

**Centro de Investigación Científica y de Educación
Superior de Ensenada, Baja California**



**Maestría en Ciencias
Ciencias de la vida
con orientación en Microbiología Celular y Molecular**

**Análisis exploratorio de las comunidades metanogénicas de los
volcanes de lodo del golfo de Cádiz**

Tesis para cubrir parcialmente los requisitos necesarios para obtener el grado de
Maestro en Ciencias

Presenta:

Celeste Cervantes Castillo

Ensenada, Baja California, México
2021

Tesis defendida por

Celeste Cervantes Castillo

y aprobada por el siguiente Comité

Dra. María Asunción Lago Lestón
Directora de tesis

Miembros del comité

Dr. Rodrigo Méndez Alonzo

Dra. Laura Gómez Consarnau



Dr. Patricia Juárez Camacho
Coordinador del Posgrado en Ciencia de la
Vida

Dra. Rufina Hernández Martínez
Directora de Estudios de Posgrado

Celeste Cervantes Castillo © 2021

Queda prohibida la reproducción parcial o total de esta obra sin el permiso formal y explícito del autor y director de la tesis.

Resumen de la tesis que presenta **Celeste Cervantes Castillo**, como requisito parcial para la obtención del grado de Maestro en Ciencias en Ciencias de la Vida con orientación en Microbiología Celular y Molecular

Análisis exploratorio de las comunidades metanogénicas de los volcanes de lodo del golfo de Cádiz

Resumen aprobado por:

Dra. María Asunción Lago Lestón
Directora de tesis

En la Tierra, la tectónica de placas y los procesos fotoquímicos atmosféricos suministran continuamente sustratos y eliminan productos de la corteza terrestre creando los ciclos geoquímicos. El vulcanismo es un fenómeno asociado a zonas de dinamismo geológico. Un tipo particular de vulcanismo son los volcanes de lodo, estructuras geológicas a través de las cuales el material arcilloso se libera desde el interior de la Tierra hacia la superficie. Dichas estructuras existen en ambientes terrestres y marinos y sus erupciones pueden implicar la emisión a la atmósfera de altas cantidades de metano y dióxido de carbono, gases fuertemente relacionados con el calentamiento global. Dada la importancia de las reacciones de intercambio geoquímico en los volcanes de lodo para el balance global de carbono, así como por ser el medio donde ocurre una gran parte de las reacciones redox que permiten la disponibilidad de los elementos utilizados por los diferentes niveles de la cadena trófica, se exploró la diversidad taxonómica y funcional de comunidades metagenómicas de dos volcanes de lodo en el golfo de Cádiz (GC). Este golfo es una zona de especial interés por la alta densidad de este tipo de vulcanismo, pues han sido caracterizadas, hasta la fecha, más de 50 estructuras de este tipo. Para entender el papel de los volcanes de lodo en las emisiones de metano y CO₂ a la atmósfera se determinaron, mediante secuenciación del gen 16S del ARNr, los perfiles taxonómicos y las predicciones funcionales de dos núcleos de sedimento tomados de los volcanes Pipoca y Anastasya del GC. El análisis de estas muestras permitió identificar 5448 *Amplicon Sequence Variants* (ASVs), 623 pertenecientes al dominio Archaea y 4811 al dominio Bacteria. Las inferencias funcionales indicaron la presencia los genes involucrados en la metanogénesis, así como la oxidación anaeróbica del metano (AOM) y la reducción de sulfuro en ambos volcanes.

Palabras clave: **metanogénesis, volcanes de lodo, extremófilos sedimentos marinos**

Abstract of the thesis presented by **Celeste Cervantes Castillo**, as a partial requirement to obtain the Master of Science degree in Life Sciences with orientation in Cellular and Molecular Microbiology.

Exploratory analysis of methanogenic communities of mud volcanoes from the Gulf of Cadiz

Abstract approved by:

Dra. María Asunción Lago Lestón
Directora de tesis

On Earth, plate tectonics and atmospheric photochemical processes are continually supplying substrates and removing products from the Earth's crust, forming the geochemical cycles. Volcanism is a phenomenon associated with areas of high geological dynamism. Mud volcanoes are geological structures emitting clay material that is released from the interior of the Earth to the surface. These kinds of structures exist in terrestrial and marine environments, and their eruptions can release high amounts of methane and carbon dioxide to the atmosphere, which are strongly related with global warming. Due to the relevance of the geochemical interchange reactions for the global balance of atmospheric carbon occurring in mud volcanoes, and also, because are important sites where the redox reactions occurs to allow the resources availability that will be used for the upper trophic levels; we explored the taxonomic and functional diversity of methagenomic communities from two mud volcanoes of the Gulf of Cadiz (GC). This gulf is a particularly interesting area because it harbors a high density of mud volcanoes, presenting more than 50 structures characterized by now. To understand the role of mud volcanoes on the emissions of greenhouse gases, such as methane and CO₂, we characterized the taxonomic profiles and their functional predictions using 16S-rRNA massive sequencing of two sediment cores collected at the Pipoca and Anastasya volcanoes in the GC. We found 5448 Amplicon Sequence Variants (ASVs), 623 from the Archaea domain and 4811 Bacteria. Functional inferences from the samples indicated the presence of genes responsible for the superpath of methanogenesis, as well as anaerobic oxidation of methane (AOM) and sulfur reduction in both mud volcanoes.

Key words: **methanogenesis, mud volcanoes, extremophiles, marine sediments**

Dedicatoria

A todas aquellas personas que sin compartir sangre
me brindaron el amor de una familia.

Agradecimientos

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología por el apoyo económico brindado durante estos dos años a través del programa de becas nacionales (No. 910818).

Al Centro de Investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada, Baja California sus programas educativos de competitividad internacional y por haberme dado la oportunidad de formar parte de su institución.

A la Dra. María Asunción Lago Lestón por darme la oportunidad de formar parte de su equipo de trabajo, por toda la paciencia, el conocimiento compartido, las charlas y convivencias. Gracias por el apoyo incondicional a pesar de los momentos difíciles, por sembrar en mí la semilla del amor a la ciencia. Por su amistad, gracias.

A mis sinodales el Dr. Rodrigo Méndez Alonzo y la Dra. Laura Gómez Consarnau por sus contribuciones y retroactividad durante el desarrollo de mi trabajo.

Al Dr. Ricardo Sánchez Leal y al Dr. Jesús Forja Pajares por el trabajo realizado para facilitarnos el acceso a las muestras.

A la Red Mexicana de Extremófilos por el apoyo económico brindado para la presentación de mi trabajo en la “2da Reunión Nacional de la Red Mexicana de Extremófilos y Taller Internacional sobre Organismos Extremófilos: preservando la biodiversidad cosmovisión y el patrimonio cultural de los ecosistemas extremos”, proyecto 311684 y proyecto 1004 respectivamente, de las Convocatorias CONACYT 2020. Así mismo, al posgrado en Ciencias de la vida y al proyecto 685-104 de la Dra. Lago, por el apoyo económico otorgado para asistir a ambos eventos.

A la M. en C. Yamne Ortega Saad y la Dra. Jennyfers Chong por su magnífico, impecable e invaluable trabajo técnico. Este trabajo no habría sido posible sin su ayuda.

A mis padres, lo más importante. Por su infinito amor e incondicional apoyo, por lo que me alientan a ser, por cada día, por todo, infinitas gracias.

A quienes me brindaron una mano y creyeron en mí cuando lo creí todo perdido. A mi padre, mi amigo Juan, Monse, Saraí, Tonancy, Liszt, Nayeli, Dra. Asunción Lago, Dra. Rosa Mouriño, Dr. Edgardo Sepúlveda,

Dra. Rufina Hernández, Dra. Pilar Sánchez, Psic. Yahaira Castañeda, a todo el departamento de Microbiología.

A tí, que conociendo el bosque oscuro que alberga mi alma, lograste hacer crecer taludes de rosas debajo de los cipreses. Mi chispa, mi compañero, el único y verdadero amor de mi vida, mi todo. Nada es suficiente. Te amo con la fuerza de todas las estrellas. Te agradezco infinitamente: Cuchy.

Tabla de contenido

Resumen en español	iii
Resumen en inglés.....	iv
Dedicatoria	v
Agradecimientos.....	vi
Lista de figuras.....	x
Lista de tablas.....	xiii
 Capítulo 1. Introducción	 1
1.1 Antecedentes.....	1
1.1.1 Ciclos biogeoquímicos.....	1
1.1.2 Flujo de carbono en el océano	2
1.1.3 El metano y sus implicaciones en el cambio climático	3
1.1.4 Volcanes de lodo	4
1.1.5 Golfo de Cádiz.....	6
1.2 Justificación	7
1.3 Hipótesis.....	8
1.4 Objetivos	8
1.4.1 Objetivo general	8
1.4.2 Objetivos específicos	9
 Capítulo 2. Metodología	 10
2.1 Muestreo	10
2.2 Extracción de DNA ambiental.....	11
2.3 Amplificación de la región V4 del gen 16S de rRNA y construcción de librerías	11
2.4 Análisis informático de las secuencias	12
2.4.1 Inferencia funcional	13
2.5 Análisis de diversidad.....	14

Capítulo 3. Resultados	15
3.1 Extracción de DNA ambiental	15
3.2 Amplificación de la región V4 del gen 16S de RNAr y construcción de librerías	15
3.3 Control de calidad y limpieza de secuencias	16
3.4 Identificación de ASVs (<i>Amplicon Sequence Variants</i>)	19
3.5 Descripción de los perfiles taxonómicos	21
3.5.1 Composición de arqueas	23
3.5.1.1 Principales familias de arqueas identificadas	25
3.5.1.2 Grupos de arqueas involucrados en el metabolismo del metano	27
3.5.2 Composición de bacterias	28
3.5.2.1 Principales familias bacterianas identificadas	30
3.5.3 Descripción taxonómica de la biosfera rara	32
3.4 Análisis de diversidad	36
3.6.1 Diversidad alfa	37
3.6.2 Diversidad beta	40
3.6.2.1 Distancias UniFrac	41
3.5 Inferencias funcionales	43
3.5.1 Metagenomas predichos con la Enciclopedia de Genes y Genomas de Kyoto (KEGG)	43
3.5.2 Metabolismo del metano	47
3.5.3 Relaciones sulfuro-metano en el volcán Anastasya	52
3.5.4 Relaciones sulfuro-metano en el volcán Pipoca	53
Capítulo 4. Discusión	56
4.1 Diversidad de procariotas en los volcanes de lodo	56
4.2.1 Arqueas metanogénicas	57
4.3 Relaciones sintróficas sulfuro-metano	59
Capítulo 5. Conclusiones	62
Literatura citada	64

Lista de figuras

- Figura 1. Tipos de bordes tectónicos.** (a) borde divergente, (b) borde convergente, (c) borde de transformación y (d) diapiros.....7
- Figura 2. Ubicación de los volcanes Anastasya y Pipoca en el golfo de Cádiz.** Imagen modificada de Somoza et al. (2003).....11
- Figura 3. Electroforesis en gel de agarosa de las amplificaciones de la región V4 del gen del ARN ribosomal.** En la parte superior se indican el último centímetro de las secciones en de la columna de sedimento de la cual se realizó la PCR. También se indica de el lado izquierdo el volcán al que pertenecen los amplicones. NA: no amplificado. Cmbfsf: *centimeters below sea floor*..16
- Figura 4. Control de calidad de las secuencias procesadas con DADA2.** En el eje X se indica el código de muestra y en el eje Y el número de secuencias.....18
- Figura 5. Total de secuencias obtenidas después del preprocesamiento.** Los valores sobre las barras indican el número de secuencias filtradas de mitocondrias y cloroplastos.....19
- Figura 6. Número de secuencias procesadas y Amplicon Sequence Variants asignadas por muestra.** En el eje Y se presenta el número de secuencias computadas y Unidades taxonómicas identificadas en escala logarítmica (base 10). La zona sombreada indica el intervalo de confianza (95%).....20
- Figura 7. Número de ASVs identificados por volcán y por profundidad del sedimento.** En el eje X se indican las muestras. En el el eje Y se indica el número ASVs asignados para cada muestra. Las barras violeta representan las muestras del volcán Anastasya y las verdes las del volcán Pipoca...21
- Figura 8. Perfiles taxonómicos a nivel de filo.** En el panel de la izquierda se indica con código de color el nombre de los fila identificados. Aquellos ASVs que no lograron ser asignados a dicho nivel quedaron agrupados en Bacteria.....23
- Figura 9. Composición de fila de Arqueas.** En el eje X se indican las profundidades muestreadas en cada volcán (cmbfsf= centímetros debajo de la superficie del mar). En el eje Y se indica el porcentaje de abundancia relativa de los principales fila de arqueas con abundancias mayores al 1%.....25
- Figura 10. Perfil de familias de arqueas identificadas en cada volcán.** El eje de Y indica el porcentaje de abundancia relativa de cada una de las familias determinadas con abundancias relativas mayores al 1%. El eje X indica la profundidad en cmbfsf y el volcán al cual pertenece la barra de abundancias. El código de color indica la familia identificada.....26
- Figura 11. Número de familias de arqueas únicas y compartidas entre los volcanes Pipoca y Anastasya, Golfo de Cadiz.** a) La gráfica de barras indica el número total de familias determinadas en cada volcán. b) El diagrama de Venn muestra el número de familias que específicas de cada volcán y las compartidas entre ellos.....27

- Figura 12. Abundancias relativas de los principales fila bacterianos en los volcanes Pipoca y Anastasya, Golfo de Cádiz.** En el eje X se indican las profundidades muestreadas en cada volcán. En el eje Y se indica el porcentaje de abundancia de fila de bacterias con abundancias relativas mayores al 1%.29
- Figura 13. Abundancia relativa de las de familias de bacterias identificadas en cada volcán. El eje de Y indica las familias de bacterias con abundancias relativas mayores al 1%.** El eje X indica la profundidad en cmbsf y el volcán al cual pertenece la barra de abundancias. El código de color indica la familia identificada.....31
- Figura 14. Número de familias de bacterias únicas y compartidas entre los volcanes Pipoca y Anastasya, Golfo de Cádiz.** (a) La gráfica de barras indica el número total de familias identificadas en cada volcán. (b) Los diagramas de Venn muestran el número de familias detectadas únicamente en cada volcán y las compartidas entre ellos.....32
- Figura 15. Abundancia y composición de la biosfera rara del volcán Anastasya.** En el gráfico de pastel se indica en color gris oscuro el porcentaje de familias con abundancias relativas mayores al 1% y en gris claro las menores al 1% (biosfera rara). La barra muestra la proporción de los dominios Archaea y Bacteria que componen la biosfera rara en las muestras de sedimento analizadas.....34
- Figura 16. Abundancias relativas de la biosfera rara por cada muestra del núcleo del volcán Anastasya.** En el eje X se indica la profundidad de cada muestra y en el Y el porcentaje de abundancia. El color lila indica el porcentaje de la biosfera rara y el verde el de las familias con abundancias relativas mayores al 1%.....34
- Figura 17. Abundancia y composición de la biosfera rara del volcán Pipoca.** En el gráfico de pastel se indica en color gris oscuro el porcentaje de familias con abundancias relativas mayores al 1% y con gris claro las menores al 1% (biosfera rara). La barra muestra la proporción de Archaea y Bacteria que componen la biosfera rara del núcleo de sedimento.....35
- Figura 18. Abundancias relativas de la biosfera rara por cada muestra del núcleo del volcán Pipoca.** En el eje X se indica la profundidad de la muestra y en el eje Y el porcentaje de abundancia. En color lila se representa el porcentaje de la biosfera rara y en verde el porcentaje de aquellas familias con abundancias mayores al 1%.....36
- Figura 19. Índice Chao 1. Curva de rarefacción del esfuerzo de muestreo para dos volcanes, Pipoca y Anastasya, golfo de Cádiz.** En el eje X se indica la profundidad de secuenciación y en el eje Y el número de ASVs.....37
- Figura 20. Análisis de coordenadas principales.** a) PCoA construido con matriz de distancia de valores de Bray-Curtis y b) PCoA construido a partir de la matriz de distancia de valores de Jaccard. Los triángulos rojos representan las muestras de Anastasya y los azules las de Pipoca.....41
- Figura 21. Análisis de coordenadas principales de distancias Unifrac.** a) PCoA construido con matriz de distancias UniFrac ponderadas y b) PCoA construido a partir de la matriz de distancias UniFrac no ponderadas. Los triángulos rojos representan las muestras de Anastasya y los azules las de Pipoca.....43
- Figura 22. Porcentajes de genes identificados con KEGG.....44**

Figura 23. Número de genes ortólogos para cada ruta metabólica pertenecientes al metabolismo basal. El asterisco indica los genes del metabolismo energético.....	45
Figura 24. Porcentajes de genes ortólogos identificados con KEGG relacionados al metabolismo energético.....	45
Figura 25. Mapa de calor construido con las abundancias del número de genes de cada metabolismo energético por muestra.....	47
Figura 26. Abundancias de genes ortólogos identificados con KEGG pertenecientes al metabolismo del metano.....	48
Figura 27. Mapa de calor de las rutas involucradas en el metabolismo del metano.....	48
Figura 28. Mapa de calor de los genes involucrados en la metanogénesis acetilotrónica.....	49
Figura 29. Mapa de calor de los genes involucrados en la metanogénesis a partir de CO₂.....	50
Figura 30. Mapa de calor de los genes involucrados en la metanogénesis metilotrónica.....	51
Figura 31. Mapa de calor de los genes involucrados en la metanogénesis a partir de metanol.....	52
Figura 32. Metabolismos del sulfuro y metano y perfiles taxonómicos relacionados. El panel de la izquierda indica las familias BRS presentes por cada muestra, el panel intermedio representa el número de copias de genes inferidos para cada metabolismo así como las rutas de interés y el panel de la derecha indica las familias metanogénicas identificadas por cada muestra.....	53
Figura 33. Metabolismos del sulfuro y metano y perfiles taxonómicos relacionados de muestras de los volcanes Pipoca y Anastasya del golfo de Cádiz. El panel de la izquierda indica las familias BRS presente por cada muestra, el panel intermedio representa el número de copias de genes inferidos para cada metabolismo así como las rutas de interés y el panel de la derecha indica las familias metanogénicas identificadas por cada muestra.....	55
Figura 34. Abundancias relativas de familias de arqueas metanogénicas.....	59

Lista de tablas

Tabla 1. Concentraciones de las muestras de ADN procesadas y sus respectivas purezas.....	15
Tabla 2. Secuencias crudas obtenidas por cada muestra. Las muestras están ordenadas de mayor a menor número de secuencias obtenidas.....	17
Tabla 3. ASVs observados por cada muestra.....	20
Tabla 4. ASVs resueltos por nivel taxonómico.....	22
Tabla 5. Familias de bacterias identificadas en muestras provenientes de los volcanes Pipoca y Anastasya, golfo de Cádiz. Las columnas con el símbolo % indican las abundancias relativas de las familias detectadas únicamente en cada volcán.....	33
Tabla 6. Valores de Shannon de las muestras analizadas. La tercera columna presenta datos tomados de Somoza et al., 2003.....	38
Tabla 7. Valores de Shannon por volcán y tipo de sedimento.....	39
Tabla 8. Valores de Pielou de equitabilidad de abundancias.....	39

Capítulo 1. Introducción

1.1 Antecedentes

1.1.1 Ciclos biogeoquímicos

En la Tierra, la disponibilidad de los elementos necesarios para la vida está mediada por interacciones geoquímicas y por la transferencia cíclica de electrones y protones. Estas interacciones ocurren en un conjunto limitado de elementos químicos mediante reacciones acopladas de oxidación y reducción (Williams y Silva, 1996) impulsadas por complejos de proteínas asociados a grupos prostéticos (Falkowski et al., 2008). Según la evidencia reciente, esta maquinaria es codificada por conjuntos estables de genes que surgieron durante los primeros 2500 millones de años de historia del planeta, dando origen a las enzimas oxidorreductasas. Estas enzimas componen los centros catalíticos de las maquinarias metabólicas y son las encargadas de llevar a cabo la transferencia de electrones. Además, son omnipresentes a lo largo del árbol de la vida (Jelen et al., 2016), han sido transferidas de célula a célula, principalmente mediante transferencia horizontal de genes y, a pesar de su antigüedad, están altamente conservadas (Falkowski et al., 2008). Algo en común que tienen estas enzimas son los sitios activos responsables de la producción de CO_2 (respiración), H_2 (metanogénesis), O_2 (fotosíntesis oxigénica) y compuestos nitrogenados (respiración y fijación de nitrógeno) a partir de componentes químicos conservados, indicando un metabolismo antiguo compartido y en el cual participan enlaces carbono-metal. De los nueve enlaces principales carbono-metal del metabolismo primario, seis pueden ser rastreados hasta el último ancestro común universal (LUCA, por su sigla en inglés).

Los ciclos geoquímicos en la Tierra siguen las leyes de la termodinámica avanzando hacia un estado de entropía máxima y las fases más estables de los minerales. Las reacciones redox entre oxidantes, como el oxígeno atmosférico, y los reductores, como el amonio o el sulfuro, pueden proceder de reacciones químicas abióticas comunes (oxidación anaeróbica de metano, combustión, procesos geotérmicos, diagénesis y movimientos tectónicos), pero a menudo son aceleradas en muchos órdenes de magnitud a través de la catálisis enzimática mediada por organismos vivos. Los microorganismos procariotas regulan en gran medida la velocidad a la que se ciclan los elementos al acoplar específicamente ciertas reacciones a través de su metabolismo energético. Estos organismos también dirigen las vías de transformación y las formas en que se acoplan los ciclos de los elementos. Los microorganismos poseen una enorme diversidad de capacidades catalíticas que parece expandirse continuamente a medida que se descubren nuevos

taxones (Jørgensen, 2000). Es probable que se subestime la diversidad de los procesos redox mediados por procariotas que existen en ambientes donde las condiciones físicas y químicas contribuyen a seleccionar organismos adaptados a condiciones que normalmente resultan inhóspitas para la gran mayoría (microorganismos extremófilos); como ocurre en los sedimentos marinos donde deben estar presentes microorganismos con metabolismos que involucran necesariamente especies donadoras y especiesceptoras de electrones (Lam et al., 2019).

Los dominios Archaea y Bacteria presentan rutas metabólicas similares para la realización de muchos procesos, como por ejemplo reducción de sulfato, reducción de sulfuro, desnitrificación, fijación de nitrógeno o fotosíntesis anoxigénica. Sin embargo, existen rutas específicas para cada dominio, como la fotosíntesis oxigénica exclusiva de cianobacterias o la metanogénesis que está presente únicamente en Arqueas (Woese, 1987). La metanogénesis es una vía que forma parte del conjunto de rutas metabólicas involucradas en el ciclo del carbono, y ésta puede ser llevada a cabo de manera aeróbica o anaeróbica (Hallam et al., 2004; Orphan et al., 2001; Schink, 2002).

1.1.2 Flujo de carbono en el océano

La sedimentación acumula carbono orgánico que sirve de fuente de energía para los microorganismos marinos. El cálculo del depósito global de carbono orgánico en el océano se encuentra en el rango de $169 \times 10^{12} \text{ g C yr}^{-1}$ (Smith et al., 2015). La descomposición de los compuestos orgánicos en los sedimentos marinos es compleja, involucrando carbohidratos, sustancias húmicas, lignina, compuestos alifáticos, lípidos y aminoácidos (Arndt et al., 2013; Carter y Mitterer 1978; Colombo et al., 1996; Goni et al., 1997; Guerzoni y Rovatti 1987; Mayer et al., 1986; Oni et al., 2015; Prahl et al., 1994; Smith et al., 2015; Volkman et al., 1987). La degradación anaeróbica de la materia orgánica en sedimentos marinos implica la fermentación y la reducción de sulfato, hierro y de manganeso (Canfield et al. 1993).

Los compuestos orgánicos como los carbohidratos pueden fermentarse en ácidos grasos de cadena corta o H_2 , y los degradadores terminales (metanógenos) utilizan estas fuentes de carbono o donantes de electrones para la formación de metano cuando los aceptores de electrones no están disponibles (Schink, 1997; Tromp et al., 1995). La difusión de metano desde el sedimento inferior hacia las capas superiores es alimentada por los oxidantes de metano cuando está disponible el aceptor de electrones sulfato (Oni et

al., 2015). En consecuencia, la conversión de carbono orgánico en sedimentos marinos profundos conduce a la acumulación de metano y CO_2 (Yin, 2019).

En el mar, las reacciones que involucran H_2 y CO_2 en sistemas hidrotermales generan metano y formiatos abióticos. Estas reacciones se asemejan al metabolismo energético central de los microorganismos metanógenos y acetógenos (Martin, 2019). Entre las muchas reacciones bioenergéticas centrales conocidas (Amend y Shock, 2001), se sabe que sólo los acetógenos (Schuchmann y Müller, 2014) y los metanógenos (Thauer et al., 2008) aprovechan energía únicamente a partir de la reducción de CO_2 con H_2 . El suelo oceánico es el hábitat más extenso del planeta (Lever M., 2013) y en las zonas profundas de este es dónde se encuentra la biosfera profunda, la cual está repleta de acetógenos y metanógenos (Silver et al., 2010; Takami et al., 2012; Ijiri et al., 2018; Rempfert et al., 2017 y Suzuki et al., 2018).

1.1.3 El metano y sus implicaciones en el cambio climático

La metanogénesis es una ruta metabólica ancestral que divergió hace 3.51 mil millones de años (Wolfe y Fournier 2018) y es el paso final de la degradación del carbono orgánico cuando se acumulan compuestos simples o donantes de electrones como CO_2 / H_2 , metanol y acetato (Ferry y Lessner, 2008). La metanogénesis está restringida a representantes dentro del dominio Arquea (Woese, 1987). Sin embargo, algunos de los componentes moleculares de los metanógenos, como genes que codifican algunas enzimas y coenzimas metanogénicas, parecen haber sido transferidos horizontalmente a miembros metilotróficos del dominio Bacteria (Chistoserdova et al. 1998).

El metano es uno de los principales gases de efecto invernadero, con una emisión anual que puede alcanzar entre 500 y 600 Tg en todo el mundo, en la que se estima que el 5 - 6% de metano se origina en el océano (Reay et al., 2018). Estas grandes cantidades de metano se generan a través de tres vías principales: metanogénesis hidrogenotrófica, metilotrófica y acetoclástica (Yin, 2019), las cuales se dan en estructuras geodinámicas como los volcanes de lodo marinos. Se ha estimado que los volcanes de lodo emiten del 60 al 80% del total del total de gases emitidos a la atmósfera. Estos gases están compuestos por metano en un 90 a 99% (Dimitrov, 2002; Kopf, 2002 y Milkov et al., 2003).

Los principales reservorios de metano en el planeta son el permafrost y los hidratos de metano que se localizan específicamente en sedimentos marinos con condiciones de alta presión y baja temperatura.

Estos últimos pueden desestabilizarse por el aumento en la temperatura. Sin embargo, estos hidratos no pueden convertirse a su forma gaseosa, atravesar a la columna y posteriormente ser liberados a la atmósfera si no existen microorganismos oxidantes de metano que lleven a cabo dicha reacción (Dyonisious et al., 2020). La oxidación anaeróbica del metano (AOM) ocurre cuando el sulfato (SO_4^{2-}) que está en el agua y que es transportado desde los sedimentos superficiales hacia el fondo concurre con el metano de origen biogénico o termogénico. Éste proceso de oxidación es llevado a cabo en presencia de un grupo específico de procariontes metanotróficos anaeróbicos (ANME) (Bhattari et al., 2015).

A la fecha, no se han hecho estimaciones del presupuesto de metano gaseoso y disuelto en los sedimentos de los volcanes de lodo submarinos. Conocerlas es un tema urgente, particularmente para conocer el impacto real en el balance de carbono atmosférico que ocurre a través de la conversión del metano liberado a la columna de agua y para ampliar y así mejorar nuestra comprensión de los procesos que afectan al cambio climático global (Kioka et al., 2019). Dado que los volcanes de lodo submarinos son los actores más destacados en el escape de material de las profundidades subterráneas provenientes del fondo marino (Kopf, 2002), la evaluación de su producción de metano también es muy relevante para desentrañar el papel de este tipo de vulcanismo en el ciclo del carbono bajo el suelo. Este flujo de carbono juega un papel clave en los procesos biogeoquímicos que regulan el hundimiento del metano dentro de los sedimentos a través de la oxidación anaeróbica microbiana del metano (AOM acoplada a la reducción de sulfatos (Knittel y Boetius, 2009; Reeburgh, 2007).

1.1.4 Volcanes de lodo

Los volcanes de lodo submarinos son estructuras geológicas a través de las cuales el material arcilloso se altera y se transporta desde el interior de la Tierra hacia su superficie, donde es expulsado. Estos volcanes pueden ser de naturaleza fría o caliente y se clasifican según sus dimensiones en: grifos, conos de lodo y volcanes de lodo. Los grifos miden hasta 3 metros de altura, los conos de lodo están por encima de 3 metros y los volcanes de lodo por encima de 50 metros (Antonielli et al., 2014). Su distribución geográfica está fuertemente controlada por los entornos geológicos en los que se encuentran. La mayoría de ellos se localizan en áreas de actividad tectónica reciente, particularmente en zonas donde hay convergencia entre placas (Kopf, 2002). Su aparición está asociada con la acción de tres factores geológicos: la tensión convergente, que aparece después de la colisión de dos o más placas tectónicas, la deposición

sedimentaria exagerada en camas homónimas y la migración vertical del fluido saturado de gas a lo largo de las fracturas y roturas.

Los volcanes de lodo difieren de otras formaciones geológicas por su capacidad para expulsar diferentes formas de materia (gas, agua y sedimentos) de forma relativamente violenta. Estas emisiones pueden implicar altas cantidades de metano y dióxido de carbono. Aquellos que liberan metano termogénico tienen los reservorios a grandes profundidades, mientras que los que contienen gas biogénico tienen los reservorios a una profundidad inferior a 2000 m (Remizov Shi et al., 2018).

Los volcanes de lodo se encuentran entre las mayores fuentes geológicas que liberan gas metano (Kioka et al., 2019). Este gas presente en los volcanes de lodo representa el 90 al 99% del volumen total de las emisiones gaseosas y está compuesto por una mezcla de metano de origen termogénico y biogénico (Dimitrov, 2002; Kopf, 2002; Milkov et al., 2003). Se cree que los volúmenes de metano que escapan de los volcanes de lodo de aguas profundas son más grandes que los calculados hasta ahora por la mayoría de mediciones geoquímicas, ya que apenas existe información sobre el metano de origen termogénico. Este hecho sugiere que el flujo global de metano del fondo marino probablemente esté subestimado (Etiope y Milkov, 2004; Milkov et al. 2003). Recientemente Ijiri et al. (2018) basándose en resultados obtenidos de relaciones isotópicas obtenidos a partir de incubaciones de sedimentos del volcán de un lodo en la zona de subducción de la placa Nankai, Japón, concluyeron que el presupuesto global de metano que aportan estos volcanes submarinos está, efectivamente, subestimado. En dicho estudio concluyen que más del 90% del metano disuelto en el sedimento de estos volcanes es de origen biogénico. Sin embargo, en la mayoría de los casos, la alta concentración de metano observada en otros volcanes todavía se sigue atribuyendo a la existencia de hidratos de metano y no está evaluado el biogénico. Además, a la fecha, no existe una estimación de la cantidad de gas libre en los conductos que alimentan los volcanes de lodo (Kioka et al., 2019).

Los volcanes de lodo de naturaleza hipertérmica están asociados a zonas de convergencia de placas tectónicas, donde el material es empujado hacia la superficie, formando perfiles geológicos característicos acompañados de cualidades térmicas resultantes de la emanación de calor del interior de la Tierra hacia la corteza. En dichos sedimentos, la estructura de las comunidades procariotas es altamente compleja y está dictada por cambios rápidos de los factores físicos, geoquímicos y por los gradientes de profundidad de los sedimentos (Pachiadaki et al., 2010). Los taxones que están representados comúnmente en estos ambientes hipertérmicos son taxones bacterianos como los filo Proteobacteria y Deinococcus-Thermus y

el género *Thermotoga*, así como de Archaea la clase Thermoprotei y los géneros *Methanococcus* y *Thermococcus* (Lewin et al., 2013).

1.1.5 Golfo de Cádiz

El golfo de Cádiz se formó por la actividad tectónica al final del Mioceno (Duggen et al., 2003) junto con la posterior inundación de Zanclean hace 5,33 millones de años (MA) (García-Castellanos et al., 2009) y la erosión regresiva coetánea (Loget y Van Den Driessche, 2006). Estos eventos llevaron a la formación del estrecho de Gibraltar, una puerta oceanográfica que conecta las masas de agua del Mediterráneo y del Atlántico medio con una cubierta sedimentaria que consiste en materiales Triásicos a Cuaternarios (Maldonado et al. 1999).

En el golfo de Cádiz, se han identificado y caracterizado muchas estructuras asociadas con el escape de fluidos, incluidos los volcanes de lodo, que se encuentran a profundidades variables que van de los 350 a 3900 m de profundidad. Los bordes tectónicos principales son los convergentes (de empuje), divergentes (de separación), fallas (de transformación) y los diapiros. (Figura 1). Todas estas estructuras tectónicas proporcionan vías de escape para materiales y fluidos con sobrepresión favoreciendo el movimiento ascendente de fluidos a lo largo de la columna sedimentaria; causando finalmente la acumulación sedimentaria con forma cónica característica de los volcanes de lodo (Medialdea et al., 2009). La composición gaseosa de los hidratos de gas recuperados de los volcanes de lodo Ginsburg, Bojardin y Captain Arutyunov dentro del golfo de Cádiz indica un origen termogénico, lo que sugiere la posible existencia de hidrocarburos en profundidad (Mazurenko et al., 2003; Pinheiro et al., 2006; Medialdea et al., 2004). Además, las variaciones en la composición isotópica del fluido de las burbujas de gas indican una mezcla de fluidos ricos en metano termogénicos y biogénicos (Mazurenko et al. 2003).

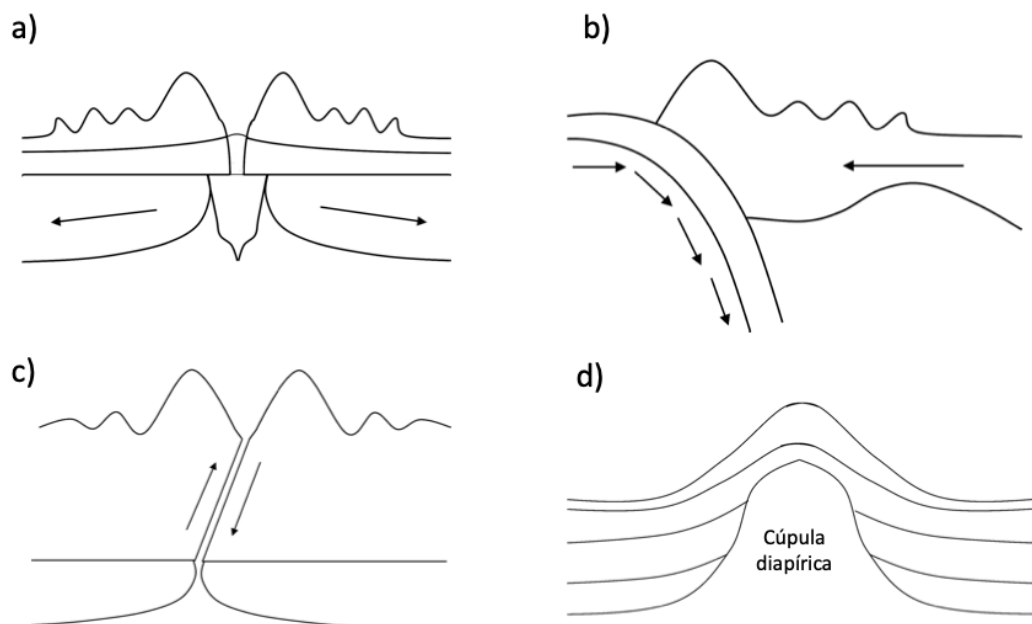


Figura 1. Tipos de bordes tectónicos. (a) borde divergente, (b) borde convergente, (c) borde de transformación y (d) diapiros.

La gran cantidad de estas estructuras volcánicas, así como su alta densidad de volcanes de lodo (unos 50 descritos hasta la fecha), convierten al golfo de Cádiz en una región única y de gran interés para la caracterización y el estudio de los microorganismos involucrados en el metabolismo del metano.

1.2 Justificación

El golfo de Cádiz es una zona geodinámica con presencia de vulcanismo. Existe una relación entre los movimientos geodinámicos de subducción y la migración de fluidos y gases estimulados por la actividad microbiana en los volcanes de lodo, lo que contribuye sustancialmente al aporte de metano a la atmósfera. Actualmente, se considera que el metano de origen antropogénico es, en volumen, el segundo gas potenciador del calentamiento atmosférico y el primero en cuanto a capacidad calorífica; pero poco o nada se sabe del metano que se produce de manera natural o el mediado mediante microorganismos, por lo tanto, el estudio de las comunidades de procariotas asociadas a volcanes de golfo de Cádiz, resultará en

una primera estimación de la presencia y abundancia de procariotas metanogénicos que podría contribuir a un cálculo más preciso de las emisiones reales de metano a la atmósfera.

Además, se desconoce la diversidad y función de las comunidades de procariotas asociadas a los sedimentos de los volcanes de lodo del golfo de Cádiz, por lo que este trabajo representa una primera exploración respecto a la estructura microbiológica de la zona. La inferencia funcional de los genes presentes aportará información al conocimiento de la circulación de energía mediante los ciclos biogeoquímicos y la adaptación a condiciones extremas para la vida. Estudiar los microorganismos procariotas que viven en ambientes hostiles a la vida también abre la oportunidad de descubrir nuevos taxones que posean extremoenzimas de interés biotecnológico.

1.3 Hipótesis

Los perfiles taxonómicos y funcionales de las comunidades procariotas de sedimentos de volcanes de lodo del golfo de Cádiz varían en función de la profundidad tipo de sedimento y de los movimientos dinámicos de los fluidos y sedimentos. Entre estas comunidades están presentes aquellas involucradas en el metabolismo del metano.

1.4 Objetivos

1.4.1 Objetivo general

Caracterizar los perfiles taxonómicos y realizar inferencias funcionales de las comunidades procariotas, en particular las metanogénicas, asociadas a los sedimentos de los volcanes de lodo Anastasya y Pipoca, del golfo de Cádiz, mediante técnicas de secuenciación masiva.

1.4.2 Objetivos específicos

- Identificar los principales taxones procariotas de las estaciones de muestreo, mediante secuenciación masiva de la región 16S del gen del ARNr.
- Inferir el perfil funcional de las comunidades procariotas mediante el uso de herramientas bioinformáticas, con énfasis en el metabolismo del metano.
- Comparar las comunidades procariotas y sus perfiles funcionales entre ambos volcanes y a lo largo de la columna sedimentaria.

Capítulo 2. Metodología

2.1 Muestreo

Las muestras se colectaron durante la campaña oceanográfica STOCAL 201612 a bordo del buque oceanográfico B/O Ángeles Alvariño del Instituto Español de Oceanografía (IEO), que se llevó a cabo del 25 de noviembre al 4 de diciembre del año 2016. Dicha campaña se enmarca dentro de las actividades y muestreos sistemáticos contemplados en el proyecto de investigación del Instituto Español de Oceanografía (IEO): *Series Temporales de datos Oceanográficos en el golfo de Cádiz (STOCA)* y tenía como objetivo la observación y el estudio de la variabilidad temporal, así como evaluar las tendencias en las condiciones oceanográficas y comunidades biológicas en el golfo de Cádiz.

Los sedimentos se tomaron mediante núcleos de gravedad (NG) en los volcanes de lodo Anastasya, y Pipoca (Figura 2). Una vez abordó, se desenroscaron las cabezas de los núcleos y sacó el esfínter en el tubo de PVC que contenía la muestra y se pusieron tapones en ambos extremos de los tubos. Los tubos se rotularon por ambos lados para mantener la nomenclatura después de cortar las secciones, se colocaron en una caja de transporte horizontal y se refrigeraron a 4°C para su transporte. Ya en el laboratorio, se seccionaron cada 5 cm y se liofilizaron para su posterior procesamiento.

En total se obtuvieron 18 muestras, de las cuales 10 proceden del volcán de Anastasya y 8 del volcán Pipoca. La profundidad máxima alcanzada por los NG fue de 52 centímetros bajo el fondo marino (cmbsf, por sus siglas en inglés) en Anastasya y 40 cmbsf en Pipoca (Tabla 1). La nomenclatura de la muestra se estableció de la siguiente forma: los tres primeros caracteres indican el nombre del volcán, seguido la profundidad mayor de la sección en cm. Por ejemplo, ANA-05 es una muestra que pertenece al volcán Anastasya correspondiente a los primeros 5 cm del núcleo, PIP-10 sería una muestra perteneciente al volcán Pipoca de la sección de 6 a 10 cm.

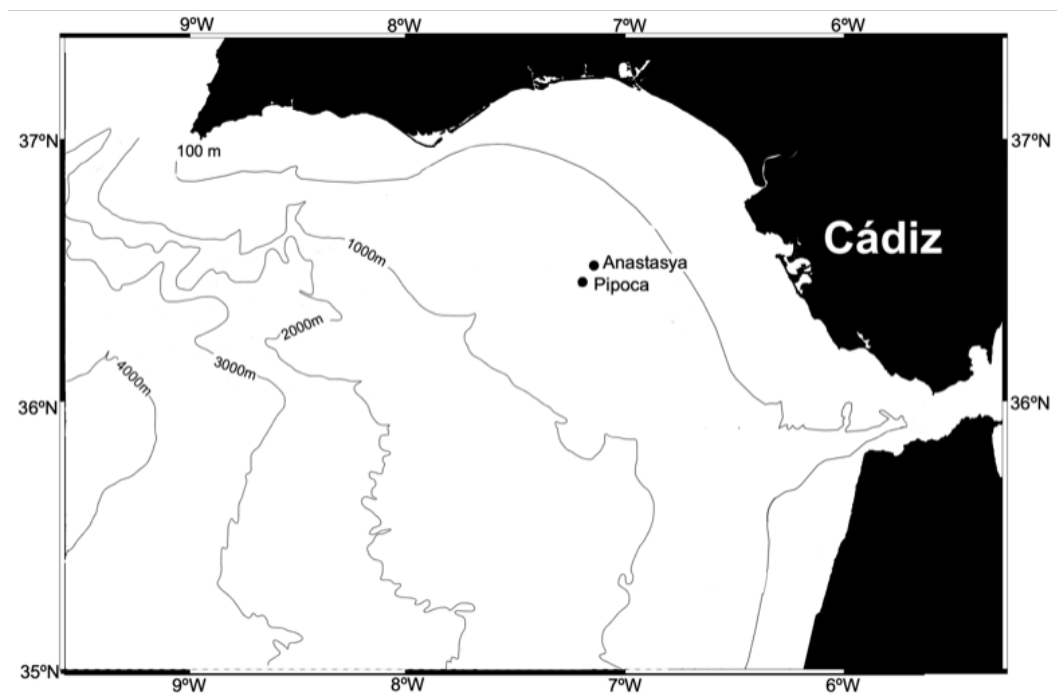


Figura 2. Ubicación de los volcanes Anastasya y Pipoca en el golfo de Cádiz. Imagen modificada de Somoza et al. (2003).

2.2 Extracción de DNA ambiental

Se extrajo el DNA total de las muestras de sedimento liofilizado utilizando el kit de extracción *DNeasy PowerSoil Kit* de QIAGEN® siguiendo el protocolo del fabricante. La concentración de DNA se cuantificó mediante espectrofotometría utilizando un NanoDrop™ Lite (Thermo Scientific), a una longitud de onda (L) de 260 nm y la pureza se midió mediante el índice 260nm/280nm. La calidad y la cantidad de DNA se verificaron mediante electroforesis en gel de agarosa al 0.8%. El gel se corrió a 80 V durante 40 minutos.

2.3 Amplificación de la región V4 del gen 16S de rRNA y construcción de librerías

Para la construcción de las librerías de amplicones 16S-rRNA se utilizó el protocolo propuesto por Kozich et al. (2013), donde tanto la amplificación como la ligación de los adaptadores se realizan en una única

reacción de PCR, ya que los cebadores incluyen los adaptadores para la plataforma de secuenciación, los índices necesarios para la identificación de cada muestra, las secuencias PAD-linker y los cebadores específicos para el gen de la región hipervariable V4 de la subunidad 16S del RNAr. Los cebadores utilizados fueron el 515F y el 806R (Caporaso et al., 2011). Dicho procedimiento facilita la construcción de las librerías y reduce el sesgo de la amplificación y está adaptado para la secuenciación en la plataforma MiSeq de Illumina.

La amplificación de DNA se llevó a cabo utilizando la polimerasa MyTaq™ (Bioline) con los cebadores específicos descritos arriba y utilizando como control positivo una *MOCK Community* (Zymo Research). Debido a la presencia de inhibidores (comúnmente ácidos húmicos y fúlvicos) en las muestras, los cuales pueden interferir en la reacción de cadena de la polimerasa, fue necesario hacer diferentes modificaciones a la reacción para lograr obtener amplicones. Dichas modificaciones consistieron en bajar la cantidad de inhibidores disminuyendo la cantidad de ADN añadido a cada reacción, ya que los inhibidores pueden intercalarse entre las bases nitrogenadas de la cadena de ADN interfiriendo en la reacción en cadena de la polimerasa. Otra modificación fue el aumento en cuanto al número de ciclos de amplificación de 30 a 35. La reacción estandarizada de PCR para las muestras de este trabajo fue: 1) desnaturalización inicial a 95°C durante 2 min; 2) 34 ciclos de 95°C durante 20 seg, 55°C durante 15 seg y 72°C durante 5 min y 3) extensión final a 72°C durante 7 min.

Una vez amplificados, los productos de PCR se normalizaron con el kit *SequalPrep™* (Invitrogen) y se cuantificaron mediante fluorometría con el equipo Qubit™ (Thermo Fisher Scientific) y el kit *Labeling Detection* (Thermo Fisher Scientific), siguiendo el protocolo del fabricante. La concentración final de las bibliotecas se cuantificó mediante un ensayo de fluorometría utilizando el fluorómetro Qubit™ (Thermo Fisher Scientific) y el kit *Labeling Detection* (Thermo Fisher Scientific). Se utilizó una biblioteca control, generada a partir del fago PhiX, la cual se mezcló con la biblioteca generada siguiendo el protocolo recomendado por el fabricante. La secuenciación de las bibliotecas se realizó en la plataforma MiSeq de Illumina que se encuentra en las instalaciones del CICESE.

2.4 Análisis informático de las secuencias

Las secuencias se obtuvieron en formato Casava 1.8. Este formato contiene información de las secuencias como el identificador único de cada muestra (la secuencia barcode o índice), el número de línea de la

corrida de secuenciación y la dirección de la secuencia (R1 o R2), entre otros parámetros. Las secuencias obtenidas se analizaron utilizando la suite QIIME2 (Bolyen et al., 2019) (<http://qiime2.org/>).

Para realizar el procesamiento en QIIME2, las secuencias se importaron con el comando *qiime tools import* el cual analiza la calidad de las secuencias. El corte de secuencias de mala calidad y la eliminación de quimeras se hizo con el pipeline de DADA2 (Callahan et al., 2016) mediante el comando *qiime dada2 denoised-paired* (Tabla 1). Este pipeline detecta y corrige los datos de las secuencias de amplicones procedentes de las plataformas Illumina. Dicho proceso de control de calidad filtra cualquier lectura del fago phiX que se puedan identificar en los datos de secuenciación y filtra las secuencias quiméricas. Para computar las secuencias filtradas y obtener las secuencias representativas y la correspondiente la tabla de frecuencias estas se cortaron en la posición 147.

Las secuencias representativas se filtraron mediante los comandos *qiime filter-table* y *qiime filter-seqs* para eliminar aquellas secuencias pertenecientes a mitocondrias, cloroplastos y las que solo presentaron una copia (singletons). Posteriormente se colapsaron al 100% de identidad para obtener los ASVs (*Amplicon Sequence Variants*) o secuencias únicas, esto se realizó con el clasificador Sklearn, entrenado con la base datos SILVA132 mediante el comando *qiime feature-classifier classify-sklearn*. Dicho comando arroja una tabla de frecuencias del tipo *FeatureTable[Taxonomy]*.

El alineamiento múltiple se hizo a través de QIIME2 con el programa MAFFT y la construcción del árbol filogenético se hizo con FastTree. Con los archivos obtenidos se creó la lista de los ASVs resueltos para cada nivel taxonómico mediante la herramienta en línea *QIIME2 View* (<https://www.view.qiime2.org>). Los perfiles obtenidos se exportaron mediante el comando *qiime tools export* para obtener las secuencias en formato FASTA de los ASVs en cada muestra, las cuales se utilizaron en análisis posteriores. Los ASVs representan las secuencias únicas en nuestro set de datos.

2.4.1 Inferencia funcional

La predicción funcional se realizó con el programa *Phylogenetic Investigation of Communities by Reconstruction of Unobserved States* (PICRUSt 2, por sus siglas en inglés) (Douglas et al., 2020), el cual es un paquete de software diseñado para predecir el contenido funcional del metagenoma a partir de genes marcadores (p. ej. 16S rRNA) y genomas completos. Es decir, relaciona la información taxonómica obtenida

con la información funcional existente en las bases de datos. Para esto, primero se utilizó una tabla en formato BIOM construida a partir de la tabla de frecuencias obtenida con QIIME2 y el archivo FASTA que contiene las secuencias de los ASVs obtenidos al colapsar las secuencias con identidades del 100%.

2.5 Análisis de diversidad

Se contruyó una matriz de metadatos utilizando los datos colectados a bordo del R/V Hesperides y R/V Cornido de Saavedra entre 1999 y 2001 y publicados por Somoza et al. (2003) y se validaron con la herramienta en línea *Keemei* para su uso en los análisis de diversidad.

Se calculó la correlación lineal de las secuencias representativas y los ASVs obtenidos por cada muestra para determinar el sesgo de variación entre los valores de las muestras y determinar si los datos cumplen con el principio de normalidad. Para esto se utilizó la librería *ggplot2* del visualizador RStudio del entorno R.

La curva de rarefacción se construyó con el índice de Chao 1 para medir la acumulación de especies en relación con el número de secuencias de cada muestra con el comando *qiime diversity alpha-rarefaction*, para establecer el valor de profundidad de muestreo para los análisis de diversidad posteriores.

La diversidad alfa y beta se calcularon mediante el comando *qiime diversity core-metrics-phylogenetic*. Para ello se computaron las métricas: índice de Shannon, distancia de Jaccard, distancias Unifrac ponderada y no ponderada, distancia de Bray-Curtis y se realizó un Análisis de Coordenadas Principales (PCoA). Se determinaron los grupos significativamente diferentes mediante un análisis de varianza multivariado permutacional (PERMANOVA) usando el comando *qiime diversity beta-group-significance*. Para dichos análisis de diversidad beta se normalizaron los datos para cumplir con el principio de homocedasticidad. Para los análisis de diversidad beta los datos se normalizaron con el método de rarefacción a una profundidad de secuenciación de 13000 lecturas. Para los análisis de diversidad alfa los datos no se normalizaron, se obtuvieron los valores del índice de Shannon de cada muestra y los valores de equitatividad de abundancias (Pielou J') para determinar relaciones entre la riqueza, diversidad y dominancia. Los gráficos de ordenación se construyeron con la herramienta en línea Vega Editor (<https://vega.github.io/editor/>).

Capítulo 3. Resultados

3.1 Extracción de DNA ambiental

Se obtuvo ADN de las 18 muestras procesadas. Las concentraciones y calidad del ADN extraído variaron de 5.1 a 214.8 ng/ μ L (Tabla 1).

Tabla 1. Concentraciones de las muestras de ADN procesadas y sus respectivas purezas.

muestra	A 260/280	ADN ng/ μ L
ANA-05	1.5	7.9
ANA-10	1.4	5.1
ANA-15	1.4	9.5
ANA-20	1.3	82.6
ANA-25	1.3	4.8
ANA-35	1.4	6.1
ANA-40	1.5	116.2
ANA-45	1.3	43.7
ANA-50	1.6	5.4
ANA-52	1.3	5.7
PIP-05	1.4	25.8
PIP-10	1.5	17.8
PIP-15	1.3	9.6
PIP-20	1.3	87.3
PIP-25	1.3	11.9
PIP-30	1.4	214.8
PIP-35	1.4	105.2
PIP-40	1.5	123.2

3.2 Amplificación de la región V4 del gen 16S de RNAr y construcción de librerías

Se lograron amplificar 16 muestras de las 18 muestras, 8 por cada volcán. Las muestras pertenecientes al volcán Anastasya presentaron problemas de amplificación, siendo necesarias hasta cinco reacciones de

PCR con diferentes modificaciones para obtener amplicones. En cuanto a las muestras del volcán Pipoca no se presentó ningún contratiempo con las amplificaciones, ya que una vez estandarizada la técnica, se logró amplificar el 100 % de las muestras de dicho volcán (Figura 3).

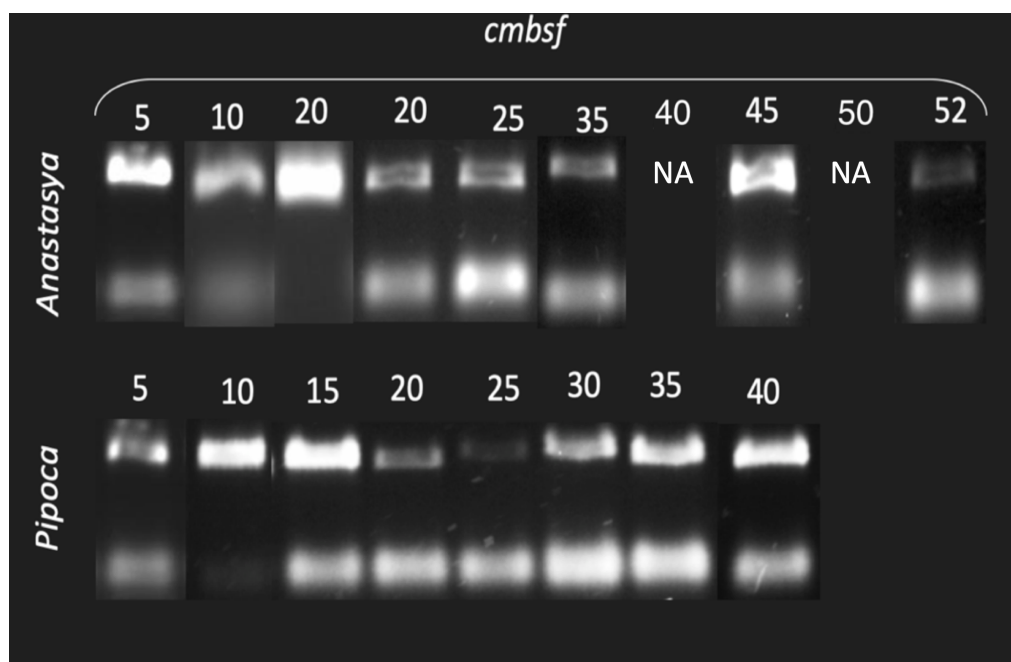


Figura 3. Electroforesis en gel de agarosa de las amplificaciones de la región V4 del gen del ARN ribosomal. En la parte superior se indican el último centímetro de las secciones en de la columna de sedimento de la cual se realizó la PCR. También se indica del lado izquierdo el volcán al que pertenecen los amplicones. NA: no amplificado. Cmbfsf: *centimeters below sea floor*.

3.3 Control de calidad y limpieza de secuencias

Se obtuvo un total de 648545 secuencias crudas. El número máximo de secuencias por muestra fue de 86070 pertenecientes a PIP-05 y el más bajo fue ANA-45 con 5067. La media obtenida fue de 34259.5 secuencias (Tabla 2).

Tabla 2. Secuencias crudas obtenidas por cada muestra. Las muestras están ordenadas de mayor a menor número de secuencias obtenidas.

muestra	secuencias crudas
PIP-05	86070
ANA-05	79860
PIP-40	67312
ANA-15	58185
ANA-10	52778
PIP-10	41971
ANA-20	40953
PIP-15	37033
ANA-52	31486
PIP-35	30451
ANA-25	30391
ANA-35	29086
PIP-25	27429
PIP-30	18273
PIP-20	12200
ANA-45	5067

El control de calidad (QC) de las secuencias se determina por un valor estimado de probabilidad de error en la lectura de cada posición. El QC recomendado para secuencias obtenidas de metagenómica de amplicon y procesamiento en QIIME2 es 18 (Moshen et al., 2019). La calidad de las secuencias *forward* fue de 34 a 39 comenzando a caer a partir de la posición 147 hasta un valor de 12. Los valores de calidad de las secuencias *reverse* estuvieron por encima de 26. El corte de secuencias se hizo en la posición 147 del extremo 3' para mantener un QC por encima de 30. Se obtuvo un total de 616,887 secuencias después del control de calidad, representando una pérdida del 4.89%. Las muestras con mayor número de secuencias fueron las correspondientes a los primeros 15 cmbsf en ambos volcanes y las de menor número fueron las correspondientes a los 45 cmbsf para Anastasya y 20 cmbsf para Pipoca. Este último volcán presentó un incremento en el número de secuencias en la profundidad de 40 cmbsf superando incluso las obtenidas a los 10 y 15 cmbsf de dicho volcán (Figura 4).

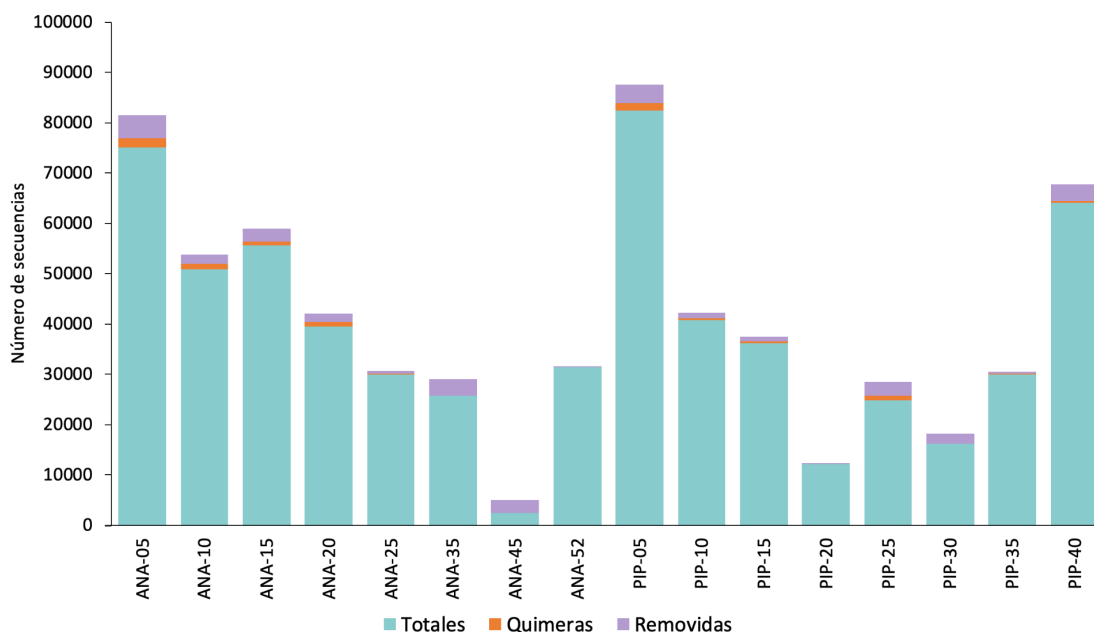


Figura 4. Control de calidad de las secuencias procesadas con DADA2. En el eje X se indica el código de muestra y en el eje Y el número de secuencias.

Tras la eliminación de secuencias pertenecientes a mitocondrias, cloroplastos y los *singletons* se retuvieron 471525 secuencias. Las muestras con mayor número de secuencias fueron también las pertenecientes a los primeros 15 cbsf en ambos volcanes y la muestra de 40 cbsf del volcán Pipoca. Las secuencias mitocondriales y de cloroplastos sólo se encontraron en 5 muestras: ANA-05, ANA-15, ANA-20, PIP-05 y PIP-40, siendo ANA-20 la que más presentó con 339 y ANA-05 la menos abundante con 8 (Figura 5).

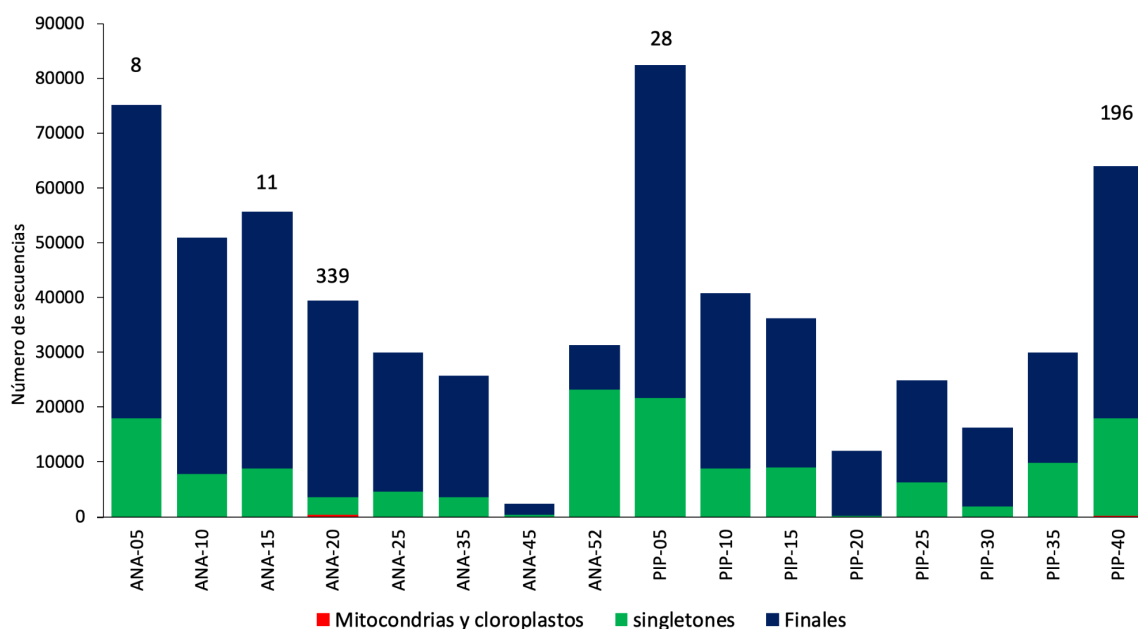


Figura 5. Total de secuencias obtenidas después del preprocesamiento . Los valores sobre las barras indican el número de secuencias filtradas de mitocondrias y cloroplastos.

3.4 Identificación de ASVs (*Amplicon Sequence Variants*)

Se identificaron 5448 ASVs diferentes. El volcán que presentó mayor número de ASVs fue Anastasya con un máximo de 1446 en ANA-05 y mínimo de 33 en ANA-20. En Pipoca la muestra con mayor número de ASVs fue PIP-05 con 1568 y la que obtuvo el menor número fue 4.6 en PIP-30 (Tabla 3).

El coeficiente de correlación lineal (R^2) mostró una variación en la proporción del 26.9% la cual fue de 1:10 para las muestras de los primeros 15 cmbsf de ambos volcanes, 1:10000 para el resto de las profundidades en Anastasya en PIP-20, 25 y 30 y de 1:1000 en PIP-35 y 40, teniendo estas últimas la misma proporción secuencias computadas/ASVs obtenidos que las de los primeros 15 cmbsf de dicho volcán. Los datos se ajustaron con transformación logarítmica base 10 para una mejor visualización (Figura 6).

Tabla 3. ASVs observados por cada muestra.

muestra	OTUs observados
ANA.05	1446
ANA.10	804
ANA.15	1124
ANA.20	33
ANA.25	24
ANA.35	43
ANA.52	42
PIP.05	1568
PIP.10	1356
PIP.15	592
PIP.25	81
PIP.30	58
PIP.40	508
PIP.35	184

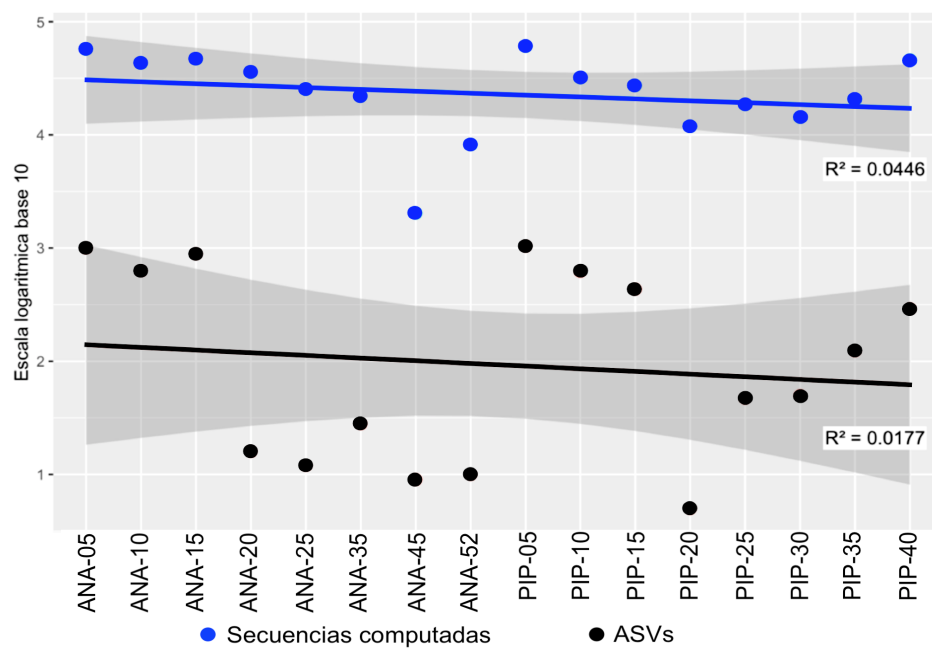


Figura 6. Número de secuencias procesadas y Amplicon Sequence Variants asignadas por muestra. En el eje Y se presenta el número de secuencias computadas y Unidades taxonómicas identificadas en escala logarítmica (base 10). La zona sombreada indica el intervalo de confianza (95%).

Ambos volcanes presentaron el mayor número de ASVs en las muestras de los primeros 15 cmbsf siendo 479 para ANA-05, 331 para ANA-10 y 451 para ANA-15, PIP-05 con 467, PIP-10 con 333 y PIP-15 con 236 respectivamente. Las muestras con menos ASVs resueltos fueron PIP-20 con 5 y ANA-45 con 9. (Figura 7).

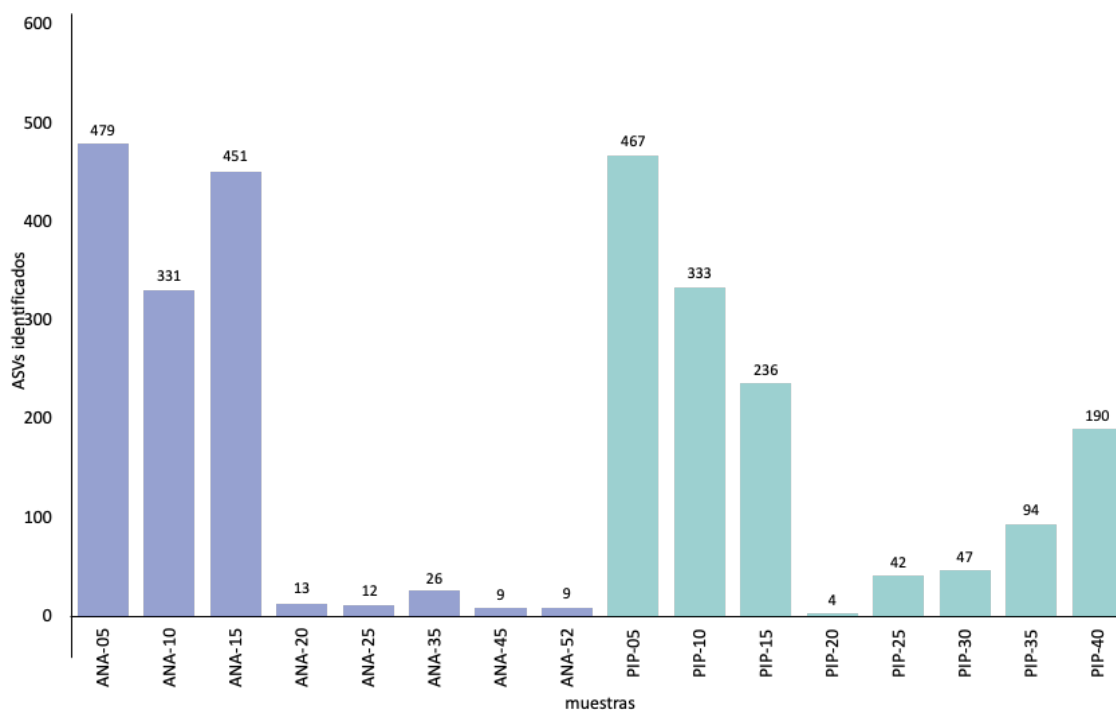


Figura 7. Número de ASVs identificados por volcán y por profundidad del sedimento. En el eje X se indican las muestras. En el eje Y se indica el número ASVs asignados para cada muestra. Las barras violeta representan las muestras del volcán Anastasya y las verdes las del volcán Pipoca.

3.5 Descripción de los perfiles taxonómicos

Para esta sección se tomó en cuenta únicamente aquellos ASVs con una abundancia relativa mayores al 1%. Las familias con abundancias menores se describen en la siguiente sección *3.5.5 Descripción taxonómica de la biosfera rara*.

A nivel Dominio, como era esperable, se logró una determinación plena, sin embargo sólo 432 unidades taxonómicas fueron resueltas a nivel de especie (100% identidad) (Tabla 4).

En general, se identificaron 53 fila diferentes de Archaea y Bacteria en las muestras de ambos volcanes. El filo más abundante fue Euryarchaeota, el cual presentó una abundancia relativa del 27.4% seguido de

Proteobacteria con un 26.7%. De los 53 fila resueltos solo 15 presentaron abundancias mayores al 1% (7 Archaea y 8 Bacteria).

Tabla 4. ASVs resueltos por nivel taxonómico.

	Anastasya		Pipoca	
	Bacteria	Archaea	Bacteria	Archaea
Filo	42	8	44	9
Clase	99	13	106	14
Orden	223	27	219	29
Familia	354	40	346	44
Género	366	34	386	37
Especie	352	34	349	45

En el volcán Anastasya el filo más abundante fue Euryarchaeota en las muestras de los primeros 35 cmbsf. En las muestras correspondientes a los 45 y 52 cmbsf los filo dominantes fueron Thaumarchaeota y Asgardeota respectivamente. Los filo Crenarchaeota, Acidobacteria, Bacteroidetes, Latescibacteria, Plantomycetes y Gammatimonadetes se identificaron únicamente en las muestras de los primeros 15 cmbsf. Aquellas unidades taxonómicas del dominio Bacteria que no se resolvieron sólo se identificaron en las muestras de los primeros 15 cmbsf (Figura 8).

El filo dominante en el volcán Pipoca en todas las muestras fue Euryarchaeota, exceptuando PIP-20, en la cual no se identificó ningún ASV perteneciente al dominio Archaea. El segundo filo con mayor abundancia en este volcán fue Crenarchaeota, seguido de Chloroflexi y Proteobacteria. Este último dominó la muestra PIP-20 en un 99%. El filo Epsilonbactareota se identificó sólo en las muestras de los primeros 15 y en la 40 cmbsf. Aquellas unidades taxonómicas del dominio Bacteria que no se resolvieron estuvieron presentes en las muestras correspondientes a los 5, 10, 15, 25, 35 y 40 cmbsf (Figura 8).

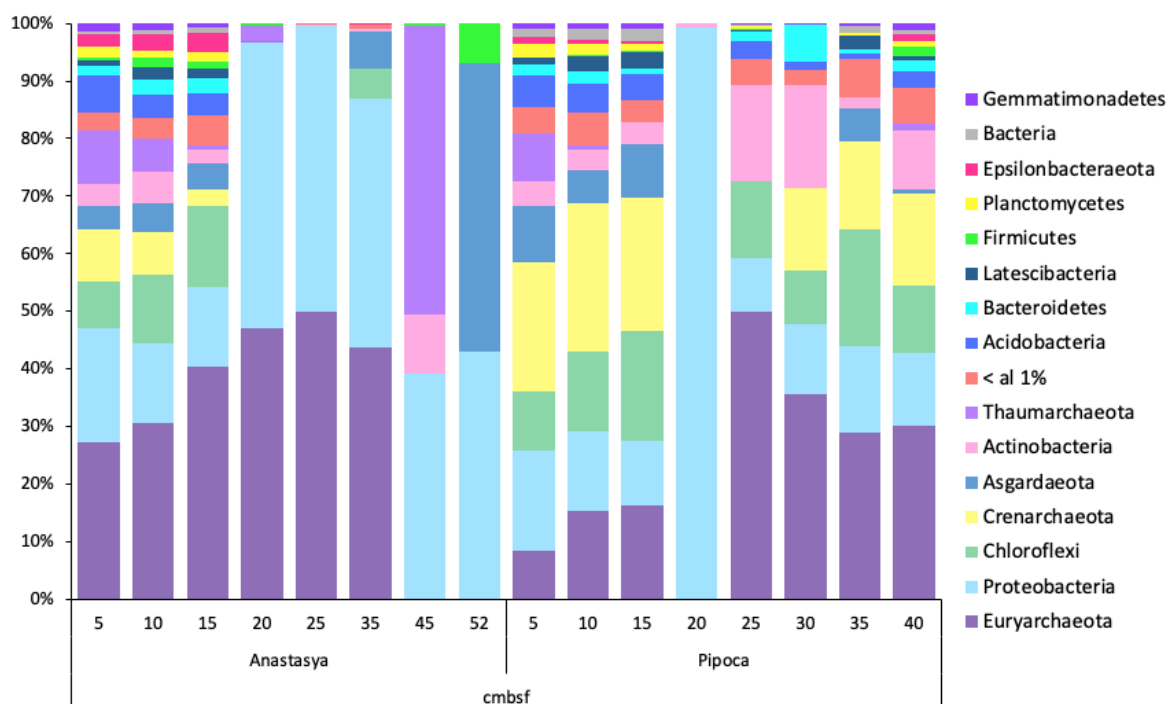


Figura 8. Perfiles taxonómicos a nivel de filo. En el panel de la izquierda se indica con código de color el nombre de los filo identificados. Aquellos ASVs que no lograron ser asignados a dicho nivel quedaron agrupados en Bacteria.

3.5.1 Composición de arqueas

Los perfiles taxonómicos de ambos volcanes están conformados solo por nueve filo con abundancias mayores al 1%. En orden descendente la abundancia relativa los filo identificados fueron: Euryarchaeota, Crenarchaeota, Asgardaeota, Thaumarchaeota, Nanoarchaeota, Diapherotrites, Hydrothermarchaeota y Hadesarchaeota. Siendo Euryarchaeota el que presentó una mayor abundancia relativa (10 a 50%) y Hadesarchaeota el que obtuvo los valores más bajos (menores al 2%). El 19.8% restante de los ASVs no se determinó a nivel de filo por lo cual quedaron agrupados sólo como Archaea (dominio).

Las muestras correspondientes a los primeros 25 cmbsf del volcán Anastasya mostraron un patrón ascendente de la abundancia del filo Euryarchaeota en relación con la profundidad llegando a representar el 100% de la abundancia relativa en la muestra ANA-25. Dicho filo decae a los 35 cmbsf y desaparece en las muestras ANA-45 y ANA-52. En estas últimas dos profundidades los filo que dominan la totalidad de las abundancias son Thaumarchaeota (52%) y Asgardaeota respectivamente (50%). Los filo Nanoarchaeota y Crenarchaeota se identificaron únicamente en los primeros 15 cmbsf, este último filo en patrón

descendente y ambos quedando sin representantes en las muestras restantes de dicho volcán. El filo Thaumarchaeota se identificó en los primeros 15 cm con valores descendentes conforme la profundidad y volviendo a aumentar a partir de los 20 cmbsf. La muestra ANA-15 resulta de particular interés al ser la única con representantes identificados de los filo Hydrothermarchaeota y Hadesarchaeota (menores al 2%). La muestra de los 20 cmbsf está dominada por Euryarchaeota en un 94%, el 6% restante corresponde a Thaumarchaeota. ANA-35 está compuesta en un 87% por el filo Euryarchaeota y 13% por Asgardeota. Las muestras de los 45 y 52 cmbsf están conformadas en su totalidad por un filo cada una, siendo estos Thaumarchaeota y Asgardeota respectivamente. Las secuencias que no pudieron ser resueltas a nivel de filo quedando como Archaea se identificaron sólo en los primeros 15 cmbsf. No se identificaron filo que se compartieran entre todas las muestras. Se observó un descenso abrupto en la diversidad en las muestras de 45 y 52 cmbsf. Las profundidades más superficiales que ANA-45 comparten todas el filo Euryarchaeota.

La composición de arqueas del volcán Pipoca contiene los mismos filo que el volcán Anastasya agregando el filo Diapherotrites (1 a 3%), el cual se identificó únicamente en las muestras de los primeros 15 cmbsf. Otros filo que conforman las comunidades sólo hasta dicha profundidad fueron Hydrothermarchaeota, Hadesarchaeota (5 cmbsf) y aquellos que no pudieron ser resueltos a nivel de género en los 5 y 10 cmbsf, dichas secuencias representan el 19.8% de la diversidad del volcán. A partir de los 25 cmbsf se da un aumento abrupto en la abundancia de miembros de Crenarchaeota, Asgardaota (35 y 40 cmbsf), Thaumarchaeota, Nanoarchaeota y Euryarchaeota. La abundancia de este último incrementa en comparación con las de los primeros 15 cmbsf. La muestra PIP-25 está compuesta en su totalidad por miembros del filo Thaumarchaeota. No se logró determinar ninguna secuencia relacionada a miembros del dominio Archaea en la muestra correspondiente a los 20 cmbsf del volcán Pipoca. Los ASVs no resueltos a nivel de filo se identificaron sólo en los primeros 10 cmbsf.

Dado que no se identificaron secuencias pertenecientes al dominio Archaea en la muestra PIP-20 no fue posible establecer que filo se comparten a lo largo del núcleo de sedimento del volcán. Sin embargo, excluyendo dicha muestra el resto comparten sólo el filo Euryarchaeota (Figura 9).

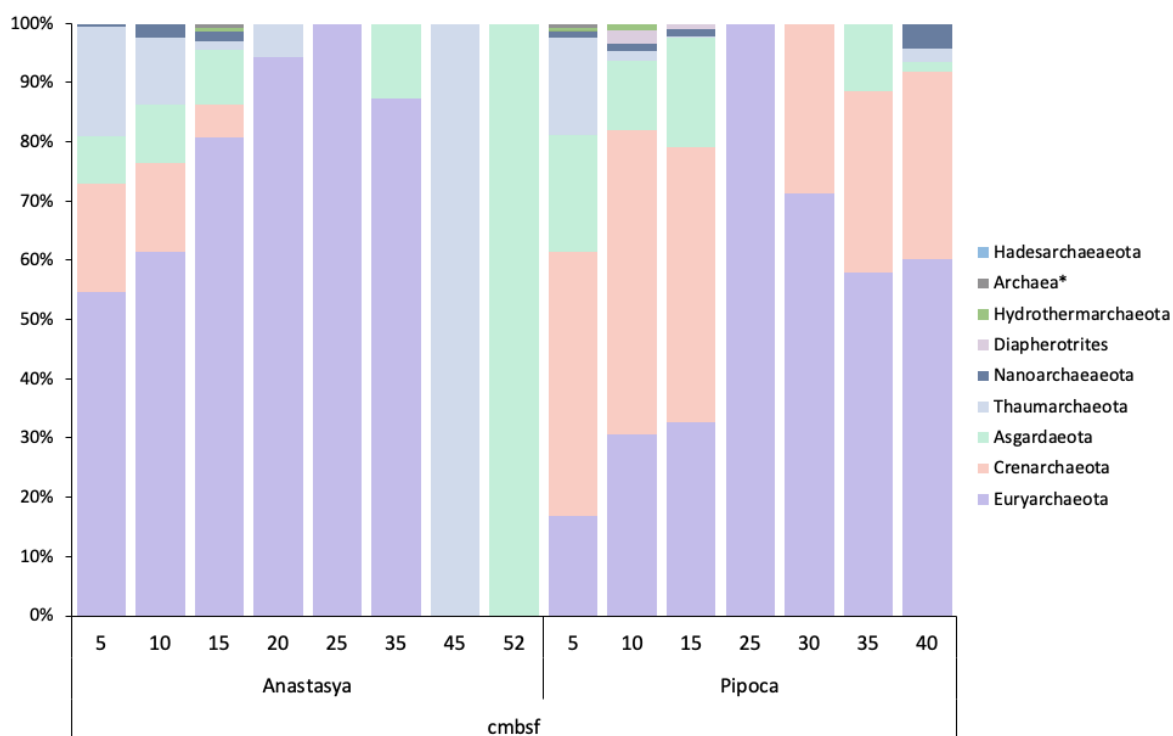


Figura 9. Composición de fila de Arqueas. En el eje X se indican las profundidades muestreadas en cada volcán (cmbsf= centímetros debajo de la superficie del mar). En el eje Y se indica el porcentaje de abundancia relativa de los principales fila de arqueas con abundancias mayores al 1%.

3.5.1.1 Principales familias de arqueas identificadas

El volcán Pipoca fue el que presentó el número más alto de familias de arqueas con 30 diferentes mientras que en las muestras del volcán Anastasya se lograron determinar 26 familias distintas (Figura 11a). Las familias que incluyen a Archaeon enrichment culture clone 43-1, Archaeon GW2011_AR13, Geothermarchaeaceae, Marine Benthic Group A, Micrarchaeia, uncultured Archaeon 19b-17, uncultured archaeon Hydrotermachaeota, uncultured archaeon Marine Benthic Group D and DHVEG-1, uncultured Desulfurococcales archaeon y uncultured Methanofastidiosales son únicas para el volcán Pipoca mientras que Methanoperedenaceae, uncultured archaeon Marine Benthic Group D, uncultured archaeon TA1f2, uncultured Crenarchaeote Odinararchaeia, uncultured eukaryote Bathyarchaeia y uncultured marine Crenarchaeote E6-3G son únicas para Anastasya.

La composición de familias del volcán Anastasya está dominada por cinco familias: ANME-1a (29%), Nitrosopumilaceae (17%), uncultured crenarchaeote Odinarcheia (13%), ANME-1b (11%) y uncultured

Methanomassillicoccales (9%). Las 21 familias restantes presentan abundancias menores al 3% (Figura 12a). En cuanto a las familias que conforman el volcán Pipoca sólo nueve de las 30 identificadas presentan abundancias mayores al 3%: uncultured Bathyarchaeia (22%), ANME-2a-2b (15%), ANME-2c (10%), uncultured archaeon Lokiarchaeia (9%), ANME-1b (7%), uncultured eukaryote Thermoplasmata (5%), uncultured archaeon Bathyarchaeia (5%), Methanosarcinaceae (4%) y uncultured Methanomassillicoccales (4%). Las 21 familias restantes de dicho volcán presentan abundancias menores al 3% (Figura 10).



Figura 10. Perfil de familias de arqueas identificadas en cada volcán. El eje de Y indica el porcentaje de abundancia relativa de cada una de las familias determinadas con abundancias relativas mayores al 1%. El eje X indica la profundidad en cmbsf y el volcán al cual pertenece la barra de abundancias. El código de color indica la familia identificada.

Ambos volcanes comparten 20 familias. De las familias compartidas sólo dos pertenecen a los grupos dominantes, siendo éstas ANME-1b y uncultured Methanomassilicoccales (Figura 11)

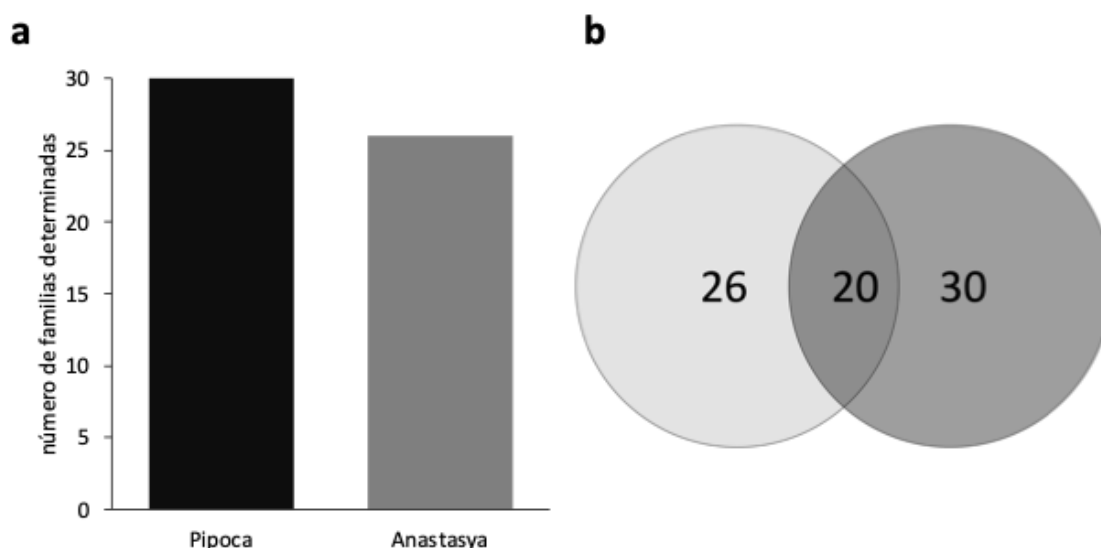


Figura 11. Número de familias de arqueas únicas y compartidas entre los volcanes Pipoca y Anastasya, Golfo de Cadiz. a) La gráfica de barras indica el número total de familias determinadas en cada volcán. b) El diagrama de Venn muestra el número de familias que específicas de cada volcán y las compartidas entre ellos.

3.5.1.2 Grupos de arqueas involucrados en el metabolismo del metano

En Anastasya las familias metanogénicas identificadas fueron: Methanosarcinaceae con abundancia de 3 a 5% (5, 10, 15 y 25 cmbsf), Methanoperenedeaceae con abundancia de 1% (5 y 10 cmbsf) y Methanomassilicoccales con abundancia relativa de del 3 al 40% (5, 10, 15 y 25 cmbsf). Hasta la fecha, este último sólo había sido reportado en ambientes dulceacuícolas y está estrechamente relacionado con el fenómeno de eutrofización y el tipo de metanogénesis presente en el rumen de distintos animales. En el volcán Pipoca se identificaron tres familias metanogénicas: Methanomassilicoccales con abundancia relativa de 2 a 13% (5, 10, 15, 35 y 40 cmbsf); Methanosarcinaceae con abundancia de 3 a 7% (5, 10, 15, 30, 35 y 40 cmbsf) y Methanofastidiosales con abundancia de 3% en PIP-25.

Se identificaron cinco familias responsables de llevar cabo la AOM en las muestras de ambos volcanes. En Anastasya las familias más abundantes fueron: ANME-1a con abundancia relativa de 11 a 24% (5, 10, 15, 20, 25 y 35 cmbsf); ANME-1b con abundancia de 6 a 37% (5, 10, 15, 25 y 35 cmbsf); ANME2a-2b con abundancia de 2 a 10% (5, 10, 15 y 35 cmbsf) y ANME-2c en ANA-10. En Pipoca la familias identificadas

fueron: ANME 2a-2b con abundancia de 3 a 63% (5, 10, 15, 25, 35 y 40 cmbsf); ANME-1b con abundancia de 2 a 28% (5, 10, 15, 35 y 40 cmbsf); ANME-1a con abundancia de 2 a 15% (10, 15, 35 y 40 cmbsf) y ANME-2c con abundancia de 66% en PIP-30.

3.5.2 Composición de bacterias

La estructura bacteriana de las muestras de los primeros 15 cmbsf del volcán Anastasya estuvo dominada por los filo Proteobacteria, Chloroflexi, Actinobacteria y Acidobacteria, conformando estos aproximadamente el 70% de la abundancia de las profundidades ya mencionadas. Dichas muestras están compuestas por 40, 33 y 36 filo de los cuales 36, 29 y 32 tuvieron una representatividad menor al 10%, siendo los filo Lentispirae, CK-C2-2 y Omnitrophicaeota los de los valores más bajos. Las muestras de 20 y 25 cmbsf estuvieron dominadas casi en su totalidad (>90%) por el filo Proteobacteria además de Chloroflexi, Acidobacteria y Cyanobacteria en ambas muestras y Firmicutes y Fusobacteria solo ANA-20 y Atribacteria en ANA-25.

La abundancia del filo Proteobacteria disminuyó a partir de los 35 cmbsf a menos del 90%, en estas muestras más profundas el filo Chloroflexi sólo se encontró en ANA-35, Actinobacteria en ANA-35 y ANA-45 y Firmicutes en ANA-45 y ANA-52. El grupo formado por los ASVs que solo fueron resueltos hasta Dominio se identificaron únicamente en las muestras de los primeros 15 cmbsf. Las secuencias que no se pudieron determinar a nivel de filo quedaron agrupadas como Bacterias no asignadas y estuvieron presentes en las muestras de los primeros 15 cm en un porcentaje de 5% (Figura 12).

La composición de bacterias en Pipoca en los primeros 15 cmbsf estuvo representada en más del 50% por los filo Proteobacteria y Chloroflexi. Seguido de estos los filo Actinobacteria, Acidobacteria, Bacteroidetes, Latescibacteria y Planctomycetes estuvieron en abundancias menores al 10%. El número de filo restantes que conformaron dichas profundidades fueron 34, 28 y 21 con abundancias relativas menores al 5%.

La muestra PIP-20 estuvo dominada en más del 95% por Proteobacteria, el porcentaje restante estuvo conformado por Actinobacteria. A partir de los 25 cmbsf las comunidades bacterianas presentaron una estructura similar a las muestras de los primeros 15 cmbsf. Actinobacteria aumentó en las muestras de 25, 30 y 40 cmbsf. En PIP-35 la abundancia de dicho filo disminuyó a menos del 10%. El número de filo que constituyen las muestras más profundas fueron 12, 13, 18 y 28. Estos últimos cuatro perfiles taxonómicos

y los de los primeros 15 cmbsf compartieron entre todos ellos 7 fila. Aquellos ASVs que no pudieron ser resueltos a nivel de filo quedaron agrupados como Bacteria y estos se presentaron en todas de dicho volcán exceptuando PIP-20 y PIP-30 con abundancia de 3% (Figura 12).

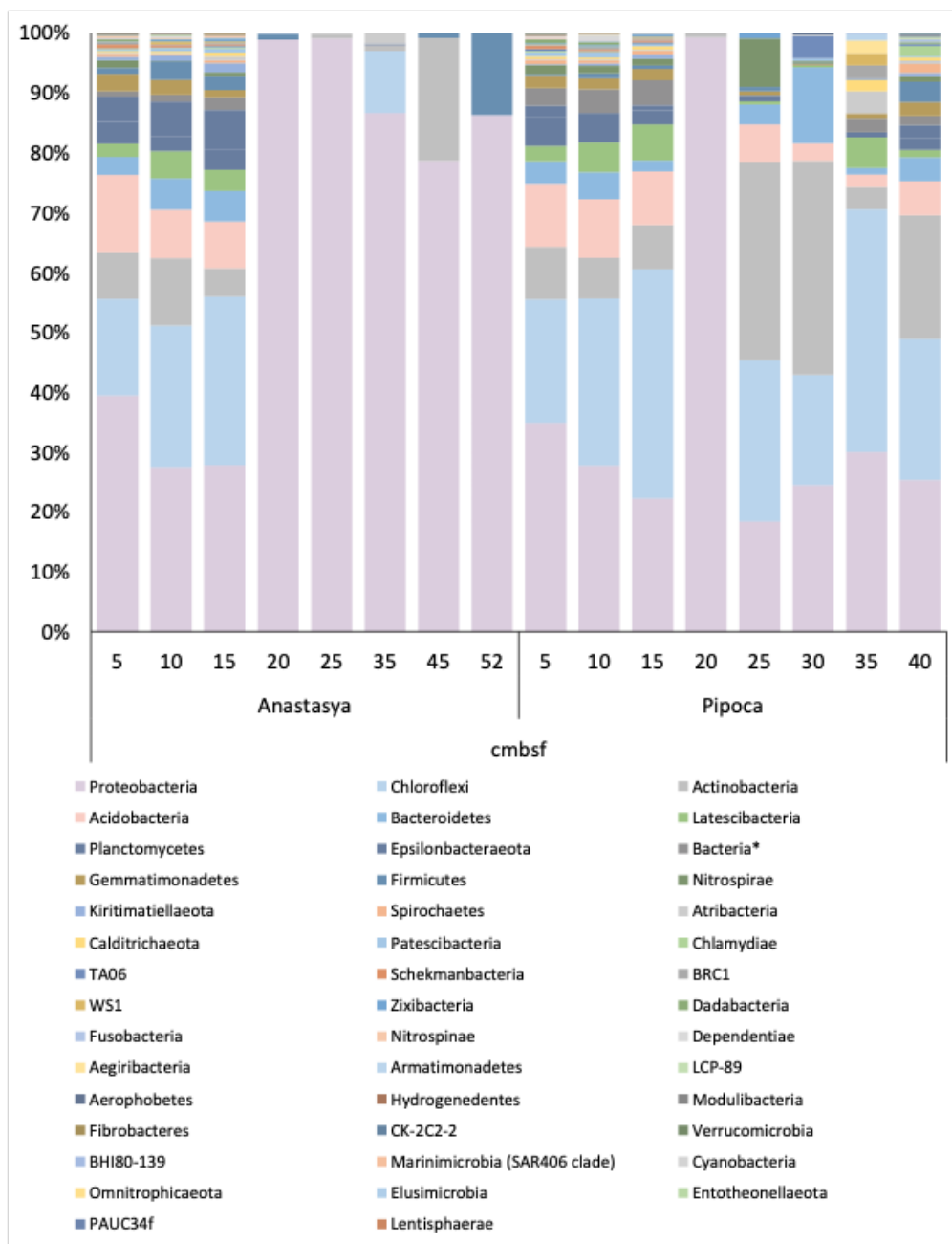


Figura 12. Abundancias relativas de los principales filo bacterianos en los volcanes Pipoca y Anastasya, Golfo de Cádiz. En el eje X se indican las profundidades muestreadas en cada volcán. En el eje Y se indica el porcentaje de abundancia de filo de bacterias con abundancias relativas mayores al 1%.

3.5.2.1 Principales familias bacterianas identificadas

La composición de familias del volcán Anastasya estuvo dominada por 11 familias: Xanthobacteraceae (34%), Pseudomonadaceae (11%), Anaerolinaceae (8%), Desulfobulbaceae, Aeromonadaceae y Caulobacteraceae (4%) y Sulfurovaceae, Actinomarinales, B2M28 y Micrococcaceae (3% cada una). Las 36 familias restantes de dicho volcán presentan abundancias menores al 3% (Figura 13 y Tabla 5).

El volcán Pipoca fue el que presentó el número más alto de familias bacterianas con 67 diferentes mientras que en las muestras del volcán Anastasya sólo se lograron identificar 47 familias distintas (Figura 14a). Ambos volcanes comparten entre ellos 30 familias (Figura 14b). En Pipoca la dominancia estuvo representada por 12 familias: Anaerolinaceae (13%), Caulobacteraceae (9%), Micrococcaceae (6%), Corynebacteraceae (5%), Buikholderiaceae y uncultured bacterium S085 con (4%). Gammaproteobacteria, uncultured bacterium Anaerolinaceae, Desulfobulbaceae, Syntrophobacteraceae, Bacteria y uncultured Actinomarinales representaron un 3%. Las 55 familias restantes presentaron abundancias menores al 3% (Figura 13 y Tabla 5).



Figura 13. Abundancia relativa de las de familias de bacterias identificadas en cada volcán. El eje de Y indica las familias de bacterias con abundancias relativas mayores al 1%. El eje X indica la profundidad en cmbsf y el volcán al cual pertenece la barra de abundancias. El código de color indica la familia identificada.

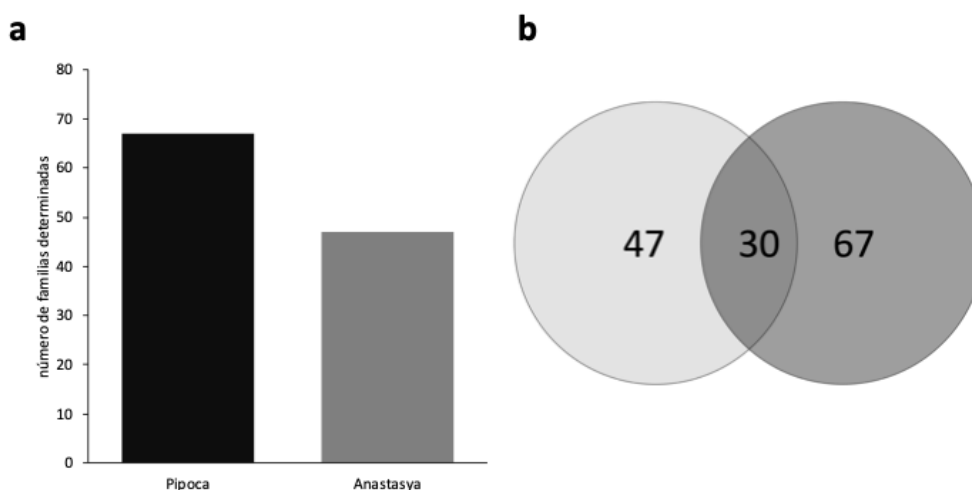


Figura 14. Número de familias de bacterias únicas y compartidas entre los volcanes Pipoca y Anastasya, Golfo de Cádiz. (a) La gráfica de barras indica el número total de familias identificadas en cada volcán. (b) Los diagramas de Venn muestran el número de familias detectadas únicamente en cada volcán y las compartidas entre ellos.

3.5.3 Descripción taxonómica de la biosfera rara

Para la determinación de la biosfera rara, entendida como aquella cuyas abundancias relativas son menores al 1%, se estableció como punto de partida el nivel taxonómico de familia. De las 394 familias identificadas en el volcán Anastasya solo dos familias de arqueas y 14 de bacterias presentaron abundancias mayores al 1%, acumulando un 64% del total de las muestras. El 36% restante está dado por 38 familias de arqueas y 340 de bacterias conformando la biosfera rara de dicho volcán (Figura 15).

Aunque la abundancia relativa de la biosfera rara, tomando en cuenta todas las muestras del núcleo de sedimento de Anastasya es del 36%, este porcentaje no es igual en todas las muestras. La abundancia de la biosfera rara es mayor en las muestras de los primeros 15 cm con respecto al resto de las profundidades siendo 42% en ANA-05 y 39% para ANA-10 y ANA-15. A partir los 20 cm la abundancia de la biosfera rara cae abruptamente a porcentajes de 2% en ANA-20, ANA-25 y ANA-45, 6% en ANA-35 y 1% en ANA-52 (Figura 16)

Tabla 5. Familias de bacterias identificadas en muestras provenientes de los volcanes Pipoca y Anastasya, golfo de Cádiz. Las columnas con el símbolo % indican las abundancias relativas de las familias detectadas únicamente en cada volcán.

compartidas	únicas en Pipoca	%	únicas en Anastasya	%
Pseudomonadaceae	Corynebacteriaceae	5	Aeromonadaceae	4
Anaerolineaceae	uncultured bacterium S085	4	Alteromonadaceae	
Desulfobulbaceae	Syntrophobacteraceae	3	Flavobacteriales	
Caulobacteraceae	uncultured bacterium Anaerolineae		Halomonadaceae	
Sulfurovaceae	Alphaproteobacteria		Kiritimatiellaceae	
uncultured Actinomarinales	Aminicenantales		Staphylococcaceae	
B2M28	Calditrichaceae		Streptococcaceae	
Micrococcaceae	Cyclobacteriaceae		Thermoanaerobaculaceae	
Burkholdeliaceae	Dehalococcoidia		uncultured Acidobacteria bacterium	
Gammaproteobacteria	Desulfarculaceae		uncultured bacterium Anaerolineae	< 3
uncultured Actinomarinales	EC3		uncultured bacterium PAUC43f marine benthic group	
uncultured Ardenticales	Marinilabiliaceae		uncultured bacterium Subgroup 21	
Desulfobacteraceae	Microtrichaceae		uncultured gamma proteobacterium B2M28	
Latescibacteraceae	Sh765B-AG-111		uncultured Gram-positive bacterium KD4-96	
Syntrophobacteraceae	Spirochaetaceae		uncultured Thermodesulfobivibronia	
Flavobacteriaceae	Subgroup 22		Vibrionaceae	
uncultured Thioalkalivibrio sp.	Thioalkalispiraceae		Xanthobacteraceae	
Moraxellaceae	Thiotrichaceae			
Bacteria	uncultured Armatimonadetes			
WCH81-81	uncultured bacterium ADurb.Bin180			
Clostridiaceae 1	uncultured bacterium BRC1			
uncultured bacterium Subgroup 22	uncultured bacterium CK-2C2-2			
Anaerolineae	uncultured bacterium FW22	< 3		
uncultured Anaerolineae	uncultured bacterium KD4-96			
uncultured Gailleales	uncultured bacterium mle1-16			
SBR1031	uncultured bacterium SBR1031			
Kiellenaceae	uncultured bacterium TA06			
Methylomonaceae	uncultured bacterium WS1			
Gammaproteobacteria incertae Sedis	uncultured Bacteroidetes bacterium			
	uncultured delta proteobacterium SAR324 clade (Marine group B)			
JS1	uncultured Desulfobulbaceae bacterium			
Ectothiorhodospiraceae				
	uncultured Nitrospirae bacterium			
	uncultured organism BD2-11 terrestrial group			
	uncultured organism LD1-PA32			
	uncultured organism SBR1031			
	uncultured sediment bacterium			
	Aegiribacteria			
	Weeksellaceae			
	Woeseiaceae			

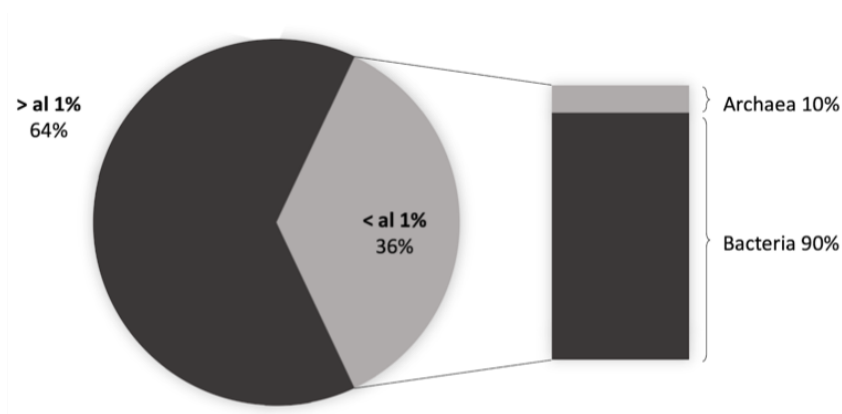


Figura 15. Abundancia y composición de la biosfera rara del volcán Anastasya. En el gráfico de pastel se indica en color gris oscuro el porcentaje de familias con abundancias relativas mayores al 1% y en gris claro las menores al 1% (biosfera rara). La barra muestra la proporción de los dominios Archaea y Bacteria que componen la biosfera rara en las muestras de sedimento analizadas.

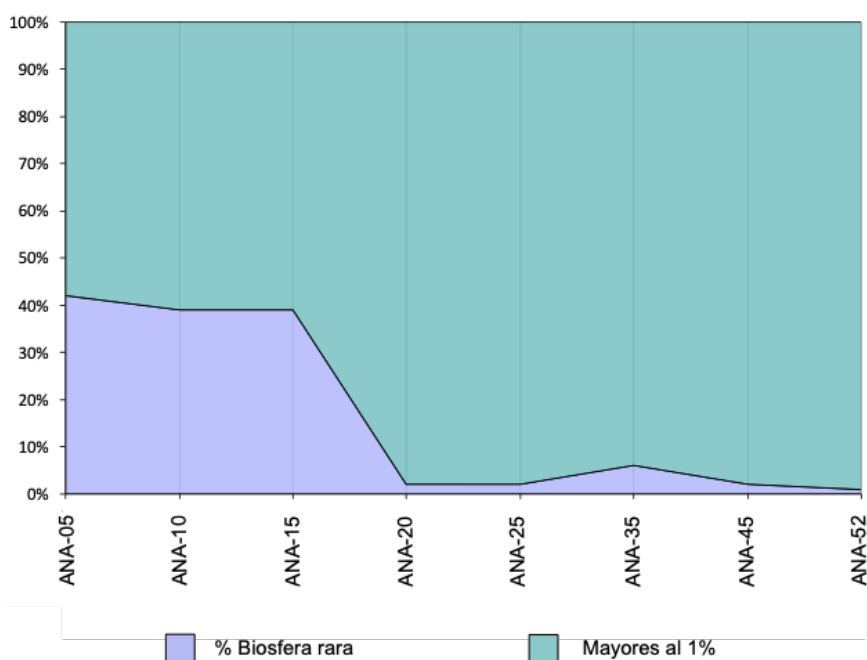


Figura 16. Abundancias relativas de la biosfera rara por cada muestra del núcleo del volcán Anastasya. En el eje X se indica la profundidad de cada muestra y en el Y el porcentaje de abundancia. El color lila indica el porcentaje de la biosfera rara y el verde el de las familias con abundancias relativas mayores al 1%.

En cuanto al volcán Pipoca, de las 389 familias identificadas, cuatro de arqueas y 24 de bacterias, presentaron abundancias relativas mayores al 1%, representando el 61% del total de las muestras analizadas. El 39% restante estuvo conformado por 39 familias de arqueas y 322 de bacterias con abundancias relativas menores al 1% (Figura 17).

La biosfera rara, mostró un patrón similar. La abundancia relativa de los primeros 15 cm fue de 41%, 39% y 36% respectivamente. En la muestra PIP-20 la abundancia bajó hasta 1%, pero pudo deberse a un problema en el procesamiento de la muestra. A partir de los 25 cmbsf las abundancias relativas de la biosfera rara forman un patrón ascendente alcanzando un 29% en la muestra más profunda (PIP-40) (Figura 18).

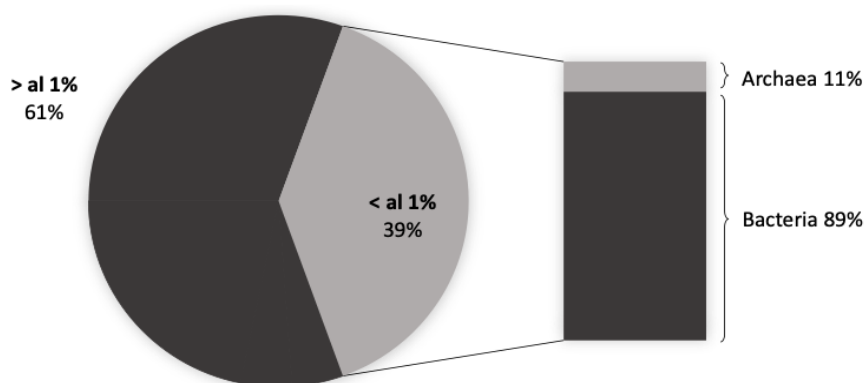


Figura 17. Abundancia y composición de la biosfera rara del volcán Pipoca. En el gráfico de pastel se indica en color gris oscuro el porcentaje de familias con abundancias relativas mayores al 1% y con gris claro las menores al 1% (biosfera rara). La barra muestra la proporción de Archaea y Bacteria que componen la biosfera rara del núcleo de sedimento.

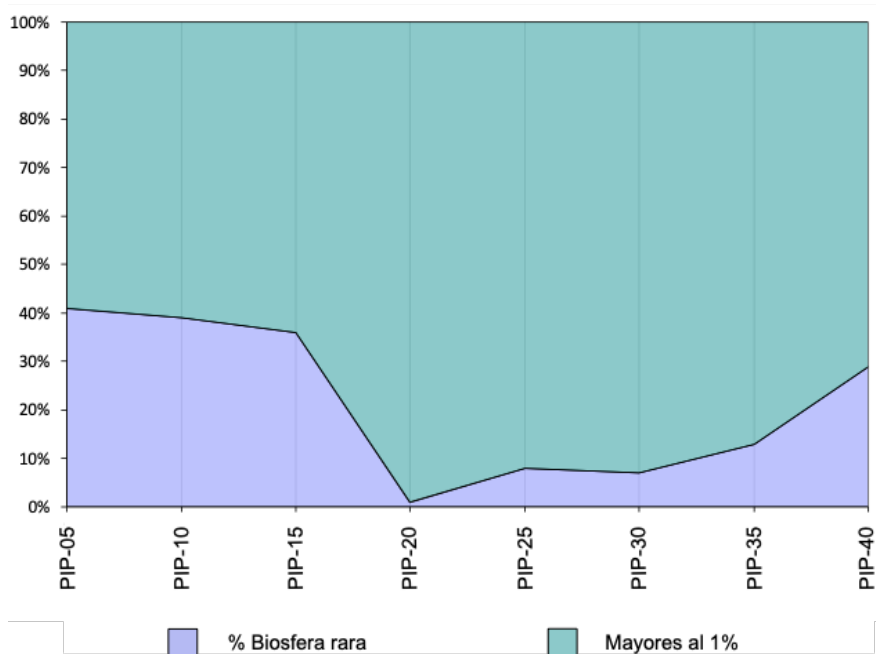


Figura 18. Abundancias relativas de la biosfera rara por cada muestra del núcleo del volcán Pipoca. En el eje X se indica la profundidad de la muestra y en el eje Y el porcentaje de abundancia. En color lila se representa el porcentaje de la biosfera rara y en verde el porcentaje de aquellas familias con abundancias mayores al 1%.

3.4 Análisis de diversidad

El índice de Chao1 indicó que la diversidad de clados se estabiliza al alcanzar una intensidad de muestreo de 7111 secuencias. Para aproximadamente este número de muestras se alcanzó el total de los ASVs esperados por cada muestra. El número de ASVs se mantuvo por arriba de los 1400 en las muestras correspondientes a los primeros 15 cmbsf siendo PIP-05 y ANA-05 las muestras que presentaron la mayor la cantidad de unidades taxonómicas observadas con 2285 y 2216 relativamente. En las muestras con profundidades mayores a los 15 cmbsf el número de ASVs fue menor a 1000 siendo PIP-20, PIP-25, PIP-30, ANA-20, ANA-25, ANA-35, ANA-45 y ANA-52 la muestras en las que se observaron menos de 100 (Figura 19).

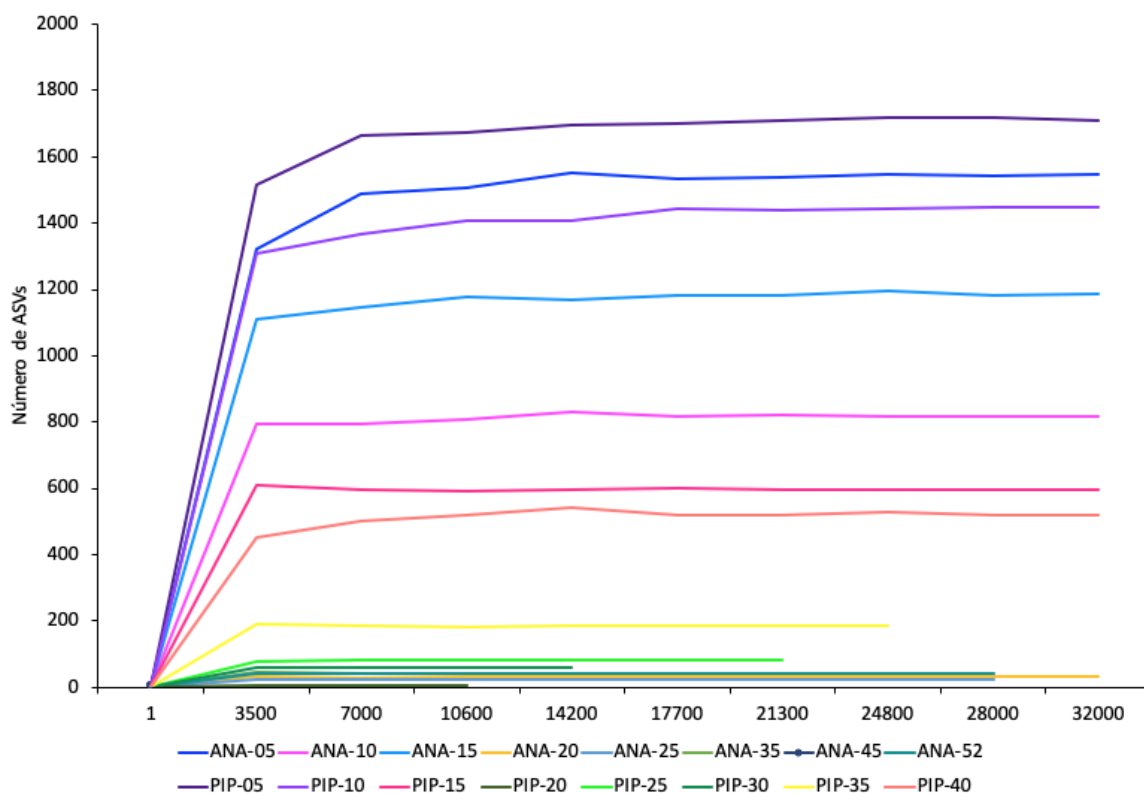


Figura 19. Índice Chao 1. Curva de rarefacción del esfuerzo de muestreo para dos volcanes, Pipoca y Anastasya, golfo de Cádiz. En el eje X se indica la profundidad de secuenciación y en el eje Y el número de ASVs.

3.6.1 Diversidad alfa

La tabla de metadatos generada se basó en el estudio realizado por Somoza et al. (2003) donde describen las características de los sedimentos de ambos volcanes. Los sedimentos de Anastasya son de lodo suave, alta saturación de gas y con un fuerte olor a ácido sulfhídrico en los primeros 15 cmbsf. Por debajo de esta profundidad el sedimento se compone de brechas de lodo de rocas sedimentarias. El volcán Pipoca presenta arenas color marrón y de granos gruesos en los primeros 30 cmbsf y arena con restos de corales hermatípicos y bivalvos en la muestra PIP-35 y PIP-40 (Tabla 6 y 7).

Los valores de Shannon de cada volcán fueron de $H' = 4.5$ para Anastasya y de $H' = 0.15$ para Pipoca, indicando mayor diversidad en el volcán Anastasya. En las muestras del volcán Anastasya los valores de H' fueron mayores a 8.5 en las muestras de los primeros 15 cmbsf y de 1.4 a 4.4 en las muestras más profundas, siendo estas diferencias significativas, con un valor de $p = 0.034$. Estos cambios coinciden con el cambio del tipo de sedimento donde se diferenciaron dos grupos (Tabla 6 y 7). Estas características del

sedimento, son las que posiblemente determinaron las variaciones en el número de ASVs y en el índice de Shanon a lo largo de la columna sedimentaria.

En Pipoca, los valores de H' de las muestras variaron entre el 4.6 al 9.7 en las muestras de los primeros 30 cmbsf. En las dos muestras más profundas (PIP-35 y PIP-40) el valor de H' fue de 6.6 y 7.8 respectivamente, coincidiendo también con los dos tipos de sedimento (grupos 1 y 2) (Tabla 6 y 7). El valor de p entre los dos grupos formados por los distintos tipos de sedimento fue de $p=0.699$ indicando que no hay diferencias significativas.

Tabla 6. Valores de Shannon de las muestras analizadas. La tercera columna presenta datos tomados de Somoza et al., 2003.

muestra	H'	<i>tipo de sedimento</i>
ANA-05	9.3	Lodo suave con alta concentración de gas y olor a ácido sulfhídrico
ANA-10	8.6	
ANA-15	8.7	
ANA-20	1.4	Brechas de lodo de rocas sedimentarias
ANA-25	1.8	
ANA-35	2.6	
ANA-52	4.4	
PIP-05	9.7	Arenas color marrón y de granos gruesos
PIP-10	9.5	
PIP-15	8.5	
PIP-25	5.4	
PIP-30	4.6	
PIP-40	7.8	Arena con restos de corales hermatípicos y bivalvos
PIP-35	6.7	

Tabla 7. Valores de Shannon por volcán y tipo de sedimento.

volcán	grupo 1	grupo 2	H'	p value
Anastasya	Lodo suave con alta concentración de gas y olor a ácido sulfhídrico	Brechas de lodo de rocas sedimentarias	4.5	0.03389485
Pipoca	Arenas color marrón y de granos gruesos	Arena con restos de corales hermatípicos y bivalvos	0.15	0.69853536

Los valores de pielou (J') para Anastasya fueron mayores a 0.90 en las muestras de los primeros 15 cmbsf lo que indica que al menos el 90% de las especies tienen la misma abundancia. Las muestras restantes de dicho volcán tuvieron valores de equitabilidad de abundancias de 0.8 o menores siendo ANA-20 la que obtuvo el valor más bajo ($J' = 0.2717$).

La uniformidad de abundancias de los primeros 15 cmbsf de ambos volcanes fue mayor a 0.90 en las muestras de los primeros 15 cmbsf, indicando una equitabilidad de abundancias alta. En este volcán el valor más bajo correspondió a la muestra de los 20 cmbsf ($J' = 0.5948$). El resto de las muestras tuvieron valores entre 0.2 y 0.89 (Tabla 8).

Tabla 8. Valores de Pielou de equitabilidad de abundancias.

Muestra	pielou_e (J')
ANA-05	0.9230
ANA-10	0.9115
ANA-15	0.9020
ANA-20	0.2717
ANA-25	0.3461
ANA-35	0.4963
ANA-45	0.7556
ANA-52	0.8081
PIP-05	0.9434
PIP-10	0.9344
PIP-15	0.9286
PIP-20	0.5948
PIP-25	0.8390
PIP-30	0.7164
PIP-35	0.8844
PIP-40	0.8935

A partir de los resultados obtenidos de la matriz de diversidad alfa filogenética (*faith PD*) no se encontraron diferencias significativas entre volcanes ($p=0.0285$) y con un valor $H'=9.0590$. Comparando entre los grupos dentro de cada volcán los valores fueron de $H'=4.5$ y $p=0.0338$ para Anastasya y $H'=0.1500$ y $p=0.6985$ para Pipoca, indicando que Anastasya presentó mayor diversidad que Pipoca.

La comparación filogenética dentro de los volcanes mostró diferencias significativas entre las muestras del volcán Anastasya ($p=0.0338$) y valor de $H'=4.5$. Dentro de los dos grupos identificados en Pipoca no se encontraron diferencias ($p=0.6985$ y $H'=4.5$).

3.6.2 Diversidad beta

El análisis de coordenadas principales computado a partir de la matriz de disimilitud de Bray-Curtis resolvió el 23.03% de la variabilidad dada por el componente 1 (tipo de sedimento) y 13.48% por el componente 2 (cmbsf). Se identificó un patrón definido con respecto a la profundidad de las muestras formado por dos grandes grupos, el primero formado por todas las muestras con valores menores a cero con respecto al C1 donde se posicionan todas las muestras del volcán Anastasya exceptuando ANA-35 y un segundo con las muestras cuyos valores de Bray-Curtis fueron mayor a cero y en el cual se agrupan todas las muestras del volcán Pipoca a partir de los 25 cmbsf en conjunto con ANA-35 (Figura 20a).

Tomando en cuenta el tipo de sedimento se lograron agrupar las muestras en 4 subgrupos. El grupo 1 está formado por las tres muestras correspondientes a los primeros 15 cmbsf del volcán Anastasya obtenidas de sedimento suave con alto contenido de gases y olor a ácido sulfúrico, este grupo mostró valores negativos en cuanto a la influencia de ambos componentes. El grupo 2 se conforma por las muestras de los primeros 15 cmbsf del volcán Pipoca obtenidas de arenas gruesas de color marrón. El tercer grupo lo forman las muestras de los 25, 30, 35 y 40 cmbsf de Pipoca y ANA-35 todas con valores mayores a 0.3 con respecto al C2 y con valores negativos relacionados al componente 1 y al grupo número cuatro el cual se conforma por las muestras correspondientes a las profundidades de 25, 30 y 52 cmbsf del volcán Anastasya y con valores positivos para ambos componentes, especialmente influenciadas por el C2 (> 0.5) (Figura 20a).

Los resultados obtenidos a partir de la matriz de distancias construida con los índices de Jaccard muestran dos grupos explicando la similitud de las muestras dada por un 14.15% por el C1 y 9.631% por el C2. Como

grupo 1 se tomó aquellas muestras cuya influencia por el C2 fuera menor a 0 quedando compuesto en su totalidad por muestras del volcán Anastasya. Este grupo se divide en dos subgrupos formados por la influencia del C1: el primero está formado por las muestras de los primeros 15 cmbsf y muestra valores de similitud menores a 0 y el segundo por las muestras restantes de dicho volcán, las cuales tienen valores de similitud mayores a 0.5. El segundo grupo se conforma por las muestras del volcán Pipoca, todas presentaron valores de similitud mayores a 0.1 con respecto al componente 2, indicando un alto nivel de similitud en relación a la profundidad de las muestras de dicho volcán, al contrario que las muestras del volcán Anastasya. Este último grupo no muestra subgrupos estrechamente definidos por lo que la diferencia solo se da por los valores obtenidos con respecto al componente 2 (Figura 20b).

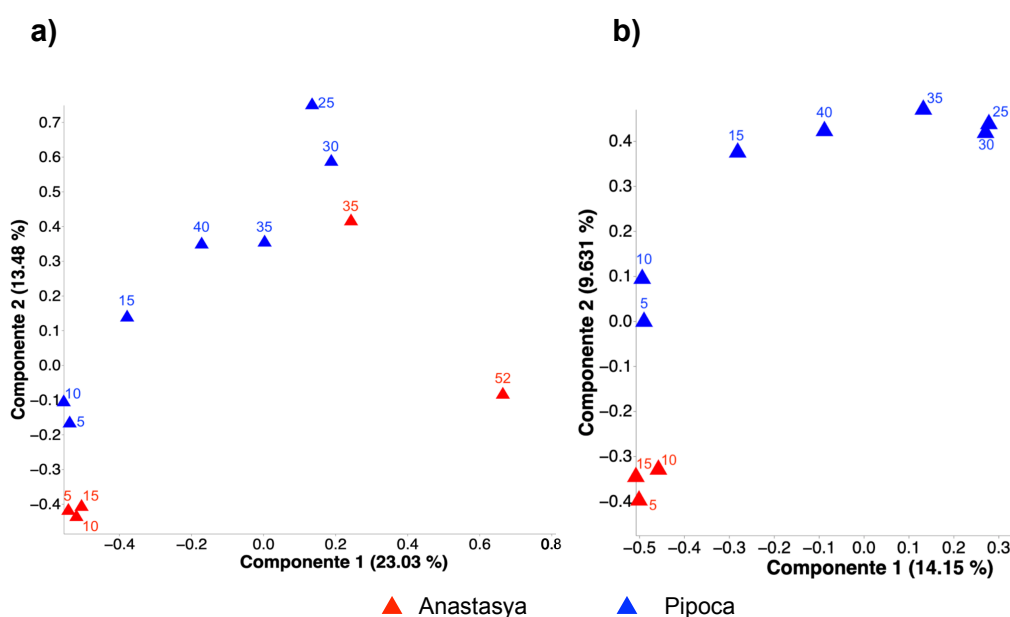


Figura 20. Análisis de coordenadas principales. a) PCoA construido con matriz de distancia de valores de Bray-Curtis y b) PCoA construido a partir de la matriz de distancia de valores de Jaccard. Los triángulos rojos representan las muestras de Anastasya y los azules las de Pipoca.

3.6.2.1 Distancias UniFrac

A diferencia de los valores que se obtienen a partir la matriz de disimilitud de Bray-Curtis, la distancia UniFrac es más informativa para examinar diferencias en la estructura de una comunidad pues construye las matrices en base en sus relaciones filogenéticas. La distancia UniFrac ponderada incorpora en el cálculo

las abundancias de las ramas compartidas y las no compartidas para calcular la distancia, por lo que el impacto de las bajas abundancias se reduce.

El PCoA computado a partir de las distancias UniFrac ponderadas explica el 40.65% de la variación por el C1 y 16.30% por el C2. Se pueden distinguir dos grupos: el primero formado por las muestras obtenidas de los sedimentos intermedios del volcán Anastasya (ANA-20 y ANA-25), las cuales están fuertemente influenciadas por el componente 2 con valores mayores 0.25 y una influencia negativa con respecto al C1 con valor de -1.0; el segundo grupo se forma con las muestras restantes las cuales tienen una influencia positiva dada por el C1 excepto la muestra ANA-05 la cual tiene un valor menores a cero. Las muestras PIP-15, PIP-25 y PIP-40 están altamente influenciadas por los dos componentes. Las muestras PIP-05 y ANA-15 están igualmente explicadas por ambos componentes (Figura 21a).

En contraste con las distancias UniFrac ponderadas, las distancias no ponderadas nos dan información cualitativa, ya que la primera toma en cuenta la abundancia de los organismos, mientras que la no ponderada solo toma en cuenta presencias y ausencias de cada grupo independientemente de su abundancia.

Los resultados obtenidos del PCoA construido a partir de la matriz de distancias UniFrac no ponderadas explicó el 40.58% de la variación por el C1 y 10.71% por el C2. Además mostró cuatro grupos definidos: dentro del grupo 1 se encuentran las muestras de los primeros 15 cmbsf del volcán Anastasya y PIP-05 y el cual se encuentra influenciado negativamente por ambos componentes; el grupo 2 está conformado por las muestras correspondientes a los 10, 15 y 40 cm del volcán Pipoca y está influenciado de forma positiva por el C2 y negativamente por el C1; el tercer grupo lo forman las muestras PIP-25 y PIP-35 ambas con valores positivos para ambos componentes y finalmente el grupo número 4 el cual está conformado por las muestras de los 20, 25 y 35 cm de Anastasya. Dicho grupo está influenciado de forma positiva por el C1 y negativamente por el C2 (Figura 21b).

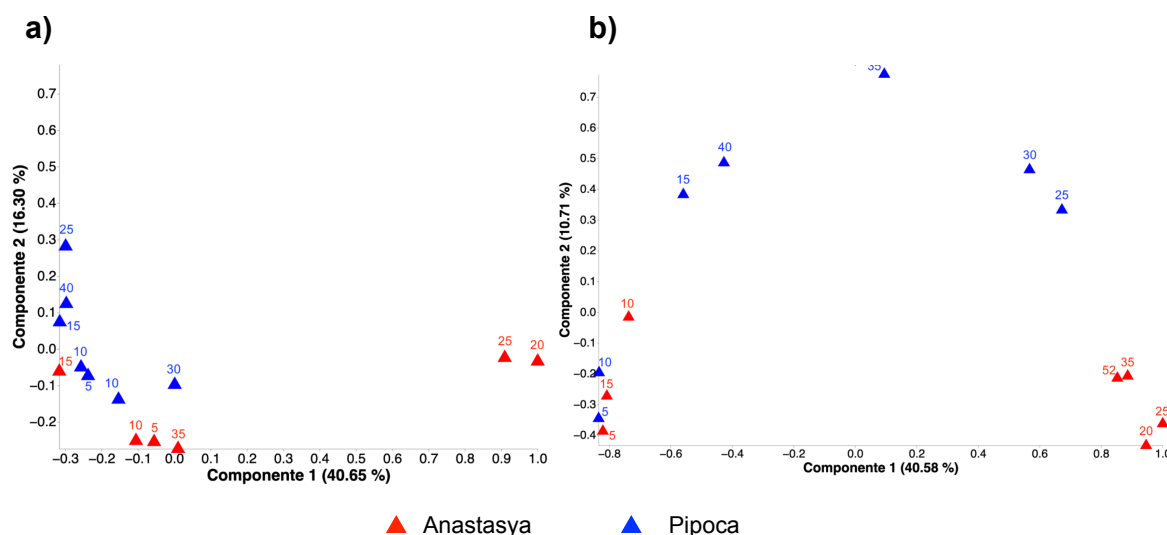


Figura 21. Análisis de coordenadas principales de distancias Unifrac. a) PCoA construido con matriz de distancias UniFrac ponderadas y b) PCoA construido a partir de la matriz de distancias UniFrac no ponderadas. Los triángulos rojos representan las muestras de Anastasya y los azules las de Pipoca.

3.5 Inferencias funcionales

3.5.1 Metagenomas predichos con la Enciclopedia de Genes y Genomas de Kyoto (KEGG)

El programa PICRUSt2 predice los metagenomas presentes en las muestras comparando los datos computados contra datos de metagenomas ya depositados en bases de datos. La enciclopedia de genes y genomas de Kyoto (KEGG, por sus siglas en inglés) es un recurso que nos ayuda a comprender las funciones y posibles utilidades de un sistema biológico, especialmente conjuntos de datos moleculares generados a partir de secuenciación masiva. La actualización más reciente de esta base de datos fue en octubre del 2020.

Se obtuvo una lista de 6554 genes diferentes en todas las muestras, de los cuales el 77% están relacionados con el metabolismo basal, 9% con el procesamiento ambiental, 4% con información genética y procesamiento y procesos celulares, 5% con enfermedades humanas y 2% con sistemas de los organismos (Figura 22).

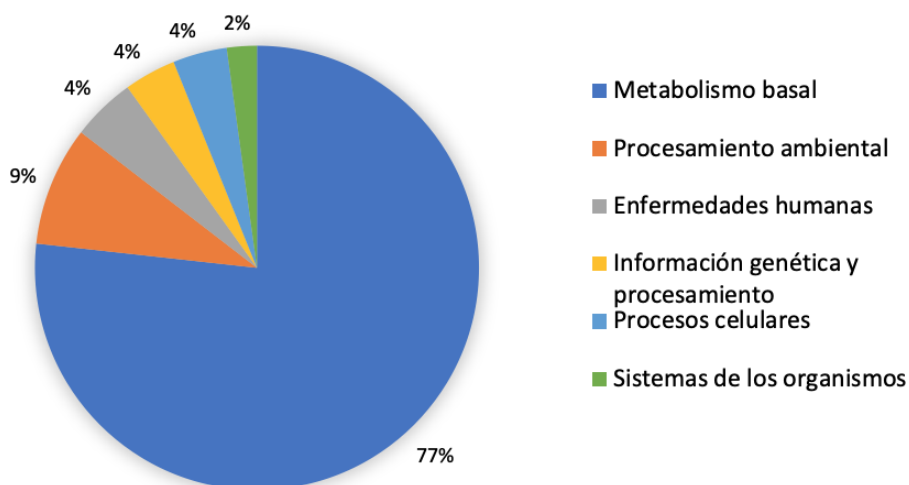


Figura 22. Porcentajes de genes identificados con KEGG.

Dentro de las rutas que conforman el metabolismo basal o *housekeeping* se encuentra la producción de energía. Ésta representó el 7% con un total de 548 genes ortólogos identificados (Figura 23) y la cual se puede dar por cualquiera de las siguientes rutas: fosforilación oxidativa, fotosíntesis, fotosíntesis con proteínas antenna, fijación de carbono en organismos fotosintéticos, fijación de carbono en procariotas, metabolismo del nitrógeno, metabolismo del sulfuro y metabolismo del metano.

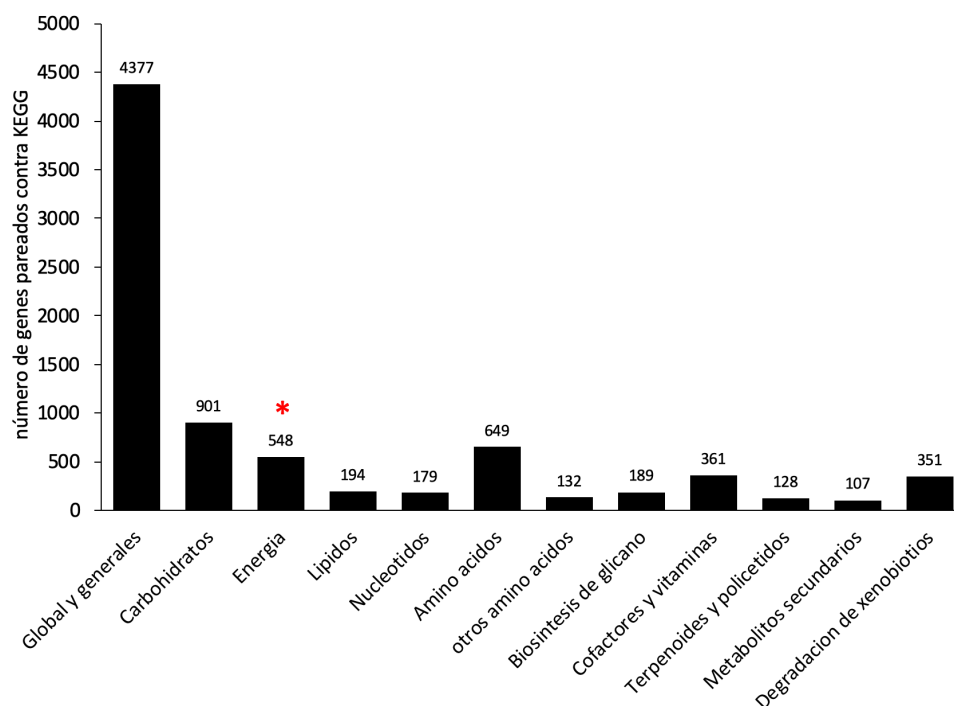


Figura 23. Número de genes ortólogos para cada ruta metabólica pertenecientes al metabolismo basal. El asterisco indica los genes del metabolismo energético.

De los 548 genes identificados para la producción de energía, el metabolismo del metano fue el más abundante con 156 genes ortólogos inferidos (29%). Dicho metabolismo incluye rutas asimilatorias (AOM) y productoras de metano (metanogénesis). (Figura 24).

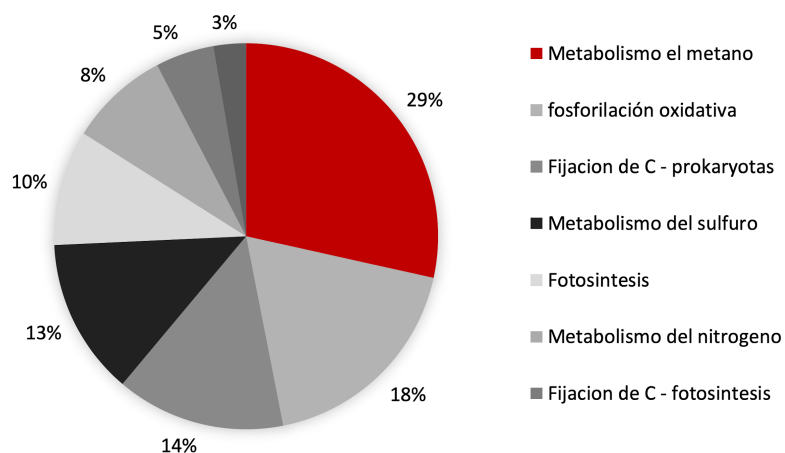


Figura 24. Porcentajes de genes ortólogos identificados con KEGG relacionados al metabolismo energético.

El mapa de calor computado con el programa PICRUSt2 a partir de la matriz de abundancias de número de genes y sus respectivas copias por muestra formó dos cluster bien definidos: el primero dado por las muestras pertenecientes a los 5, 10, 15 y cmbfsf del volcán Anastasya y las correspondientes a los 5 y 40 cm de Pipoca.

Los datos de la abundancia de los genes responsables de los distintos metabolismos energéticos por cada muestra, mostró que el modo de obtención de energía a través de la fosforilación oxidativa fue el más abundante. Esto indica que, si bien el metabolismo del metano el cual es el que presenta el mayor número de genes diferentes, no mantiene una relación directa con el número de copias encontradas. Esto puede ser debido a que para llevar a cabo reacciones de vías compartidas entre todos los metabolismos energéticos es necesario el intercambio de electrones a través de la fosforilación oxidativa. Aunque el metabolismo del metano fue el más abundante en cuanto a los distintos genes identificados, este fue el tercer metabolismo energético más abundante en cuanto al número de copias de genes. La muestra con mayor número de copias fue ANA-20 seguida de ANA-25. El resto de las muestras pertenecientes al primer cluster presentaron abundancias significativas.

El segundo metabolismo energético en cuanto a la abundancia de copias fue la fijación de carbono por procariotas. Este metabolismo fue más abundante en la muestra ANA-20 seguida de ANA-05 y PIP-05; el segundo cluster se formó por aquellas muestras que presentaron 4289065 copias de genes totales de todos los metabolismos o menos (Figura 25).

La muestra con mayor número de genes pertenecientes al metabolismo del sulfuro fue ANA-20, seguida de ANA-25. El resto de las muestras pertenecientes al primer cluster y responsable de este metabolismo energético no mostraron abundancias significativas.

El número de genes identificados y sus respectivas abundancias para cada vía metabólica formaron dos clusters bien definidos. El primero formado por las tres vías energéticas con mayor número de copias de genes (mayores a 11048512). El segundo cluster incluye el resto de las vías energéticas y el cual a su vez forma dos subgrupos: el primero formado por el metabolismo del sulfuro/metabolismo del nitrógeno y el segundo por fijación de carbono por organismos fotosintéticos y la fotosíntesis. La fotosíntesis acoplada a proteínas antena se ubica en el segundo cluster fuera de los dos grupos ya mencionados (Figura 25).

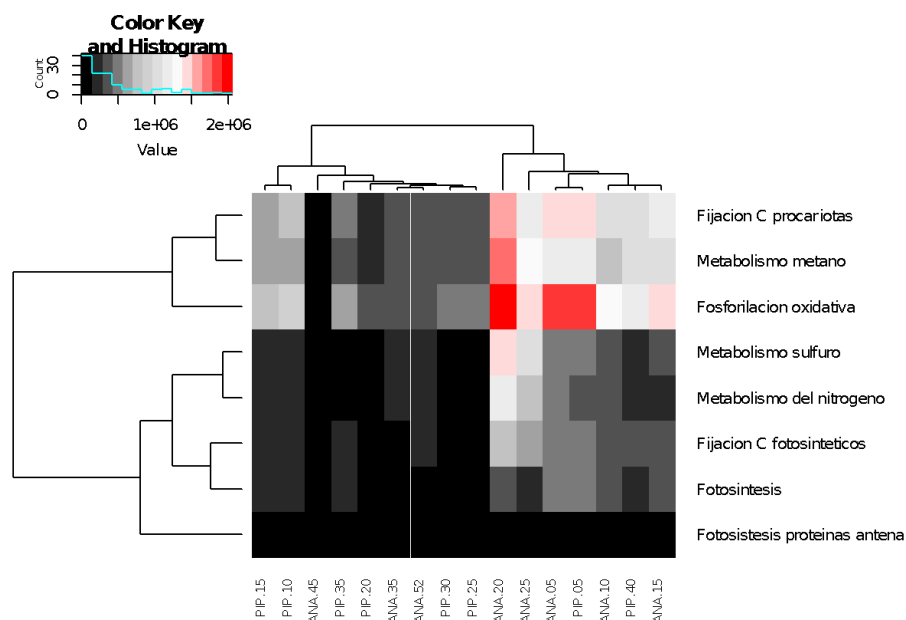


Figura 25. Mapa de calor construido con las abundancias del número de genes de cada metabolismo energético por muestra.

3.5.2 Metabolismo del metano

El metabolismo del metano está formado por diez rutas: metanogénesis a partir de CO_2 , metanogénesis a partir de acetato, metanogénesis a partir de metanol, metanogénesis a partir de compuestos metilados (metilamina/dimetilamina/trimetilamina), la extensión de la cadena del ácido 2-Oxocarboxílico, un precursor del 2-oxosuberato y la coenzima B, la oxidación del metano por metanotrofos para formar formaldehído, asimilación del formaldehído por la ruta de la serina, asimilación del formaldehído por la ruta de la ribulosa monofosfato, biosíntesis del factor F420, la ruta de Acetyl-CoA, biosíntesis de la coenzima M, asimilación de formaldehído vía xilulosa monofosfatasa y la biosíntesis de metafurano.

De las rutas mencionadas, las cuatro rutas específicas para la producción de metano fueron las más abundantes siendo estas la metanogénesis a partir de CO_2 con un 24%, seguida de la metanogénesis a partir acetato, metanogénesis a partir de compuestos metilados y la metanogénesis a partir de metanol con un 20%, 16% y 13% respectivamente (Figura 26).

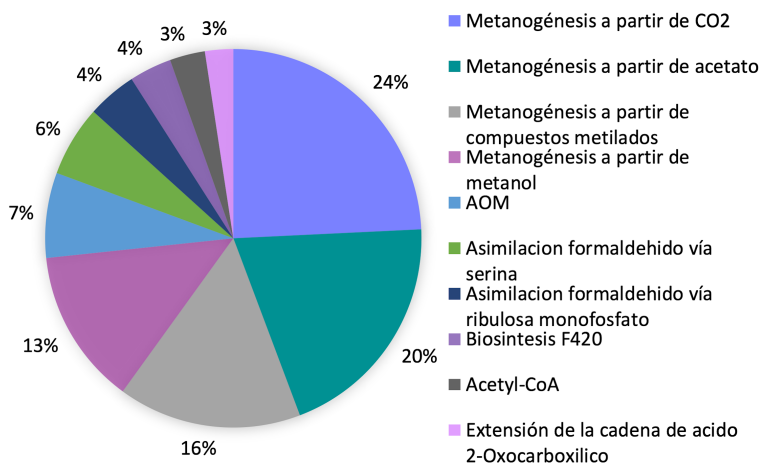


Figura 26. Abundancias de genes ortólogos identificados con KEGG pertenecientes al metabolismo del metano.

El mapa de calor construido con el programa PICRUSt2 nos muestra el número de copias de genes involucrados en el metabolismo del metano por muestra. Con este análisis se identificó la presencia de todas las vías metabólicas que participan en el metabolismo del metano con abundancias considerables en las muestras PIP-05, ANA-05 y ANA-15 (Figura 27).

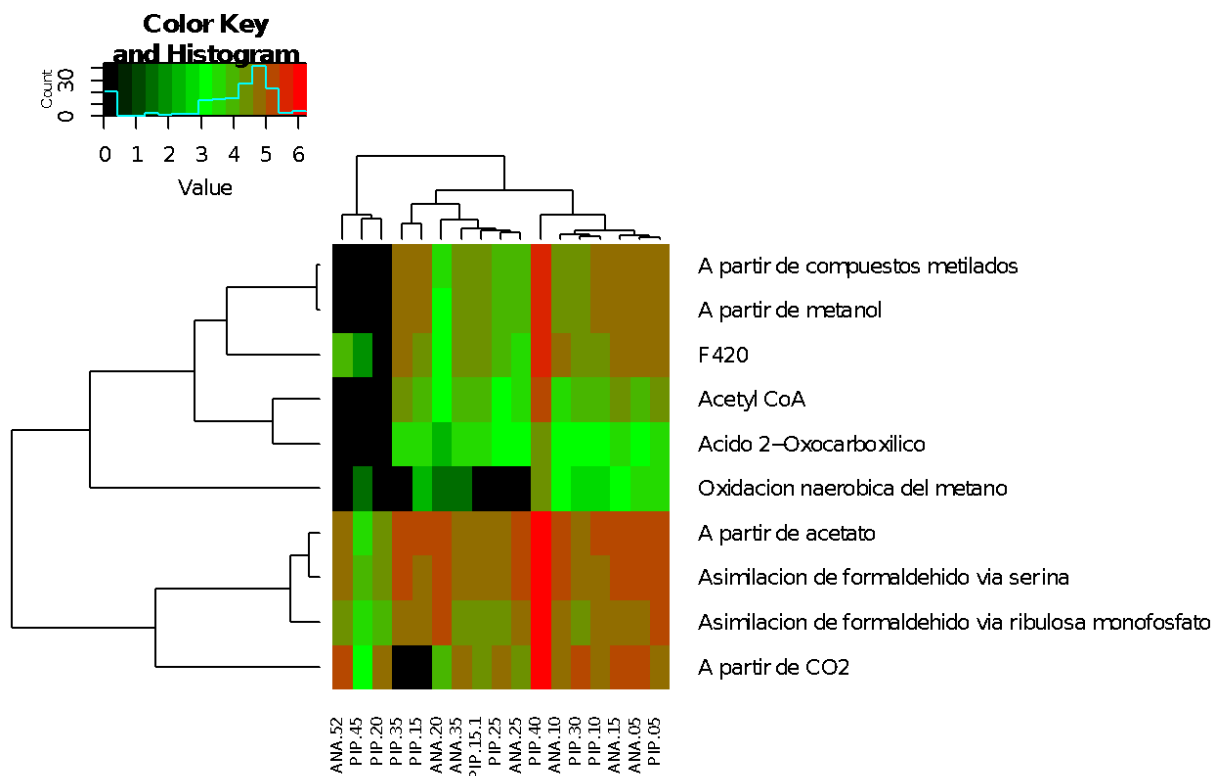


Figura 27. Mapa de calor de las rutas involucradas en el metabolismo del metano.

Se indago en los resultados relacionados estrechamente con las cuatro vías de producción de metano, observándose que la metanogénesis acetilotrónica fue la más abundante de las cuatro con un total de 1 804 939 copias de genes. Los números de copias de genes involucrados en las tres vías restantes fueron: 1086524 de la metanogénesis a partir de CO₂, 53188 de la metanogénesis metilotrónica y 491270 para la metanogénesis a partir de metanol.

La muestra con mayor abundancia de genes pertenecientes a la metanogénesis acetilotrónica es ANA-20 con 239422 copias, las cuales pertenecen en su mayoría a la biosíntesis de la Acetyl CoA sintetasa, acetato cinasa y fosfato acetiltransferasa (Figura 28).

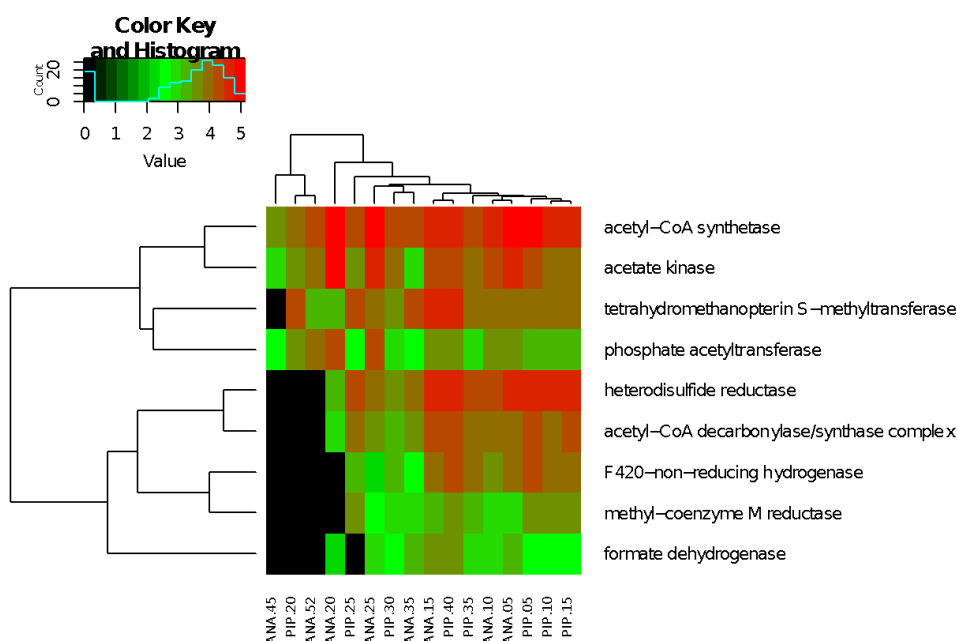


Figura 28. Mapa de calor de los genes involucrados en la metanogénesis acetilotrónica.

Se identificaron 1086524 copias de genes pertenecientes a vía de la metanogénesis a partir de CO₂. Las muestras con las abundancias más altas fueron ANA-05, PIP-05, ANA-15 y PIP-40. Esta última presentó la mayor abundancia de todas las vías necesarias para este tipo de metanogénesis con 180372 copias de genes involucrados en el proceso. Las muestras ANA-20 y ANA-52 fueron las que presentaron los valores más bajos de abundancias con 7,233 y 1292 copias (Figura 29).

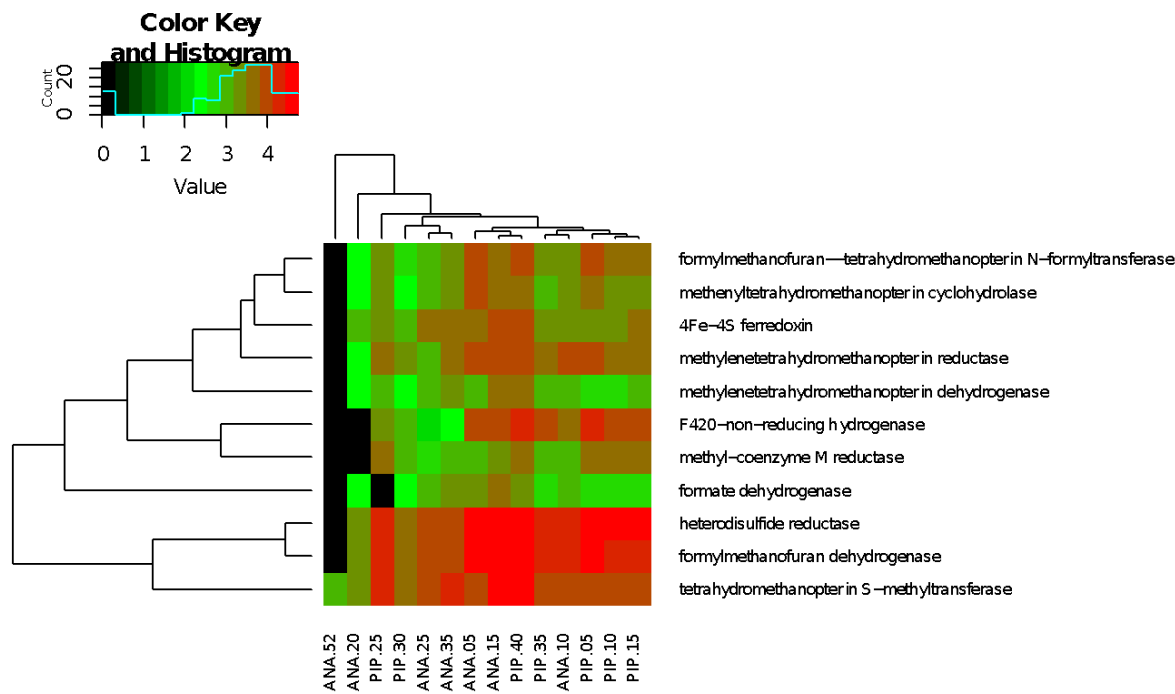


Figura 29. Mapa de calor de los genes involucrados en la metanogénesis a partir de CO₂.

El número de copias de genes responsables de la metanogénesis acetilotrófica fueron 531888. Las vías relacionadas a este metabolismo energético más abundantes fue la biosíntesis de la heterodisulfuro reductasa con 342031 copias de genes. Las muestras con mayor abundancia de genes fueron PIP-10 (50252), PIP-15 (52316), PIP-05 (78077), ANA-15 (76612) y PIP-40 (85914). En las muestras ANA-45, ANA-53 y PIP-20 no se infirió ningún gen relacionado a este tipo de metanogénesis (Figura 30).

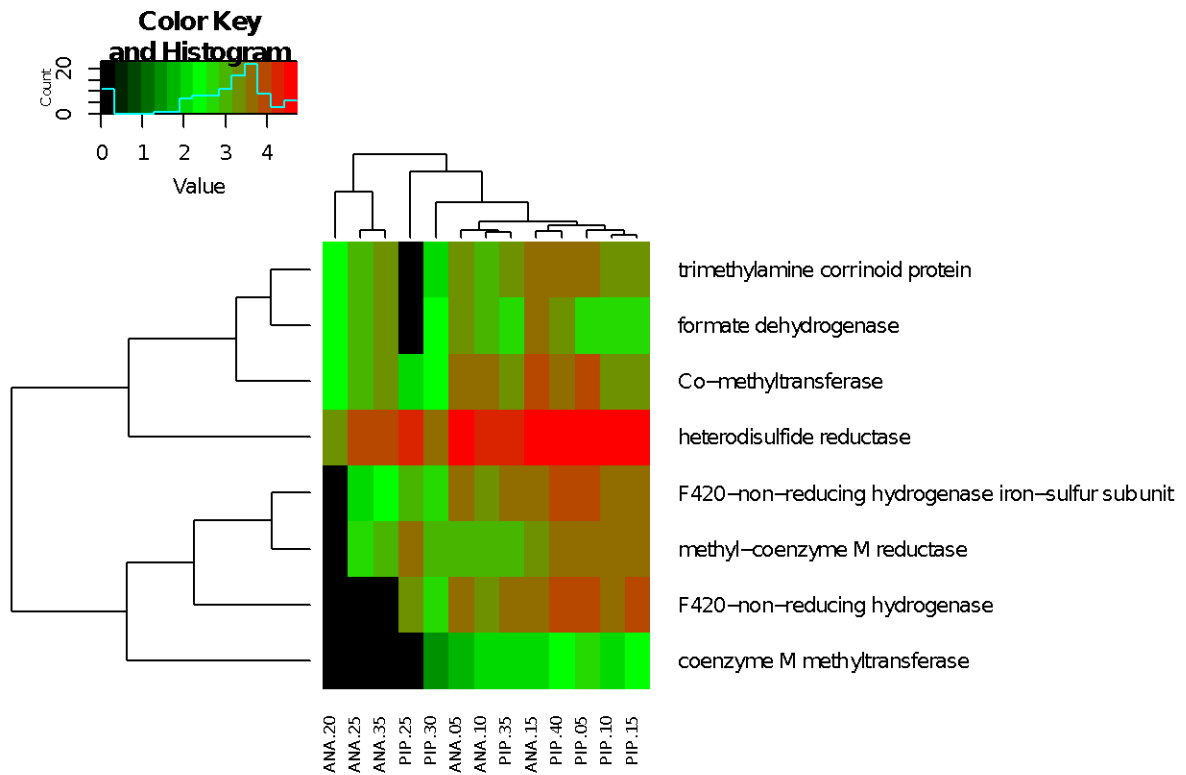


Figura 30. Mapa de calor de los genes involucrados en la metanogénesis metilotrófica.

La producción de metano a partir de metanol fue la vía que presentó el menor número de copias de genes con 491370. La vía con mayor abundancia fue la biosíntesis de la heterodisulfuro reductasa con 331584 copias. Las muestras con mayor abundancia fueron ANA-15 y PIP-40 con 70466 y 70022 copias de genes respectivamente. En las muestras ANA-45, ANA-52 y PIP-20 no se identificó ningún gen responsable de este tipo de metanogénesis (Figura 31).

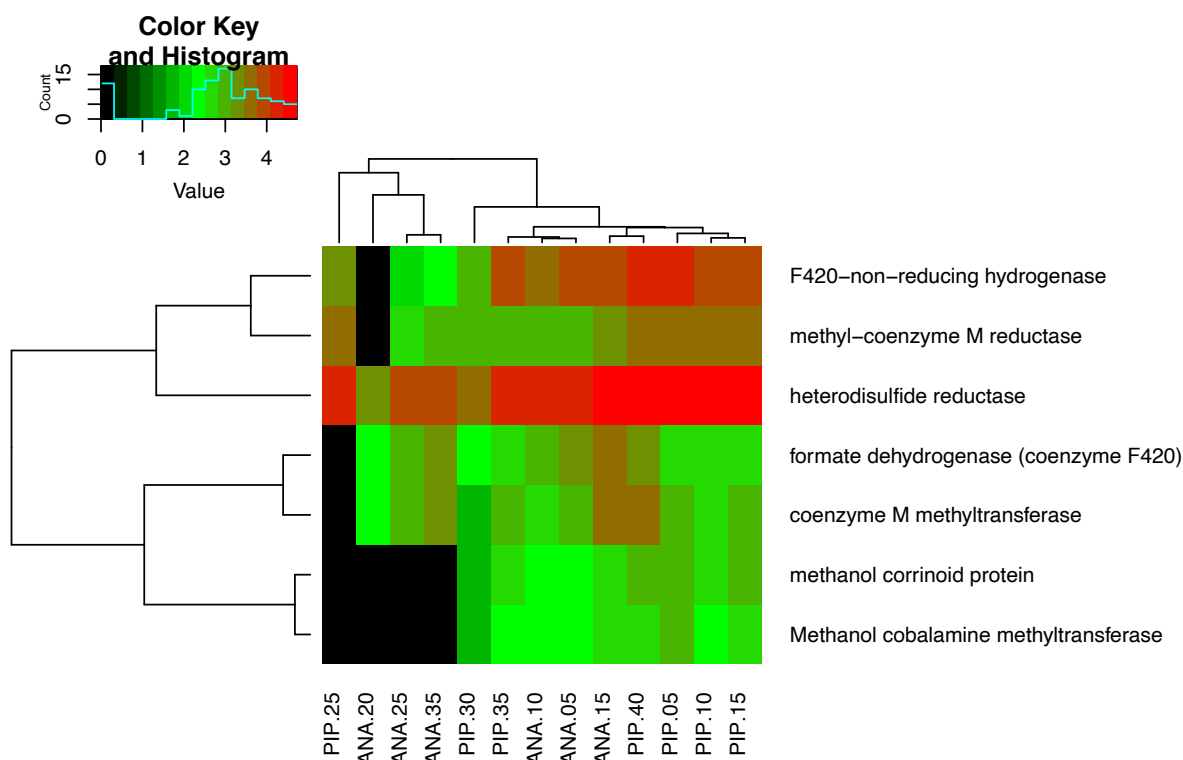


Figura 31. Mapa de calor de los genes involucrados en la metanogénesis a partir de metanol.

3.5.3 Relaciones sulfuro-metano en el volcán Anastasya

En las muestras de los primeros 15 cmbsf, el valor más alto de número de genes fue el correspondiente al metabolismo general del metano, seguido de la metanogénesis y por último las relacionadas al metabolismo del sulfuro. En estos primeros 15 cmbsf la familia más abundante de bacterias reductoras de sulfato BRS fue Desulfobulbaceae, seguida de Desulfobacteraceae y uncultured Thioalkalivibrio sp y las familias metanogénicas Methanomasiliicoccales, Methanosarcinaceae y Methanoperedeneaceae. A los 20 cmbsf hay una reducción abrupta en cuanto al metabolismo general del metano y la metanogénesis, quedando esta última por debajo del metabolismo general del sulfuro y muy cercana a la reducción del sulfato. En dicha profundidad no se identificaron miembros de arqueas metanogénica y la familia de BRS más abundante fue Xanthobacteraceae. A los 25 cmbsf solo los valores de metanogénesis se mantienen, el resto decaen. En esta profundidad se identificaron miembros metanogénicos pertenecientes en su totalidad a la familia Methanomasiliicoccales y la familia dominante de BRS fue Xanthobacteraceae. En los 35 cmbsf las copias de genes de ambos metabolismos decae por debajo de las 300000 copias, quedando

el metabolismo general del sulfuro y la reducción del mismo con valores iguales. No se identificaron miembros metanogénicos y la familia BRS más abundante fue Pseudomonadaceae. En la muestra de los 45 cmbsf todos los valores decaen por debajo de las 100000 copias de genes, siendo la familia BRS Aeromonadaceae la más abundante. Sin embargo, esta muestra presentó complicaciones para su amplificación y fue de la que se obtuvo la menor cantidad de reads (2147), lo que podría explicar el bajo número de copias. Finalmente, en la muestra de los 52 cmbsf ambos metabolismos se mantienen por debajo de los 300000 números de copias. No hay miembros metanogénicos y la familia de BRS más abundante fue Xanthobacteraceae (Figura 32).

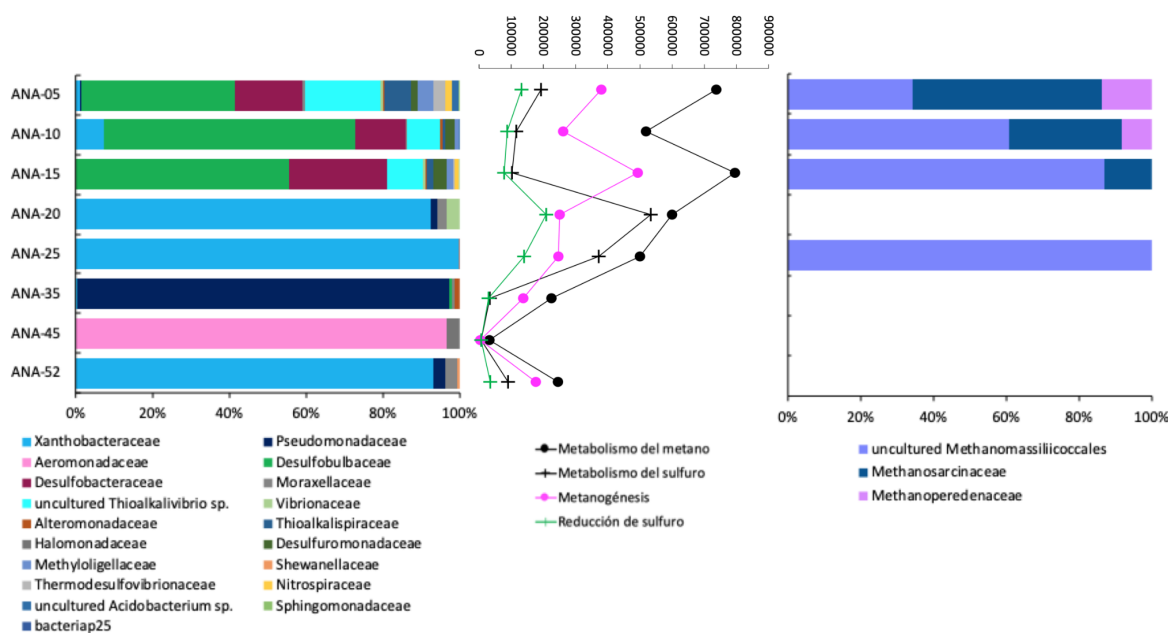


Figura 32. Metabolismos del sulfuro y metano y perfiles taxonómicos relacionados. El panel de la izquierda indica las familias BRS presentes por cada muestra, el panel intermedio representa el número de copias de genes inferidos para cada metabolismo, así como las rutas de interés y el panel de la derecha indica las familias metanogénicas identificadas por cada muestra.

3.5.4 Relaciones sulfuro-metano en el volcán Pipoca

En general, el número de copias de genes responsables del metabolismo general del sulfuro y de la reducción del sulfuro presentan valores bajos a lo largo del núcleo de sedimento siendo todos los valores menores a las 200000 copias. Solo los valores de la muestra PIP-05 muestran ligeras diferencias entre ellos. En la muestra PIP-05, el metabolismo general del metano sobrepasa las 800000 copias de genes siendo

este el más alto. El número de copias de los genes responsables de la metanogénesis es cercano a los 400000 en la muestra PIP-05 y las familias de BRS fueron Desulfobacteraceae y Desulfobulbaceae, las cuales dominaron en más 70%. Las familias metanogénicas identificadas fueron Methanomasiliicoccales y Methasarcinaceae. En las muestras correspondientes a los 10 y 15 cmbsf los valores relacionados al metabolismo del metano se reducen por debajo de las 50000 y 400000 (metabolismo general) y por debajo de las 300000 y 200000 copias (metanogénesis) respectivamente. En esta profundidad, las familias de BRS más abundantes fueron Desulfobacteraceae, Desulfobulbaceae (ambas con los mismos valores de valores de abundancia para ambas muestras) y Morexellaceae dominando estas más del 70%. Las familias metanogénicas identificadas fueron Methanomasiliicoccales y Methanosarcinaceae. A los 20 cmbsf, los valores del metabolismo caen abruptamente, por debajo de las 200000 copias, lo cual se explica por la ausencia total de miembros del dominio Archaea en esta la muestra, ya que solo se identificó la familia BRS Moraxellaceae. En la muestra PIP-25, las copias del metabolismo del metano aumentan ligeramente, aunque sin cambiar en orden de magnitud. Las familias BRS más abundantes fueron Moraxacellaceae, Desulbulbaceae, Desulfobacteraceae y Alteromonadaceae. La familia metanogénica Methanofastidiosales fue la única en dicha profundidad. A los 30 cmbsf, los valores del metabolismo del metano se mantienen. En esta profundidad las familias de BRS más abundantes fueron Thioalkadirispiaceae, Moraxellaceae y Desulfobacteraceae y la familia metanogénica Methanosarcinaceae fue la única identificada. En la muestra correspondiente a los 35 cmbsf los valores del metabolismo del metano aumentan por arriba de las 300000 copias (metanogénesis) y de las 500000 para el metabolismo general del metano, valores cercanos a los de la muestra PIP-10. Las familias BRS más abundantes fueron Desulfobulbaceae y Desulfobacteraceae. Las familias metanogénicas presentes fueron Methanomasiliicoccales y Methanosarcinaceae. En la muestra de los 40 cm los valores pertenecientes al metabolismo del metano aumentaron drásticamente hasta superar las 600000 copias. Las familias BRS dominantes fueron Desulfobacteraceae, Thioalkalivibrio, Desulfobulbaceae y Moraxellaceae. Las familias de arqueas presentes fueron Methanomasiliicoccales y Methanosarcinaceae (Figura 33).

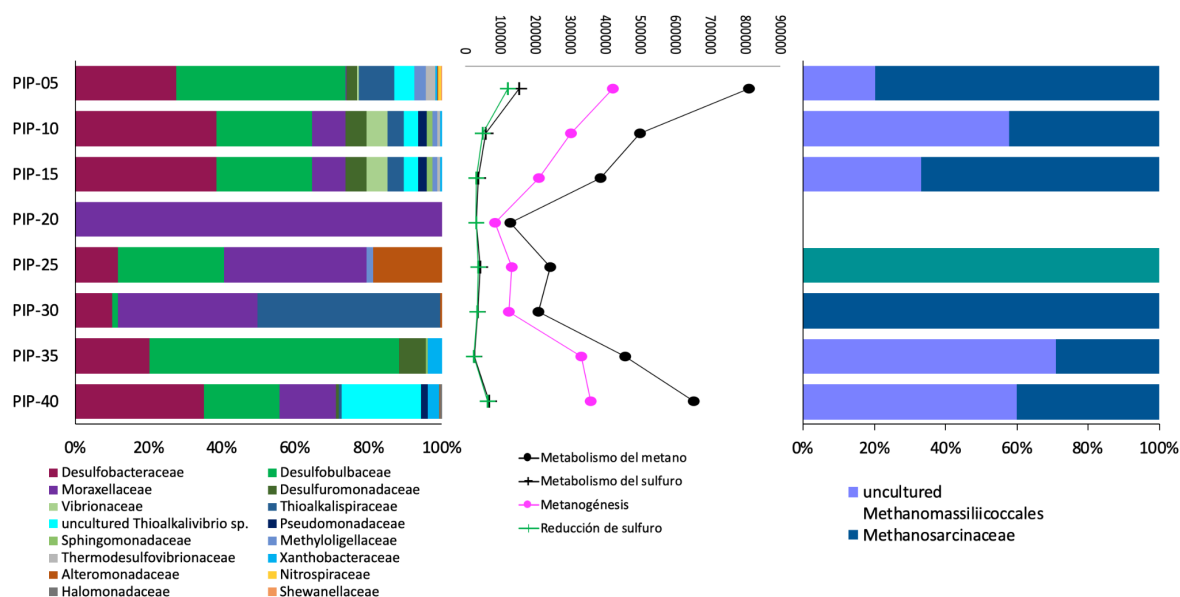


Figura 33. Metabolismos del sulfuro y metano y perfiles taxonómicos relacionados de muestras de los volcanes Pipoca y Anastasya del golfo de Cádiz. El panel de la izquierda indica las familias BRS presente por cada muestra, el panel intermedio representa el número de copias de genes inferidos para cada metabolismo así como las rutas de interés y el panel de la derecha indica las familias metanogénicas identificadas por cada muestra.

Capítulo 4. Discusión

4.1 Diversidad de procariotas en los volcanes de lodo

La abundancia relativa de los dominios Archaea y Bacteria fue del 11 y 89% respectivamente. Estos porcentajes coinciden parcialmente con el estudio más reciente (Hoshino e Inagaki, 2018) de caracterización de núcleos de sedimento de ventilas hidrotermales de diferentes sitios del planeta y en el cual determinaron valores de abundancias relativas de células de arqueas con valores de del 1 al 50.4% y que éstas en promedio constituyen el 37.3% del total de células microbianas en los sedimentos marinos. Sin embargo, de las abundancias reportadas por Hoshino e Inagai (2018), 25 presentaron valores muy cercanos a las obtenidas en este trabajo (10.1 a 14.3%) y las cuales fueron obtenidas de profundidades variables que van desde los 427 a 5088 metros de profundidad y de 0.3 a 202.5 metros bajo en fondo marino (mbsf) y que se pueden considerar zonas de muestreo más parecidas a las analizadas por nosotros.

Otros estudios también han reportado abundancias relativas de arqueas y bacterias cercanas a las obtenidas en este trabajo. En muestras de sedimentos colectados de ventilas hidrotermales de distintas partes del planeta, con profundidades de 972 a 1398 mbsf, se determinaron valores de abundancias de miembros del dominio Archaea de 3 a 26.5% y de miembros del dominio Bacteria de 73.5 a 97% y en las cuales hay las condiciones de alta temperatura, flujo de CO₂, CH₄, H₂S y otros hidratos de carbono (Takai y Horikoshi, 1999), que suponemos similares a las de este estudio, dado que de momento no tenemos todos los datos fisicoquímicos de nuestros núcleos, pero sí los datos reportados en otros trabajos (Somoza et al., 2003 y Sierra et al., 2020).

Cuando nos centramos en estudios realizados específicamente en volcanes de lodo, existen algunos trabajos, aunque pocos, describiendo la estructura microbiana de este tipo de estructuras, donde también se reportan resultados similares a los encontrados en este trabajo. Por ejemplo, de un núcleo procedente de un volcán, a 600 mbsl y con 12 cmbsf de profundidad, obtenido en el golfo de México se calculó una abundancia relativa de arqueas del 20% (Martínez et al., 2006). En cuatro volcanes del Margen Ibérico Occidental localizados a más de 4000 mbsl se determinó la estructura de microeucariotas y de bacterias encontrando que el filo más abundante de bacterias era Proteobacteria (> 60%), seguida de Actinobacteria y Chloroflexi (~ 5%) y cuya abundancia disminuyó conforme aumentaba la profundidad en cmbsf. En el mar Mediterráneo se han reportado abundancias de arqueas de 11.73% y 88.27% de bacterias en muestras

colectadas a 30 cmbsf de profundidad y con una resolución de 5 cm (misma utilizada en este trabajo) (Pachiadaki, 2011). Todos estos datos muestran un patrón similar a los encontrados en este trabajo.

Los valores de diversidad alfa y beta mostraron, en general, una disminución de los valores de diversidad en relación a la profundidad y se identificaron grupos bien definidos en ambos volcanes en relación al tipo de sedimento. Cada volcán mostró dos grupos diferenciados. Los rangos en los valores de H' de los dos grupos que forman Anastasya fueron de 8.5 a 9.3 en las muestras de los primeros 15 cmbsf y de 1.4 a 4.4 en las muestras más profundas. Esta tendencia descendente en los valores de diversidad concuerda con los resultados de los estudios anteriormente mencionados, ya que es sabido que la abundancia relativa de genes de ARNr 16S de arqueas y bacterias generalmente disminuye con la profundidad del sedimento (Hoshino e Inagaki, 2018). Sin embargo, dicho patrón de diversidad no se presenta en Pipoca. En este volcán los valores de diversidad fueron variables a lo largo de la columna sedimentaria fluctuando de 8.5 a 9.7 en los primeros 15 cmbsf, 4.6 y 5.3 en los 20 y 25 cmbsf y de 6.7 y 7.8 en los 35 y 40 cmbsf. La información consultada que describe los tipos de sedimento en este volcán (Somoza et al., 2003) diferencia dos grupos: el primero formado por las muestras de los primeros 30 cmbsf, fracción del núcleo en la cual se observó el patrón descendente de valores de diversidad que se ha reportado en estudios relacionados. El segundo grupo está formado por las muestras PIP-35 y PIP-40, en las cuales los valores de H' aumentan y el tipo de sedimento cambia de arena de granos gruesos y arcilla a arena con restos de corales hermatípicos. Esto podría sugerir que además de la profundidad en cmbsf, posiblemente las características edafológicas contribuyen a la estructura de la comunidad procariótica. Sin embargo, el debate sobre la contribución y distribución de miembros del dominio Archaea en la biosfera sedimentaria del subsuelo y su dinámica energética sigue abierto, ya que la recolección y estudio de muestras de sedimentos marinos profundos es reciente (Hoshino e Inagaki, 2018).

4.2 Arqueas metanogénicas

En ambos volcanes el filo más abundante fue Euryarchaeota, que es el único taxón que incluye organismos metanogénicos. La resolución a nivel de orden permitió identificar tres grupos metanogénicos: Methanosarcinales, Methanofasdisiosales y Methanomasiliicoccales y cuatro familias: uncultured Methanomasiliicoccales, Methanoperedenaceae, Methasarcinaceae y uncultured Methanofastidiosales. El filo Euryarchaeota originalmente se clasificaban en seis órdenes: Methanomicrobiales,

Methanobacteriales, Methanosarcinales, Methanococcales, Methanocellales y Methanopyrales de los cuales solo se identificó Methanosarcinales en las muestras de ambos volcanes. Un orden adicional de metanógenos fue propuesto por Paul et al., 2012 y que fue confirmado Dridi et al. (2012) gracias al aislamiento de *Methanomassiliicoccus luminyensis*, el único miembro cultivado dentro de este nuevo orden Methanomassiliicoccales (Oren y Garrity, 2018). Estudios recientes muestran que el orden Methanomassiliicoccales tiene un metabolismo energético diferente al resto de los metanógenos y en los cuales se ha demostrado que *M. luminyensis* obtiene energía a partir del metanol y H₂ (Borrel et al., 2012; Dridi et al., 2012; Paul et al., 2012; lino et al., 2013).

El orden Methanomasiliicoccales se encontró en 8 de las 10 muestras con miembros metanogénicos. En Anastasya la abundancia de este grupo aumentó conforme la profundidad dominando en 100% la comunidad metanogénica de ANA-25 siendo el único grupo metanogénico en dicha muestra. En Pipoca los porcentajes de dicha familia no mostraron una tendencia clara fluctuando entre 25 y 70% (Figura 34). A la fecha, dicho orden sólo ha sido reportado en heces fecales de humanos y rumiantes y en ambientes dulceacuícolas está estrechamente relacionado al fenómeno de eutrofización. Por ejemplo, Söllinger et al. (2016) identificaron dos grupos de Methanomasiliicoccales de muestras procedentes de cuerpos de agua de Alemania, Austria e Italia y en el rumen de distintos animales a partir del 16S ARNr usando el gen marcador de metanógenos *McrA*. La librería de clones mostró que generaron presentaba un cluster de OTUs (Unidad Taxonómica Operacionales) que comprendía la mayoría de los Methanomassiliicoccales identificados en humedales. Los resultados mencionados concuerdan con los obtenidos en este trabajo en varios puntos: 1) la abundancia reportada de Methanomasiliicoccales fue de más del 50% del total de metanógenos y en este trabajo la abundancia de dicho orden fue de mayor al 50% en 6 de las 11 muestras de ambos volcanes en las que se identificaron metanógenos (Figura 34). Con esto se puede sugerir que en el volcán Anastasya hay una cantidad de materia orgánica disuelta mayor a la de Pipoca, ya que como se sabe, el metano es el producto final de la fermentación de materia orgánica y en Anastasya la abundancia de este orden fue es mayor, dominando incluso la muestra de los 25 cmbsf. 2) Esto se ve reforzado por los resultados obtenidos de las inferencias funcionales que mostraron que las muestras superficiales de Anastasya contenían un mayor número de genes relacionados específicamente con el metabolismo energético del metano, siendo notoriamente más abundantes con respecto al resto de las muestras (Figura 24).

La familia Methanosarcinaceae fue la segunda más abundante de las familias metanogénicas de ambos volcanes. A la fecha no hay reportes que profundicen en la distribución y actividad metabólica de esta familia. En este trabajo, el orden Methanosarcinales se encontró en las muestras correspondientes a 5,

10, 15 y 25 cmbsf del volcán Anastasya y en todas las muestras del volcán Pipoca donde se identificaron arqueas. La primera vez que se identificaron los miembros del grupo ANME fue en muestras de un sitio con hidratos de gas, en California (Eel River Basin) por Hinrichs et al. (1999) mediante cultivo. Los análisis que realizaron permitieron caracterizar un tipo específico de lípidos en su membrana, que pueden ser usados como biomarcadores para este grupo. Usando estos biomarcadores se han reportado miembros de Methanosarcinales en muestras recuperadas de volcanes de lodo del mar Mediterráneo (Pancost et al., 2001), sin embargo, estos miembros no fueron conspicuos en la prueba isotópica ^{13}C indicando que el metano era la fuente de carbono para estos microorganismos. Nuestro trabajo contribuye por tanto a reforzar la presencia de este grupo en los volcanes de lodo.

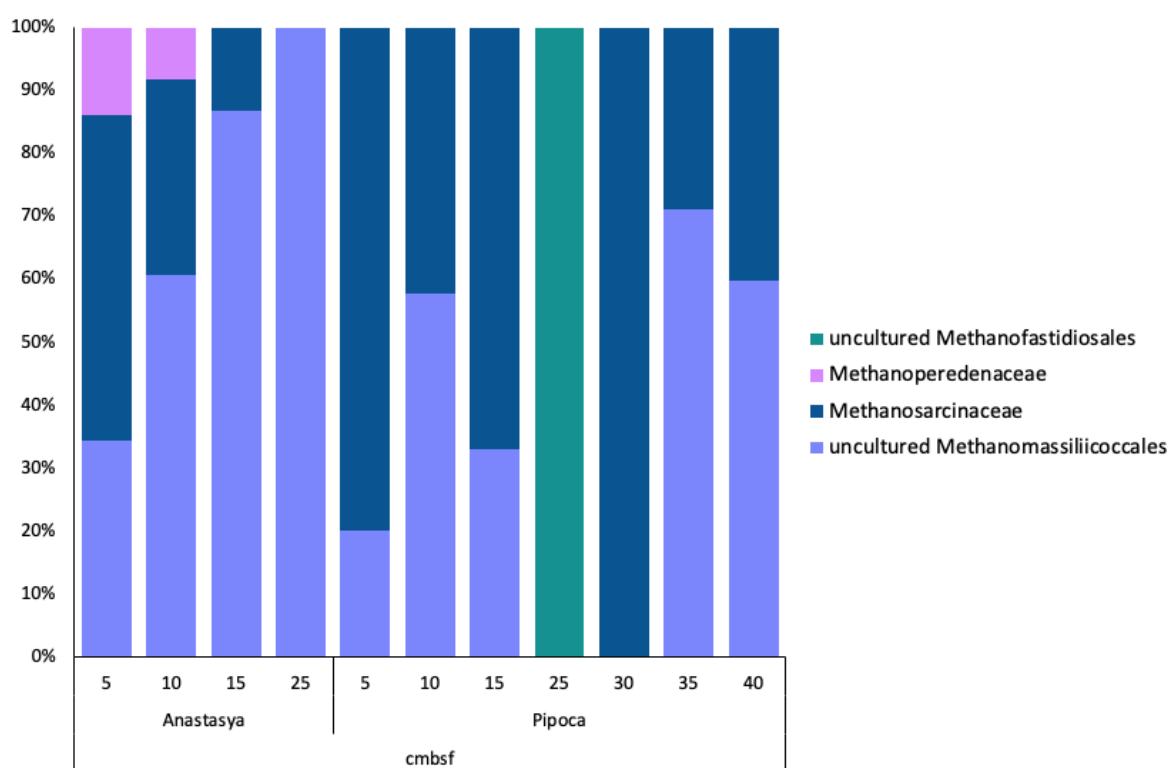


Figura 34. Abundancias relativas de familias de arqueas metanogénicas.

4.3 Relaciones sintróficas sulfuro-metano

En los perfiles taxonómicos determinados en este trabajo se identificaron los géneros de bacterias reductoras de sulfato (BRS) *Pseudomonas*, *Acinetobacter*, *Alteromonas*, *Shewanella*, *Bradirhizobium*,

Spirochaeta, *Desulfuvibrio*, *Desulfobolbus*, *Desulfococcus* y *Desulfocapsa* en las muestras de los primeros 15 cmbsf de ambos volcanes. Aquellas muestras en las que se identificaron miembros ANME-2, especialmente ANME-2a y ANME-2b fueron las mismas muestras en las que se identificó el género BRS *Desulfococcus*, lo que sugiere la relación obligada entre los miembros ANME-2 y las BRS. Además los grupos ANME-1 y ANME-2 usualmente están asociados con la BRS *Desulfococcus*. Estas BRS se encuentran físicamente unidas a los miembros ANME-2 formando agregados celulares cubiertos de una capa delgada de materia orgánica (Knitell y Boetius, 2009). La presencia de las relaciones sintróficas mencionadas se da sólo en los primeros 15 cmbsf de ambos volcanes lo cual explicaría esta parte del sedimento sería anóxica o al menos subóxica, dado que ambos grupos de arqueas (AOM y ANME) y los diversos BRS asociadas con ellos no toleran el oxígeno. Nunca se han detectado miembros ANME en sedimentos penetrados por oxígeno y tampoco se ha investigado la causa exacta, pero es bien sabido que los metanógenos son altamente intolerantes al oxígeno debido a la sensibilidad redox de sus cofactores y enzimas (Jarrell, 1985). Lamentablemente para este trabajo no fue posible obtener datos biogeoquímicos de los NG. Sin embargo, dada la cualidad de anaerobia obligada de los miembros ANME, BRS y metanogénicos se puede inferir que los primeros 15 cmbsf de cada volcán son anóxicos, lo que refuerza la inferencia anteriormente expresada respecto a la anoxigenia de los sedimentos superficiales de ambos volcanes.

El grupo ANME desciende del filo Euryarchaeota y la literatura indica que su única forma de obtención de energía es exclusivamente la oxidación anaeróbica del metano (AOM) con sulfato como el último aceptor de electrones acorde con la siguiente reacción:



Los miembros ANME se encuentran en la llamada zona de transición de metano-sulfato (SMTZ) (Reeburgh, 2007). Estas zonas se encuentran en todos los sistemas acuáticos anóxicos donde el transporte de metano desde el fondo y el sulfato desde la superficie provee un nicho definido por la producción mínima de energía para los miembros ANME. El metano se consume por completo en la SMTZ que puede encontrarse a decímetros o decenas de metros por debajo del lecho marino, dependiendo de la tasa de sedimentación de la materia orgánica, la profundidad de la zona y la velocidad de transporte del metano y el sulfato y sus tasas de consumo (Knitell y Boetius, 2009).

En el volcán Anastasya la abundancia relativa de familias BRS como *Desulfobulbaceae* es mayor en relación a la del volcán Pipoca. Esto puede ser explicarse por las características del sedimento reportadas por Somoza et al. (2003). Las BRS necesitan metano para llevar a cabo la reducción del sulfato. En el volcán

Anastasya, se podría suponer que el metano funge como moldeador en las comunidades de los primeros 15 cmbsf. Se ha reportado que en las filtraciones y respiraderos que albergan las rutas de escape de burbujas de gas y fluidos ricos en metano, una proporción sustancial de metano puede escapar del filtro metanotrófico microbiano y ser liberado a la columna de agua sin ser reducido (Roussel et al., 2008). En el volcán de lodo Haakon Mosby más del 60% del flujo de metano anual total escapa del consumo bentónico (Niemann et al., 2006). Esto está soportado por las mediciones de metano disuelto en la columna de agua publicados por Sierra et al. (2020) y en las cuales reportan que la cantidad de metano disuelto en la columna de agua es mayor en el volcán Anastasya con respecto a Pipoca. La mayor parte del lecho marino en los márgenes continentales consiste en sedimentos arcillosos de granos finos donde la penetración de oxígeno está restringida a unos pocos centímetros o incluso pocos decímetros. Esto también ocurre en las filtraciones frías impactadas por el movimiento de fluidos, características de los volcanes de lodo, donde la penetración de oxígeno se limita a unos pocos milímetros, o en menor medida, debido a la advección hacia arriba de las burbujas libres de sulfato (De Beer et al., 2006), como ocurre en los sedimentos superficiales de Anastasya donde Somoza et al., (2003) reportaron una alta presencia de gases y olor a ácido sulfúrico. Estos resultados soportan la hipótesis de que el metano puede ser un sustrato utilizado mediante la cooperación de arqueas que activan el metano y BRS disponibles para proveer electrones (Hoehler et al., 1994). Además, es sabido que en los sedimentos anóxicos que subyacen en la la mayoría de los océanos de la Tierra, los únicos metabolismos conocidos de arqueas cultivadas son la producción de energía a partir de sustratos de carbono simple y el consumo de metano.

Los miembros pertenecientes a ANME-3 se encontraron en abundancias menores al 1% en las muestras ANA-05, ANA-15 y PIP-15. Esto concuerda con la distribución global de ANME-3 reportada por Knitell y Boetius (2009) donde indican que su distribución estaría restringida principalmente a volcanes de lodo submarinos y esporádicamente en otros tipos de sedimentos con filtraciones de fluidos, siempre en bajas proporciones (Knitell y Boetius, 2009). Estos datos estarían indicando que además de la presión y la presencia de metano y sulfuro, existe otra variable más limitante que estaría moldeando la distribución de ANME-3 y la cual es específica de los volcanes de lodo.

Capítulo 5. Conclusiones

En total se identificaron 53 fila de Archaea y Bacteria en ambos volcanes, 42 en Anastasya y 44 en Pipoca. De estos solo 15 presentaron abundancias mayores al 1% (7 de Archaea y 8 de Bacteria). El filo más abundante fue Euryarchaeota (al que pertenecen todos los miembros metanogénicos descritos), con una abundancia relativa del 71% en Anastasya y 48% en Pipoca, seguido de Proteobacteria con 57% en Anastasya y 32% en Pipoca.

En los primeros 15 cm fue donde se presentó la mayor diversidad de bacterias y arqueas. Las familias que presentaron abundancias relativas menores al 1% (biosfera rara) fueron también mucho más abundantes en los primeros 15 cmbsf en ambos volcanes, contribuyendo a esta diversidad de manera importante. Sin embargo, en Pipoca tanto la abundancia como la diversidad vuelven a aumentar a partir de los 30 cm.

El número de familias compartidas en ambos volcanes, tanto de arqueas como de bacterias, es menor que las específicas de cada volcán. Entre éstas, el grupo ANME-3 solo se detectó en Anastasya.

Las familias de bacterias BRS en ambos volcanes se encontraron en las mismas profundidades en que también se identificaron miembros del dominio Archaea que llevan a cabo la AOM y la metanogénesis, lo que apoya la hipótesis de una relación sintrófica obligada entre estos microorganismos.

Las muestras formaron dos grupos principales bien definidos por volcán, siendo la profundidad y el tipo de sedimento los factores principales para diferenciar ambas comunidades. Este patrón se observó en ambos volcanes. Sin embargo, las muestras del volcán Anastasya mostraron una mayor variabilidad que las del volcán Pipoca. En el volcán Pipoca, sólo se observaron diferencias significativas de los 31 a 40 cm en columna de sedimento. Los sedimentos más profundos fueron similares a los de los primeros 30 cm.

Al considerar las distancias filogenéticas no ponderadas (UniFrac *unweighted*) se confirma la separación de las muestras de ambos volcanes en dos grupos cada uno. Sin embargo, al introducir las distancias ponderadas el ordenamiento muestra que las muestras superficiales de Anastasya, estarían moldeadas por otros componentes, a parte de la profundidad y el tipo de sedimento, posiblemente la presencia de H₂S y el contenido de gases.

Si bien se ha hablado de la biosfera rara y su estrecha relación con ciclos biogeoquímicos, con los datos obtenidos en este trabajo no se puede asegurar que el papel de dichos grupos sea crucial en el ciclo del

carbono. Sin embargo, con base en el porcentaje de abundancias, mayor al 30%, los valores más altos de diversidad y el mayor número genes involucrados en el metabolismo energético del metano, se puede inferir que la biosfera rara tendría el potencial para participar activamente, en la recirculación de la energía en ambos volcanes.

La inferencia funcional mostró que, dentro del metabolismo energético, el metabolismo del metano fue el más abundante y en particular la metanogénesis a partir de CO_2 .

El alto número de genes inferidos en las muestras donde también se identificaron grupos involucrados en el metabolismo del sulfuro (donantes de electrones) y del del metano (aceptores de electrones), apoyan la existencia de relaciones sintróficas entre los microorganismos metanogénicos, los que llevan a cabo la AOM, y las bacterias reductoras de sulfato.

Literatura citada

- Amend, J.P. y Shock, E.L. 2001, Energetics of overall metabolic reactions of thermophilic and hyperthermophilic Archaea and bacteria. *FEMS Microbiology Reviews* 25, 175–243
- Antonielli, B., Monserrat, O., Bonini, M., Righini, G., Sani, F., Luzi, G., Feyzullayev, A.A., Aliyev, C.S. 2014: Pre-eruptive ground deformation of Azerbaijan mud volcanoes detected through satellite radar interferometry (DInSAR). *Tectonophysics*, 637: 163-177.
- Arndt, S., Jørgensen, B. B., LaRowe, D. E., Middelburg, J. J., Pancost, R. D. y Regnier, P. 2013, Quantifying the degradation of organic matter in marine sediments: A review and synthesis. *Earth-Sciences Review.*, 123, 53-86.
- Bhattarai, S., Naangmenyele, Z., Cassarini, C., Gonzalez-Gill, G., Rene, E. R., y Lens, P. N. 2015, May. Sulphate Reduction by Marine Sediment Hosting Anaerobic Oxidation of Methane from Gulf of Cadiz and Marine Lake Grevelingen. In 4th International Conference on Research Frontiers in Chalcogen Cycle Science & Technology (p. 125).
- Bolyen, E., Rideout, J. R., Dillon, M. R., Bokulich, N. A., Abnet, C. C., Al-Ghalith, G. A., ... y Bai, Y. 2019. Reproducible, interactive, scalable and extensible microbiome data science using QIIME 2. *Nature biotechnology*, 37(8), 852-857.
- Callahan, B. J., McMurdie, P. J., Rosen, M. J., Han, A. W., Johnson, A. J. A., y Holmes, S. P. 2016. DADA2: high-resolution sample inference from Illumina amplicon data. *Nature methods*, 13(7), 581-583.
- Canfield, D. E., Thamdrup, B. y Hansen, J. W. 1993. The anaerobic degradation of organic matter in Danish coastal sediments iron reduction, manganese reduction, and sulfate reduction. *Geochimistry Cosmochimica Acta*, 57, 3867-3883.
- Carter, P. W. y Mitterer, R. M. 1978. Amino acid composition of organic matter associated with carbonate and non-carbonate sediments. *Geochimistry Cosmochimica Acta*, 42, 1231-1238.
- Caporaso, J. G., Lauber, C. L., Walters, W. A., Berg-Lyons, D., Lozupone, C. A., Turnbaugh, P. J., ... y Knight, R. 2011. Global patterns of 16S rRNA diversity at a depth of millions of sequences per sample. *Proceedings of the national academy of sciences*, 108(Supplement 1), 4516-4522.
- Chistoserdova, L., Vorholt, J. A., Thauer, R. K., y Lidstrom, M. E. 1998. C1 transfer enzymes and coenzymes linking methylotrophic bacteria and methanogenic Archaea. *Science*, 281(5373), 99-102.
- Colombo, J. C., Silverberg, N. y Gearing, J. N. 1999 Biogeochemistry of organic matter in the Laurentian Trough, II. Bulk composition of the sediments and relative reactivity of major components during early diagenesis. *Mar.ineChemistry.*, 51, 295-314.

- De Beer D, Sauter E, Niemann H, Kaul N, Foucher J-P, et al. 2006. In situ fluxes and zonation of microbial activity in surface sediments of the Haakon Mosby mud volcano. *Limnology Oceanography*. 51:1315–31
- Dimitrov, L. I. 2002. Mud volcanoes—The most important pathway for degassing deeply buried sediments. *Earth-Science Reviews*, 59(1-4), 49–76. [https://doi.org/10.1016/S0012-8252\(02\)00069-7](https://doi.org/10.1016/S0012-8252(02)00069-7)
- Douglas, G. M., Maffei, V. J., Zaneveld, J., Yurgel, S. N., Brown, J. R., Taylor, C. M., ... y Langille, M. G. 2020. PICRUSt2: An improved and customizable approach for metagenome inference. *BioRxiv*, 672295.
- Dridi, B., Fardeau, M. L., Ollivier, B., Raoult, D., y Drancourt, M. 2012. *Methanomassiliicoccus luminyensis* gen. nov., sp. nov., a methanogenic archaeon isolated from human faeces. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, 62(8), 1902-1907.
- Duggen, S., Hoernle, K., Van den Bogaard, P., Rüpke, L., y Morgan, J. P. 2003. Deep roots of the Messinian salinity crisis. *Nature*, 422(6932), 602.
- Dyonisius, M. N., Petrenko, V. V., Smith, A. M., Hua, Q., Yang, B., Schmitt, J., ... y Vimont, I. 2020. Old carbon reservoirs were not important in the deglacial methane budget. *Science*, 367(6480), 907-910.
- Etiope, G., y Milkov, A. V. 2004. A new estimate of global methane flux from onshore and shallow submarine mud volcanoes to the atmosphere. *Environmental Geology*, 46, 997–1002. <https://doi.org/10.1007/s00254-004-1085-1>
- Falkowski, P. G., Fenchel, T., y Delong, E. F. 2008. The microbial engines that drive Earth's biogeochemical cycles. *Science*, 320(5879), 1034-1039.
- Ferry, J. G. y Lessner, D. J. 2008. Methanogenesis in marine sediments. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1125, 147-157.
- Garcia-Castellanos, D., Estrada, F., Jiménez-Munt, I., Gorini, C., Fernández, M., Vergés, J., y De Vicente, R. 2009. Catastrophic flood of the Mediterranean after the Messinian salinity crisis. *Nature*, 462(7274), 778.
- Guerzoni, S. y Rovatti, G. 1987. Organic matter composition in coastal marine sediments from different depositional areas, Italy. *Science Total Environment.*, 62, 477-479.
- Goni, M. A., Ruttenberg, K. C. y Eglinton, T. I. 1997. Sources and contribution of terrigenous organic carbon to surface sediments in the Gulf of Mexico. *Nature*, 389, 275-278.
- Hallam S. J., Putnam N., Preston C. M., Detter J. C., Rokhsar D, Richardson P. H. y DeLong E. F. 2004. Reverse methanogenesis: testing the hypothesis with environmental genomics. *Science* 305: 1457–1462.
- Hinrichs, K. U., Hayes, J. M., Sylva, S. P., Brewer, P. G., y DeLong, E. F. 1999. Methane-consuming archaeobacteria in marine sediments. *Nature*, 398(6730), 802-805.

- Hoehler, T. M., Alperin, M. J., Albert, D. B., y Martens, C. S. 1994. Field and laboratory studies of methane oxidation in an anoxic marine sediment: Evidence for a methanogen-sulfate reducer consortium. *Global biogeochemical cycles*, 8(4), 451-463.
- Hoshino, T., e Inagaki, F. 2019. Abundance and distribution of Archaea in the subseafloor sedimentary biosphere. *The ISME journal*, 13(1), 227-231.
- Ijiri, A. et al. 2018. Deep-biosphere methane production stimulated by geofluids in the Nankai accretionary complex. *Sci.Adv.* 4, eaao4631
- Jarrell, K. F. 1985. Extreme oxygen sensitivity in methanogenic archaeobacteria. *Bioscience*, 35(5), 298-302.
- Jelen, B. I., Giovannelli, D., y Falkowski, P. G. (2016). The role of microbial electron transfer in the coevolution of the biosphere and geosphere. *Annual review of microbiology*, 70.
- Jørgensen, B. B. 2000. Bacteria and marine biogeochemistry. In *Marine geochemistry* (pp. 173-207). Springer, Berlin, Heidelberg. Kioka, A., Tsuji, T., Otsuka, H., y Ashi, J. (2019). Methane concentration in mud conduits of submarine mud volcanoes: A coupled geochemical and geophysical approach. *Geochemistry, Geophysics, Geosystems*, 20(2), 792-813.
- Knittel, K., y Boetius, A. 2009. Anaerobic oxidation of methane: Progress with an unknown process. *Annual Review of Microbiology*, 63, 311–334. <https://doi.org/10.1146/annurev.micro.61.080706.093130>
- Kopf, A. J. 2002. Significance of mud volcanism. *Reviews of Geophysics*, 40(2).
- Kozich, J., Wescott, S., Baxter, N., Highlander, S., Schloss, P. 2013. Development of a Dual-Index sequencing strategy and curation pipeline for analyzing amplicon sequence data on the MiSeq Illumina sequencing platform. *Applied and Environmental Microbiology*, 79(17): 5112-5120.
- Lam, B., Barr, C., Rowe, A., y Nealson, K. 2019. Differences in Applied Redox Potential on Cathodes Enrich for Diverse Electrochemically Active Microbial Isolates From a Marine Sediment. *Frontiers in microbiology*, 10, 1979.
- Lever, M. A. 2013. Functional gene surveys from ocean drilling expeditions—a review and perspective. *FEMS microbiology ecology*, 84(1), 1-23.
- Lewin, A., Wentzel, A., y Valla, S. 2013. Metagenomics of microbial life in extreme temperature environments. *Current Opininions in Biotechnoly.* 24, 516–525. doi: 10.1016/j.copbio.2012.10.012
- Loget, N., y Van Den Driessche, J. 2006. On the origin of the Strait of Gibraltar. *Sedimentary Geology*, 188, 341-356.
- Maldonado, A., Somoza, L., y Pallarés, L. 1999. The Betic orogen and the Iberian–African boundary in the Gulf of Cadiz: geological evolution (central North Atlantic). *Marine Geology*, 155(1-2), 9-43.

- Martin, W. F. 2019. Carbon–metal bonds: rare and primordial in metabolism. *Trends in biochemical sciences*.
- Martinez, R. J., Mills, H. J., Story, S., y Sobecky, P. A. 2006. Prokaryotic diversity and metabolically active microbial populations in sediments from an active mud volcano in the Gulf of Mexico. *Environmental Microbiology*, 8(10), 1783-1796.
- Mayer, L. M., Schick, L. L. y Setchell, F. W. 1986. Measurement of protein in nearshore marine sediments. *Marine Ecology Progress Series.*, 30, 159-165.
- Mazurenko, L. L., Soloviev, V. A., Gardner, J., y Ivanov, M. K. 2003. Gas hydrates in the Ginsburg and Yuma mud volcano sediments (Moroccan Margin): results of chemical and isotopic studies of pore water. *Marine Geology*, 195(1-4), 201-210.
- Medialdea, T., Vegas, R., Somoza, L., Vázquez, J. T., Maldonado, A., Diaz-del-Rio, V., ... y Fernández-Puga, M. C. 2004. Structure and evolution of the “Olistostrome” complex of the Gibraltar Arc in the Gulf of Cádiz (eastern Central Atlantic): evidence from two long seismic cross-sections. *Marine Geology*, 209(1-4), 173-198.
- Medialdea, T., Somoza, L., Pinheiro, L. M., Fernández-Puga, M. C., Vázquez, J. T., León, R., ... y Vegas, R. 2009. Tectonics and mud volcano development in the Gulf of Cádiz. *Marine Geology*, 261(1-4), 48-63.
- Milkov, A. V., Sassen, R., Apanasovich, T. V., y Dadashev, F. G. 2003. Global gas flux from mud volcanoes: A significant source of fossil methane in the atmosphere and the ocean. *Geophysical Research Letters*, 30(2), 1037. <https://doi.org/10.1029/2002GL016358>
- Mohsen, A., Park, J., Chen, Y. A., Kawashima, H., y Mizuguchi, K. 2019. Impact of quality trimming on the efficiency of reads joining and diversity analysis of Illumina paired-end reads in the context of QIIME1 and QIIME2 microbiome analysis frameworks. *BMC bioinformatics*, 20(1), 1-10.
- Niemann H, Lösekann T, de Beer D, Elvert M, Nadalig T, Knittel K, Amann R, Sauter EJ, Schlüter M, Klages M, Foucher JP, Boetius A. 2006. Novel microbial communities of the Haakon Mosby mud volcano and their role as a methane sink. *Nature* 443:854–858.
- Schink, B. 1997. Energetics of syntrophic cooperation in methanogenic degradation. *Microbiology and molecular biology reviews*, 61(2), 262-280.
- Smith, R. W., Bianchi, T. S., Allison, M., Savage, C. y Galy, V. 2015. High rates of organic carbon burial in fjord sediments globally. *Nature Geosciences*, 8, 450-453.
- Silver, B., Onstott, T., Rose, G., Lin, L. H., Ralston, C., Sherwood-Lollar, B., Pfiffner, S., Kieft, T., y McCuddy, S. 2010. In situ cultivation of subsurface microorganisms in a deep mafic sill: implications for SLiMEs, *Geomicrobiology Journal.*, 27, 329–348, 2010.

- Somoza, L., Diaz-del-Rio, V., Leron, R., Ivanov, M. K., Fernandez-Puga, M. C., Lobato, A., Maestro, A., Hernandez-Molina, F. J., Gardner, J. M., Roderio, J., Pinheiro, L. M., Vasquez, J. T., Medialdea, T., Fernandez-Salas, L. M., 2003. Seabed morphology and hydrocarbon seepage in the Gulf of Cadiz mud volcano area: imagery of multibeam data and ultra-high resolution data. *Mar. Geol.* S0025-3227(02)00686-2.
- Suzuki, S., Nealson, K. H., y Ishii, S. I. 2018. Genomic and in-situ transcriptomic characterization of the candidate phylum NPL-UPL2 from highly alkaline highly reducing serpentinized groundwater. *Frontiers in microbiology*, 9, 3141.
- Oren A, Garrity GM. 2018. List of new names and new combinations previously effectively, but not validly, published. *Int J Syst Evol Microbiology* 2013;63:3931–34.
- Orphan, V. J., House, C. H., Hinrichs, K. U., McKeegan, K. D., y DeLong, E. F. 2001. Methane-consuming archaea revealed by directly coupled isotopic and phylogenetic analysis. *science*, 293(5529), 484-487.
- Oni, O. E., Schmidt, F., Miyatake, T., Kasten, S., Witt, M., Hinrichs, K. U. y Friedrich, M. W. 2015 Microbial communities and organic matter composition in surface and subsurface sediments of the Helgoland Mud Area, North Sea. *Frontiers in Microbiology.*, 6, 1290, doi: 10.3389/fmicb.2015.01290.
- Pachiadaki, M. G., Lykousis, V., Stefanou, E. G., y Kormas, K. A. 2010. Prokaryotic community structure and diversity in the sediments of an active submarine mud volcano (Kazan mud volcano, East Mediterranean Sea). *FEMS microbiology ecology*, 72(3), 429-444.
- Pachiadaki, M. G., Kallionaki, A., Dähmann, A., De Lange, G. J., y Kormas, K. A. 2011. Diversity and spatial distribution of prokaryotic communities along a sediment vertical profile of a deep-sea mud volcano. *Microbial ecology*, 62(3), 655-668.
- Pancost, R. D., Sinninghe Damsté, J. S., De Lint, S., Van der Maarel, M. J. E. C., y Gottschal, J. C. the Medinaut Shipboard Scientific Party. 2000. Biomarker evidence for widespread anaerobic methane oxidation in Mediterranean sediments by a consortium of methanogenic archaea and bacteria. *Appl Environ Microbiol*, 66(3), 1126-1132. Party, 2001. Archaeal lipids in Mediterranean Cold Seeps: molecular proxies for anaerobic methane oxidation. *Geochim. Cosmochim. Acta* 65, 1611–1627
- Prahl, F. G., Ertel, J. R., Goni, M. A., Sparrow, M. A. y Eversmeyer, B. E. 1994. Terrestrial organic carbon contributions to sediments on the Washington margin. *Geochimistry Cosmochimica Acta*, 58, 3035-3048.
- Pinheiro, L. M., Magalhaes, V., Somoza, L., Gardner, I. Ivanov, M., Kopf, A., Rensbergen, P. v., Monteiro, J. H., Euromargins-MVSEIS Team, 2006. Structural control of mud volcanism and hydrocarbon-rich fluid seepage in the Gulf of Cadiz: recent results from the TIR-15 cruise. In: Masc1e, I. Sakellariou, D., Briand, E (Eds.), *Fluid Seepages/Mud Volcanoes in the Mediterranean and Adjacent Domains*. CIESM Workshop Monographs, vol. 29, pp. 53-58. Monaco.
- Reay, D. S., Smith, P., Christensen, T. R., James, R. H. y Clark, H. 2018. Methane and global environmental change. *Annual Reviews Environmental Resources*, 43, 165-192.

- Reeburgh, W. S. 2007. Oceanic methane biogeochemistry. *Chemical Reviews*, 107(2), 486–513. <https://doi.org/10.1021/cr050362v>
- Remizovschi, A., Carpa, R., y Drăgan-Bularda, M. 2018. Biological and geological traits of terrestrial mud volcanoes-a review. *Analele universitatii din oradea, fascicula biologie*, 25(2).
- Rempfert, K.R. et al. 2017. Geological and geochemical controls on subsurface microbial life in the Samail Ophiolite, Oman. *Frontiers in Microbiology*. 8, 56
- Roussel, E. G., Bonavita, M. A. C., Querellou, J., Cragg, B. A., Webster, G., Prieur, D., y Parkes, R. J. 2008. Extending the sub-sea-floor biosphere. *Science*, 320(5879), 1046-1046.
- Schink, B. 2002. Synergistic interactions in the microbial world. *Antonie Van Leeuwenhoek*, 81(1-4), 257-261.
- Schuchmann, K. y Müller, V. 2014. Autotrophy at the thermodynamic limit of life: a model for energy conservation in acetogenic bacteria. *Nature Review in Microbiology*. 12, 809–821
- Sierra, A., Jiménez-López, D., Ortega, T., Fernández-Puga, M. C., Delgado-Huertas, A., y Forja, J. 2020. Methane dynamics in the coastal–Continental shelf transition zone of the Gulf of Cadiz. *Estuarine, Coastal and Shelf Science*, 236, 106653.
- Söllinger, A., Schwab, C., Weinmaier, T., Loy, A., Tveit, A. T., Schleper, C., y Urich, T. 2016. Phylogenetic and genomic analysis of Methanomassiliicoccales in wetlands and animal intestinal tracts reveals clade-specific habitat preferences. *FEMS microbiology ecology*, 92(1), fiv149.
- Takai, K., y Horikoshi, K. 1999. Genetic diversity of archaea in deep-sea hydrothermal vent environments. *Genetics*, 152(4), 1285-1297.
- Takami, H., Noguchi, H., Takaki, Y., Uchiyama, I., Toyoda, A., Nishi, S., ... y Takai, K. 2012. A deeply branching thermophilic bacterium with an ancient acetyl-CoA pathway dominates a subsurface ecosystem. *PLoS one*, 7(1), e30559.
- Thauer, R.K. et al. 2008. Methanogenic archaea: ecologically relevant differences in energy conservation. *Nature Reviews in Microbiology*. 6, 579–591
- Tromp, T. K., Van Cappellen, P. y Key, R. M. 1995. A global model for the early diagenesis of organic carbon and organic phosphorus in marine sediments. *Geochimistry Cosmochimica Acta*, 59, 1259-1284.
- Volkman, J. K., Farrington, J. W. y Gagosian, R. B. 1987. Marine and terrigenous lipids in coastal sediments from the Peru upwelling region at 15°S: Sterols and triterpene alcohols. *Organic Geochemistry*., 11, 463-477.
- Williams, R. J. P., y Da Silva, J. F. 1996. The natural selection of the chemical elements. *Chemistry in Britain*, 32, 42-46.

- Woese, C.R., 1987. Bacterial evolution. *Microbiology Reviews*. 51, 221–271.
- Wolfe, J. M. y Fournier, G. P. 2018. Horizontal gene transfer constrains the timing of methanogen evolution. *Nature Ecology and Evolution.*, 2, 897-903.
- Yin, X. 2019. Carbon Metabolism of Methylotrophic Methanogens and Asgard Archaea in Marine Sediments (Doctoral dissertation, Universität Bremen).