nivel de arqueas, donde las phyla *Crenarchaeota* y *Nanoarchaeota* fueron las secuencias de ARNr 16S más dominantes dentro de la comunidad. Principalmente el phylum *Crenarchaeota* estuvo representado por secuencias afiliadas a dos familias, *Nitrososphaeraceae* y *Nitrosotaleaceae*, las cuales fueron recientemente reubicadas en dicho phylum. Las arqueas ubicadas dentro de estas familias están involucrados en la oxidación del amoníaco, paso inicial y limitante en la nitrificación (Zhao *et al.*, 2021), lo que sugiere que en estos lagos aparentemente el ciclo de nitrógeno por arqueas tendría mayor importancia. Se ha observado que arqueas oxidantes de amonio (AOA) pertenecientes a la familia *Nitrososphaeraceae* prefieren ambientes bajos en contenido de nitrógeno y con bajos niveles de pH (menores a 5,5) (Hetz y Horn, 2021). En lagos de agua dulce se ha observado que las AOA en general se encuentran en ambientes con bajo contenido de nutrientes y que que la concentración de amonio es uno de los principales factores que regulan la abundancia y distribución de AOA (Bollman *et al.*, 2014). En estos ecosistemas las AOA son favorecidas en condiciones de baja concentración de amonio, explicado por los bajos valores de Km para el amonio/amoníaco (Bollman *et al.*, 2014). Además, en estudios de enriquecimiento con cultivos de AOA en sistemas de agua dulce se obtuvo que otros factores ambientales como el pH y la exposición a la luz pueden también afectar su abundancia (French *et al.*, 2012), encontrándose mayor abundancia de AOA en ambientes bajos en amonio, poca luz y pH bajo (French *et al.*, 2012; Bollaman *et al.*, 2014; Juottonen *et al.*, 2020). En consecuencia, las AOA halladas en nuestros sitios de estudio se encontraron en mayor abundancia en aquellos sitios con baja cantidad de nitrógeno y el *Candidatus Nitrosotalea* mostró abundancias relativas más altas en lagos con bajo pH y profundidades mayores (más oscuros) (Tabla 15).

Por otra parte, dentro del phylum *Nanoarchaeota*, que ubica a arqueas de genomas de pequeño tamaño, capacidad metabólica limitada y vida simbiótica (Jarett *et al.*, 2018), se halló únicamente arqueas pertenecientes al orden *Woesearchaeales*. Se ha observado que estas arqueas son capaces de metabolizar el carbono e hidrógeno bajo condiciones anóxicas, lo cual puede asociarse con estilos de vida simbióticos y/o basados en fermentación. Estudios de coocurrencia demuestran una existencia de consorcios potenciales entre arqueas pertenecientes al orden *Woesearchaeales* y metanógenos

(Liu *et al.*, 2018). En Liu *et al.*, 2018 se plantea la hipótesis de la existencia de un proceso sintrófico entre el consorcio *Woesearchaeales* y metanógenos, donde las primeras apoyan el crecimiento de metanógenos que usan acetato e H_2/CO_2 . Por lo tanto, se especula con *Woesearchaeota* como socios de metanógenos y que podría afectar directamente el tipo de metanógenos presentes en el medio ambiente y la tasa de formación de metano (Liu *et al.*, 2018). Interesantemente, el ASV3 afiliado al orden *Woesearchaeales* fue el ASV con más prevalencia al estar presente en todos los lagos muestreados. De las pruebas de correlación solo se obtuvo que las arqueas del orden *Woesearchaeales* se correlacionaron positivamente con la relación C:N. Se ha reportado que las arqueas pertenecientes al orden *Woesearchaeales* eran dominantes en lagos boreales de Suecia, con una abundancia relativa mayor al 80 % de toda la comunidad de arqueas. *Woesearchaeales* también han sido hallados en otros ecosistemas árticos como en suelo de humedales (Dellagnezze *et al.*, 2021), sedimentos de lagos termokarst en el ártico (Matheus Carnevali *et al.*, 2018) y, además, en ecosistemas sub-antárticos como sedimentos de lagos (Lavergne *et al.*, 2021).

Como se menciona en la sección 1.5, las arqueas metanogénicas se agrupan en tres phyla, *Euryarchaeota*, *Halobacterota* y *Thermoplasmata*, las cuales fueron halladas en los sitios de estudio. Hubo un claro predominio de secuencias de ARNr 16S de arqueas metanogénicas en las comunidades de arqueas de sedimentos de los lagos China, Drake 1, Drake 2, Drake 3 y Green. En contraste, las arqueas metanogénicas en el resto de los lagos solo representaron menos del 10 % de la comunidad. A partir de las secuencias de ARNr 16S obtenidas de los sedimentos de los lagos China, Drake 1, Drake 2, Drake 3, Green, se encontraron hasta 24 ASV correspondientes a metanógenos. Entre ellos, los géneros *Methanosaeta* (orden *Methanosarcinales*), *Methanoregula* (orden *Methanomicrobiales*), *Methanosarcina* (orden *Methanosarcinales*) y *Methanosphaerula* (orden *Methanomicrobiales*), fueron los que se encontraron en mayor abundancia relativa en toda la comunidad de arqueas. A diferencia de lo observado en estos lagos, en Kitezh, Long, Mondsee y Slalom solo se hallaron seis ASV de las cuales las pertenecientes al género *Methanosaeta* fueron las más abundantes en Kitezh. En el resto de los lagos las abundancias relativas de secuencias ARNr 16S de metanógenos fueron menores al 1 % (Figura 18). De acuerdo con nuestros resultados, la existencia de arqueas metanogénicas también ha sido confirmado en varios estudios realizados en la Antártida. El estudio de la estructura de la comunidad de microorganismos en el lago Yukidori-Ike en el este de la Antártida, mostró que la comunidad de arqueas se encontraba dominada por secuencias ARNr 16S pertenecientes al género *Methanosarcina*, el cual ocupó un 97,2 % de la comunidad, y el género *Methanosaeta*, ambos clones compartieron un 99,0 y 98,1 % de similitud con las especies *Methanosarcina subterranea* y *Methanosaeta concilii*, respectivamente (Chaya *et al.*, 2020). Los géneros *Methanosarcina*, *Methanosaeta*, *Methanoregula* fueron los principales metanógenos encontrados en otros ecosistemas en ambientes fríos como estanques de deshielo en el Ártico alto canadiense (Negandhi *et al.*, 2013) y en de sedimentos subglaciales (Stibal *et al.*, 2012 y

Ma *et al.*, 2018). Arqueas metanogénicas ubicadas dentro del género *Methanosaeta* fueron halladas como las más abundantes ocupando más del 60 % de la comunidad de arqueas presentes en sedimentos de humedales árticos ubicados en Noruega (Blake *et al.*, 2015). Del mismo modo, altas abundancias relativas de *Methanosaeta* fueron observadas en sedimentos de lagos de agua dulce en Alaska (entre un 46,8 a 60,9 % de la comunidad de arqueas). Además, en estos sedimentos *Methanoregula* fue el segundo género metanogénico de mayor abundancia ocupando de un 14 a 25 % de la comunidad recolectada (Dellagnezze *et al.*, 2021). Sin embargo, a diferencia de estos estudios realizados en ecosistemas árticos, en nuestros análisis no se halló el grupo Rice cluster II. Este grupo no cultivado de arqueas metanogénicas nombradas así por la base de datos SILVA (versión SILVA 138) y asignadas al orden *Methanomicrobiales*, ha sido propuesto como parte de una nueva familia denominada *Candidatus Methanoflorentaceae* y reasignada al orden *Methanocellales* (Mondav *et al.*, 2014). En base al estudio de su genoma, se ha descubierto que pueden producir metano por la vía hidrogenotrófica a partir de H₂/CO₂, formiato y folmaldehído (Mondav *et al.*, 2014). Se ha demostrado que la distribución de este grupo de metanógenos es amplia, encontrándose en ecosistemas templados, subtropicales y marinos con un amplio rango de condiciones físicoquímicas (Mondav *et al.*, 2014). Aún así, tiene una fuerte presencia en ambientes árticos (Kotsyurbenko *et al.*, 2004; Yavitt *et al.*, 2011; Mondav *et al.*, 2014; Juottonen *et al.*, 2015), no encontrándose, hasta el momento, en muestras provenientes desde el hemisferio sur como regiones subantárticas y antárticas.

En el presente estudio, además, relevamos la composición y estructura de arqueas metanogénicas mediante el análisis de genes *mcrA* en lagos que fueron muestreados en el año 2020. Los resultados obtenidos aquí revelan nuevamente la dominancia de *Methanosarcina* (familia *Methanosarcinaceae*) (Figura 24 y 25). Sin embargo, a diferencia de lo obtenidos con el análisis de genes ARNr 16S, la diversidad de metanógenos fue mayor con el análisis de genes *mcrA*. Éste permitió revelar arqueas metanogénicas en los lagos Oil Tank y Uruguay, no obtenidas con secuencias ARNr 16S. Secuencias de metanógenos pertenecientes a la familia *Methanobacteriaceae* (orden *Methanobacteriales*) fueron halladas en Oil Tank a través del análisis de genes *mcrA*. Además, arqueas metanogénicas pertenecientes al orden *Methanomicrobiales* fueron las más abundantes con abundancias relativas próximas al 68 %, siendo el género *Methanoregula* el más dominante, ocupando un 35 % de la comunidad de metanógenos en este lago. Si bien la presencia de los géneros hidrogenotróficos pertenecientes a los órdenes *Methanomicrobiales* y *Methanobacteriales* fueron los más abundantes en este lago, la producción de metano fue mayormente realizada por *Methanosarcina* tanto a partir de acetato como de H₂/CO₂, a 5 y 20 °C (Figura 29). Lo que sugiere que la metanogénesis en el lago Oil Tank sería realizada por arqueas metanogénicas pertenecientes al género *Methanosarcina*. Este género también fue hallado en altas abundancias en el lago Uruguay y al igual que lo sucedido en Oil Tank, podría explicar la producción de metano a partir de los sustratos acetato o H₂/CO₂. Asimismo, la presencia de metanógenos aceoclásticos como *Methanosaeta* puede explicar la

producción de metano a partir de acetato. La obtención de metano a partir de acetato solo a 15 y 20 °C en este lago podría deberse a una población de *Methanosarcina* y/o *Methanosaeta* activa a temperaturas mesófilas. Además, el análisis de genes *mcrA* permitió recuperar en este lago arqueas metanogénicas con metabolismo hidrogenotrófico pertenecientes a los ordenes *Methanomicrobiales* y *Methanobacteriales*. Estos metanógenos hidrogenotróficos junto a la presencia del género *Methanosarcina* también podrían explicar la producción de metano a partir del sustrato H₂/CO₂. A diferencia del gen ARNr 16S que cuenta con una vasta base de datos de secuencias disponibles, la del gen *mcrA* es incompleta aún, no logrando muchas veces clasificar secuencias más allá del phylum. Para el lago Uruguay, además de las arqueas metanogénicas antes mencionadas, la comunidad de metanógenos fue dominada por secuencias que solo pudieron ser afiliadas al phylum *Euryarchaeota*.

Por último, el análisis de secuencias de genes *mcrA* nos permitió observar una mayor riqueza de taxones frente a lo obtenido con el estudio del gen ARNr 16S (Tabla 16). Esto se debe a la naturaleza altamente conservada de los genes ARNr 16S y al hecho de estar secuenciando solo una pequeña región del gen, lo que en consecuencia genera que aquellos taxones estrechamente relacionados no se logren diferenciar correctamente (Johnson *et al.*, 2019). Por otra parte, la diferenciación entre taxones con secuencias *mcrA* ofrece una mayor resolución frente a la asignación con secuencias ARNr 16S debido que el número de diferencias por sitio en fragmentos de secuencias *mcrA* es de 2-3 veces más alto que lo observado en secuencias completas de ARNr 16S (Montoya *et al.*, 2011).

5.5 Reestructuración de la comunidad de arqueas en respuesta al sustrato metanogénico y/o temperatura

Con el fin de obtener una comprensión más profunda de los efectos de la adición de sustratos metanogénicos y/o temperatura en la comunidad de arqueas, se estudió la estructura de ésta mediante análisis de secuencias ARNr 16S en los microcosmos incubados con o sin sustrato metanogénico, a 5 y 20 °C. Como se esperaba, en la mayoría de los lagos (excepto China), la adición de sustrato metanogénicos en los microcosmos provocó una reestructuración en la comunidad de arqueas potenciando el aumento de la abundancia relativa de metanógenos. Sin embargo, en el lago China el perfil de la comunidad se mantuvo similar al sedimento original en todas las condiciones de estudio. Por otra parte, se observó que los lagos respondieron de manera diferente a la adición de sustrato metanogénico, obteniéndose así dos patrones: en la mayoría de los microcosmos de los lagos Drake 3, Green (excepto a 20 °C con H₂/CO₂) y Oil Tank las secuencias más predominantes fueron de género *Methanosarcina*, en cambio en los lagos Drake 2 (excepto a 5 °C con H₂/CO₂) y China fue del género *Methanosaeta*.

Es bien sabido que los géneros *Methanosaeta* y *Methanosarcina* son los únicos metanógenos capaces de utilizar el acetato como sustrato para la producción de metano. Metanógenos pertenecientes al género *Methanosarcina* son organismos con una alta velocidad de crecimiento capaces de realizar las tres vías metabólicas de producción de metano conocidas como la hidrogenotrófica, acetoclástica y metilotrófica (ver sección 1.4). Además, estas arqueas metanogénicas son capaces de crecer en altas concentraciones de acetato (0,2-1,2 mM) al presentar un alta constante de saturación media (K_s) (Lu *et al.*, 2015; Chen *et al.*, 2016). Estas características de *Methanosarcina* podrían explicar su dominancia en los microcosmos de los lagos Drake 3, Green y Oil Tank con el agregado de altas concentraciones de acetato. Además, la dominancia de este tipo de metanógenos no fue afectada por la temperatura de incubación, demostrando una vez más de que se tratarían de especies de *Methanosarcinas* psicotolerantes y/o mesófilas. Sin embargo, cuando se cambia el sustrato metanogénico a H_2/CO_2 el comportamiento no es el mismo que el observado con acetato. Como se mencionó en la sección 5.2, la producción de metano a partir del H_2/CO_2 a bajas temperaturas fue muy baja con respecto a lo obtenido a altas temperaturas y, además, el sustrato se utilizó en porcentajes menores al 5 % (datos no mostrados). Lo que sugiere que en estas condiciones las arqueas metanogénicas hidrogenotróficas presentes en los lagos Drake 3, Green y Oil Tank no se vieron favorecidas. Sin embargo, no se pudo explicar lo que sucede con *Methanosarcina* a 5 °C en Drake 2 con el agregado de H_2/CO_2 .

En cambio, cuando se aumentó la temperatura de incubación, la utilización de H_2/CO_2 y la producción de metano fue potenciada a causa del enriquecimiento de los géneros *Methanosarcina* (en los lagos Drake 3 y Oil Tank) y *Methanobacterium* (en el lago Green) (Figuras 28, 29 y 30). En el lago Green, el incremento de la temperatura y el cambio del sustrato provocaron un cambio en la estructura de la comunidad de arqueas metanogénicas en donde se vieron favorecidos metanógenos pertenecientes al género *Methanobacterium*. Este género metanogénico, el cual se caracteriza por utilizar principalmente H_2/CO_2 como precursor metanogénico, comprende hasta el momento de 41 especies con nombre válidamente publicado (según lo indica la base de datos <http://lpsn.dsmz.de>) que, excluyendo las especies termófilas, la mayoría de las especies se describen como mesófilas con temperaturas óptimas que se aproximan entre 28-40 °C. Incluyéndose aquellas especies que han sido aisladas de ambientes fríos como el ártico (Krivushin *et al.*, 2009 y Shcherbakova *et al.*, 2010). En base a lo antes mencionado, los resultados obtenidos para este microcosmos, suplementado con H_2/CO_2 y 20 °C, estarían dentro de lo esperado.

La producción de metano a través de la vía acetoclástica ha sido reportada como la predominante en sedimentos lacustres a bajas temperaturas (Schulz y Conrad, 1996; Zepp *et al.*, 1999 y Nozhevnikova *et al.*, 2002), lo que coincide con los hallazgos de este estudio para el lago China y Drake 2. Además, el análisis de la comunidad de sedimentos a bajas temperaturas, han demostrado una alta dominancia

del género acetoclástico *Methanosaeta* (Zapp *et al.*, 1999; Lavergne *et al.*, 2021; Dellagnezze *et al.*, 2021). En concordancia con estos estudios, el análisis de la comunidad en el lago China y Drake 2 demostró siempre una alta prevalencia de secuencias pertenecientes al género *Methanosaeta* tanto en la muestra *in situ* (a tiempo cero) como en microcosmos sin y con agregado de sustrato. En contraste al género *Methanosarcina*, *Methanosaeta* spp. es estrictamente acetoclástico, solo pudiendo utilizar acetato como sustrato para la producción de metano. Además, son organismos de lento crecimiento que presentan una alta afinidad por el acetato, lo que produce una baja constante de saturación media (K_S) para el crecimiento sobre este sustrato (Chen y He, 2015). Por ende, metanógenos pertenecientes al género *Methanosaeta* se ven favorecidos en condiciones de bajos niveles de acetato ($< 100 \mu\text{M}$) (Conrad, 2007). Sin embargo, en microcosmos proveniente de sedimentos de los lagos China y Drake 2 en condiciones de altos niveles de acetato (5 mM), se encontró a *Methanosaeta* spp. como el metanógenos más dominante de la comunidad (con abundancias relativas mayores al 60 %), a bajas y altas temperaturas. Para el lago China, esta respuesta podría estar explicada por la alta abundancia de *Methanosaeta* spp. y la baja abundancia relativa de *Methanosarcina* spp. *in situ* (abundancias relativas menores al 4 % de la comunidad de arqueas totales) sumado a una alta actividad por parte de los metanógenos acetoclásticos, como se reportó también en Dellagnezze *et al.*, 2021. En cambio, para el lago Drake 2 los altos niveles de acetato no fue un impedimento para el enriquecimiento de *Methanosaeta* a 5 y 20 °C, desplazando a *Methanosarcina* a porcentajes menores al 5 %. Varios estudios previos, con foco en los procesos de digestión anaerobia, han reportado el dominio de *Methanosaeta* a altas concentraciones de acetato (Chen y He, 2015; Franke-Whittle *et al.*, 2014; van Haandel *et al.*, 2013), lo que indicaría que este comportamiento podría estar muy extendido en la digestión anaerobia a diferencia de lo observado en ecosistemas naturales con altos niveles de acetato. En Chen *et al.*, (2016) se sugiere la existencia de una divergencia en la relación competitiva entre las poblaciones de *Methanosaeta* y *Methanosarcina* aún no caracterizadas frente a las reportadas en la literatura. Además, enfatiza la importancia de identificar las diferencias genéticas y fisiológicas entre las especies de *Methanosaeta* capaces de tener una alta actividad a niveles elevados de acetato de aquellas que no lo son, como también, determinar su distribución.

A diferencia de lo observado en los lagos Drake 3, Green y Oil Tank a 5 °C y con H_2/CO_2 , en el lago Drake 2 las metanogénicas pertenecientes al género *Methanosarcina* fueron los más dominantes de la comunidad. Lo que sugiere que no solo las condiciones impuestas en este trabajo estarían influyendo en el crecimiento de *Methanosarcina* si no que otros factores ambientales, presentes en Drake 2, lo estarían haciendo. Se observó también que en este lago a 20 °C y con H_2/CO_2 , aumenta *Methanosaeta* respecto a lo que ocurre con el mismo sustrato pero a 5 °C. Hasta el momento, en la literatura no se ha reportado la existencia de especies de *Methanosaeta* capaces de metabolizar el H_2/CO_2 para producir metano, por lo tanto, se podría pensar la presencia de homoacetogénicas

mesófilas consumidoras de hidrógeno que producen acetato y éste sería utilizado en una última instancia por *Methanosaeta*. Resultados similares se obtuvieron para el lago China, con respecto a este lago ya se discutió en la sección 5.2.

6. Conclusiones

En este estudio se demostró que el aumento de la temperatura tiene gran influencia en la metabolización de la materia orgánica por parte de la comunidad microbiana y sobre todo en la actividad metanogénica. Además, mediante la obtención de las velocidades de producción de metano se obtuvo que las temperaturas óptimas de producción de metano serían iguales o más altas que la máxima temperatura aquí ensayada (20 °C). Se demostró que la actividad metanogénica no solo estaría limitada por la temperatura, sino que la escasez de materia orgánica y/o sustrato metanogénico también estaría influyendo en el potencial de producción de metano en este ecosistema. La adición de sustratos metanogénicos a ensayos en microcosmos, como el acetato e H_2/CO_2 , permitieron observar que las vías acetoclástica e hidrogenotrófica estaban presentes en la comunidad y presentaban diferencias en la producción de metano dependiendo de la temperatura de incubación. La producción de metano a partir del sustrato acetato siempre fue mayor a bajas temperaturas, mientras que a altas temperaturas predominó la producción de metano hidrogenotrófica en la mayoría de los sitios de estudio. Estos resultados indicarían que, en un escenario de calentamiento global, la vía hidrogenotrófica sería la vía que contribuya más a las emisiones de este gas de efecto invernadero.

El análisis de la diversidad mediante el uso de herramientas ómicas como la secuenciación masiva del gen universal ARNr 16S y el gen funcional *mcrA*, permitió revelar una baja diversidad de arqueas que en la mayoría de los sitios de estudio estuvo en gran parte dominada por arqueas metanogénicas. Secuencias génicas de metanógenos pertenecientes a los géneros *Methanosarcina*, *Methanoregula*, *Methanobacterium*, *Methanosphaerula* y *Methanosaeta* fueron las más abundantes en la mayoría de los sitios de estudio. Sin embargo, en tres de los 11 lagos estudiados el análisis de la comunidad de arqueas demostró la alta abundancia de arqueas con metabolismo oxidante de amonio, indicando que en estos lagos el ciclo de nitrógeno por arqueas tendría mayor importancia. Por otra parte, se halló que secuencias ARNr 16S pertenecientes al orden *Woesearchaeales* fueron las únicas compartidas entre la comunidad de arqueas de todos los lagos.

Se logró también demostrar la reestructuración que sufre la comunidad de arqueas frente a diferentes sustratos metanogénicos y cambio de temperatura. Sobre la base de nuestros resultados, se puede sugerir que los principales metanógenos involucrados en la producción de metano serían los pertenecientes a los géneros *Methanosaeta* y *Methanosarcina*. Además, los resultados obtenidos dejan al descubierto una posible competencia entre *Methanosaeta* y *Methanosarcina* por el acetato, muy diferente a lo expuesto en la literatura, lo que indicaría la presencia de especies nuevas de *Methanosaeta* con una maquinaria enzimática divergente a lo conocido hasta el momento.

7. Perspectivas

Sobre la base de los resultados obtenidos en esta tesis, es de gran interés obtener más información del potencial metabólico de las arqueas metanogénicas presentes en este ecosistema. Para esto, se propone la realización de análisis metagenómicos en la comunidad microbiana. Este abordaje nos permitiría conocer si en este tipo de ecosistema existen nuevas rutas metabólicas existentes en las arqueas metanogénicas presentes aún no descritas en la literatura. Además, un análisis metagenómico donde se secuencie el ADN total de una muestra dada y junto al ensamblado de secuencias se podría llegar a obtener secuencias completas del gen ARNr 16S, lo que nos podría permitir también la identificación de nuevas especies y/o géneros metagenómicos.

Por otra parte, para complementar nuestros resultados, se propone el desarrollo de ensayos con sustratos marcados. La evaluación de actividades metanogénicas potenciales a temperaturas psicrófilas cercanas a las *in situ* y mesófilas, a partir de microcosmos con adición de sustratos marcados, nos podría aportar conocimiento sobre cual vía metanogénica es la que aporta más a la producción de metano en este tipo de ecosistema. Para esto se realizarían incubaciones con sustratos metanogénicos marcados como ^{13}C -2-acetato y ^{13}C -bicarbonato, los cuales nos permitirían evaluar la vía acetoclástica e hidrogenotrófica, respectivamente. Además, se puede complementar con otros análisis moleculares como la secuenciación de amplicones (por ejemplo, ARNr 16S y/o *mcrA*) para conocer la taxonomía de aquellos microorganismos que se encuentran activos y que utilizan dichos sustratos.

Referencias bibliográficas

Alvarado, A., Montañez-Hernández, L. E., Palacio-Molina, S. L., Oropeza-Navarro, R., Luévanos-Escareño, M. P., & Balagurusamy, N. (2014). Microbial trophic interactions and *mcrA* gene expression in monitoring of anaerobic digesters. *Frontiers in Microbiology*, 5. DOI:10.3389/fmicb.2014.00597.

Amarelle, V., Carrasco, V., & Fabiano, E. (2019). The Hidden Life of Antarctic Rocks. *The Ecological Role of Micro-Organisms in the Antarctic Environment*, 221–237. DOI:10.1007/978-3-030-02786-5_10.

Angel, R., Matthies, D., & Conrad, R. (2011). Activation of Methanogenesis in Arid Biological Soil Crusts Despite the Presence of Oxygen. *PLoS ONE*, 6(5), e20453. DOI:10.1371/journal.pone.0020453.

Anisimov, O. A. (2007). Potential feedback of thawing permafrost to the global climate system through methane emission. *Environmental Research Letters*, 2(4), 045016. DOI: 10.1088/1748-9326/2/4/045016.

Baptiste, É., Brochier, C., & Boucher, Y. (2005). Higher-level classification of the Archaea: evolution of methanogenesis and methanogens. *Archaea*, 1(5), 353–363. DOI:10.1155/2005/859728.

Berghuis, B. A., Yu, F. B., Schulz, F., Blainey, P. C., Woyke, T., & Quake, S. R. (2019). Hydrogenotrophic methanogenesis in archaeal phylum Verstraetearchaeota reveals the shared ancestry of all methanogens. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 201815631. DOI:10.1073/pnas.1815631116.

Blake LI, Tveit A, Øvreås L, Head IM, Gray ND. (2015). Response of Methanogens in Arctic Sediments to Temperature and Methanogenic Substrate Availability. *PLoS ONE* 10(6): e0129733. DOI:10.1371/journal.pone.0129733.

Bollmann, A., Bullerjahn, G. S., & McKay, R. M. (2014). Abundance and Diversity of Ammonia-Oxidizing Archaea and Bacteria in Sediments of Trophic End Members of the Laurentian Great Lakes, Erie and Superior. *PLoS ONE*, 9(5), e97068. DOI:10.1371/journal.pone.0097068.

Borrel, G., Jézéquel, D., Biderre-Petit, C., Morel-Desrosiers, N., Morel, J.-P., Peyret, P., Fonty, G., Lehours, A.-C. (2011). Production and consumption of methane in freshwater lake ecosystems. *Research in Microbiology*, 162(9), 832–847. DOI: 10.1016/j.resmic.2011.06.004.

- Boyd, E. S., Skidmore, M., Mitchell, A. C., Bakermans, C., & Peters, J. W. (2010). Methanogenesis in subglacial sediments. *Environmental Microbiology Reports*, 2(5), 685–692. DOI:10.1111/j.1758-2229.2010.00162.x.
- Braun, M. H., & Saurer, H. (2014). Climate, energy fluxes and ablation rates on the ice cap of King George Island. *Pesquisa Antártica Brasileira* (4): 87-103.
- Burggraf, S., Huber, H., & Stetter, K. O. (1997). Reclassification of the Crenarchaeal Orders and Families in Accordance with 16S rRNA Sequence Data. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 47(3), 657–660. DOI:10.1099/00207713-47-3-657.
- Callahan, B. J., McMurdie, P. J., Rosen, M. J., Han, A. W., Johnson, A. J. A., & Holmes, S. P. (2016). DADA2: High-resolution sample inference from Illumina amplicon data. *Nature Methods*, 13(7), 581-583. DOI:10.1038/nmeth.3869.
- Carrizo, D., Sánchez-García, L., Menes, R. J., & García-Rodríguez, F. (2019). Discriminating sources and preservation of organic matter in surface sediments from five Antarctic lakes in the Fildes Peninsula (King George Island) by lipid biomarkers and compound-specific isotopic analysis. *Science of The Total Environment*, 672, 657–668. DOI:10.1016/j.scitotenv.2019.03.4.
- Chaya, A., Kurosawa, N., Kawamata, A., Kosugi, M., & Imura, S. (2019). Community Structures of Bacteria, Archaea, and Eukaryotic Microbes in the Freshwater Glacier Lake Yukidori-Ike in Langhovde, East Antarctica. *Diversity*, 11(7), 105. DOI:10.3390/d11070105.
- Chen, S., & He, Q. (2015). Persistence of Methanosaeta populations in anaerobic digestion during process instability. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*, 42(8), 1129–1137. DOI:10.1007/s10295 015-1632-7.
- Chen, S., Cheng, H., Liu, J., Hazen, T. C., Huang, V., & He, Q. (2016). Unexpected competitiveness of Methanosaeta populations at elevated acetate concentrations in methanogenic treatment of animal wastewater. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 101(4), 1729–1738. DOI:10.1007/s00253 016..
- Chen, S-C., Huang, H-H., Lai, M-C., Weng, C-Y., Chiu, H-H., Tang, S-L., Rogozin, D. Y., Degermendzhy, A. G. (2018). *Methanolobus psychrotolerans* sp. nov., a psychrotolerant methanoarchaeon isolated from a saline meromictic lake in Siberia. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 68(4):1378 1383. DOI: 10.1099/ijsem.0.002685.

Chen, T., Zhang, H., Liu, Y., Liu, Y.-X., & Huang, L. (2021). EVenn: Easy to create repeatable and editable Venn diagrams and Venn networks online. *Journal of Genetics and Genomics*. DOI:10.1016/j.jgg.2021.07.007..

Chong, S. C., Liu, Y., Cummins, M., Valentine, D. L., & Boone, D. R. (2002). Antonie van Leeuwenhoek, 81(1), 263–270. DOI:10.1023/a:1020535222281.

Conrad, R., Bak, F., Seitz, H. J., Thebrath, B., Mayer, H. P., & SchÄ¼tz, H. (1989). Hydrogen turnover by psychrotrophic homoacetogenic and mesophilic methanogenic bacteria in anoxic paddy soil and lake sediment. *FEMS Microbiology Letters*, 62(5), 285–293. doi:10.1111/j.1574-6968.1989.tb03382.x.

Conrad, R. (1999). Contribution of hydrogen to methane production and control of hydrogen concentrations in methanogenic soils and sediments. *FEMS Microbiology Ecology*, 28(3), 193–202. DOI:10.1111/j.1574-6941.1999.tb00575.x.

Conrad, R. (2007). Microbial Ecology of Methanogens and Methanotrophs. *Advances in Agronomy*, 1–63. DOI:10.1016/s0065-2113(07)96005-8.

Conrad, R. (2020). Importance of hydrogenotrophic, aceticlastic and methylotrophic methanogenesis for methane production in terrestrial, aquatic and other anoxic environments: A mini review. *Pedosphere*, 30(1), 25–39. DOI:10.1016/s1002-0160(18)60052-9.

Dean, J. F., Middelburg, J. J., Röckmann, T., Aerts, R., Blauw, L. G., Egger, M., Jetten, M. S. M., De Jong, A. E. E., Meisel, O. H., Rasigraf, O., Slomp, C. P., in't Zandt, M. H., Dolman, A. J. (2018). Methane Feedbacks to the Global Climate System in a Warmer World. *Reviews of Geophysics*, 56(1), 207–250. DOI:10.1002/2017rg000559.

De Jong, A. E. E., in 't Zandt, M. H., Meisel, O. H., Jetten, M. S. M., Dean, J. F., Rasigraf, O., & Welte, C. U. (2018). Increases in temperature and nutrient availability positively affect methane cycling microorganisms in arctic thermokarst lake sediments. *Environmental Microbiology*. DOI:10.1111/1462-2920.14345.

Dellagneze, B. M., Bovio-Winkler, P., Lavergne, C., Menoni, D.A., Mosquillo, F., Cabrol, L., Barret, M., Etchebehere, C. (2021). Temperature increase affects acetate-derived methane production in Alaskan lake sediments and wetland soils. *bioRxiv*. DOI: <https://doi.org/10.1101/2021.08.22.457279>.

- Dong, X., & Chen, Z. (2012). Psychrotolerant methanogenic archaea: Diversity and cold adaptation mechanisms. *Science China Life Sciences*, 55(5), 415–421. DOI:10.1007/s11427-012-4320-0.
- Duc, N. T., Crill, P., & Bastviken, D. (2010). Implications of temperature and sediment characteristics on methane formation and oxidation in lake sediments. *Biogeochemistry*, 100(1-3), 185–196. DOI:10.1007/s10533-010-9415-8.
- Earl, J., Hall, G., Pickup, R. W., Ritchie, D. A., & Edwards, C. (2003). Analysis of methanogen diversity in a hypereutrophic lake using PCR-RFLP analysis of *mcr* sequences. *Microbial Ecology*, 46(2), 270–278. DOI:10.1007/s00248-003-2003-x.
- Easterbrook, D. J. (2016). Greenhouse Gases. *Evidence-Based Climate Science*, 163–173. DOI:10.1016/b978-0-12-804588-6.00009-4.
- Ellis-Evans, J. C. 1983. Methane in Maritime Antarctic Freshwater Lakes. *Polar Biology*, 3:63-71.
- Environmental Protection Agency (EPA). (2010). Methane and nitrous oxide emissions from natural source. Document EPA 430-R-10-001. Washington, D.C.: EPA.
- Ferry, J. G. (1992). Biochemistry of Methanogenesis. *Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology*, 27(6), 473–503. DOI:10.3109/10409239209082570.
- Ferry, J. G. (Ed.). (1993). Methanogenesis. DOI:10.1007/978-1-4615-2391-8.
- Frank-Fahle, B. A., Yergeau, É., Greer, C. W., Lantuit, H., & Wagner, D. (2014). Microbial Functional Potential and Community Composition in Permafrost-Affected Soils of the NW Canadian Arctic. *PLoS ONE*, 9(1), e84761. DOI:10.1371/journal.pone.0084761.
- Franke-Whittle, I. H., Walter, A., Ebner, C., & Insam, H. (2014). Investigation into the effect of high concentrations of volatile fatty acids in anaerobic digestion on methanogenic communities. *Waste Management*, 34(11), 2080–2089. DOI:10.1016/j.wasman.2014.07.020.
- Franzmann, P. D., Roberts, N. J., Mancuso, C. A., Burton, H. R., McMeekin, T. A. (1991). Methane production in meromictic Ace Lake, Antarctica. *Hydrobiologia*, 210(3), 191–201. DOI:10.1007/bf00034677.
- Franzmann, P. D., Springer, N., Ludwig, W., Conway De Macario, E., & Rohde, M. (1992). A Methanogenic Archaeon from Ace Lake, Antarctica: *Methanococcoides burtonii* sp. nov. *Systematic and Applied Microbiology*, 15(4), 573–581. DOI:10.1016/s0723-2020(11)80117-7.

- Franzmann, P. D., Springer, N., Ludwig, W., Conway De Macario, E., & Rohde, M. (1992). A Methanogenic Archaeon from Ace Lake, Antarctica: *Methanococcoides burtonii* sp. nov. *Systematic and Applied Microbiology*, 15(4), 573–581. DOI:10.1016/s0723-2020(11)80117-7.
- French, E., Kozlowski, J. A., Mukherjee, M., Bullerjahn, G., & Bollmann, A. (2012). Ecophysiological Characterization of Ammonia-Oxidizing Archaea and Bacteria from Freshwater. *Applied and Environmental Microbiology*, 78(16), 5773–5780. DOI:10.1128/aem.00432-12.
- Garcia, J.-L., Patel, B. K., & Ollivier, B. (2000). Taxonomic, Phylogenetic, and Ecological Diversity of Methanogenic Archaea. *Anaerobe*, 6(4), 205–226. DOI:10.1006/anae.2000.0345.
- Glissman, K., Chin, K.-J., Casper, P., & Conrad, R. (2004). Methanogenic Pathway and Archaeal Community Structure in the Sediment of Eutrophic Lake Dagow: Effect of Temperature. *Microbial Ecology*, 48(3), 389–399. doi:10.1007/s00248-003-2027-2.
- Hedderich, R., & Whitman, W. B. (2013). Physiology and Biochemistry of the Methane-Producing Archaea. *The Prokaryotes*, 635–662. doi:10.1007/978-3-642-30141-4_81.
- Hetz, S. A. & Horn, M. A. (2021) Burkholderiaceae Are Key Acetate Assimilators During Complete Denitrification in Acidic Cryoturbated Peat Circles of the Arctic Tundra. *Front. Microbiol.* 12:628269. DOI: 10.3389/fmicb.2021.628269.
- Jarett, J. K., Nayfach, S., Podar, M., Inskeep, W., Ivanova, N. N., Munson-McGee, J., Schulz, F., Young, M., Jay, Z. J., Beam, J. P., Kyrpides, N. C., Malmstrom, R. R., Strepanauskas, R., Woyke, T. (2018). Single-cell genomics of co-sorted Nanoarchaeota suggests novel putative host associations and diversification of proteins involved in symbiosis. *Microbiome*, 6(1). DOI:10.1186/s40168-018-0539-8.
- Johnson, J. S., Spakowicz, D. J., Hong, B.-Y., Petersen, L. M., Demkowicz, P., Chen, L., ... Weinstock, G. M. (2019). Evaluation of 16S rRNA gene sequencing for species and strain-level microbiome analysis. *Nature Communications*, 10(1). DOI:10.1038/s41467-019-13036-1.
- Juottonen, H., Kotiaho, M., Robinson, D., Merilä, P., Fritze, H., & Tuittila, E.-S. (2015). Microform-related community patterns of methane-cycling microbes in boreal Sphagnum bogs are site specific. *FEMS Microbiology Ecology*, 91(9), fiv094. DOI:10.1093/femsec/fiv094.
- Juottonen, H., Fontaine, L., Wurzbacher, C., Drakare, S., Peura, S., & Eiler, A. (2020). Archaea in boreal Swedish lakes are diverse, dominated by Woese archaeota and follow deterministic community assembly. *Environmental Microbiology*. doi:10.1111/1462-2920.15058.

Kejna, M., & Sobota, I. (2013). Climatic change on King George Island in the years 1948 – 2011. *Polish Polar Research*, 34(2). DOI: 10.2478/popore-2013-0004.

Kirschke, S., Bousquet, P., Ciais, P., Saunoy, M., Canadell, J. G., Dlugokencky, E. J., Bergamaschi, P., 4, Bergmann, D., Blake, D. R., Bruhwiler, L., Cameron-Smith, P., Castaldi, S., Chevallier, F., Fraser, A., Heimann, M., Hodson, E. L., Houweling, S., Josse, B., Fraser, P. J., Krummel, P. B., Lamarque, J-F., Langenfelds, R. L., Quéré, C. L., Naik, V., O'Doherty, S., Palmer, P. I., Pison, I., Plummer, D., Poulter, B., Prinn, R. G., Rigby, M., Ringeval, B., Santini, M., Schmidt, M., Shindell, D. T., Simpson, I. J., Spahni, R., L., Steele, P., Strode S. A., Sudo, K., Szopa, S., van der Werf, G. T., 30, Voulgarakis, A., van Weele, M., Weiss R. F., Williams, J. E., Zeng, G. (2013). Three decades of global methane sources and sinks. *Nature Geoscience*, 6(10), 813–823. DOI:10.1038/geo1955.

Kotsyurbenko, O. R., Nozhevnikova, A. N., & Zavarzin, G. A. (1993). Methanogenic degradation of organic matter by anaerobic bacteria at low temperature. *Chemosphere*, 27(9), 1745–1761. DOI:10.1016/0045-6535(93)90155-x.

Kotsyurbenko, O. R., Chin, K.-J., Glagolev, M. V., Stunbner, S., Simankova, M. V., Nozhevnikova, A. N., Conrad, R. (2004). Acetoclastic and hydrogenotrophic methane production and methanogenic populations in an acidic West-Siberian peat bog. *Environmental Microbiology*, 6(11), 1159-1173. DOI: 10.1111/j.1462-2920.2004.00634.x.

Krivushin, K. V., Shcherbakova, V. A., Petrovskaya, L. E., & Rivkina, E. M. (2010). *Methanobacterium veterum* sp. nov., from ancient Siberian permafrost. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 60(2), 455–459. DOI:10.1099/ijs.0.011205-0.

Kurr, M., Huber, R., König, H., Jannasch, H. W., Fricke, H., Trincone, A., Kristjansson, J. K., Stetter, K. O. (1991). *Methanopyrus kandleri*, gen. and sp. nov. represents a novel group of hyperthermophilic methanogens, growing at 110 °C. *Archives of Microbiology*, 156(4), 239–247. DOI:10.1007/bf00262992.

Lavergne, C., Aguilar-Muñoz, P., Calle, N., Thalasso, F., Astorga-España, M. S., Sepulveda-Jauregui, A., Martinez-Cruz, K., Gandois, L., Mansilla, A., Chamy, R., Barret, M., Cabrol, L. (2021). Temperature differently affected methanogenic pathways and microbial communities in sub-Antarctic freshwater ecosystems. *Environment International*, 154, 106575. DOI:10.1016/j.envint.2021.106575.

- Liu, X., Li, M., Castelle, C. J., Probst, A. J., Zhou, Z., Pan, J., Liu, Y., Banfield, J. F., Gu, J.-D. (2018). Insights into the ecology, evolution, and metabolism of the widespread Woese archaeal lineages. *Microbiome*, 6(1). DOI:10.1186/s40168-018-0488-2.
- Lofton, D. D., Whalen, S. C., & Hershey, A. E. (2013). Effect of temperature on methane dynamics and evaluation of methane oxidation kinetics in shallow Arctic Alaskan lakes. *Hydrobiologia*, 721(1), 209–222. DOI:10.1007/s10750-013-1663-x.
- Lu, Y., Fu, L., Lu, Y., Hugenholtz, F., & Ma, K. (2015). Effect of temperature on the structure and activity of a methanogenic archaeal community during rice straw decomposition. *Soil Biology and Biochemistry*, 81, 17–27. DOI:10.1016/j.soilbio.2014.10.031.
- Lyu, Z., Shao, N., Akinyemi, T., & Whitman, W. B. (2018). Methanogenesis. *Current Biology*, 28(13), R727–R732. DOI:10.1016/j.cub.2018.05.021.
- Lyu, Z., Chou, C.-W., Shi, H., Wang, L., Ghebream, R., Phillips, D., Yan, Y., Duin, E. C., Whitman, W. B. (2018b). Assembly of Methyl Coenzyme M Reductase in the Methanogenic Archaeon *Methanococcus maripaludis*. *Journal of Bacteriology*, 200(7). DOI:10.1128/jb.00746-17.
- Lyu, Z., & Liu, Y. (2019). Diversity and Taxonomy of Methanogens. *Biogenesis of Hydrocarbons*, 19–77. DOI:10.1007/978-3-319-78108-2_5.
- Ma, H., Yan, W., Xiao, X., Shi, G., Li, Y., Sun, B., Dou, Y., Zhang, Y. (2018). Ex Situ Culturing Experiments Revealed Psychrophilic Hydrogentrophic Methanogenesis Being the Potential Dominant Methane-Producing Pathway in Subglacial Sediment in Larsemann Hills, Antarctic. *Front. Microbiol.* 9:237. DOI: 10.3389/fmicb.2018.00237.
- Matheus Carnevali, P. B., Rohrsen, M., Williams, M. R., Michaud, A. B., Adams, H., Berisford, D., Love, G. D., Priscu, J. C., Rassuchine, O., Hand, K. P., Murray, A. E. (2015). Methane sources in arctic thermokarst lake sediments on the North Slope of Alaska. *Geobiology*, 13(2), 181–197. DOI:10.1111/gbi.12124.
- Matheus Carnevali, P. B., Herbold, C. W., Hand, K. P., Priscu, J. C., & Murray, A. E. (2018). Distinct Microbial Assemblage Structure and Archaeal Diversity in Sediments of Arctic Thermokarst Lakes Differing in Methane Sources. *Frontiers in Microbiology*, 9. DOI:10.3389/fmicb.2018.01192.
- McMurdie, P. J., & Holmes, S. (2014). Waste Not, Want Not: Why Rarefying Microbiome Data Is Inadmissible. *PLoS Computational Biology*, 10(4), e1003531. doi:10.1371/journal.pcbi.1003531

Metje, M., & Frenzel, P. (2007). Methanogenesis and methanogenic pathways in a peat from subarctic permafrost. *Environmental Microbiology*, 9(4), 954–964. DOI:10.1111/j.1462-2920.2006.01217.x.

Mondav, R., Woodcroft, B. J., Kim, E.-H., McCalley, C. K., Hodgkins, S. B., Crill, P. M., Chanton, J., Hurst, G. B., VerBerkmoes, N. C., Saleska, S. R., Hugenholtz, P., Rich, V. I., Tyson, G. W. (2014). Discovery of a novel methanogen prevalent in thawing permafrost. *Nature Communications*, 5(1). doi:10.1038/ncomms4212.

Montoya, L., Lozada-Chávez, I., Amils, R., Rodriguez, N., & Marín, I. (2011). The Sulfate-Rich and Extreme Saline Sediment of the Ephemeral Tirez Lagoon: A Biotope for Acetoclastic Sulfate-Reducing Bacteria and Hydrogenotrophic Methanogenic Archaea. *International Journal of Microbiology*, 2011, 1–22. doi:10.1155/2011/753758.

Myhre, G., D. Shindell, F.-M. Bréon, W. Collins, J. Fuglestedt, J. Huang, D. Koch, J.-F. Lamarque, D. Lee, B. Mendoza, T. Nakajima, A. Robock, G. Stephens, T. Takemura, and H. Zhang, 2013: Anthropogenic and natural radiative forcing. In *Climate Change 2013: The Physical Science Basis. Contribution of Working Group I to the Fifth Assessment Report of the Intergovernmental Panel on Climate Change*. T.F. Stocker, D. Qin, G.-K. Plattner, M. Tignor, S.K. Allen, J. Doschung, A. Nauels, Y. Xia, V. Bex, and P.M. Midgley, Eds. Cambridge University Press, pp. 659-740, DOI:10.1017/CBO9781107415324.018.

Negandhi K, Laurion I, Whiticar MJ, Galand PE, Xu X, et al. (2013) Small Thaw Ponds: An Unaccounted Source of Methane in the Canadian High Arctic. *PLoS ONE* 8(11): e78204. DOI:10.1371/journal.pone.0078204.

Nozhevnikova, A. N., Holliger, C., Ammann, A., Zehnder, A. J. B. (1997). Methanogenesis in sediments from deep lakes at different temperatures (2–70°C). *Water Science and Technology*, 36(6-7). DOI:10.1016/s0273-1223(97)00507-6.

Nozhevnikova, A. N., Simankova, M. V., Parshina, S. N., & Kotsyurbenko, O. R. (2001). Temperature characteristics of methanogenic archaea and acetogenic bacteria isolated from cold environments. *Water Science and Technology*, 44(8), 41–48. DOI:10.2166/wst.2001.0460.

Nusslein, B. & Conrad, R. (2000). Methane production in eutrophic Lake Plußsee: seasonal change, temperature effect and metabolic processes in the profundal sediment. *Archiv für Hydrobiologie*, 149 (4), 597 – 623.

Peter, H.-U., Buesser, C., Mustafa, O., Pfeiffer, S. (2008). Risk assessment for the Fildes Peninsula and Ardley Island, and development of management plans for their designation as Specially Protected or Specially Managed Areas - Research Report 203 13 124 UBA-FB 001155e, p. 344, 2008.

Pociecha, A. (2010). Rotifers as Indicators of Climate Change in the Antarctic Environments. *Papers on Global Change IGBP*, 17(1). DOI:10.2478/v10190-010-0003-5.

Poggi, M., Godoy, A., Vidal, L., Petino Zappala, E., Fernandez, C. (2020). Récords antárticos y cambio climático. Servicio Meteorológico Nacional Argentina. Recuperado de: <https://www.smn.gov.ar/noticias/r%C3%A9cords-ant%C3%A1rticos-y-cambio-clim%C3%A1tico> [20/04/2021].

Rivkina, E., Shcherbakova, V., Laurinavichius, K., Petrovskaya, L., Krivushin, K., Kraev, G., Kraev, G., Percheritsina, S., Gilichinsky, D. (2007). Biogeochemistry of methane and methanogenic archaea in permafrost. *FEMS Microbiology Ecology*, 61(1), 1–15. doi:10.1111/j.1574-6941.2007.00315.x.

Quayle, W. C. (2002). Extreme Responses to Climate Change in Antarctic Lakes. *Science*, 295(5555), 645–645. DOI:10.1126/science.1064074.

Sattley, W. M., & Madigan, M. T. (2007). Cold-active acetogenic bacteria from surficial sediments of perennially ice-covered Lake Fryxell, Antarctica. *FEMS Microbiology Letters*, 272(1), 48–54. DOI:10.1111/j.1574-6968.2007.00737.x .

Simankova, M. V., Kotsyurbenko, O. R., Lueders, T., Nozhevnikova, A. N., Wagner, B., Conrad, R., & Friedrich, M. W. (2003). Isolation and Characterization of New Strains of Methanogens from Cold Terrestrial Habitats. *Systematic and Applied Microbiology*, 26(2), 312–318. DOI:10.1078/072320203322346173.

Shcherbakova, V., Rivkina, E., Pecheritsyna, S., Laurinavichius, K., Suzina, N., & Gilichinsky, D. (2010). *Methanobacterium arcticum* sp. nov., a methanogenic archaeon from Holocene Arctic permafrost. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 61(1), 144–147. DOI:10.1099/ijs.0.021311-0.

Schulz, S. & Conrad, R. (1996). Influence of temperature on pathways to methane production in the permanently cold profundal sediment of Lake Constance. *FEMS Microbiology Ecology* (20) 1-14

Shevnina, E., & Kourzeneva, E. (2017). Thermal regime and components of water balance of lakes in Antarctica at the Fildes peninsula and the Larsemann Hills. *Tellus A: Dynamic Meteorology and Oceanography*, 69(1), 1317202. DOI:10.1080/16000870.2017.1317202

Singh, N. (2005). Isolation and characterization of methylotrophic methanogens from anoxic marine sediments in Skan Bay, Alaska: description of *Methanococoides alaskense* sp. nov., and emended description of *Methanosarcina baltica*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 55(6), 2531–2538. DOI:10.1099/ijs.0.63886-0..

Sirohi, S. K., Chaudhary, P. P., Singh, N., Singh, D., & Puniya, A. K. (2013). The 16S rRNA and *mcrA* gene based comparative diversity of methanogens in cattle fed on high fibre based diet. *Gene*, 523(2), 161–166. DOI:10.1016/j.gene.2013.04.002 .

Springer, E., Sachs, M. S., Woese, C. R., & Boone, D. R. (1995). Partial Gene Sequences for the A Subunit of Methyl-Coenzyme M Reductase (*mcrI*) as a Phylogenetic Tool for the Family Methanosarcinaceae. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 45(3), 554–559. DOI:10.1099/00207713-45-3-554.

Solomon, S., Quin, D., MAnning, M., Marquis, M., Averyt, K., Tinor M. M. B., LeRoy Miller, H. (eds). 2007. *Climate Change 2007: The Physical Science Basis*. Cambridge University Press: Cambridge.

Stahl, D.A. and Amann, R. (1991) Development and Application of Nucleic Acid Probes in Bacterial Systematics. In: Stackebrandt, E. and Goodfellow, M., Eds., *Nucleic Acid Techniques in Bacterial Systematics*, John Wiley & Sons Ltd., Chichester, 205-248.

Steinberg, L. M., & Regan, J. M. (2008). Phylogenetic Comparison of the Methanogenic Communities from an Acidic, Oligotrophic Fen and an Anaerobic Digester Treating Municipal Wastewater Sludge. *Applied and Environmental Microbiology*, 74(21), 6663–6671. DOI:10.1128/aem.00553-08.

Steinberg, L. M., & Regan, J. M. (2009). *mcrA*-Targeted Real-Time Quantitative PCR Method To Examine Methanogen Communities. *Applied and Environmental Microbiology* 75(13), 4435–4442. DOI:10.1128/aem.02858-08.

Stibal, M., Wadham, J. L., Lis, G. P., Telling, J., Pancost, R. D., Dubnick, A., Sharp, M. J., Lawson, E. C., Butler, C. E. H., Hasan, F., Tranter, M., Anesio, A. M. (2012). Methanogenic potential of

Arctic and Antarctic subglacial environments with contrasting organic carbon sources. *Global Change Biology*, 18(11), 3332–3345. DOI:10.1111/j.1365-2486.2012.02763.x.

Takai, K. & Horikoshi, K. (2000). Rapid detection and quantification of members of the archaeal community by quantitative PCR using fluorogenic probes. *Applied and Environmental Microbiology* 66, 5066–5072.

Touzel, J. P., & Albagnac, G. (1983). Isolation and characterization of *Methanococcus mazei* strain MC3. *FEMS Microbiology Letters*, 16(2-3), 241–245. DOI:10.1111/j.1574- 6968.1983.tb00295.x.

Van Haandel, A., De Vrieze, J., Verstraete, W., & dos Santos, V. S. (2013). Methanosaeta dominate acetoclastic methanogenesis during high-rate methane production in anaerobic reactors treating distillery wastewaters. *Journal of Chemical Technology & Biotechnology*, 89(11), 1751–1759. DOI:10.1002/jctb.4255.

Vega-García, S., Sánchez-García, L., Prieto-Ballesteros, O., & Carrizo, D. (2021). Molecular and isotopic biogeochemistry on recently-formed soils on King George Island (Maritime Antarctica) after glacier retreat upon warming climate. *Science of The Total Environment*, 755, 142662. DOI:10.1016/j.scitotenv.2020.1426.

Von Klein, D., Arab, H., Völker, H., & Thomm, M. (2002). *Methanosarcina baltica*, sp. nov., a novel methanogen isolated from the Gotland Deep of the Baltic Sea. *Extremophiles*, 6(2), 103–110. DOI:10.1007/s007920100234.

Wadham, J. L., Arndt, S., Tulaczyk, S., Stibal, M., Tranter, M., Telling, J., G. P. Lis, E. Lawson, A. Ridgwell, A. Dubnick, M. J. Sharp, A. M. Anesio, Butler, C. E. H. (2012). Potential methane reservoirs beneath Antarctica. *Nature*, 488(7413), 633–637. DOI:10.1038/nature11374.

Wagner, D., Gattinger, A., Embacher, A., Pfeiffer, E.-M., Schlöter, M., Lipski, A. (2007). Methanogenic activity and biomass in Holocene permafrost deposits of the Lena Delta, Siberian Arctic and its implication for the global methane budget. *Global Change Biology*, 13(5), 1089–1099. DOI:10.1111/j.1365-2486.2007.01331.x.

Wagner, D. (2008) Microbial Communities and Processes in Arctic Permafrost Environments. In: P. Dion and C.S. Nautiyal (eds.), *Microbiology of Extreme Soils*. *Soil Biology* 13, Springer Berlin, pp 133-154.

Wei, S., Cui, H., Zhu, Y., Lu, Z., Pang, S., Zhang, S., Dong, H., Su, X. (2018). Shifts of methanogenic communities in response to permafrost thaw results in rising methane emissions and soil property changes. *Extremophiles*, 22(3), 447–459. DOI:10.1007/s00792-018-1007-x.

Whiticar, M. J. (2020). The Biogeochemical Methane Cycle. *Hydrocarbons, Oils and Lipids: Diversity, Origin, Chemistry and Fate*, 669–746. doi:10.1007/978-3-319-90569-3_5.

Wilkins, D., Lu, X.-Y., Shen, Z., Chen, J., & Lee, P. K. H. (2014). Pyrosequencing of *mcrA* and Archaeal 16S rRNA Genes Reveals Diversity and Substrate Preferences of Methanogen Communities in Anaerobic Digesters. *Applied and Environmental Microbiology*, 81(2), 604–613. DOI:10.1128/aem.02566-14.

Xavier, K. V. M., Souza, E. S. E, Santos, E. de A., & Diniz, M. C. (2020). Genetic diversity of 16S rRNA and *mcrA* genes from methanogenic archaeas. *Acta Scientiarum. Biological Sciences*, 42, e49877. DOI:10.4025/actasciobiolsci.v42i1.

Yang, Sizhong; Liebner, Susanne; Alawi, Mashal; Ebenhöf, Oliver; Wagner, Dirk (2014): Supplement to: Taxonomic database and cutoff value for processing *mcrA* gene 454 pyrosequencing data by MOTHUR. Deutsches GeoForschungsZentrum GFZ. DOI: doi.org/10.5880/GFZ.4.5.2014.001.

Yavitt, J. B., Yashiro, E., Cadillo-Quiroz, H., & Zinder, S. H. (2011). Methanogen diversity and community composition in peatlands of the central to northern Appalachian Mountain region, North America. *Biogeochemistry*, 109(1-3), 117–131 DOI:10.1007/s10533-011-9644-5.

Ye, R., Jin, Q., Bohannan, B., Keller, J. K., & Bridgham, S. D. (2014). Homoacetogenesis: A potentially underappreciated carbon pathway in peatlands. *Soil Biology and Biochemistry*, 68, 385–391. DOI:10.1016/j.soilbio.2013.10.020.

Zeikus, J. G. & Winfrey, M. R. (1976). Temperature Limitation of Methanogenesis in Aquatic Sediments. *Applied and Environmental Microbiology* (31) 99-107.

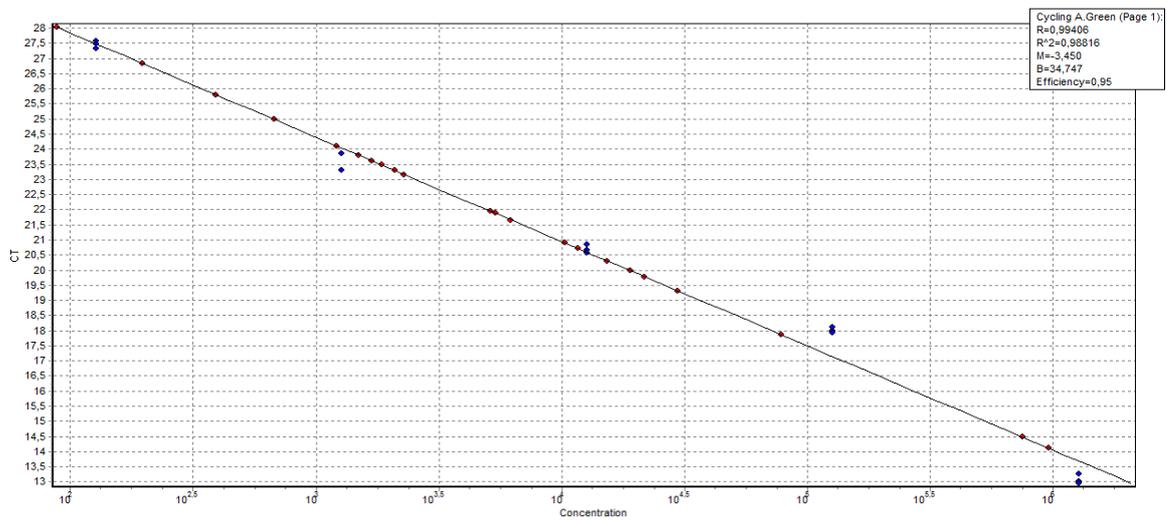
Zepp Falz, K., Holliger, C., Grosskopf, R., Liesack, W., Nozhevnikova, A. N., Müller, B., Wehrli, B., & Hahn, D. (1999). Vertical distribution of methanogens in the anoxic sediment of Rotsee (Switzerland). *Applied and environmental microbiology*, 65(6), 2402–2408. DOI:https://doi.org/10.1128/AEM.65.6.2402-2408.1999.

Zhao, J., Wang, B., Zhou, X. et al. Long-Term Adaptation of Acidophilic Archaeal Ammonia Oxidisers Following Different Soil Fertilisation Histories. *Microb Ecol* (2021). DOI: <https://doi.org/10.1007/s00248-021-01763-2>.

Apéndices

Apéndice 1. Abundancia de arqueas totales y arqueas metanogénicas en sedimentos lacustres antárticos

a



b

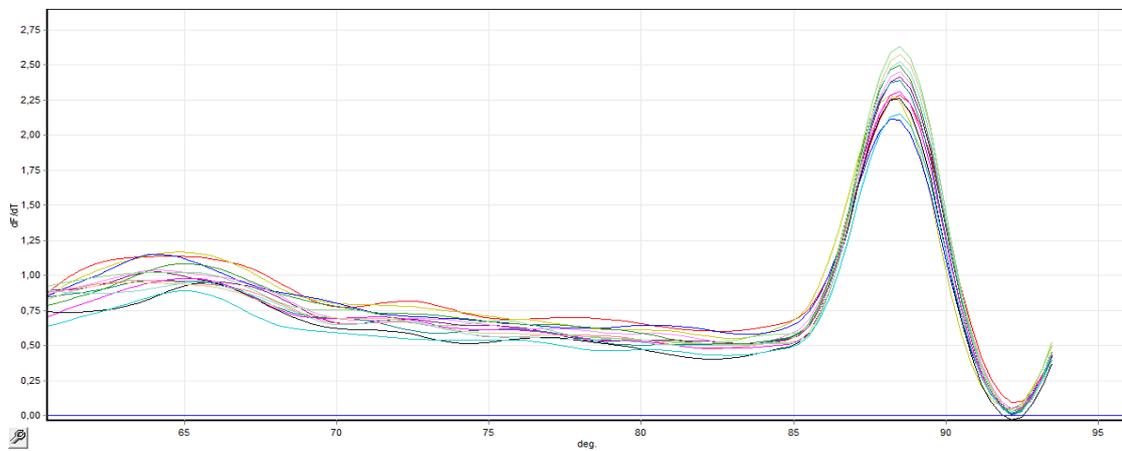
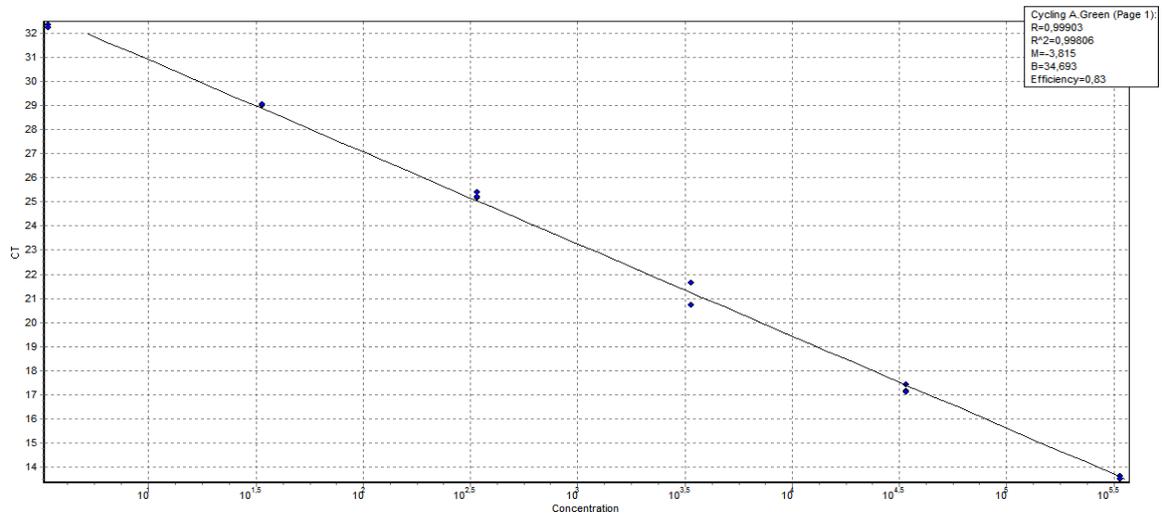


FIGURA 1. a. Curva de calibración a partir de la dilución del estándar generada para la cuantificación de arqueas totales en los sedimentos. Puntos de color azul corresponden a las réplicas de las diluciones del estándar y puntos color rojo corresponden a la amplificación de genes ARNr 16S de arqueas en los sedimentos. b. Curva de *melting* realizada para evaluar la formación de productos no-específicos o dímeros de cebadores.

a



b

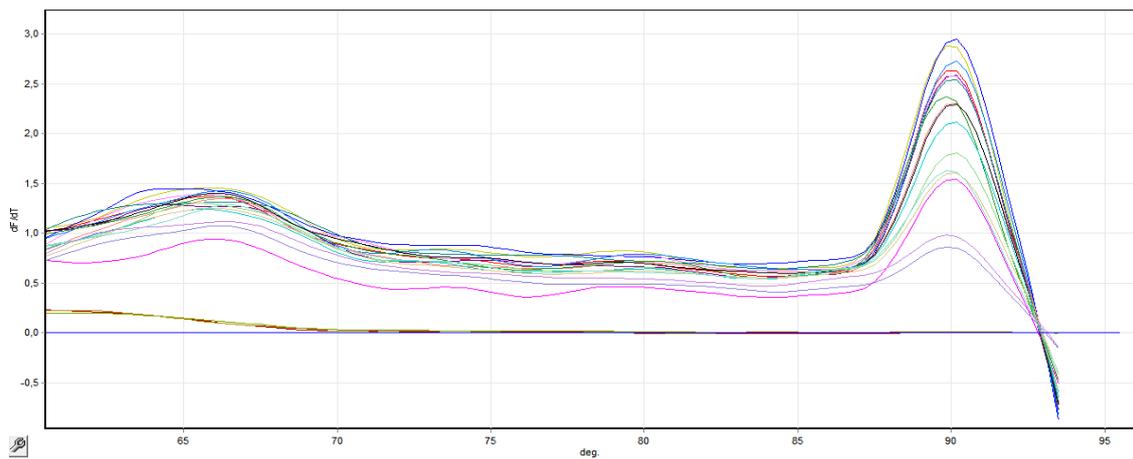


FIGURA 2. a. Curva de calibración a partir de la dilución del estándar generada para la cuantificación de arqueas metanogénicas en los sedimentos. Puntos de color azul corresponden a las réplicas de las diluciones del estándar y puntos color rojo corresponden a la amplificación de genes *mcrA* de arqueas en los sedimentos. b. Curva de *melting* realizada para evaluar la formación de productos no-específicos o dímeros de cebadores.

Apéndice 2. Composición y estructura de la comunidad de arquea por secuenciación masiva del gen ARNr 16S

TABLA 1. Resultados de las etapas de procesamiento de datos y estadísticas de secuenciación de recuentos de lecturas

Muestra (Lago)	Secuencia sin procesar (2x, <i>pair</i> <i>end</i>)	Luego del filtrado	Después de eliminar ruido y fusionar lecturas	Eliminación de quimeras y la clasificación
Kitezh	101727	78506	78102	71984
Long	115408	89429	88976	82717
Mondsee	104349	82047	81562	76841
Slalom	89718	70876	70468	65809
China	173953	167833	166928	135735
Drake 1	118938	112088	110566	9316
Drake 2	112595	105327	104203	55913
Drake 3	109175	99477	97840	33382
Green	123549	117401	116134	12887
Oil Tank	82116	72810	71994	40023
Uruguay	115574	109339	108440	90279

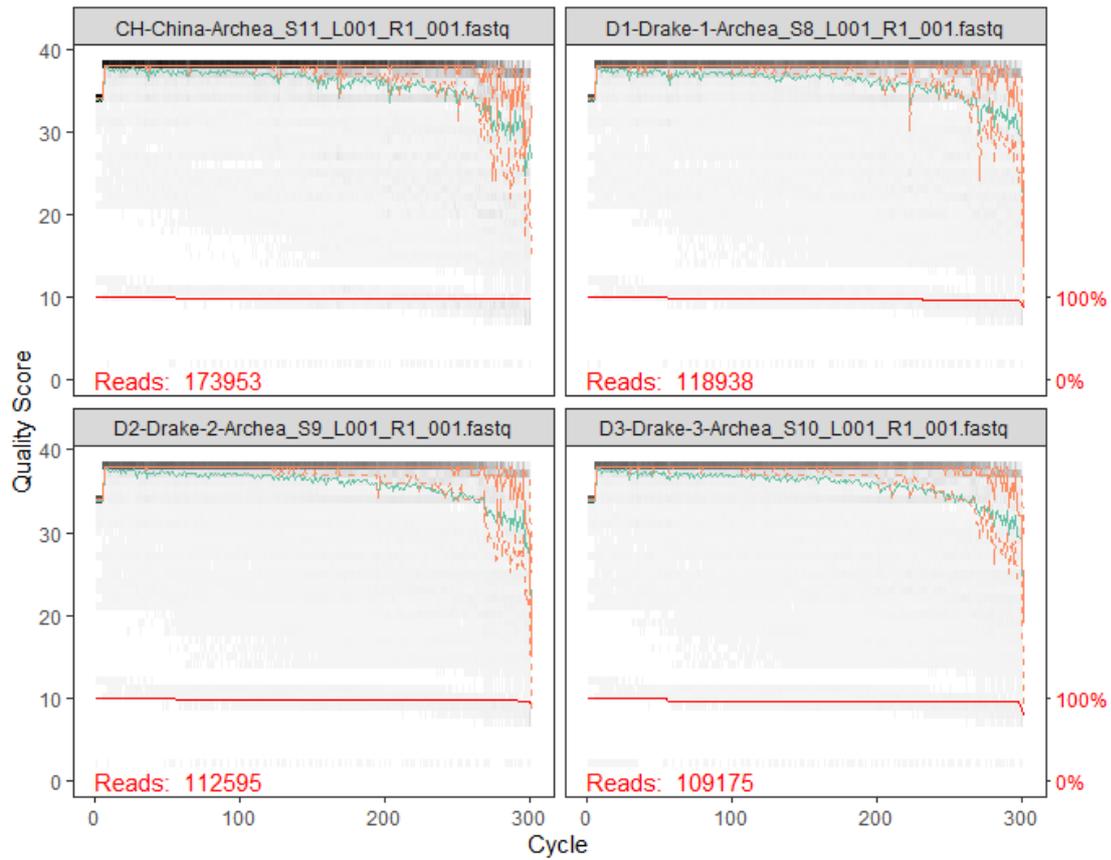


FIGURA 3. Perfiles de calidad basados en puntuaciones de calidad Phred para lecturas de secuenciación *forward*. Esta visualización resume la distribución del puntaje de calidad en referencia a la posición de cada base en las secuencias (denotado como "Cycle").

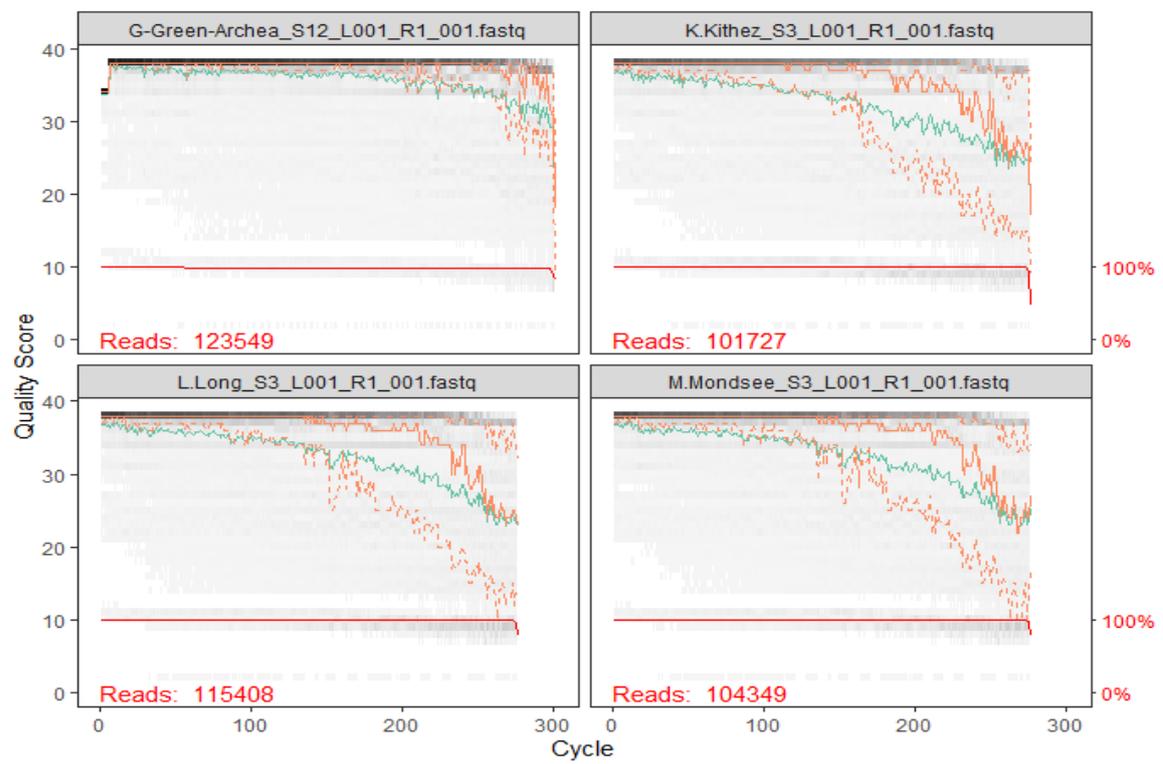


FIGURA 4. Perfiles de calidad basados en puntuaciones de calidad Phred para lecturas de secuenciación *foward*. Esta visualización resume la distribución del puntaje de calidad en referencia a la posición de cada base en las secuencias (denotado como "Cycle").

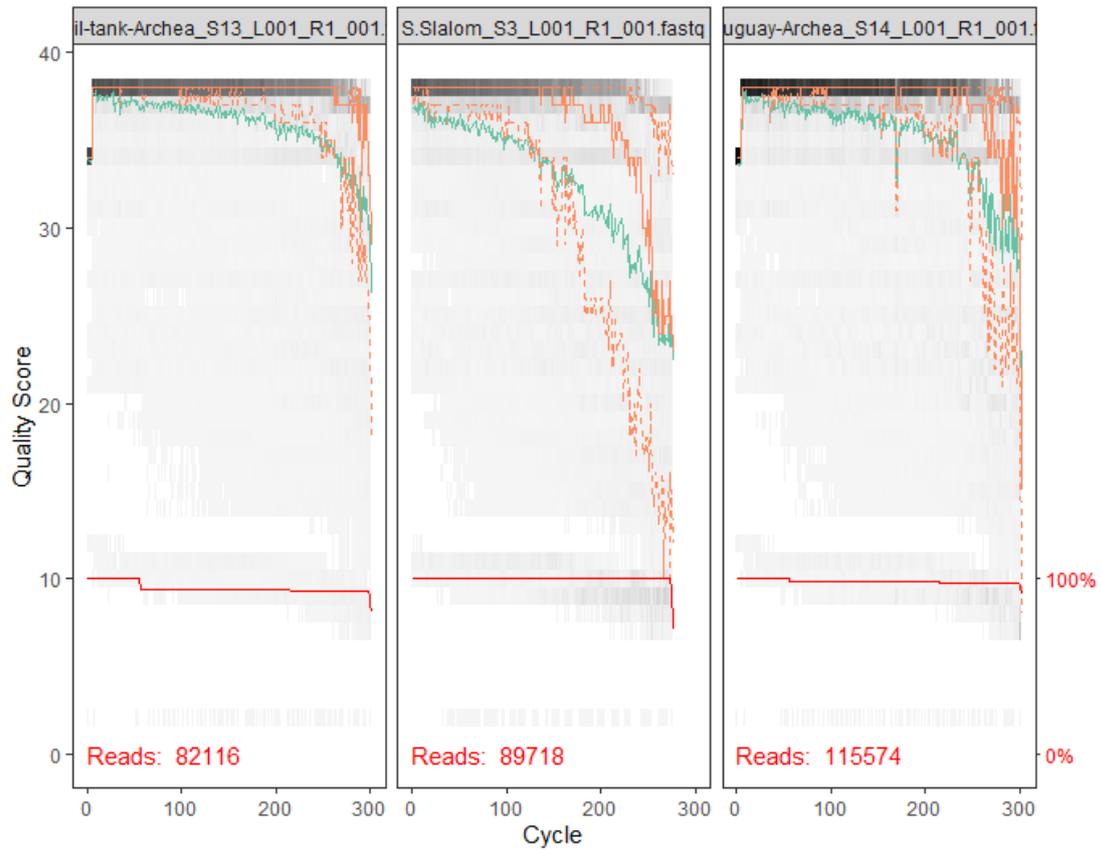


FIGURA 5. Perfiles de calidad basados en puntuaciones de calidad Phred para lecturas de secuenciación *forward*. Esta visualización resume la distribución del puntaje de calidad en referencia a la posición de cada base en las secuencias (denotado como "Cycle").

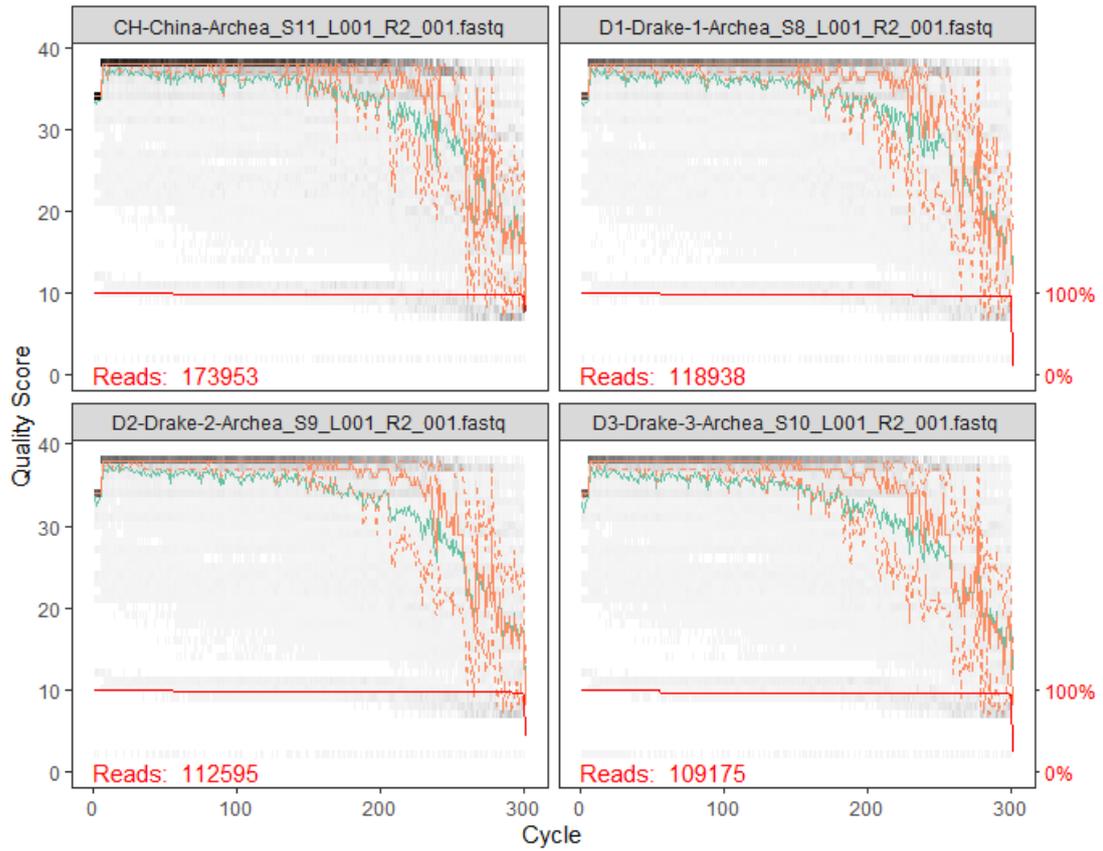


FIGURA 6. Perfiles de calidad basados en puntuaciones de calidad Phred para lecturas de secuenciación *reverse*. Esta visualización resume la distribución del puntaje de calidad en referencia a la posición de cada base en las secuencias (denotado como "Cycle").

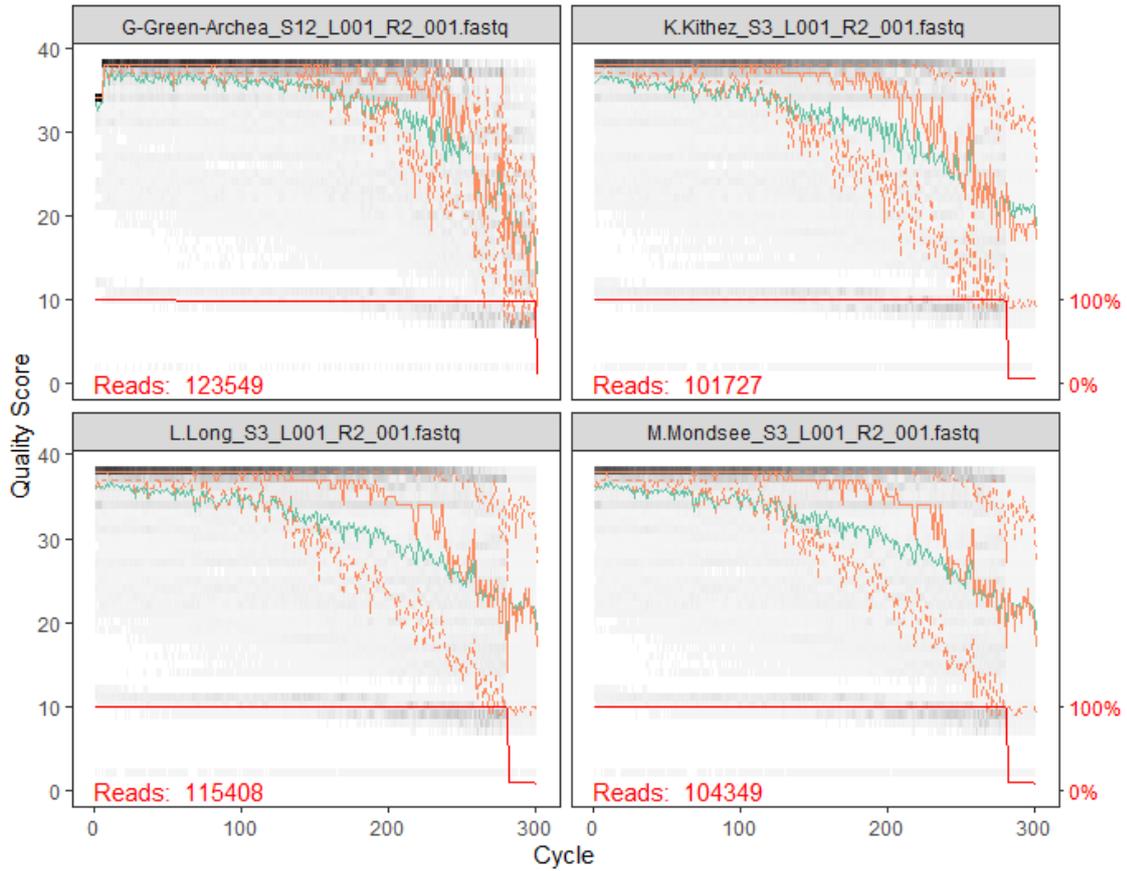


FIGURA 7. Perfiles de calidad basados en puntuaciones de calidad Phred para lecturas de secuenciación *reverse*. Esta visualización resume la distribución del puntaje de calidad en referencia a la posición de cada base en las secuencias (denotado como "Cycle").

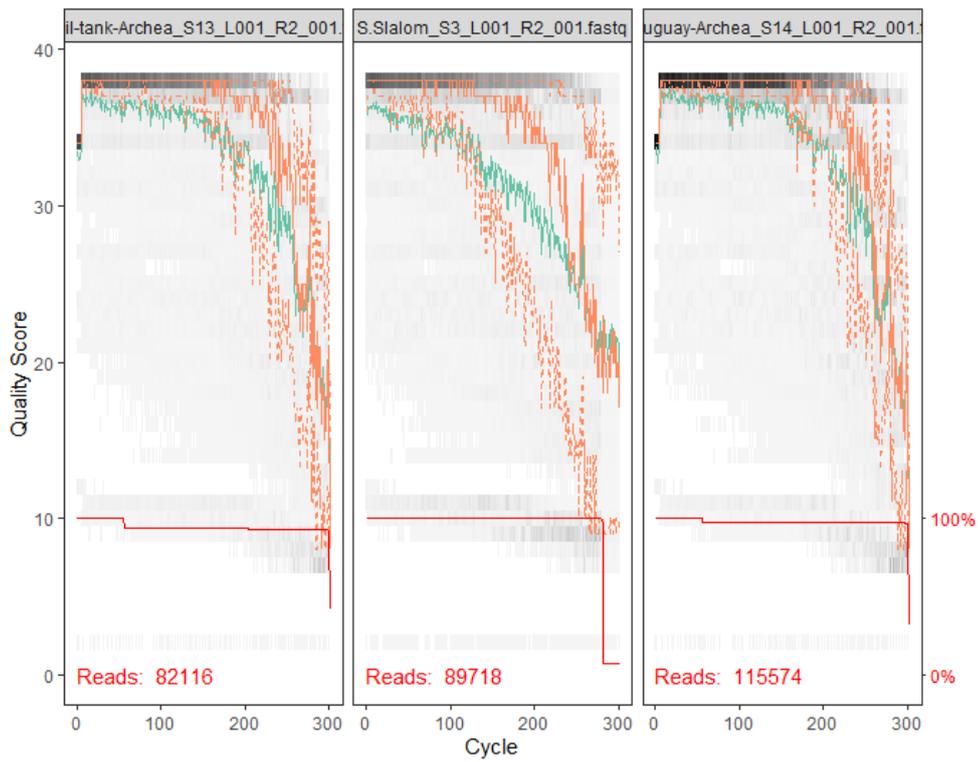


FIGURA 8. Perfiles de calidad basados en puntuaciones de calidad Phred para lecturas de secuenciación *reverse*. Esta visualización resume la distribución del puntaje de calidad en referencia a la posición de cada base en las secuencias (denotado como "Cycle").

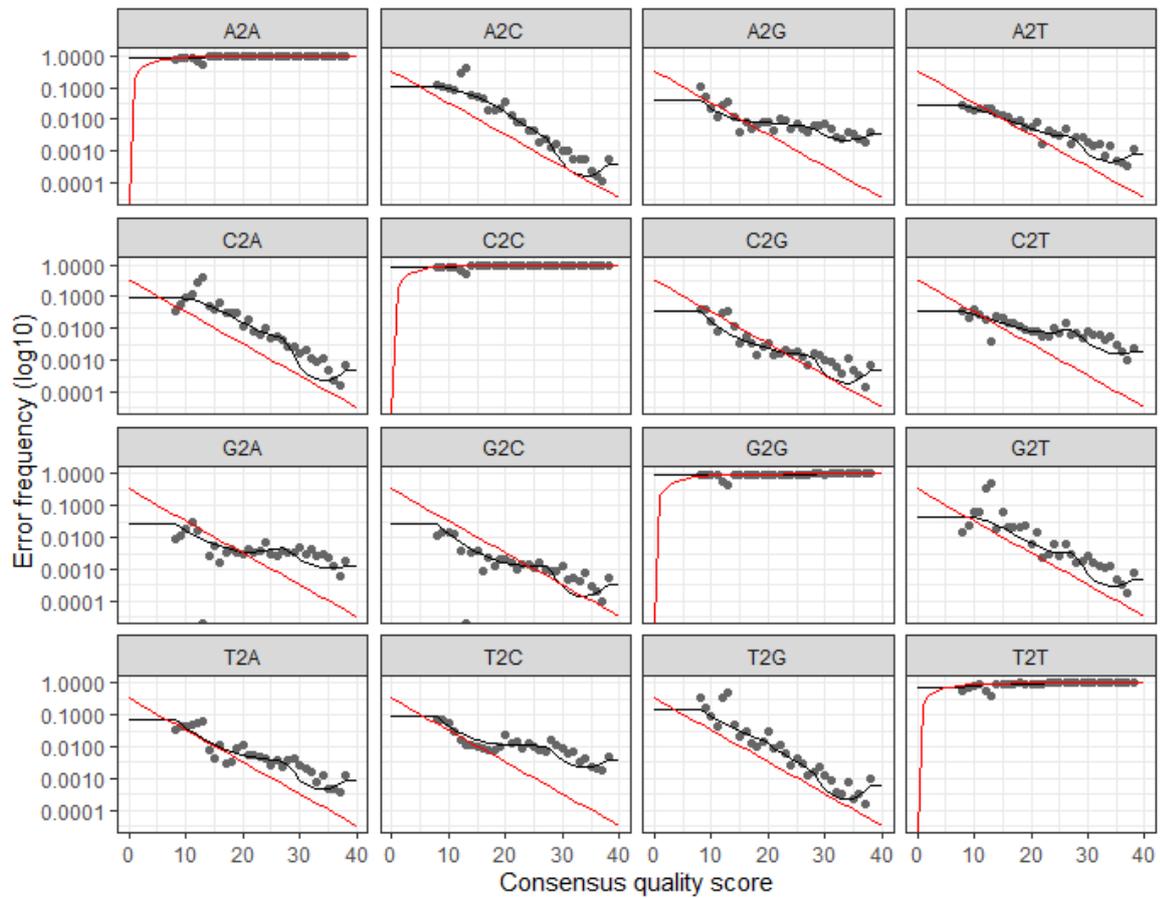


FIGURA 9. Gráficos de índices de aprendizaje de error del conjunto de datos utilizando el pipeline DADA2 para lecturas *forward*. Las tasas de error se representan como la frecuencia de error asociada con cada posible transición (por ejemplo, T a A) con respecto a la puntuación de calidad de consenso relacionada. Las tasas de error observadas se representan como puntos negros. Las tasas de error estimadas fueron aprendidas por el programa DADA2 y se trazan como la línea negra. Las tasas de error esperadas se basan en la definición nominal de los puntajes de calidad Phred y se trazan como la línea roja.

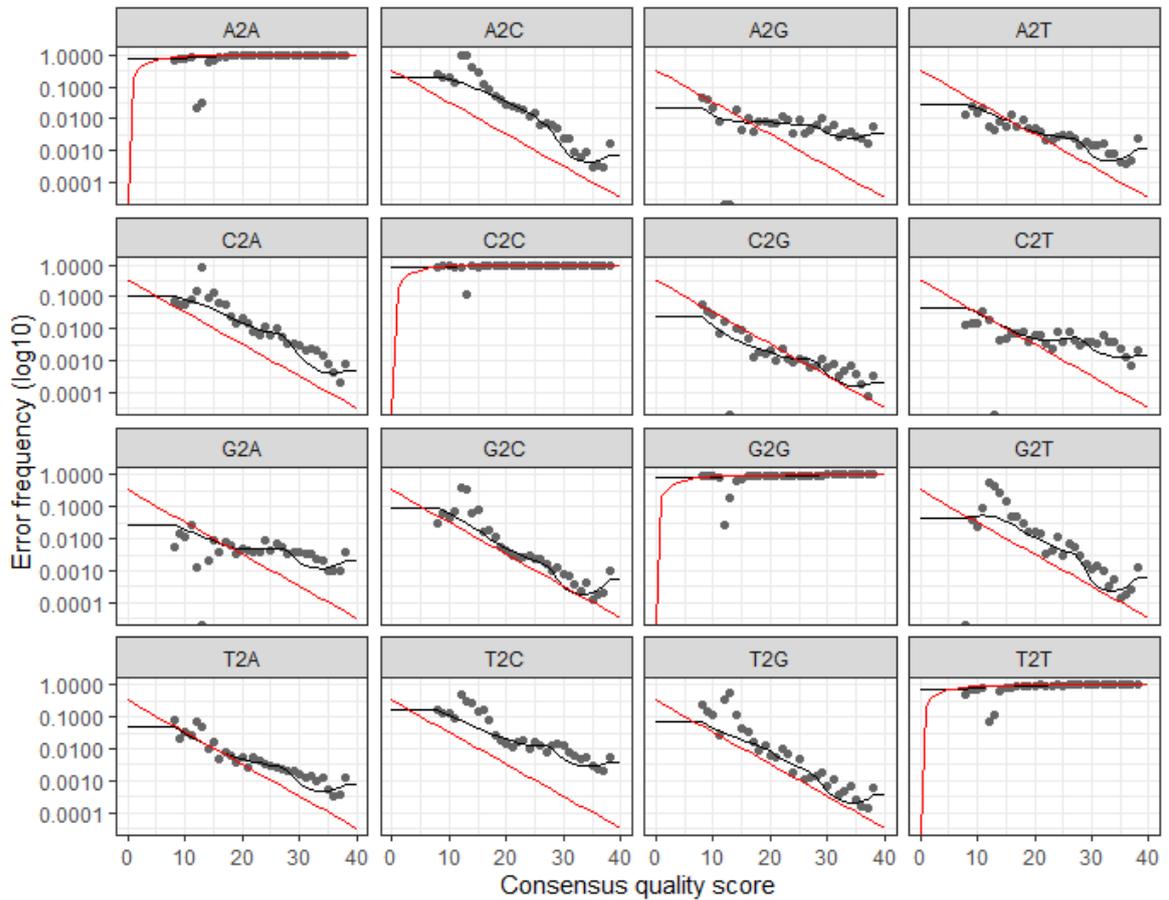


FIGURA 10. Gráficos de índices de aprendizaje de error del conjunto de datos utilizando el pipeline DADA2 para lecturas *reverse*. Las tasas de error se representan como la frecuencia de error asociada con cada posible transición (por ejemplo, T a A) con respecto a la puntuación de calidad de consenso relacionada. Las tasas de error observadas se representan como puntos negros. Las tasas de error estimadas fueron aprendidas por el programa DADA2 y se trazan como la línea negra. Las tasas de error esperadas se basan en la definición nominal de los puntajes de calidad Phred y se trazan como la línea roja.

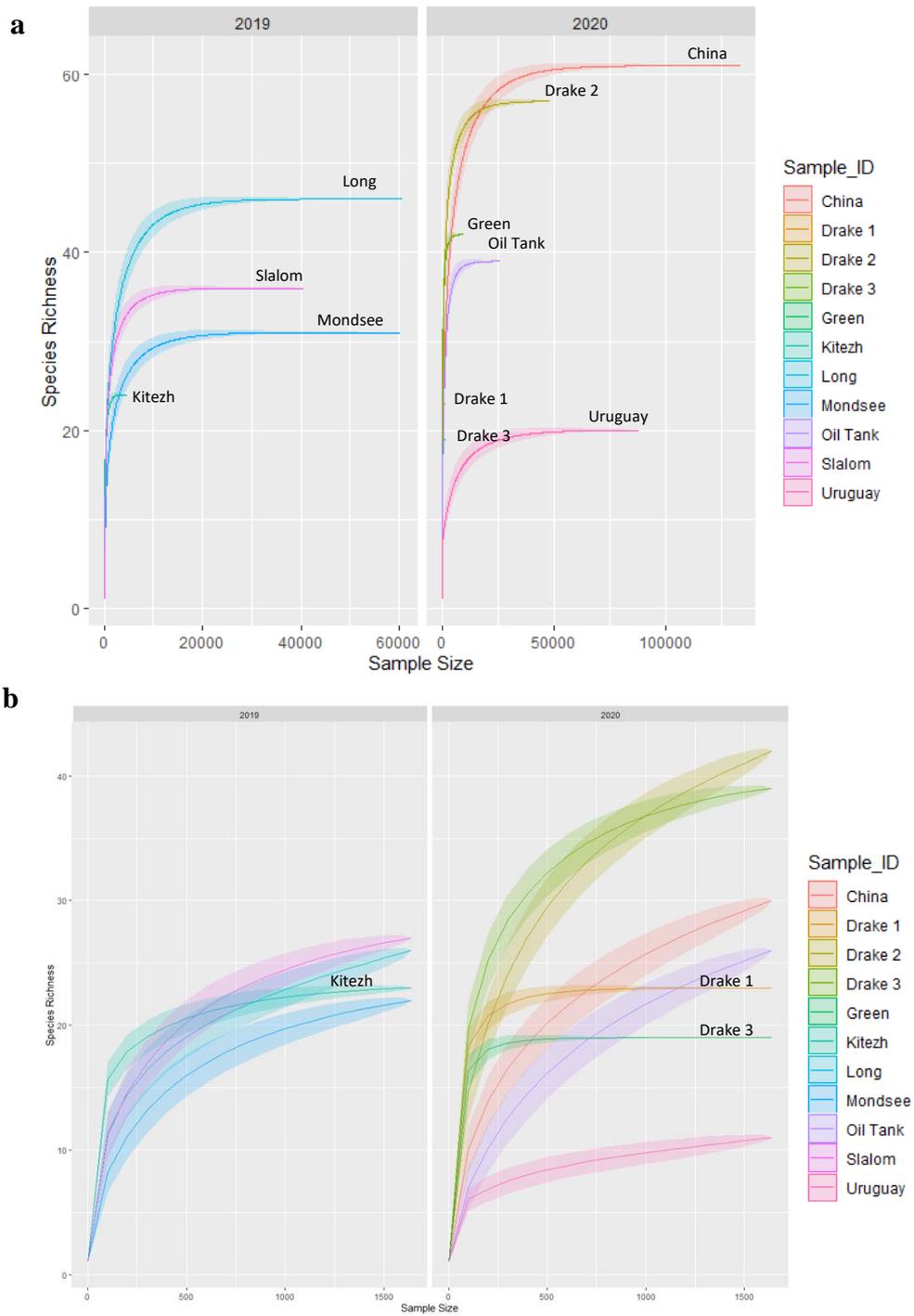


FIGURA 11. a. Gráfico de rarefacción que ilustra la profundidad de secuenciación con respecto al número de ASV a nivel de arqueas observados. b. Gráfico de rarefacción (a una escala máxima en el eje x de 1600 secuencias por muestra) que ilustra la profundidad de secuenciación con respecto al número de ASV observados. Se muestra como la profundidad de secuenciación en los lagos Kitezh, Drake 1 y Green permitió revelar el máximo de riqueza observada para esos lagos.

Apéndice 3. Diversidad beta

TABLA 2. Número y taxonomía de las ASV de arqueas compartidas entre los lagos Long, Mondsee y Kitez.

Lagos	N° de ASV compartidos	Taxonomía
Long Mondsee Slalom	5	ASV2:f__Nitrosotaleaceae; ASV3:o__Woearchaeales; ASV6:Nitrosarchaeum; ASV7:Methanoregula; ASV55:f__Nitrososphaeraceae
Long Slalom	1	ASV184:f__Nitrosopumilaceae
Long Mondsee	1	ASV645:f__Candidatus Iainarchaeum
Mondsee Slalom	1	ASV4:Candidatus Nitrosotalea
Long	5	ASV1:Methanosaeta; ASV135:f__GW2011_GWC1_47_16; ASV323:o__Aenigmarchaeales; ASV632:o__Micrarchaeales; ASV2186:Candidatus Nitrososphaera
Mondsee	1	ASV135:f__GW2011_GWC1_47_17
Slalom	5	ASV17:Methanosphaerula; ASV33:f__Methanomassiliicoccaceae; ASV45:Candidatus Nitrocosmicus; ASV135:f__GW2011_GWC1_47_19; ASV2017:AR15

TABLA 3. Número y taxonomía de las ASV de arqueas compartidas entre los lagos Kitezh, Oil Tank y Uruguay.

Lagos	Nº de ASV compartidas	Taxonomía
Kitezh Oil Tank Uruguay	2	ASV1:Methanosaeta; ASV3:o__Woesearchaeales
Kitezh Oil Tank	3	ASV6:Nitrosarchaeum; ASV7:Methanoregula; ASV55:f__Nitrososphaeraceae
Oil Tank Uruguay	5	ASV9:Methanosarcina; ASV33:f__Methanomassiliicoccaceae; ASV292:c__Bathyarchaeia; ASV632:o__Micrarchaeales; ASV645:f__Candidatus Iainarchaeum
Kitezh	3	ASV2:f__Nitrosotaleaceae; ASV45:Candidatus Nitrocosmicus; ASV135:f__GW2011_GWC
Oil Tank	1	ASV135:f__GW2011_GWC1_47_18
Uruguay	3	SV4:Candidatus Nitrosotalea; ASV501:Candidatus Methanoperedens; ASV1584:f__CG1-02-32-21

TABLA 4. Número y taxonomía de las ASV de arqueas compartidas entre los lagos China, Drake 1, Drake 2, Drake 3 y Green.

Lagos	N° de ASV compartidas	Taxonomía
China Drake 1 Drake 2 Drake 3 Green	6	ASV1:Methanosaeta ASV3:o__Woearchaeales ASV9:Methanosarcina ASV17:Methanosphaerula ASV33:f__Methanomassiliicoccaceae ASV44:Methanobacterium
China Drake 2 Drake 3 Green	2	ASV7:Methanoregula ASV392:o__Methanomicrobiales
China Drake 2 Drake 3	1	ASV135:f__GW2011_GWC1_47_15
China Drake 3	1	ASV6:Nitrosarchaeum
China Drake 2	3	ASV292:c__Bathyarchaeia ASV632:o__Micrarchaeales ASV1784:c__Odinarchaeia
China Drake 1 Drake 2	1	ASV506:Methanospirillum
Drake 1 Drake 2 Drake 3 Green	1	ASV55:f__Nitrososphaeraceae
Drake 1 Drake 3 Green	1	ASV1227:f__Methanocellaceae
Drake 2 Drake 3	1	ASV501:Candidatus Methanoperedens
China	1	ASV2220:Candidatus Altiarchaeum
Drake 2	1	ASV1504:c__Thermoplasmata
Drake 3	2	ASV45:Candidatus Nitrocosmicus ASV2302:f__Rice Cluster II
Green	1	ASV1743:o__Marine Group II

TABLA 5. Número y taxonomía de los asv de arqueas compartidos entre el total de lagos evaluados en este trabajo.

Lagos	Nº de ASV compartidas	Taxonomía
China Drake 1 Drake 2 Drake 3 Green Kitezh Long Mondsee Oil Tank Slalom Uruguay	1	o__Woesearchaeales
China Drake 1 Drake 2 Drake 3 Green Kitezh Long Oil Tank Uruguay	1	ASV1:Methanosaeta
China Drake 2 Drake 3 Green Kitezh Long Mondsee Oil Tank Slalom	1	ASV7:Methanoregula
China Drake 3 Kitezh Long Mondsee Oil Tank Slalom	1	ASV6:Nitrosarchaeum
China Drake 1 Drake 2 Drake 3 Green Oil Tank Uruguay	1	ASV9:Methanosarcina
China Drake 1 Drake 2 Drake 3 Green Slalom	1	ASV17:Methanosphaerula
China Drake 1 Drake 2 Drake 3 Green Oil Tank Slalom Uruguay	1	ASV33:f__Methanomassiliicoccaceae
China Drake 1 Drake 2 Drake 3 Green China Drake 2 Drake 3 Kitezh	1	ASV44:Methanobacterium
China Drake 2 Drake 3 Kitezh	1	ASV135:f__GW2011_GWC1_47_15
China Drake 2 Oil Tank Uruguay	1	ASV292:c__Bathyarchaeia
China Drake 2 Drake 3 Green	1	ASV392:o__Methanomicrobiales
China Drake 1 Drake 2	1	ASV506:Methanospirillum
China Drake 2 Long Oil Tank Uruguay	1	ASV632:o__Micrarchaeales
China Drake 2	1	ASV1784:c__Odinarchaeia
Drake 1 Drake 2 Drake 3 Green Kitezh Long Mondsee Oil Tank Slalom	1	ASV55:f__Nitrososphaeraceae
Drake 1 Drake 3 Green	1	ASV1227:f__Methanocellaceae
Drake 2 Drake 3 Uruguay	1	ASV501:Candidatus Methanoperedens
Drake 3 Kitezh Slalom	1	ASV45:Candidatus Nitrocosmicus
Kitezh Long Mondsee Slalom	1	ASV2:f__Nitrosotaleaceae
Long Slalom	1	ASV184:f__Nitrosopumilaceae
Long Mondsee Oil Tank Uruguay	1	ASV645:f__Candidatus Iainarchaeum
Mondsee Slalom Uruguay	1	ASV4:Candidatus Nitrosotalea
China	1	ASV2220:Candidatus Altiarchaeum
Drake 2	1	ASV1504:c__Thermoplasmata
Drake 3	1	ASV2302:f__Rice Cluster II
Green	1	ASV1743:o__Marine Group II
Long	3	ASV135:f__GW2011_GWC1_47_16 ASV323:o__Aenigmarchaeales ASV2186:Candidatus Nitrososphaera
Mondsee	1	ASV135:f__GW2011_GWC1_47_17
Oil Tank	1	ASV135:f__GW2011_GWC1_47_18
Slalom	2	ASV135:f__GW2011_GWC1_47_19 ASV2017:AR15
Uruguay	1	ASV1584:f__CG1-02-32-21

Apéndice 4. Análisis de la comunidad de arqueas metanogénicas mediante secuenciación masiva del gen *mcrA*

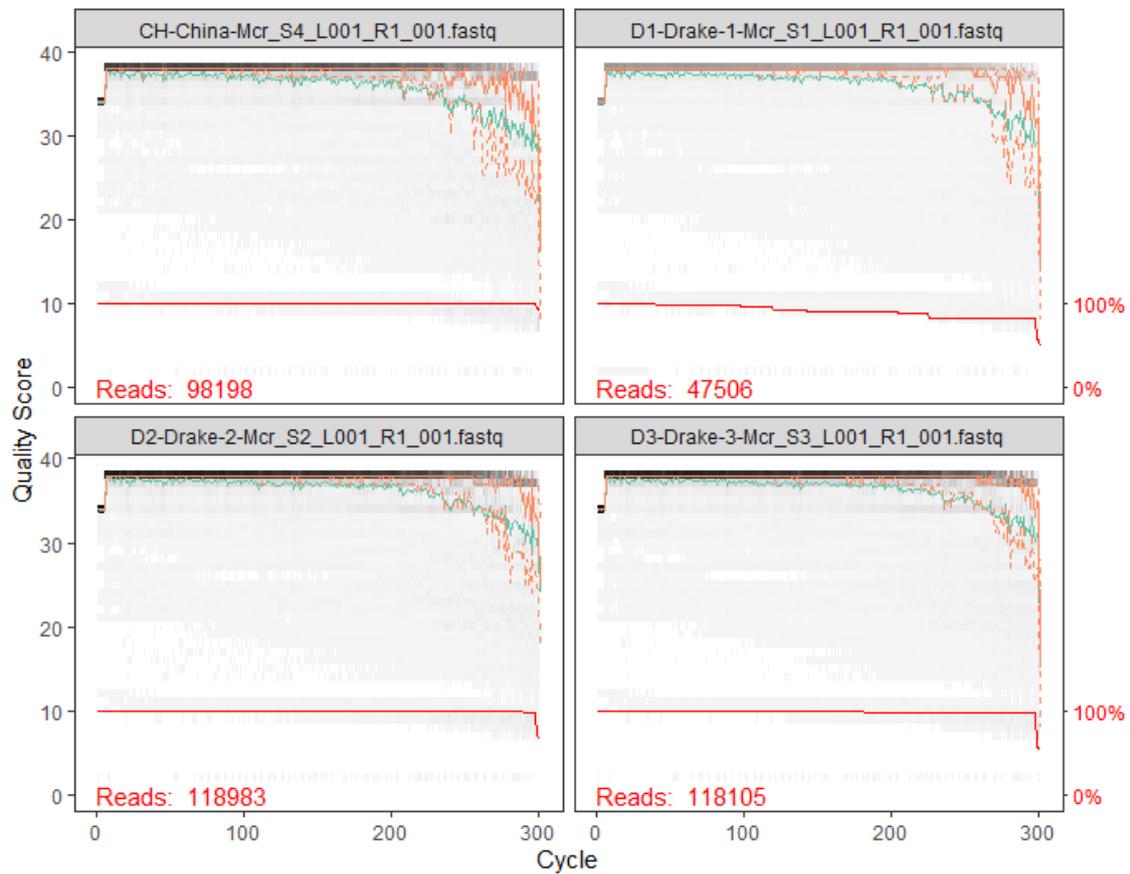


FIGURA 12. Perfiles de calidad basados en puntuaciones de calidad Phred para lecturas de secuenciación *forward*. Esta visualización resume la distribución del puntaje de calidad en referencia a la posición de cada base en las secuencias (denotado como "Cycle").

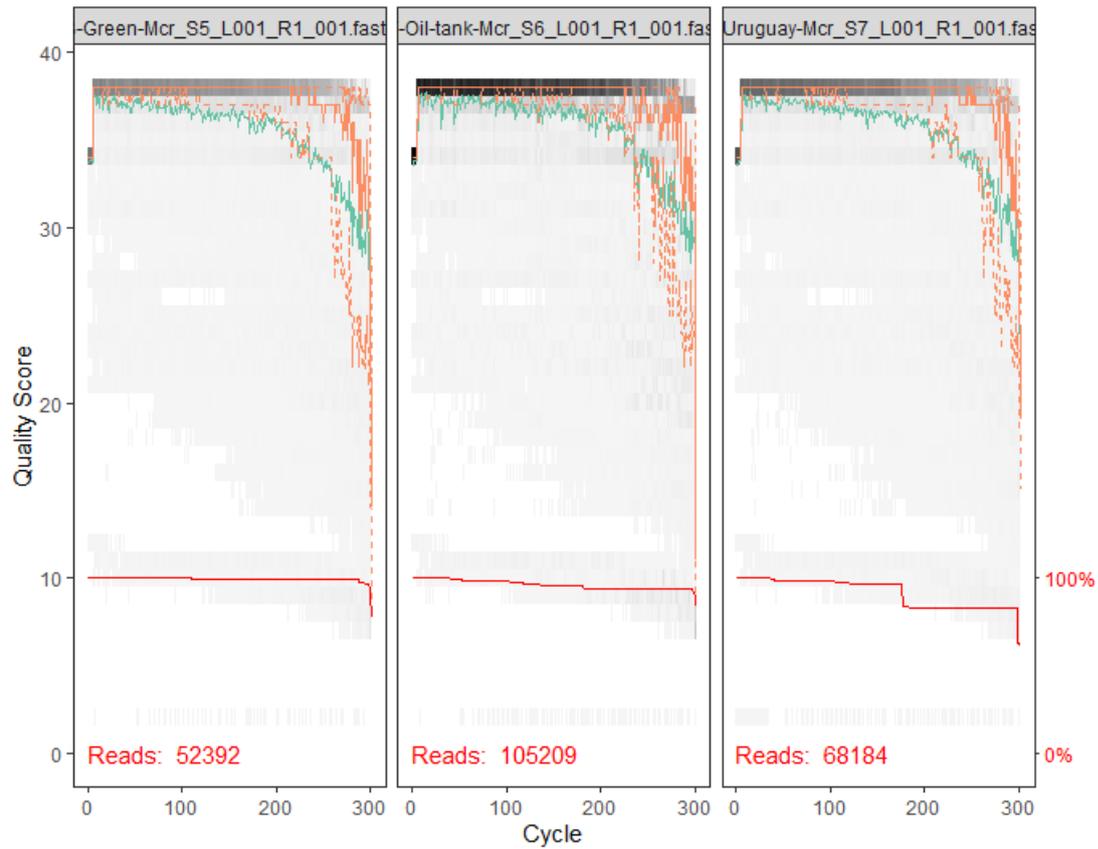


FIGURA 13. Perfiles de calidad basados en puntuaciones de calidad Phred para lecturas de secuenciación *forward*. Esta visualización resume la distribución del puntaje de calidad en referencia a la posición de cada base en las secuencias (denotado como "Cycle").

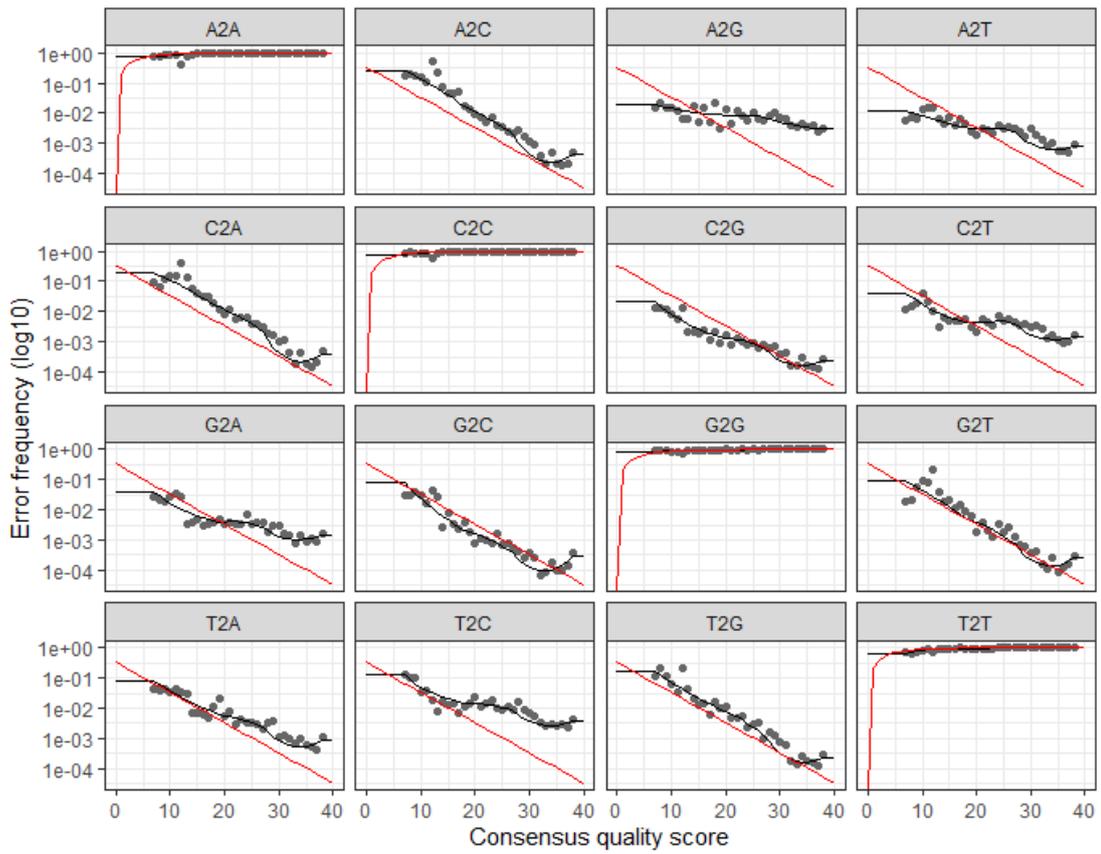


FIGURA 14 Gráficos de índices de aprendizaje de error del conjunto de datos utilizando el pipeline DADA2 para lecturas *forward*. Las tasas de error se representan como la frecuencia de error asociada con cada posible transición (por ejemplo, T a A) con respecto a la puntuación de calidad de consenso relacionada. Las tasas de error observadas se representan como puntos negros. Las tasas de error estimadas fueron aprendidas por el programa DADA2 y se trazan como la línea negra. Las tasas de error esperadas se basan en la definición nominal de los puntajes de calidad Phred y se trazan como la línea roja.

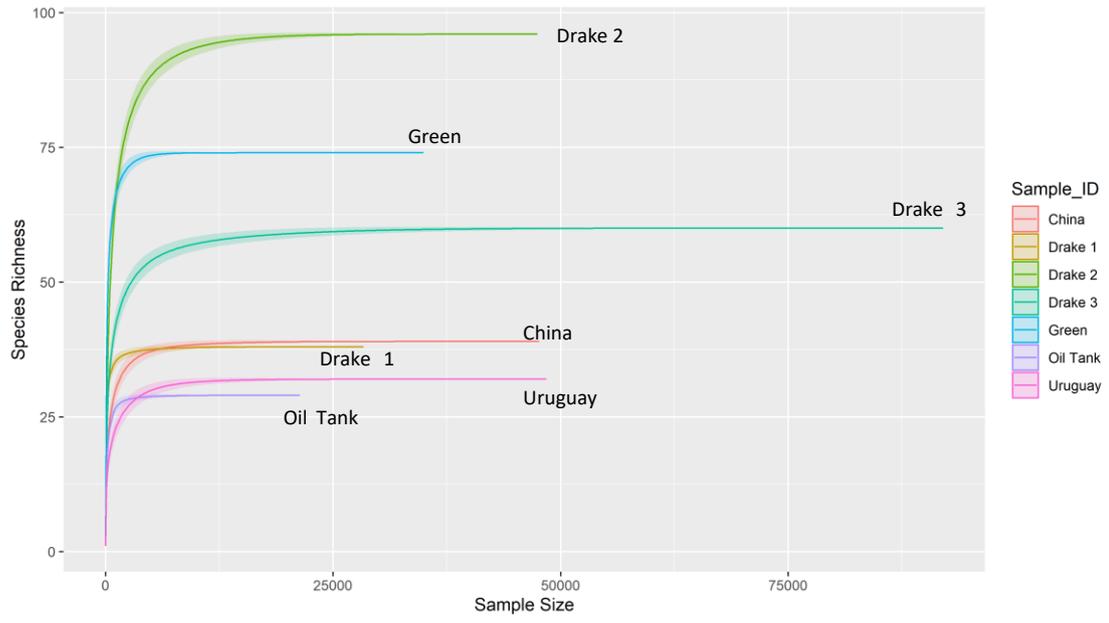


FIGURA 15. Gráfico de rarefacción que ilustra la profundidad de secuenciación con respecto al número de ASV a nivel de arqueas metanogénicas observadas.