



**CENTRO DE INVESTIGACIÓN Y DE ESTUDIOS AVANZADOS DEL  
INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL**

**UNIDAD ZACATENCO**

**DEPARTAMENTO DE BIOTECNOLOGÍA Y BIOINGENIERÍA**

**“Caracterización de la actividad metanotrófica en lagos por  
espectrometría láser”**

**T E S I S**

Que presenta

**SARA GISELA SÁNCHEZ UREÑA**

Para obtener el grado de

**MAESTRA EN CIENCIAS**

**EN LA ESPECIALIDAD DE BIOTECNOLOGÍA**

Directores de tesis:

Dr. Frédéric Thalasso

Dr. Ricardo Aguilar López

México, DF

Noviembre, 2015

## Créditos Institucionales

Esta tesis fue elaborada en el Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional, en el Departamento de Biotecnología y Bioingeniería, bajo la co-dirección de los doctores Frédéric Thalasso (CINVESTAV-IPN) y Ricardo Aguilar López (CINVESTAV-IPN), y la asesoría de los doctores Luc Dendooven (CINVESTAV-IPN) y Mariano Gutiérrez Rojas (UAM-Iztapalapa).

Durante la realización de este proyecto, la alumna recibió una beca académica del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (367430/298655).

Se agradece también al Instituto de la Patagonia, de la Universidad de Magallanes, Chile, por las facilidades otorgadas para llevar a cabo parte del presente trabajo.

## Agradecimientos

A Dios por permitirme vivir esta experiencia, y por demostrarme que vaya a donde vaya, Él siempre me acompaña.

A mi familia por ser mi apoyo, y porque sé que a pesar de la distancia, nos unen lazos más fuertes que cualquier tempestad.

Al doctor Fred, por confiar en mí para este proyecto, por ser mi guía y por enseñarme cómo hacer ciencia. Al doctor Ricardo por enseñarme la importancia de la termodinámica en fenómenos naturales. Al doctor Luc por orientarme siempre a hacer un trabajo de calidad. Al doctor Mariano por enseñarme a utilizar mi criterio ingenieril en cada ámbito de mi investigación.

A todos los integrantes del laboratorio de Bioprocesos, por enseñarme el verdadero significado de la tolerancia, amistad, trabajo en equipo y compañerismo. A veces, con una plática o una sonrisa hacían que los días difíciles se volvieran llevaderos.

A mis compañeros de la maestría, por ser esos “muérganos” que siempre estuvieron a mi lado. Celebramos, reímos, lloramos, pero sobre todo, somos y seguiremos siendo amigos.

## **COMITÉ TUTORIAL**

### **Co-Directores:**

Frédéric Thalasso

Ricardo Aguilar López

### **Asesores:**

Luc Dendooven

Mariano Gutiérrez Rojas

## Índice General

Índice de Figuras y Tablas .....	2
Figuras.....	2
Tablas .....	2
Resumen .....	3
Abstract.....	4
Introducción.....	5
Calentamiento Global .....	5
Metano.....	6
Lagos .....	6
Ciclo de Metano en Lagos .....	8
Antecedentes .....	14
Técnicas actuales para determinar actividad metanotrófica. ....	14
Antecedentes del grupo de trabajo. ....	18
Justificación.....	21
Hipótesis .....	22
Objetivo.....	22
Objetivo General.....	22
Objetivos Específicos .....	22
Materiales y métodos .....	23
Método de determinación de actividad metanotrófica. ....	23
Análisis de datos .....	28
Sitios de estudio.....	28
Muestreo.....	29
Estratificación y mezclado.....	29
Resultados.....	32
Régimen de mezclado.....	32
Perfil de Oxígeno Disuelto.....	33
Determinación de actividad metanotrófica.....	35
Técnica de medición de concentración de CH <sub>4</sub> disuelto.....	35
Conclusiones y perspectivas .....	47
Bibliografía .....	49

## Índice de Figuras y Tablas

### Figuras

Figura 1. Estratificación de lagos (Hutchinson, 1999).....	7
Figura 2. Esquema de Metanogénesis y Metanotrofia en la columna de agua. ....	9
Figura 3. Patrones de distribución de OD en la columna de agua. (Modificado de Horne & Goldman, 1994).....	12
Figura 4. Descripción general del método MA-ICOS. Las etapas son explicadas en el texto previo. ....	24
Figura 5. Perfiles de temperatura en diferentes estaciones del año.....	33
Figura 6. Perfiles de OD en diferentes épocas del año. ....	34
Figura 7. A) Calibración de estándares en Cromatógrafo de Gases. B) Precisión del analizador de GEI basado en OA-ICOS. ....	35
Figura 8. Precisión jeringas A) 12ml y B) 60ml. Las barras de error son tan pequeñas que no se alcanzan a ver en el gráfico. ....	36
Figura 9. Permeabilidad jeringas de polipropileno. A) Prueba de entrada de O <sub>2</sub> . B) Prueba de pérdida de CH <sub>4</sub> . Ambas pruebas fueron abióticas, en jeringas de 60 mL sin espacio de cabeza. ....	37
Figura 10. Determinación de tiempo de agitación de la sub-muestra para alcanzar el equilibrio gas/líquido. ....	38
Figura 11. Perfiles temporales de concentración de CH <sub>4</sub> . ....	39
Figura 12. Muestra anóxica de 9 m de profundidad en LG.....	42
Figura 13. Perfiles verticales de Velocidad de Oxidación de Metano en distintos lagos.	46

### Tablas

Tabla 1. PCG de los principales GEI. El PCG integrado en horizontes temporales de 20 y 100 años. (Modificado de IPCC, 2013). El subíndice del PG es el horizonte de tiempo considerado.....	5
Tabla 2. Técnicas desarrolladas por el grupo de trabajo. ....	20
Tabla 3. Metodología de MA-ICOS con las diferentes jeringas de incubación. ....	25
Tabla 4. Ubicación de los puntos de muestreo.....	29
Tabla 5. Clasificación de acuerdo al RWCS.....	31
Tabla 6. Régimen de mezclado/estratificado en cada época de muestreo.....	32
Tabla 7. Parámetros cinéticos obtenidos en los ensayos de metanotrofia.....	41

## Resumen

El CH<sub>4</sub> es uno de los GEI (Gases de efecto invernadero) más importantes, y tiene Potencial de Calentamiento Global de 34. A pesar de conocer los mecanismos generales involucrados en el cambio climático, todavía se conoce poco sobre los ciclos biogeoquímicos que gobiernan las emisiones de GEI, y en particular los que se llevan a cabo en ecosistemas acuáticos. Está reportado que estos ecosistemas son responsables del 6-16% de las emisiones globales de CH<sub>4</sub> a la atmósfera. Dichas emisiones son el resultado de varios procesos, entre ellos dos que son antagónicos: metanogénesis (producción de CH<sub>4</sub> por arqueas) y metanotrofia (oxidación de CH<sub>4</sub> por bacterias).

Para conocer el ciclo del CH<sub>4</sub> en los lagos se requiere un balance general, donde se pueda conocer; (1) emisión, (2) concentración de CH<sub>4</sub> disuelto y (3) las dinámicas de producción/consumo a lo largo de la columna de agua de CH<sub>4</sub>. Se estima que entre el 30 y 99% del CH<sub>4</sub> producido en ecosistemas acuáticos se oxida por metanotrofia, por lo tanto es importante conocer las velocidades de oxidación de CH<sub>4</sub> en lagos.

En este trabajo se desarrolló un método para determinar metanotrofia en las zonas óxicas de los lagos. Dicho método permitió medir velocidades de oxidación de CH<sub>4</sub> en condiciones reales de concentración de O<sub>2</sub> y CH<sub>4</sub>, además de poder realizar mediciones de potencial metanotrófico, que es la técnica comúnmente utilizada. De esta forma, se compararon ambas velocidades, concluyendo que las técnicas de potencial metanotrófico dan valores de velocidad de oxidación por mucho mayores a las velocidades obtenidas en condiciones reales. Por ello, podría ser que los balances reportados en literatura estén sobreestimados. Aunado a lo anterior, el método permitió determinar metanotrofia en tres lagos con un amplio rango de estado trófico, lo que permitirá a futuro tener un mejor estudio del ciclo del CH<sub>4</sub> en diferentes ecosistemas.

## Abstract

CH<sub>4</sub> is one of the most important GHG. It has a Global Warming Potential equal to 34. Although general mechanisms involved in Climate Change are known, biogeochemical cycles responsible of GHG emissions are not entirely known particularly in freshwater ecosystems. These ecosystems are responsible for 6–16% of global emission to the atmosphere. Those emissions are the result of several processes, in particular two antagonistic processes: methanogenesis (methane production by archaea) and methanotrophy (methane oxidation by bacteria).

In order to have a better knowledge about CH<sub>4</sub> cycle in lakes, a general balance is required, where three factors can be measured; (1) emission, (2) concentration of dissolved CH<sub>4</sub> and (3) production/consumption dynamics through water column. It has been estimated that globally, 30–99% of total CH<sub>4</sub> produced in freshwater ecosystems is oxidized by methanotrophy. Because of this, it is important to know methane oxidation rates (MOR) in lakes.

A method to determine methanotrophy in oxic zones has been developed. This method allows us to measure MOR in the actual conditions of oxygen and methane concentrations in lakes. In addition, we determine potential methanotrophy rates (PMR), which is the commonly used technique. We compare MOR and PMR, concluding that PMR has bigger values than MOR. Because of that, some of the balances reported might be overestimated.

In addition, with this method we were able to determine MOR and PMR in three different lakes, with a wide range of trophic state, which will allow us to have a better evaluation of the CH<sub>4</sub> cycle in different ecosystems.

## Introducción

### Calentamiento Global

El efecto invernadero es un fenómeno natural en el que la radiación térmica emitida por la superficie planetaria es absorbida por los gases de efecto invernadero (GEI) atmosféricos. Sin este fenómeno la temperatura de la superficie terrestre sería aproximadamente de  $-19^{\circ}\text{C}$  (Garduño, 2003). En los últimos años se ha incrementado la concentración de GEI en la atmósfera, lo que ha provocado que aumente la temperatura media de la Tierra (IPCC, 2007), fenómeno conocido como “Calentamiento Global”. A su vez, este calentamiento ha generado cambios en el clima de distintas regiones del mundo, lo que se conoce como “Cambio Climático”.

Cada GEI tiene una influencia distinta en el Calentamiento Global, determinada por su potencial de calentamiento global (PCG), el cual es un índice basado en el forzamiento radiativo (la capacidad para absorber la radiación) de una unidad másica de un determinado gas en la atmósfera actual, integrado sobre un horizonte temporal elegido, en relación con un gas de referencia ( $\text{CO}_2$ ). Por lo tanto, el PCG de un gas representa el efecto combinado de su forzamiento radiativo y de su tiempo de vida en la atmósfera (IPCC, 2013).

Los principales GEI, así como su potencial de calentamiento global, se presentan en la tabla 1, ordenados de menor a mayor vida media en la atmósfera. No se muestra el  $\text{CO}_2$  ya que es el gas de referencia. El presente trabajo se enfoca en el  $\text{CH}_4$ , el segundo GEI más importante, y que se describe a continuación.

*Tabla 1. PCG de los principales GEI. El PCG integrado en horizontes temporales de 20 y 100 años. (Modificado de IPCC, 2013). El subíndice del PG es el horizonte de tiempo considerado.*

<b>GEI</b>	<b>Vida media (años)</b>	<b>PCG<sub>20</sub></b>	<b>PCG<sub>100</sub></b>
<b>CH<sub>4</sub></b>	12.4	86	34
<b>HFC-134a</b>	13.4	3790	1550
<b>CFC-11</b>	45.0	7020	5350
<b>N<sub>2</sub>O</b>	121.0	268	298
<b>CF<sub>4</sub></b>	50 000.0	7350	5400

## Metano

El CH<sub>4</sub> es el segundo GEI más importante, después del CO<sub>2</sub>. Estudios recientes del IPCC han determinado que su participación al Calentamiento Global es mayor a la que se tenía estimada. En efecto, en 2007 se reportó que el PCG del CH<sub>4</sub> en horizontes de 20 y 100 años era de 72 y 25, respectivamente (IPCC, 2007), mientras que en la Tabla 1 se muestran valores del reporte del IPCC en 2013, siendo estos últimos, superiores. La concentración de CH<sub>4</sub> en la atmósfera se ha incrementado 2.5 veces desde la época pre-industrial principalmente por causas antropogénicas (IPCC, 2013).

Las fuentes de metano se pueden dividir en antropogénicas y naturales. Las fuentes antropogénicas incluyen; los cultivos de arroz, la ganadería de rumiantes, la disposición de desechos en rellenos sanitarios, fugas de CH<sub>4</sub> geológico al extraer combustibles fósiles, los incendios forestales y la quema de carbón, leña o combustibles fósiles (Heiling, 1994). Las fuentes naturales, incluyen las termitas y diferentes ecosistemas, tales como océanos, humedales, pantanos, lagos, tundra y bosques inundados (Khali & Shearer, 1993; Ehhalt, 1974).

Los lagos, a pesar de sólo ocupar menos del 2.8% de la superficie continental (Downing, et al., 2006), son responsables de emitir aproximadamente 92 Tg de CH<sub>4</sub> al año (Bastviken, et al., 2011). Por ello, es importante conocer el ciclo del CH<sub>4</sub> en lagos, y así tener una mejor comprensión de las dinámicas de los bioprocesos involucrados en ello, ya que de estos ecosistemas acuáticos depende el 16% de las emisiones de GEI a la atmósfera (Bastviken, et al., 2011).

## Lagos

Los lagos son cuerpos de agua natural continental, en condiciones estancadas (lénticas), sin comunicación directa con el mar. Constituyen masas de agua permanentes y que se depositan en una depresión del terreno, lo que se conoce como cuenca lacustre (Cervantes, 2007) o en depresiones causadas por descongelamiento del permafrost en zonas boreales y australes.

Los lagos actúan como sumideros o fuentes de carbono, lo que depende de numerosos factores fisicoquímicos tales como el pH, el oxígeno disuelto, la temperatura y los regímenes de mezclado o estratificación y de factores biológicos. La producción o consumo de carbono, en específico de CH<sub>4</sub>, se regirá por el conjunto de dichos factores que detallaremos más adelante.

#### *Temperatura y estratificación vertical.*

Cuando los lagos son relativamente profundos, y cuando los vientos y las corrientes son insuficientes para mezclar la columna de agua, se crea un marcado gradiente de temperatura, el cual ocasiona la división en estratos la columna de agua. La radiación térmica se absorbe en mayor proporción en los primeros metros de la columna de agua. Esta capa más cálida se llama epilimnio, y la capa inferior más densa y fría que llega hasta el fondo del lago es llamada el hipolimnio. Entre ambas zonas se encuentra una capa de transición llamada metalimnio. La sección de la columna de agua en la cual se observa el gradiente de temperatura se conoce como termoclina (Figura 2).

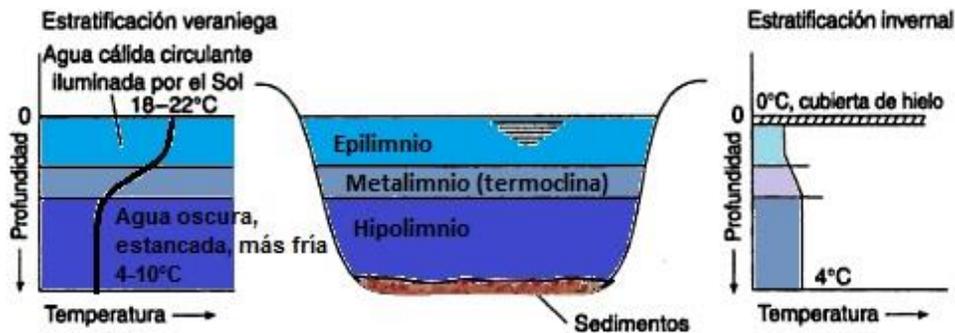


Figura 1. Estratificación de lagos (Hutchinson, 1999).

Generalmente, la estratificación térmica de la columna de agua no es permanente. Cuando la estratificación desaparece, se habla de una columna de agua mezclada. Lo que dictamina el régimen de estratificación o mezclado es la densidad del agua, la cual disminuye conforme aumenta la temperatura, siempre y cuando ésta sea mayor a 4°C. Entre los 0 y 4°C el aumento en la densidad será directamente proporcional al aumento de la temperatura, es decir, a mayor temperatura, mayor densidad. Por ejemplo, al principio de invierno, el enfriamiento de las aguas superficiales por debajo de la

temperatura de las aguas del hipolimnio, resulta en una inversión del hipolimnio y del epilimnio y, consecuentemente el mezclado de la columna de agua. Los lagos de zonas templadas son generalmente estratificados todo el año, salvo un episodio de mezclado en invierno. En este caso se habla de lagos monomícticos. En lagos de zonas frías, cubiertos por una capa de hielo durante el invierno, se observa una estratificación de la columna de agua, causada por temperaturas cercanas a 0°C del agua en contacto con el hielo, y temperaturas cercanas a 4°C en el fondo del lago. En esos lagos las relativamente altas temperaturas del verano generan también una estratificación térmica. La transición entre esas dos épocas de estratificación ocasiona un mezclado de la columna de agua en la primavera y al principio del invierno. En este caso, se habla de lagos dimícticos.

La estratificación térmica también influye en el perfil vertical de otros parámetros. Por ejemplo, el régimen de mezclado tiene un importante impacto en el oxígeno disuelto (OD), que detallaremos más adelante. El oxígeno proviene de la transferencia desde la atmosfera y de la fotosíntesis que ocurre en las capas superior (zona fótica). Cuando la columna de agua esta estratificada, el hipolimnio recibe aportes limitados de OD y puede volverse anóxico. Al contrario, cuando la columna de agua es mezclada, el hipolimnio recibe mayor aportes de OD. Considerando que, por ejemplo, la metanotrofia depende de la disponibilidad de OD y de CH<sub>4</sub>, la estratificación o el mezclado de la columna de agua tiene un impacto importante sobre el ciclo del CH<sub>4</sub>.

### Ciclo de Metano en Lagos

Los lagos contienen distintos organismos tales como peces, aves acuáticas y otros animales pero también zooplancton, fitoplancton y macrófitas, que generan el depósito de materia orgánica en los sedimentos del cuerpo acuático, a los cuales se añaden los aportes alóctonos de materia orgánica. Esa materia orgánica que se deposita en los sedimentos está sujeta a complejos ciclos en los que compuestos de alto peso molecular se metabolizan en otros de menor peso molecular. Al final de esa cadena degradativa, y si las condiciones son estrictamente anaerobias, arqueas metanogénicas producen CH<sub>4</sub> y CO<sub>2</sub>. El CH<sub>4</sub> y el CO<sub>2</sub> producidos en los sedimentos migran a través de la columna de agua hasta llegar a la zona óxica, donde el CH<sub>4</sub> es parcialmente oxidado por bacterias

metanotróficas (Madigan, et al., 2003). También existen organismos capaces de oxidar al  $\text{CH}_4$  en condiciones anaerobias, en presencia de otros aceptores de electrones como, nitratos, nitritos o sulfatos (Thauer, et al., 2008). De esta manera, la concentración de  $\text{CH}_4$  obedece a estos dos procesos antagónicos. Un esquema general de estos procesos se muestra en la Figura 2.

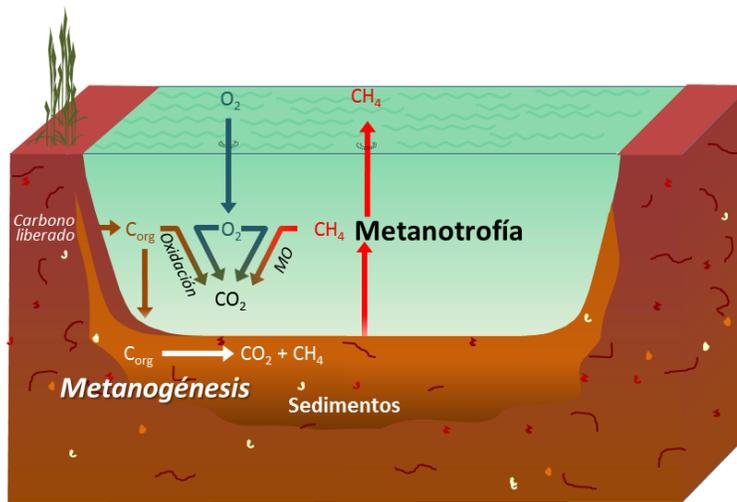


Figura 2. Esquema de Metanogénesis y Metanotrofia en la columna de agua.

El metano se genera de manera sintrófica en condiciones anóxicas. Los microorganismos metanogénicos utilizan sustratos que son generalmente los productos finales de la degradación de materia orgánica por microorganismos fermentativos *Bacteria* y *Eukarya*. Estos sustratos pueden ser  $\text{H}_2$ /  $\text{CO}_2$ , formato, acetato, metanol, compuestos metilados,  $\text{CO}$ , etanol y alcoholes secundarios (Borrel, et al., 2011).

Se han identificado tres rutas metabólicas principales para la producción de  $\text{CH}_4$  (Hedderich & Witman, 2006):

- Metanogénesis hidrogenotrófica: la reducción de  $\text{CO}_2$  a  $\text{CH}_4$  requiere  $\text{H}_2$  que es producido principalmente por bacteria acetogénicas productoras obligadas de hidrogeno (conocidas como OHPA por sus siglas en inglés). Esta ruta metanogénica es el principal sumidero del  $\text{H}_2$  producido por fermentación. Las bacterias fermentativas y los metanógenos crecen sintróficamente, ya que los

segundos mantienen concentraciones bajas de  $H_2$ , lo que es necesario para que las primeras puedan fermentar. Se estima que 30% del  $CH_4$  en ecosistemas de agua dulce se produce por esta ruta.

- Metanogénesis acetoclástica: el acetato se cataboliza por partes, se oxida el grupo carboxilo a  $CO_2$ , y el grupo metilo se reduce a  $CH_4$ . Sólo los géneros *Methanosarcina* y *Methanosaeta*, (ambos del orden *Methanosarcinales*) utilizan esta vía, y es la más importante en lagos templados y fríos.
- Metanogénesis metilotrófica: El grupo metilo se reduce a metil-coenzima M y después se reduce a metano. Los electrones para esta reducción provienen de la oxidación a  $CO_2$  de un grupo metilo adicional. A diferencia de las rutas hidrogenotrófica y acetoclástica, los metanógenos metilotróficos no compiten por sustrato con las bacterias sulfato-reductoras.

La metanotrofia es un tipo específico de metilotrofia que puede usar  $CH_4$  como fuente de carbono. El  $CH_4$  se oxida secuencialmente a metanol ( $CH_3OH$ ), formaldehído ( $CH_2O$ ), metanoato ( $HCOO^-$ ) y finalmente a dióxido de carbono (Madigan, et al., 2003). Las bacterias metanotróficas son capaces de usar la molécula de  $CH_4$  como única fuente de energía y carbono. Llevan a cabo la oxidación mediante la enzima metano monooxigenasa (MMO), y después utilizan las mismas enzimas que se han encontrado en otras bacterias aerobias metilotróficas Gram (-) para las subsecuentes oxidaciones de metanol a formaldehído, formato y dióxido de carbono, así como para asimilar carbono, a partir del formaldehído, en constituyentes celulares (Murrell & Smith, 2010).

Aunque la metanotrofia más común es la aerobia, se reportado oxidación anaerobia de metano. En el caso de lagos, este proceso es dependiente de nitratos/nitritos, mientras que en el caso de ecosistemas marinos está acoplada a sulfato-reducción, o es dependiente de hierro/manganeso (Borrel, et al., 2011).

Sin embargo, este estudio se enfoca a la metanotrofia aerobia. Se ha reportado que las metanótrofas pueden oxidar hasta 99% del  $CH_4$  producido en sedimentos de lagos (Bastviken, et al., 2002). El porcentaje de oxidación depende de diversos factores que

afectan a la metanotrofía en los lagos; principalmente la temperatura y la disponibilidad de oxígeno disuelto y de  $\text{CH}_4$ , que a su vez dependen de numerosos factores, tal como lo describiremos a continuación.

El crecimiento de bacterias metanotróficas se da cuando hay simultáneamente  $\text{CH}_4$  y  $\text{O}_2$  (Amaral & Knowles, 1995). Como lo hemos visto, el  $\text{CH}_4$  se produce en los sedimentos y migra hacia la superficie. Al contrario, el OD proviene de las capas superiores de la columna de agua. Cuando el lago está estratificado, se observa por lo tanto gradientes opuestos de OD y de  $\text{CH}_4$ . Como resultado de lo anterior, se observan generalmente valores más altos de metanotrofía en zonas cercanas a la oxiclina (Bédard & Knowles, 1997; Bastviken, et al., 2002; Schmale, et al., 2012).

El  $\text{O}_2$  es un parámetro fundamental de los lagos, ya que la presencia de este gas es esencial para el metabolismo de todos los organismos aerobios que viven en ecosistemas acuáticos. El suministro de dicho gas proviene de la fracción de  $\text{O}_2$  atmosférico que se disuelve en el agua y de la producción fotosintética. Por otro lado, este gas es consumido por la biota. La solubilidad del  $\text{O}_2$  atmosférico depende de la temperatura y de la presión atmosférica (Ley de Henry). Por lo tanto, factores como clima y altura sobre el nivel del mar tendrán influencia sobre el oxígeno disuelto (Wetzel, 2001).

La distribución de  $\text{O}_2$  en la columna de agua se relaciona también con la estratificación y el estado trófico del cuerpo de agua. Se reconocen cuatro patrones de distribución de oxígeno en cuerpos de agua que presentan una estratificación térmica (Figura 3). En cuerpos de agua oligotróficos (presentan una baja actividad fotosintética y por ende, una baja productividad), la distribución del oxígeno a lo largo de la columna de agua varía en función de la temperatura. Este patrón se conoce como distribución ortogrado, y se caracteriza porque no se observan cambios apreciables en la concentración de oxígeno disuelto a lo largo del perfil de profundidad.

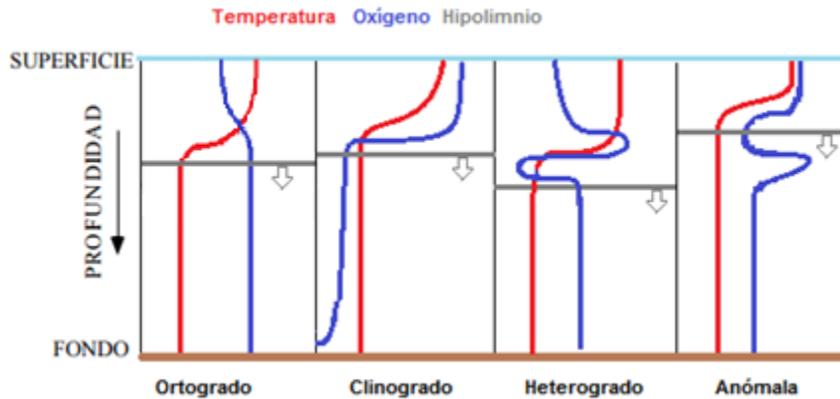


Figura 3. Patrones de distribución de OD en la columna de agua. (Modificado de Horne & Goldman, 1994)

La curva clinogrado se caracteriza por un contenido relativamente mayor de oxígeno cerca de la superficie, donde se desarrolla la actividad fotosintética. Este patrón de distribución vertical de oxígeno se observa en cuerpos de agua estratificados, con una alta productividad. Se produce una reducción significativa de oxígeno en el hipolimnio, como resultado de la descomposición aerobia de la materia orgánica por acción biológica.

La curva heterogrado exhibe una pendiente irregular a lo largo del perfil de profundidad. Se puede producir una distribución heterogrado negativa (disminución  $O_2$  disuelto) como resultado de la acumulación de organismos heterotróficos que lleve a que la respiración domine sobre la actividad fotosintética. De igual forma se podría producir una distribución heterogrado positiva como resultado de la acumulación de organismos fototróficos. Se pueden producir patrones anómalos en la distribución vertical del oxígeno disuelto como resultado del asentamiento de aguas superficiales frías, ricas en oxígeno (Figura 3). El mismo fenómeno puede también producirse por la estratificación a profundidades intermedias de afluentes que tienen una concentración de oxígeno diferente.

Por su parte, la eutroficación es el incremento en la velocidad de suministro de materia orgánica a un ecosistema (Nixon, 1995), que a su vez determina el estado trófico de un cuerpo de agua. Por lo tanto, al aumentar la materia orgánica disponible se genera un

aumento de nutrientes. El enriquecimiento de nutrientes en un lago favorece el crecimiento del plancton, lo que aumenta la turbidez del agua. Esta turbidez evita que la luz llegue a la vegetación sumergida, por lo que dichas plantas mueren. Con la desaparición de la vegetación acuática sumergida se pierden alimentos, hábitats y el OD proveniente de la fotosíntesis. Aunado a lo anterior, el fitoplancton se ubica en la superficie, y el O<sub>2</sub> que produce mediante la fotosíntesis satura las aguas superficiales, por lo que el O<sub>2</sub> que no se disuelve es emitido a la atmósfera. De esta manera quedan sin OD las aguas más profundas, excepto en los periodos en que las aguas se mezclan. Por otra parte, cuando el plancton alcanza su máxima densidad poblacional, su crecimiento se estanca, y finalmente pasa a la fase de muerte. El plancton muerto se asienta y produce en el fondo depósitos espesos de detritos (Moreno Franco, Quintero Manzano, & López Cuevas, 2010) que promoverán la metanogénesis. El nivel trófico es por lo tanto un parámetro determinante en el ciclo del CH<sub>4</sub>.

De acuerdo al estado trófico, los lagos se pueden clasificar en (Forsberg & Ryding, 1980) :

- Oligotrófico: bajo nivel de productividad biológica. Aguas claras, algunas plantas acuáticas, pocos peces, fondo arenoso.
- Mesotrófico: Moderado nivel de productividad, claridad de agua y plantas acuáticas.
- Eutrófico: Alto nivel de productividad. Si hay claridad de agua, hay buena cantidad de plantas, por lo contrario, si el agua es turbia, hay pocas plantas acuáticas. Gran potencial para soportar la cantidad de peces y vida silvestre.
- Hipereutrófico: niveles de productividad biológica muy altos, muy pobre claridad de agua y abundancia de plantas acuáticas y peces.

## Antecedentes

Con algunas simplificaciones menores, el ciclo del  $\text{CH}_4$  en lagos se describe adecuadamente con 3 procesos principales; las emisiones de  $\text{CH}_4$  a la atmosfera, la producción de  $\text{CH}_4$  por metanogénesis en los sedimentos y la oxidación de  $\text{CH}_4$  por metanotrofia. La determinación de la velocidad de oxidación de  $\text{CH}_4$  por metanotrofia es, por lo tanto, primordial para determinar el ciclo del  $\text{CH}_4$  y es el objetivo de este trabajo.

### Técnicas actuales para determinar actividad metanotrófica.

La actividad metanotrófica se determina generalmente mediante dos métodos;

1. Perfiles de concentración: Determinar el perfil de concentración de  $\text{CH}_4$  disuelto en la columna de agua del lago permite estimar la velocidad de oxidación. En efecto, tal como lo hemos descrito, el  $\text{CH}_4$  se produce generalmente en los sedimentos y migra hacia la superficie, por difusión molecular y, ocasionalmente por ebullición. Por lo anterior, se observa generalmente un gradiente de concentración. Conociendo la concentración de  $\text{CH}_4$  en el fondo del lago, su concentración atmosférica y la difusividad o constante de difusión del  $\text{CH}_4$  en la columna de agua, se puede estimar un perfil teórico de concentración del  $\text{CH}_4$ . Considerando que concentraciones de  $\text{CH}_4$  menores a las teóricamente estimadas son producto de la oxidación de  $\text{CH}_4$ , se puede determinar el perfil de velocidad de oxidación del  $\text{CH}_4$  en la columna de agua, comparando el perfil difusivo teórico y un perfil real, determinado experimentalmente. Este método ha sido empleado por varios grupos (Adler, Eckert, & Sivan, 2011; Schmale, et al., 2012; Granin, et al., 2013). Su principal ventaja es que permite la determinación de la actividad real en la columna de agua, pero su principal inconveniente es que requiere de modelos difusivos teóricos que todavía no son consensados. Otro inconveniente mayor, es que esa técnica es aplicable solamente a lagos térmicamente estratificados, porque el régimen de mezclado elimina los gradientes de concentración.

Además de la medición del perfil de concentración del CH<sub>4</sub>, algunos autores reportaron la determinación de la marca isotópica del <sup>13</sup>CH<sub>4</sub> (Bastviken, et al., 2002; Schubert, et al., 2010; Blee, et al., 2014; Morana, et al., 2015). Esos métodos están basados en el fenómeno de fraccionamiento isotópico. Este fraccionamiento describe procesos que afectan a la abundancia relativa de los isótopos, a menudo utilizado en geoquímica de isótopos. Todos los organismos utilizan preferentemente especies isotópicas más ligeras, ya que "los costos de energía" son más bajos, lo que resulta en un fraccionamiento significativo entre el sustrato (más pesado) y el producto (más ligero) biológicamente mediado. A modo de ejemplo, la fotosíntesis toma preferentemente el isótopo ligero del <sup>12</sup>C durante la asimilación de una molécula de CO<sub>2</sub> atmosférico. Ocurre lo mismo en la metanotrofia, los metanótrofos usando preferentemente el <sup>12</sup>CH<sub>4</sub> que el <sup>13</sup>CH<sub>4</sub>. De esta manera, el fraccionamiento isotópico puede ser usado para determinar el porcentaje del CH<sub>4</sub> proveniente de los sedimentos que es oxidado por metanotrofia.

2. Métodos de incubación: Este método directo permite determinar la velocidad de oxidación de CH<sub>4</sub> en una muestra de agua. Ese método consiste en incubar una muestra de agua y determinar la evolución de la concentración de CH<sub>4</sub> durante un tiempo generalmente de 2 a 10 días. Ese método directo es relativamente simple y permite determinar de forma directa la velocidad de oxidación de CH<sub>4</sub>. No obstante, ese método tiene un inconveniente mayor, requiere generalmente del enriquecimiento de la muestra con CH<sub>4</sub> y/o O<sub>2</sub> exógenos. En efecto, las técnicas actuales de cuantificación de CH<sub>4</sub>, tanto por cromatografía como por espectrometría, requieren de muestras en fase gaseosa. En la actualidad no existe técnica que permita determinar la concentración de CH<sub>4</sub> directamente en líquido, con la debida sensibilidad y precisión. Por lo anterior, las técnicas de determinación de la concentración de CH<sub>4</sub> disuelto en agua se basan en el establecimiento de un equilibrio entre la muestra líquida y un espacio de cabeza. Midiendo la concentración de CH<sub>4</sub> en el espacio de cabeza y conociendo el equilibrio gas/líquido (ley de Henry), se puede determinar la concentración de CH<sub>4</sub> en el agua. Por lo anterior, las incubaciones para la determinación de la actividad metanotrófica

requieren de un espacio de cabeza suficientemente importante para permitir la toma de varias muestras y su posterior análisis. Antes de la toma de muestra del espacio de cabeza, el vial de incubación se agita vigorosamente para establecer el equilibrio gas/líquido. La determinación de la actividad metanotrófica se realiza considerando la masa total de CH<sub>4</sub> presente en el vial, es decir, la suma de la masa de CH<sub>4</sub> presente en la muestra de agua y el espacio de cabeza. El uso de espacios de cabeza tiene dos corolarios importantes;

En primer lugar, el CH<sub>4</sub> y el O<sub>2</sub> son gases muy poco solubles, por lo que el uso de un gas libre de CH<sub>4</sub> y de O<sub>2</sub> para el espacio de cabeza significaría un desplazamiento de la casi totalidad del CH<sub>4</sub> y del O<sub>2</sub> disuelto en la muestra de agua. En efecto, a 15°C el coeficiente de partición aire/agua del CH<sub>4</sub> y del O<sub>2</sub> es de aproximadamente 24.5 y 27.0, respectivamente. El uso de un espacio de cabeza de igual volumen a la muestra significaría que 96.1% del CH<sub>4</sub> inicialmente contenido en el líquido se desplazaría hacia el espacio de cabeza y, en el caso del O<sub>2</sub>, se desplazaría aproximadamente 96.4% de la concentración inicial. Por lo anterior, la incubación se realizaría bajo condiciones de muy baja concentración de CH<sub>4</sub> y de O<sub>2</sub>, por mucho inferior a las condiciones reales en el lago. Para evitar lo anterior, usualmente se utiliza aire como espacio de cabeza, enriqueciéndolo con un pequeño volumen de CH<sub>4</sub>. Evidentemente, esa adición de CH<sub>4</sub> y de O<sub>2</sub> modifica considerablemente la concentración de ambos gases en la muestra y la velocidad metanotrófica que se determina durante la incubación corresponde a una velocidad en condiciones de altas concentración de ambos gases, que llamamos “velocidad potencial”.

En segundo lugar, la toma de muestras regulares del espacio de cabeza, modifica en cada muestreo la masa de CH<sub>4</sub> y O<sub>2</sub> presente así como la presión del espacio de cabeza. Por lo tanto, el tratamiento de los resultados debe corregir el impacto de dichos cambios.

Este método ha sido ampliamente utilizado (Deborde, et al., 2010; Duc, et al., 2010; Kankaala, et al., 2006; Utsumi, et al., 1998) y en algunos casos, se corrige la velocidad observada potencial utilizando un modelo de tipo Monod y la concentración observada

de  $O_2$  y  $CH_4$  para estimar la velocidad real en el ecosistema (Martinez-Cruz, et al., 2015; Lofton, Whalen, & Hershey, 2014; Siljanen, et al., 2011). Algunos autores aplicaron el método de incubación conjuntamente con un análisis isotópico que permite determinar, además de la actividad metanotrófica, la asimilación del  $CH_4$ . Algunos autores utilizaron  $^{14}CH_4$  (Rudd, et al., 1974; Bédard & Knowles, 1997; Bastviken, et al., 2002; Miller, et al., 2004; Schubert, et al., 2010; Lofton, Whalen, & Hershey, 2014; Brees, et al., 2014), mientras que otros autores utilizaron  $^{13}CH_4$  (Morana, et al., 2015) ó  $C^3H_4$  (Valentine, et al., 2001; Carini, et al., 2005; Osudar, et al., 2015). Para medir la concentración de isótopos radiactivo ( $^{14}CH_4$  o  $C^3H_4$ ) se utilizan métodos de análisis de centelleo y para medir fracciones de isótopos estables ( $^{13}CH_4$ ) se utilizan métodos de espectrometría de masa o de espectrometría láser.

Otra variante de ese método de incubación es la medición de la concentración de  $CH_4$  en viales con y sin inhibidor de metanotrofia ( $CH_3F$ ) y en ese caso, la actividad metanotrófica se determina a partir de la diferencia de concentración a diferentes tiempos (Hershey, et al., 2015).

## Antecedentes del grupo de trabajo.

Nuestro grupo de trabajo es activo desde hace varios años tanto en el estudio del ciclo del CH<sub>4</sub> en ecosistemas acuáticos como en el desarrollo de métodos rápidos, precisos, aplicables en campo. Es importante subrayar que los métodos que hemos desarrollado se basan en una plataforma tecnológica única; un espectrómetro láser de cavidad integrada (OA-ICOS, por sus siglas en inglés), lo cual facilita considerablemente el trabajo de campo. Al igual que todos los espectrómetros láser, ese detector presenta una sensibilidad proporcional a la distancia recorrida por el rayo láser. Para lograr una alta sensibilidad manteniendo la portabilidad, la espectroscopía láser de cavidad integrada (OA-ICOS) tiene una cavidad con espejos altamente reflejantes que permiten que el láser se refleje alrededor de 1000 veces, generando un recorrido de entre 5 y 10 km. Al estar el láser fuera de eje (OA-ICOS), se previene la interferencia óptica dentro de la cavidad y la retroalimentación óptica del láser con los espejos (Gupta, 2012).

Con esa tecnología, los métodos que el grupo desarrolló son (resumidos en Tabla 2);

1. Medición de la concentración de CH<sub>4</sub> y CO<sub>2</sub> en la columna de agua: Hemos desarrollado un nuevo método OA-ICOS que nos permite determinar, *in situ*, la concentración de CH<sub>4</sub> y CO<sub>2</sub> disuelto en agua, con alta frecuencia (1 dato/segundo) y alta sensibilidad (p.ej.  $5 \cdot 10^{-9}$  g L<sup>-1</sup> para el CH<sub>4</sub>; Gonzalez-Valencia, 2014).
2. Medición de las emisiones de CH<sub>4</sub> y CO<sub>2</sub> a la atmosfera: Estamos utilizando ahora la misma plataforma tecnológica; OA-ICOS, para la determinación de las emisiones de CH<sub>4</sub> y CO<sub>2</sub>, que nos permite obtener una definición espacial y temporal significativamente mejor que los métodos tradicionales.
3. Medición de la actividad metanotrófica: Hemos iniciado con métodos usando “tunable diode laser absorption spectroscopy” (TDLAS Martinez-Cruz, et al., 2012, 2015) pero con el interés de migrar la plataforma tecnológica hacia la tecnología OA-ICOS, que tiene una sensibilidad mayor. Este método es el objeto del presente trabajo.

En cuanto a la aplicación de los métodos desarrollados por nuestro grupo, hemos estimado las emisiones de GEI en lagunas de estabilización (Hernandez-Paniagua, et al., 2014) y en lagos (Sepulveda-Jauregui et al., 2013), hemos determinado el impacto de la contaminación sobre las emisiones de GEI en lagos templados y tropicales (Gonzalez-Valencia, et al., 2014a) y hemos aplicado los métodos para determinar la importancia de la metanotrofia (Martinez-Cruz et al., 2015) y de las dinámicas de CH<sub>4</sub> en lagos subárticos (Sepulveda-Jauregui et al., 2015). En el historial del grupo, hemos cubierto tanto ecosistemas tropicales, templados y subárticos, de México y Estados Unidos y recientemente, caracterizamos los ríos Solimoes, Negro, Amazona y Tapájos, de la cuenca amazónica brasileña. Desde 2014 estamos también colaborando con la Universidad de Magallanes para la caracterización de lagos subantárticos.

Tabla 2. Técnicas desarrolladas por el grupo de trabajo.

<b>TÉCNICA</b>	<b>MEDICIÓN</b>	<b>DETERMINACIÓN</b>	<b>ACTIVIDAD REAL/ POTENCIAL</b>	<b>REFERENCIA</b>
<b>CÁMARA ESTÁTICA-ICOS</b>	Flux	Emisión	_____	Gonzalez-Valencia, et al., 2014
<b>HE-ICOS</b>	Concentración en una muestra	Perfil (calibración de M-ICOS)	_____	Gonzalez-Valencia, et al., 2014
		Metanotrofia	Real y Potencial	Este trabajo
<b>M-ICOS</b>	Concentración continua	Perfil	_____	Gonzalez-Valencia, et al., 2014

## Justificación

El ciclo del metano en lagos depende de dos procesos biológicos antagónicos, a saber la metanogénesis y la metanotrofía. Se estima que la metanotrofía oxida entre el 30 y el 99% del  $\text{CH}_4$  producido por metanogénesis. La determinación de la velocidad de oxidación de  $\text{CH}_4$  por metanotrofía es por lo tanto primordial para determinar el ciclo del  $\text{CH}_4$ . Las técnicas actualmente disponibles se basan en; (i) la estimación de la velocidad de oxidación con base en modelo difusivos y (ii) la incubación de muestras. El primer método permite determinar un perfil de actividad pero requiere el uso de modelos que todavía no son consensados y son aplicables solamente en lagos térmicamente estratificados, mientras que el segundo método es una estimación directa, aplicable a cualquier ecosistema, pero bajo condiciones modificadas de  $\text{O}_2$  y  $\text{CH}_4$ , lo cual la convierte a mediciones de potencial metanotrófico que no corresponde necesariamente a las condiciones reales del ecosistema.

Por lo tanto, se requiere de un método sencillo que permita determinar la actividad metanotrófica real en lagos, de forma rápida y sencilla y que cubra un amplio rango de velocidades. Este método debe permitir la incubación de muestras discretas sin modificar las condiciones iniciales, para obtener velocidades de actividad metanotrófica en las condiciones reales de los lagos.

## Hipótesis

El método desarrollado, basado en un detector OA-ICOS conjuntamente con incubaciones de jeringas herméticas, permitirá determinar la actividad metanotrófica en lagos, en condiciones reales y potenciales.

## Objetivo

### Objetivo General

Desarrollar un método para determinar la actividad metanotrófica real y potencial en la columna de agua de lagos, basado en espectroscopía láser.

### Objetivos Específicos

- Desarrollar un método para determinar actividad metanotrófica en la columna de agua de lagos, en condiciones reales y potenciales.
- Aplicar el método en lagos subantárticos y templados.
- Comparar actividad metanotrófica, bajo condiciones reales y potenciales, en lagos subantárticos y templados.

## Materiales y métodos

### Método de determinación de actividad metanotrófica.

Basado en una revisión de la literatura que mostró que la técnica de determinación de actividad metanotrófica por incubación es más fácil de utilizar que los métodos basados en el perfil de  $\text{CH}_4$  disuelto en la columna de agua, se consideró el desarrollo de un nuevo método de incubación. Tal como lo hemos visto en los antecedentes, el principal problema de las técnicas tradicionales de incubación es el requerimiento de un espacio de cabeza, para poder medir la concentración de  $\text{CH}_4$  disuelto, con base en el equilibrio gas/líquido. Ese espacio de cabeza impide la medición de la actividad metanotrófica en condiciones idénticas a las del ecosistema acuático. Para eliminar esos inconvenientes, nuestro planteamiento es; (i) realizar incubaciones sin espacio de cabeza, (ii) tomar sub-muestras de líquido a tiempos regulares, (iii) determinar la concentración de  $\text{CH}_4$  en esas sub-muestras de forma independiente al recipiente de incubación y, por lo tanto, (iv) realizar las incubaciones en viales de volumen variables para que la toma de las sub-muestras no afecte la presión del sistema. Para realizar lo anterior, se propuso; (i) utilizar jeringas como recipiente de incubación y (ii) utilizar un detector OA-ICOS para determinar la concentración de  $\text{CH}_4$  en las sub-muestra, de acuerdo con un esquema tradicional de equilibrio gas/líquido entre la sub-muestra de agua y un espacio de cabeza libre de  $\text{CH}_4$ . La Figura 4 muestra un esquema del concepto general, con las siguientes etapas;

1. Muestras de agua son tomadas a la profundidad deseada del lago, mediante una bomba peristáltica operada con batería. Para evitar entradas de aire atmosférico, se purgan las jeringas tres veces con nitrógeno libre de  $\text{CH}_4$  antes de enjuagarlas varias veces con agua de la muestra, evitando la presencia de burbujas de gas.
2. Las mismas jeringas se incuban a la temperatura media del lago.
3. A tiempo regulares se toman sub-muestras de las jeringas para la determinación de la concentración de  $\text{CH}_4$  disuelto. Las jeringas de sub-muestreo se purgan previamente con nitrógeno libre de  $\text{CH}_4$ .
4. Una vez conteniendo la sub-muestra, se añade a la jeringa un volumen conocido de nitrógeno libre de  $\text{CH}_4$ .
5. Se establece el equilibrio gas/líquido mediante agitación con un vortex.

6. Se elimina la fase líquida de las jeringas de sub-muestreo.
7. Se inyecta el espacio de cabeza de las jeringas de sub-muestreo en un flujo continuo y conocido de nitrógeno libre de  $\text{CH}_4$  que pasa por el detector OA-ICOS.
8. El detector da una señal de respuesta de tipo “pico” de forma semejante a un cromatógrafo de gas, señal que se integra para determinar la concentración de  $\text{CH}_4$ , mediante la calibración correspondiente.

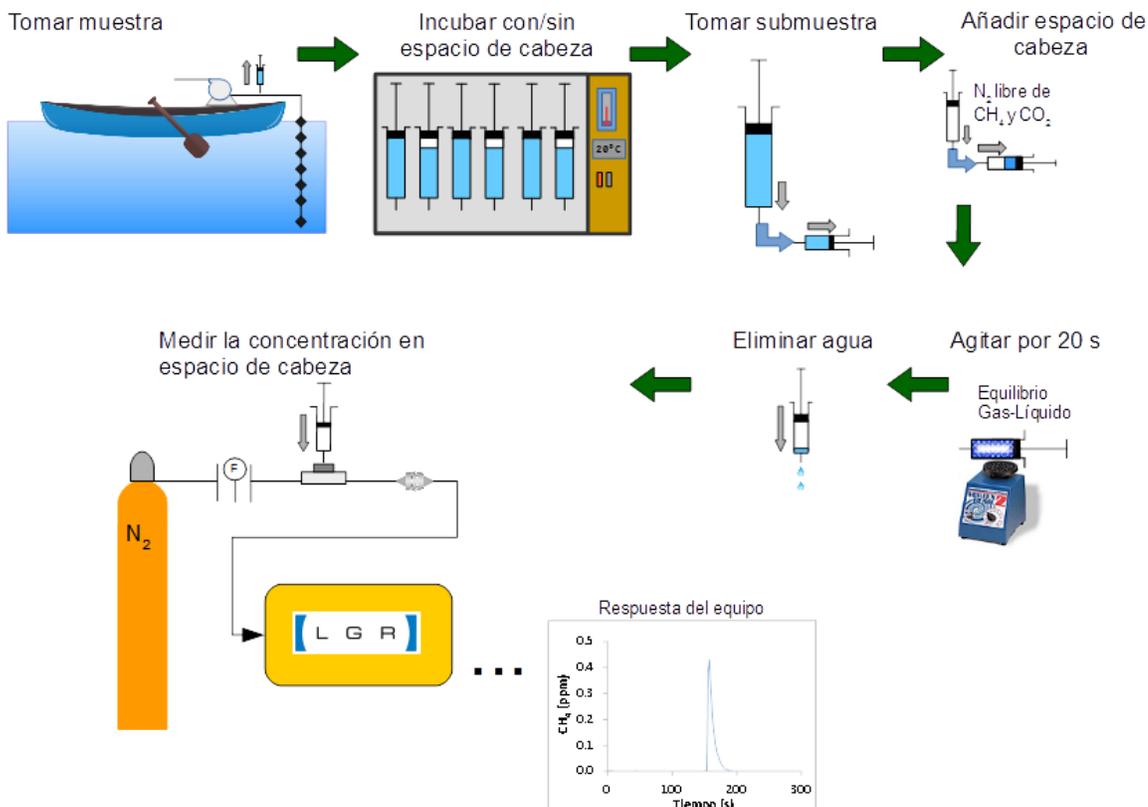


Figura 4. Descripción general del método MA-ICOS. Las etapas son explicadas en el texto previo.

Como lo hemos descrito anteriormente, este método permite determinar la actividad metanotrófica bajo condiciones reales. El mismo concepto puede utilizarse para determinar la actividad potencial, asegurándose que las jeringas de incubación contengan un espacio de cabeza de aire enriquecido con  $\text{CH}_4$ . El mismo método permite por lo tanto medir actividad real y potencial. Este método se nombró MA-ICOS, por sus siglas en inglés; “Methanotrophic Activity - Integrated Cavity Output Spectroscopy”. Cabe mencionar que el uso de un detector OA-ICOS permite el uso de la misma plataforma tecnológica que las técnicas de medición de fluxes y de concentración de gas disuelto, desarrollados por el grupo de trabajo.

En una primera etapa, utilizamos jeringas de incubación de polipropileno (PP) de 60 mL, para la realización de los ensayos de metanotrofia real y potencial. No obstante, tal como lo describiremos en la sección de resultados, en el transcurso de este trabajo observamos que la permeabilidad del PP no era despreciable e influyó sobre la concentración de CH<sub>4</sub> y O<sub>2</sub>. Por lo anterior, en una segunda etapa se sustituyeron las jeringas de PP de 60 mL por jeringas de 10 mL de vidrio para la realización de los ensayos de actividad real. Como lo veremos, las jeringas de PP de 60 mL no fueron sustituidas para los ensayos de actividad potencial. En todos los casos las sub-muestras fueron tomadas con jeringas de PP de 12 mL. Los detalles metodológicos están descritos en la Tabla 3.

Tabla 3. Metodología de MA-ICOS con las diferentes jeringas de incubación.

		<i>Real PP</i>	<i>Real vidrio</i>	<i>Potencial PP</i>
<i>Incubación</i>	Volumen muestra (mL)	60	10-12	50
	Volumen espacio de cabeza (ml)	No Aplica	No Aplica	10
	Gas utilizado	No Aplica	No Aplica	Aire+CH <sub>4</sub>
	Tiempo de agitación (s)	No Aplica	No Aplica	20
<i>Medición</i>	Volumen sub-muestra (mL)	5	2-3	2-5
	Volumen espacio de cabeza (mL)	5	5	5
	Gas utilizado	N <sub>2</sub>	N <sub>2</sub>	N <sub>2</sub>
	Tiempo de agitación (s)	20	20	20

La técnica de determinación de concentración por inyección de muestras discretas en un detector OA-ICOS ha sido previamente utilizada por nuestro grupo de trabajo, así como también por Gülzow et al. (2011), quienes reportaron que la precisión de esa técnica es similar a la de las técnicas de cromatografía. La integración del pico de respuesta del detector OA-ICOS se realizó de forma numérica con un programa Excel. La calibración del método se realizó con la inyección de volúmenes conocidos de estándares de 20, 50, 100, 200 y 500 ppm (INFRA, México). Los estándares se midieron también en un Cromatógrafo de gases. Una vez obtenida la concentración en el espacio de cabeza de la jeringa de sub-muestra, se determinó la concentración en la muestra líquida original mediante la constante de Henry (Ecuaciones 1, 1.1 y 1.2), donde; C<sub>m</sub> es la concentración de CH<sub>4</sub> en la muestra original (mg·L<sup>-1</sup>), C<sub>i</sub> la concentración de CH<sub>4</sub> en la sub muestra (mg·L<sup>-1</sup>), α el coeficiente de partición aire-agua (-), V<sub>i</sub> el volumen de sub-muestra (mL), V<sub>g</sub> el

volumen de N<sub>2</sub> añadido como espacio de cabeza (mL), C<sub>g</sub>, concentración de CH<sub>4</sub> en el espacio de cabeza (mg·L<sup>-1</sup>), PM<sub>CH<sub>4</sub></sub> el peso molecular de CH<sub>4</sub>, V<sub>mol</sub> el volumen molar a presión y temperatura de incubación (L·mol<sup>-1</sup>) y H la constante de Henry a la temperatura de incubación (mol·L<sup>-1</sup>·bar<sup>-1</sup>) (NIST, 2011).

$$C_m = \left( \frac{(C_l * V_l) + (C_l) * \alpha * V_g}{V_l} \right) \quad (1)$$

$$C_l = C_g * \frac{(PM_{CH_4}) * 1000}{1000000 * V_{mol} * \alpha} \quad (1.1)$$

$$\alpha = \frac{1}{H * V_{mol} * 1.013} \quad (1.2)$$

La velocidad de oxidación de CH<sub>4</sub> real se determinó con base en la diferencia de concentración (C<sub>m</sub>) en función del tiempo. En el caso de la determinación de la velocidad potencial, como la incubación se realizó en jeringas con espacio de cabeza, se requirió de un cálculo adicional. En efecto, para determinar la actividad metanotrófica, se requiere determinar el consumo total de CH<sub>4</sub>, presente tanto en el agua como en el espacio de cabeza de la jeringa de incubación. Para tal efecto, se definió una concentración total aparente de CH<sub>4</sub> (C\*<sub>m</sub>), igual a la masa total de CH<sub>4</sub> presente en la jeringa de incubación dividida por el volumen de agua presente en dicha jeringa (Ecuación 1.3), donde C\*<sub>m</sub> es, como ya se mencionó, la concentración de CH<sub>4</sub> en la jeringa de incubación (mg·L<sup>-1</sup>), C<sub>m</sub> la concentración de CH<sub>4</sub> en la sub muestra (mg·L<sup>-1</sup>), α el coeficiente de partición aire-agua (-) (Ecuación 1.2), V<sub>lv</sub> el volumen de líquido en la jeringa de incubación (mL), y V<sub>gv</sub> el volumen de gas en jeringa de incubación (mL).

$$C_m^* = \frac{(C_m * V_{lv}) + (C_m * \alpha * V_{gv})}{V_{lv}} \quad (1.3)$$

Para determinar la velocidad de oxidación, se realizaron ajustes a cinéticas tipo Monod. Se trazaron gráficas de concentración vs tiempo, y se calculó la velocidad al origen, considerando los parámetros de K<sub>s</sub> y R<sub>max</sub> resultantes del ajuste, así como la concentración inicial de la muestra.

Con el fin de reducir el error experimental, se realizó un análisis volumétrico exhaustivo de las jeringas, con el fin de determinar el volumen real de las jeringas y el error asociado al volumen. El método utilizado fue gravimétrico, llenando las jeringas con agua destilada a 20°C hasta diferentes volúmenes marcados, y pesando el agua añadida con una balanza electrónica Velab ES-1000H (capacidad máxima 1000 g; precisión 0.01 g). La densidad del agua se calculó de acuerdo a la Ecuación 3.1 (ver más adelante).

El método que planteamos se basa en el establecimiento de un equilibrio gas/líquido en las jeringas de 12 mL de sub-muestras así como en las jeringas de PP de 60 mL utilizadas para determinar velocidades potenciales de la metanotrofia. El tiempo de agitación requerido para alcanzar el equilibrio fue determinado de acuerdo con Sepulveda-Jauregui, et al., (2012). En una jeringa de sub-muestreo de 12 ml se tomaron 5 ml de una muestra de agua sintética con una concentración conocida de CH<sub>4</sub> disuelto, se añadieron 5 ml de N<sub>2</sub> y se agitó durante un tiempo determinado. Después se midió la concentración en el espacio de cabeza, retirando previamente el agua de la jeringa. Se determinó el coeficiente de transferencia de masa K<sub>L</sub>a mediante la Ecuación 2, donde; %sat es el porcentaje de saturación de CH<sub>4</sub> y t el tiempo de agitación.

$$K_L a = -\ln \frac{100 - \%sat}{100} * \frac{1}{t} \quad (2)$$

Cabe mencionar que los ensayos de equilibrio se realizaron exclusivamente con las jeringas de 12 mL. En efecto, Sepulveda-Jauregui y col. (2012) ya reportaron curvas de equilibrio en recipiente de las mismas dimensiones que las jeringas de 60 mL utilizadas para la determinación de la velocidad de oxidación de CH<sub>4</sub> potencial.

Para determinar la permeabilidad al O<sub>2</sub> y CH<sub>4</sub> de las jeringas se realizaron experimentos con agua sintética, con una concentración determinada de CH<sub>4</sub>, o saturadas de N<sub>2</sub>, y se determinó el cambio de concentración de O<sub>2</sub> y CH<sub>4</sub> durante un tiempo similar al de la incubación de las muestras de los lagos (10 días). Para la medición del cambio de concentración de CH<sub>4</sub> se utilizó la técnica MA-ICOS, y para la concentración de O<sub>2</sub> se utilizó un sensor de fluorescencia (Quenching fluorescent sensor), el cual se basa en la

atenuación de la fluorescencia de una molécula activa en presencia de  $O_2$ . Dicha molécula se encuentra contenida en un parche que puede adherirse a la pared de un recipiente, en este caso, en las jeringas. Para realizar la medición, se colocaron las jeringas, con parche, sobre un equipo de medición de fluorescencia (CellPhase, Fluorometrix E.U.). Esta técnica ya ha sido utilizada por el grupo de trabajo (Gerardo Nieto, 2014), demostrando que puede medirse el  $O_2$  de forma no invasiva en diversos recipientes.

#### Análisis de datos

Los datos obtenidos de cambio de concentración respecto al tiempo se ajustaron a un modelo simple de Monod, utilizando el programa AquaSim 2.0 para estimar los parámetros cinéticos de  $K_S$  y  $R_{max}$ . Con estos datos, y con la concentración inicial medida, se calculó la velocidad de oxidación de  $CH_4$ . Los perfiles verticales de velocidad de oxidación se presentan como la media aritmética de las réplicas con su respectiva desviación estándar.

Tanto la calibración de estándares, como determinación de la precisión del OA-ICOS y de las jeringas utilizadas, se obtuvieron a partir de regresiones lineales, realizadas con Microsoft Office Excel 2013.

#### Sitios de estudio.

Para probar el método de determinación de la actividad metanotrófica, lo aplicamos para determinar perfiles de actividad en tres lagos, dos mexicanos y uno chileno. Los lagos mexicanos fueron Presa-Lago de Guadalupe (LG), ubicado en el municipio de Cuautitlán Izcalli, y Presa El Llano (LL), en el municipio de Villa del Carbón, ambos del Estado de México. Estos dos cuerpos de agua se encuentran en la misma cuenca hidrológica, a la misma altitud, por lo tanto, tienen las mismas características macroclimáticas (Sepulveda-Jauregui, et al., 2013). Esos dos lagos se distinguen por un nivel trófico drásticamente diferente; siendo el Lago de Guadalupe hipereutrófico y altamente contaminado mientras que el Lago el Llano es mesotrófico y no contaminado.

En cuanto al lago chileno, seleccionamos el Lago Hambre (LH), el cual también es mesotrófico y no contaminado. Este lago se localiza a 80 km de la ciudad de Punta Arenas, capital de la Región de Magallanes. Esta zona cuenta con una densidad poblacional estimada de 1.2 hab/km<sup>2</sup> (INE, 2012). Por otra parte, LH se localiza dentro de la ecorregión subantártica de Magallanes, que es una de las 24 mejor conservadas en el mundo (Rozzi, et al., 2012). Cada uno de los lagos fue caracterizado en dos épocas contrastantes.

*Tabla 4. Ubicación de los puntos de muestreo.*

<b>LAGO</b>	<b>UBICACIÓN</b>	<b>FECHAS DE MUESTREO</b>	<b>PUNTO DE MUESTREO</b>
<b>EL LLANO</b>	Villa del Carbón, Edo. de México, México	Abril (primavera) y julio (verano)	19.6584° N, 99.5076° O
<b>GUADALUPE</b>	Cuautitlán Izcalli, Edo. de México, México	Abril (primavera) y julio (verano)	19.6310° N, 99.2567° O
<b>HAMBRE</b>	Puerto del Hambre, Magallanes, Chile	Febrero (verano) y junio (otoño-invierno)	53.1758° S, 71.0083° O

#### Muestreo.

Jeringas limpias, tanto de polipropileno como de vidrio, se llenaron con N<sub>2</sub> de alta pureza en el laboratorio, antes de ir al sitio de muestreo. Una vez en el punto de muestreo se les vació el N<sub>2</sub> y se llenaron con agua del lago a una determinada profundidad. El llenado fue utilizando una bomba peristáltica, y después de enjuagar tres veces cada jeringa, éstas se cerraron con una válvula de 3 vías. Las muestras se tomaron por duplicado, considerando entre 8 y 10 profundidades para cada lago. La profundidad se seleccionó con base en la concentración de OD, misma que se midió con una sonda multiparamétrica YSI 556 o HANNA HI 9828. De esta manera se tomaron muestras de la zona tanto óxica como anóxica de cada lago, mismas que fueron incubadas a la temperatura media del lago, durante una semana aproximadamente.

#### Estratificación y mezclado.

Para determinar el régimen de estratificación o mezclado de los lagos, se usó el parámetro de estabilidad relativa de la columna de agua (RWCS por sus siglas en inglés), el cual otorga un valor numérico, basándose en la diferencia de densidad entre el agua

superficial y el agua del fondo del lago, considerando que la diferencia entre estas densidades es la fuerza motriz que ocasiona el mezclado de las aguas. La densidad del agua depende principalmente de su temperatura, por lo que RWCS se determina con base en la diferencia de temperaturas, como lo muestra la Ecuación 3 (Naselli-Flores & Barone, 2005), donde;  $\rho_f$  es la densidad del agua en el fondo,  $\rho_s$  la densidad del agua superficial,  $\rho_{4^\circ}$  la densidad del agua a 4°C y  $\rho_{5^\circ}$  la densidad del agua a 5°C.

$$RWCS = \frac{\rho_f - \rho_s}{\rho_{4^\circ} - \rho_{5^\circ}} \quad (3)$$

Para calcular la densidad del agua de cada lago, se utilizó la ecuación (3.1) (Tanaka, et al., 2001), la cual toma en cuenta la temperatura del agua (T, en °C) y añade correcciones por aire disuelto ( $C_{ad}$ ) y el factor de compresibilidad ( $F_c$ ), así como constantes que dependen de la temperatura ( $a_1=-3.983035^\circ\text{C}$ ,  $a_2= 301.797^\circ\text{C}$ ,  $a_3=522\ 528.9^\circ\text{C}^2$ ,  $a_4=69.34881^\circ\text{C}$ ,  $a_5=999.972\ \text{kg}\cdot\text{m}^{-3}$ ).

$$\rho = \left\{ a_5 \left[ 1 - \frac{(T+a_1)^2(T+a_2)}{a_3(T+a_4)} \right] + C_{ad} \right\} * F_c \quad (3.1)$$

Para calcular los factores de corrección  $C_{ad}$  y  $F_c$ , se tienen las ecuaciones (3.2) y (3.3).

$$F_c = [1 + (K_0 + K_1 * T + K_2 * T^2) * (P - P_0)] \quad (3.2)$$

Donde:

P= presión atmosférica en Pa

$P_0 = 101\ 325\ \text{Pa}$

$K_0 = 50.74 \times 10^{-11}\ \text{Pa}^{-1}$

$K_1 = -0.326 \times 10^{-11}\ \text{Pa}^{-1}\cdot^\circ\text{C}^{-1}$

$K_2 = 0.004\ 16 \times 10^{-11}\ \text{Pa}^{-1}\cdot^\circ\text{C}^{-2}$

$$C_{ad} = s_0 + s_1 * T \quad (3.3)$$

Donde:

$s_0 = 4.612 \times 10^{-3}\ \text{kg}\cdot^\circ\text{m}^{-3}$

$s_1 = 0.106 \times 10^{-3}\ \text{kg}\cdot^\circ\text{m}^{-3}\cdot^\circ\text{C}^{-1}$

Una vez obtenido el valor de RWCS, se clasificó el mezclado del lago de acuerdo al criterio utilizado por Branco y col. (2009), como se muestra en la tabla 5. El perfil de temperatura de cada lago fue medido con una sonda YSI 556 para el periodo de primavera de LG y LL

y de verano para LH, mientras que los otros muestreos fueron con una sonda HANNA HI 9828.

*Tabla 5. Clasificación de acuerdo al RWCS*

<b>Valor de RWCS</b>	<b>Régimen del lago</b>
<b>RWCS &lt;16.3</b>	Mezclado
<b>16.3 &lt; RWCS &lt; 56.5</b>	Débilmente estratificado
<b>RWCS &gt;56.5</b>	Fuertemente estratificado

## Resultados

### Régimen de mezclado

La temperatura se midió in situ, y con estos datos, se calculó el RWCS, de acuerdo con la ecuación de Naselli-Flores y col. (2005), mencionada en el capítulo de Material y Métodos. El régimen de mezclado o estratificación se determinó de acuerdo con Branco y col. (2009). Estos resultados se muestran en la tabla 6.

Tabla 6. Régimen de mezclado/estratificado en cada época de muestreo.

Lago	Régimen (RWCS)		
	Primavera	Verano	Invierno
<b>LG</b>	Estratificación fuerte (106.43)	Estratificación fuerte (67.93)	-----
<b>LL</b>	Estratificación fuerte (98.23)	Mezclado (15.85)	-----
<b>LH</b>	-----	Estratificación fuerte (66.50)	Mezclado (0.77)

La Figura 5 muestra los perfiles de temperaturas de los lagos. Se puede apreciar el régimen de mezclado de LL en verano y de LH en invierno. LH presentó una temperatura casi uniforme en la columna de agua. Por otra parte, la Figura 5 muestra que LG presentó una estratificación fuerte en ambos muestreos, siendo la diferencia de temperaturas entre la superficie y el fondo de hasta 4°C. Magaña Rodríguez (2013) y Gerardo Nieto (2014) reportaron resultados similares en cuanto a los regímenes de estratificación en LG, señalando que el mezclado tiende a ser en invierno. Nuestros resultados, combinados con los de Magaña Rodríguez (2013) y de Gerardo Nieto (2014) sugieren que los 3 lagos estudiados son monomícticos.

La gráfica de temperatura para LG en verano termina en 14m, cuando la misma gráfica muestra mediciones en primavera de hasta 20 m. Esa diferencia de nivel de agua se debió a la extracción de una importante cantidad de agua durante la época de sequía. Magaña Rodríguez (2013) también reportó disminución del nivel de LG por la misma causa.

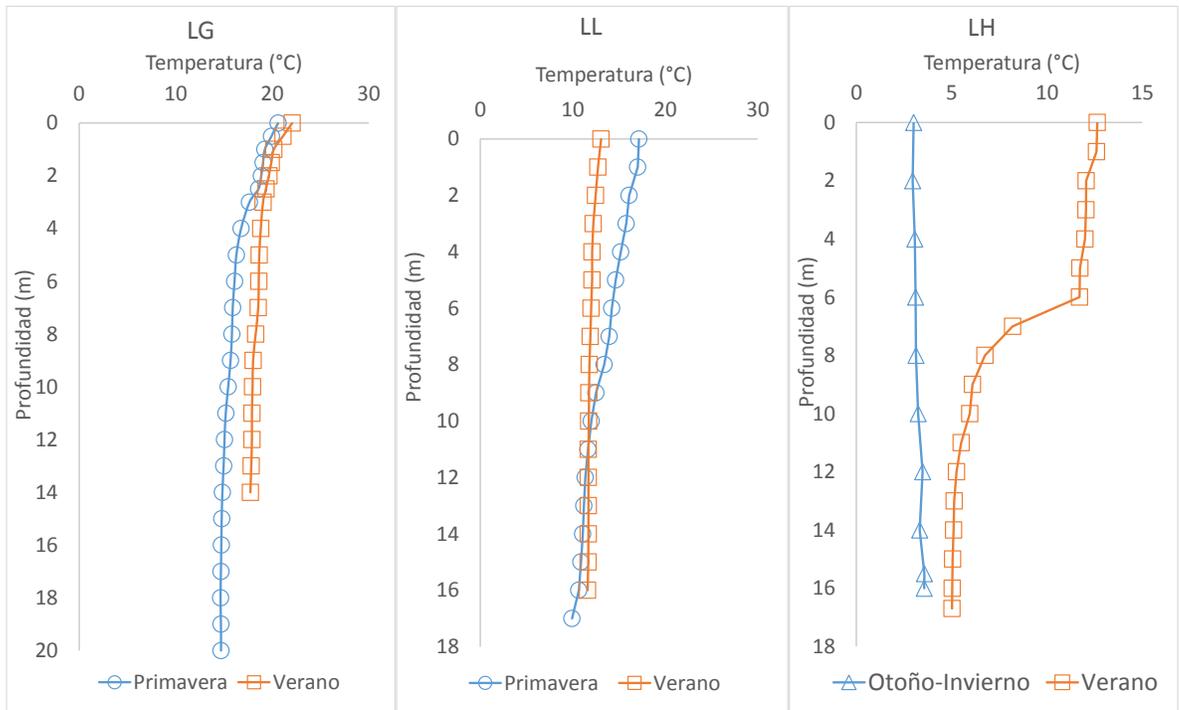


Figura 5. Perfiles de temperatura en diferentes estaciones del año.

### Perfil de Oxígeno Disuelto

El OD se midió in situ en cada muestreo, y a partir de los datos obtenidos se realizaron perfiles, mismos que se presentan en la Figura 6. En el caso de LL sólo se midió OD en primavera, debido a una falla de la sonda multiparamétrica durante el muestreo de verano. En LG, la oxiclina y la termoclina no coincidieron, como reportado anteriormente por Magaña Rodríguez (2013) y González Valencia (2010). Esa diferencia de perfil sugiere que el estado trófico de LG controló más el perfil de OD que la estratificación térmica. Al ser un lago que se mezcla una sola vez al año, se dificulta la transferencia de oxígeno de la atmósfera a zonas inferiores a la oxiclina. Por otro lado el lago con mayor temperatura fue LG, y Sepúlveda Jáuregui (2008) menciona que a mayor temperatura del lago, menor solubilidad de oxígeno en éste, además de favorecer la actividad microbiana, agotando el O<sub>2</sub> presente y generando zonas anóxicas.

En LL y en LH, en cambio, la oxiclina coincidió con la termoclina. En el caso de LL, toda la columna de agua presentó condiciones óxicas. Este lago se cataloga como mesotrófico, lo cual explica que la columna de agua se encuentre más oxigenada en comparación con

LG, como lo reportan González Valencia (2010) y Sepúlveda Jáuregui (2008), además de que presenta mezclado en verano, permitiendo la transferencia de O<sub>2</sub> a lo largo de la columna de agua. A pesar de no contar con datos para realizar un perfil de OD en el muestreo de verano, se infiere que, por presentar régimen de mezclado, las condiciones de la columna de agua también eran óxicas.

La Figura 6 muestra que en LH la concentración de OD en verano era más baja que en invierno, probablemente debido a que la temperatura del lago era baja (2°C) en invierno, favoreciendo la solubilidad del oxígeno y también por una menor actividad de respiración microbiana. Por otra parte, en verano se distinguió claramente la oxiclina, y después de los 6m el agua carecía de OD. Cabe señalar que nuestro grupo de trabajo es pionero en el estudio de este lago, por lo que no se tienen reportes previos de su caracterización.

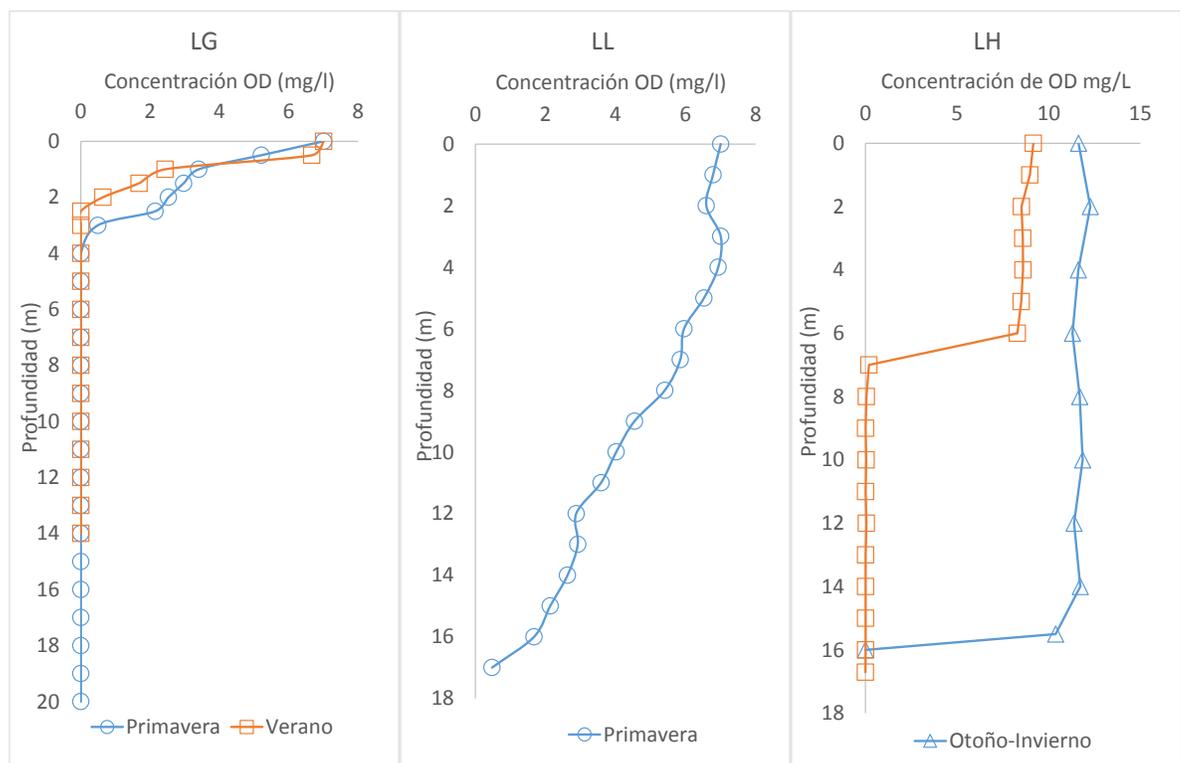


Figura 6. Perfiles de OD en diferentes épocas del año.

A partir de estos perfiles de oxígeno, se determinó la profundidad a la que se tomaron las muestras, con la finalidad de abarcar tanto la zona óxica como la anóxica.

### Determinación de actividad metanotrófica

Técnica de medición de concentración de CH<sub>4</sub> disuelto

#### *Precisión analizador OA-ICOS.*

Con el fin de verificar la concentración de los estándares que posteriormente sirvieron para la calibración del detector OA-ICOS, se verificó la concentración de 8 estándares por cromatografía de gas. Los resultados obtenidos se muestran en la Figura 7A, con una pendiente de 1.0016 y un coeficiente de correlación de 0.9999. En una segunda etapa, esos mismos estándares fueron inyectados al analizador OA-ICOS, y las mediciones obtenidas se muestran en la Figura 7B, con una pendiente de 0.9998 y un coeficiente de correlación de 0.9986. Esos resultados confirman la precisión del espectrómetro OA-ICOS, con un coeficiente de variación de  $0.65\% \pm 0.2$ .

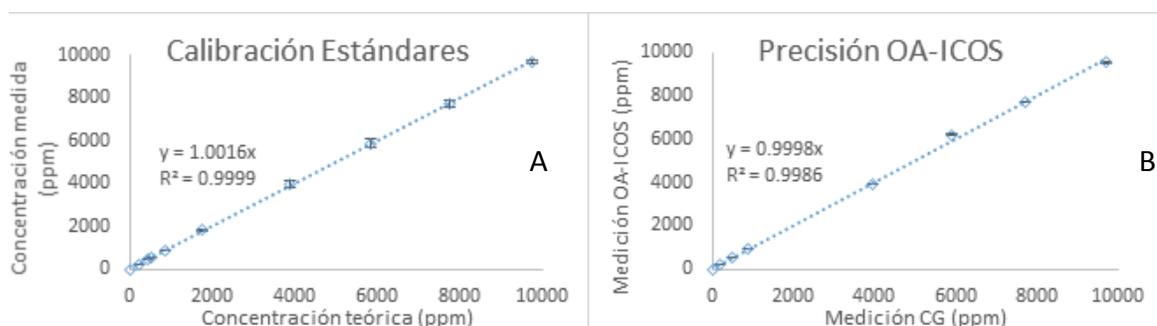


Figura 7. A) Calibración de estándares en Cromatógrafo de Gases. B) Precisión del analizador de GEI basado en OA-ICOS.

#### *Calibración volumétrica de jeringas.*

Como se mencionó en Material y Métodos, nuestro método se basa en diversas configuraciones de jeringas, con y sin espacio de cabeza. En varias etapas de la metodología, se establecen equilibrios gas/líquido, muy sensibles a cualquier error de volumen. Por lo anterior, una etapa primordial en el desarrollo del método era asegurarnos de la precisión de los volúmenes de las jeringas de incubación y de sub-

muestras. Tanto las jeringas de 12 ml como las de 60ml se llenaron a diferentes volúmenes marcados, y se verificó el volumen de forma gravimétrica. El coeficiente de variación del volumen de las jeringas de 12 fue de  $0.34\% \pm 0.26$ , con un máximo 0.7%, y en el caso de las jeringas de 60 ml el CV fue de  $0.13\% \pm 0.07$  con un máximo de 0.3%. Las gráficas de la calibración volumétrica se muestran en la Figura 8.

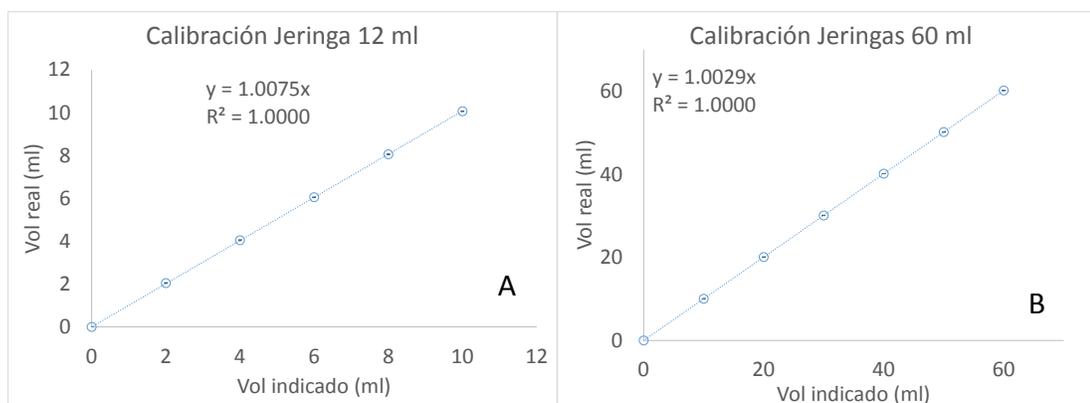


Figura 8. Precisión jeringas A) 12ml y B) 60ml. Las barras de error son tan pequeñas que no se alcanzan a ver en el gráfico.

### Permeabilidad jeringas

Al inicio de este trabajo, se desarrolló el método con jeringas de PP. En el transcurso del proyecto, se observó que dichas jeringas eran permeables a los gases. Para cuantificar dicha permeabilidad y establecer el impacto que pueda tener sobre los experimentos se determinó el coeficiente de transferencia de masa ( $K_{La}$ ). La Figura 9A muestra un ejemplo de la evolución de la concentración de OD en una jeringa de 60 mL de PP, previamente llenada con agua anóxica. La Figura 9A muestra un comportamiento asintótico, relativamente bien descrito por una ecuación de  $K_{La}$ . En promedio, el  $K_{La}$  fue de  $0.033 \pm 0.004 \text{ h}^{-1}$ . Este valor de  $K_{La}$  corresponde a una tasa máxima de transferencia de oxígeno ( $OTR_{max}$ ) de  $0.20 \text{ mg L}^{-1} \text{ h}^{-1}$ , en las condiciones de la ciudad de México de y de hasta  $0.42 \text{ mg L}^{-1} \text{ h}^{-1}$ , al nivel del mar y una temperatura de  $5^\circ\text{C}$  (condiciones, p.ej. de LH en otoño). Esos valores no son despreciables y significan que las jeringas de PP no permiten la determinación de la actividad metanotrófica real, conservando la misma concentración de OD que la del lago. Al contrario, las jeringas de PP son ideales para

realizar pruebas de actividad potencial, porque evitan condiciones limitantes de OD. Para confirmar lo anterior, se realizaron pruebas abióticas, durante las cuales se determinó la pérdida de CH<sub>4</sub> en jeringa de 60 mL. La Figura 9B muestra un ejemplo de los resultados obtenidos, en la cual se puede observar una pérdida significativa de la concentración inicial de CH<sub>4</sub>.

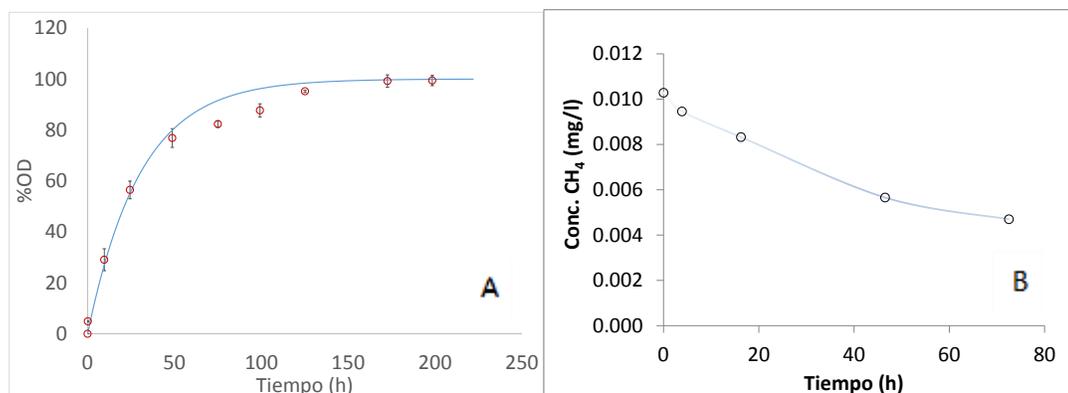


Figura 9. Permeabilidad jeringas de polipropileno. A) Prueba de entrada de O<sub>2</sub>. B) Prueba de pérdida de CH<sub>4</sub>. Ambas pruebas fueron abióticas, en jeringas de 60 mL sin espacio de cabeza.

Los valores de permeabilidad observados corresponden a una pérdida de aproximadamente 20% de la concentración inicial en las primeras 24 h durante ensayos de determinación de actividad metanotrófica. Por esta razón, se determinó utilizar jeringas impermeables, a partir de los segundos muestreos de los lagos. La permeabilidad de las jeringas de vidrio se probó durante nuevos ensayos de laboratorio. Lo resultados obtenidos confirmaron la ausencia de intercambio gas/líquido. Como ejemplo para ilustrar lo anterior, la Figura 12 muestra el perfil de la concentración de CH<sub>4</sub> observado en una muestra de LG anóxica, es decir en ausencia de oxígeno. Esa Figura muestra claramente la ausencia de cambio de concentración, demostrando la ausencia de permeación del CH<sub>4</sub>, e indirectamente, la ausencia de entrada de OD. En efecto, en presencia de entrada de OD, el CH<sub>4</sub> contenido en la muestra hubiera sido oxidado.

#### Tiempo de agitación

Como mencionado en Material y Métodos, varias etapas de la metodología implican el establecimiento de equilibrios gas/líquido, que se alcanzan mediante agitación, con un

vortex. Por lo anterior, una etapa importante del desarrollo del método era determinar el tiempo de agitación requerido para alcanzar el equilibrio en las jeringas de PP de 12ml que fueron utilizadas para determinar la concentración de CH<sub>4</sub> en las sub-muestras. Se hicieron pruebas agitando una alícuota de muestra sintética de concentración de CH<sub>4</sub> conocida a distintos tiempos; i.e. de 5 a 20 s. La Figura 10 muestra un ejemplo de resultado obtenido, indicando que 99% del equilibrio fue alcanzado en 15 s. De acuerdo con ese resultado, las muestras se agitaron por 20 s en el resto de los experimentos. Cabe mencionar que no se realizaron pruebas de equilibrio en jeringas de PP de 60 ml, utilizadas para la realización de los ensayos de potencial metanotrófico, porque ese tiempo de agitación fue previamente caracterizado (Sepulveda-Jauregui et al., 2012).

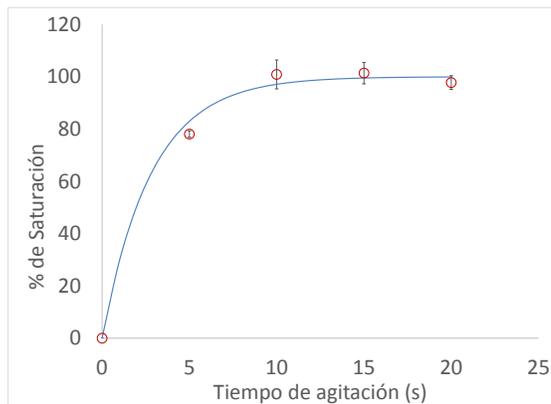


Figura 10. Determinación de tiempo de agitación de la sub-muestra para alcanzar el equilibrio gas/líquido.

#### *Perfiles temporales de concentración de CH<sub>4</sub> real y potencial.*

Durante los ensayos de actividad metanotrófica, se observaron diferentes tipos de perfiles temporales de CH<sub>4</sub> disuelto. Durante los ensayos de actividad real distinguimos 3 tipos de perfiles temporales, que se ilustran en la Figura 11 (columna izquierda). El perfil más observado fue de tipo 2, donde claramente se observa una reducción progresiva de la velocidad de oxidación del CH<sub>4</sub>, resultando en una curva asintótica de la concentración de CH<sub>4</sub>. En otras ocasiones, observamos una velocidad constante, resultando en un perfil de concentración lineal. Finalmente, en algunos casos, observamos perfiles complejos, con cambio repentinos de la velocidad de oxidación. Por

lo general, los perfiles de tipo 1 se observaron a mayor concentración de CH<sub>4</sub> inicial, mientras que los perfiles de tipo 2 fueron generalmente observados a menores concentraciones de CH<sub>4</sub>. Lo anterior sugiere una cinética de tipo Monod, de orden 0 a concentraciones de CH<sub>4</sub> muy superiores a la constante de afinidad y de orden variable a concentraciones cercanas a la constante de afinidad. Por su parte, los perfiles de tipo 3 fueron observados exclusivamente en las muestras de superficie y a concentraciones muy bajas de CH<sub>4</sub>. Lo anterior se podría por lo tanto explicar por errores de medición y/o por un comportamiento biológico más complejo. En efecto, está claramente establecido que, en la superficie de los lagos, los ciclos biogeoquímicos son más complejos que en zonas profundas por ser una zona fótica y con intercambios con la atmosfera.

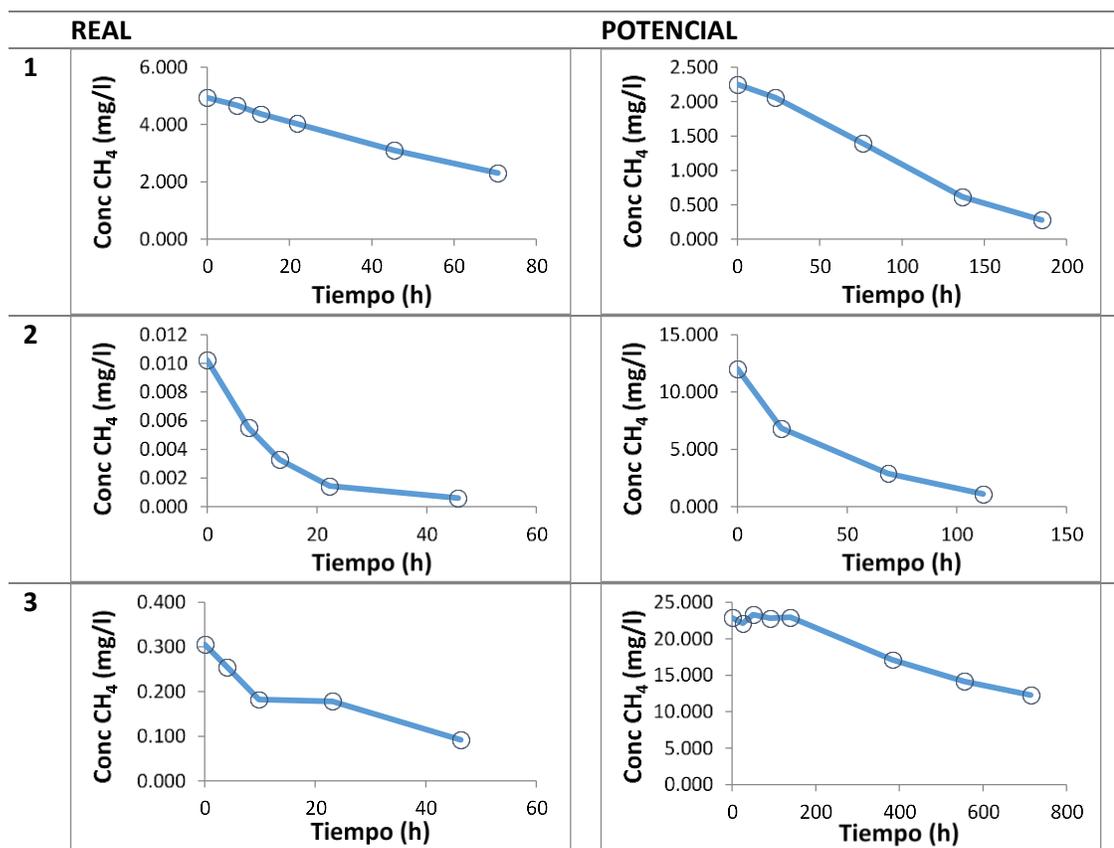


Figura 11. Perfiles temporales de concentración de CH<sub>4</sub>.

De igual forma, durante los ensayos de actividad potencial, se observaron tres tipos de perfiles de CH<sub>4</sub> disuelto (Figura 11, columna derecha), siendo los perfiles de tipo 1 y 2 similares a los perfiles observados durante los ensayos de actividad real. Al contrario, se

observó, en el perfil de tipo 3, la existencia de una fase lag que no se ha observado en ningún ensayo de actividad real. Esa fase lag fue anteriormente reportada en ensayos de actividad potencial por Martínez-Cruz et al. (2015). Se sugiere que esa fase lag sea causada por una adaptación de los microorganismos metanótrofos a las nuevas condiciones del cultivo (concentraciones relativamente altas de OD y de CH<sub>4</sub>).

Considerando los diferentes perfiles temporales observados y para evitar determinaciones arbitrarias, las velocidades de oxidación de CH<sub>4</sub> se determinaron después de un ajuste del modelo de Monod a los datos experimentales. Después de ese ajuste, salvo en los casos de perfiles de tipo 3 de actividades potenciales que fueron los casos donde una fase lag fue observada, la velocidad de oxidación se consideró como la velocidad de oxidación al origen (tiempo 0). En el caso de los perfiles de tipo 3 de actividad potencial se eliminaron los datos de la fase lag para evitar datos que no son propios de la oxidación de metano.

A partir de los ajustes del modelo de Monod a los datos experimentales, se obtuvieron los parámetros cinéticos de velocidad máxima ( $R_{max}$ ) y de constante de afinidad para CH<sub>4</sub> ( $K_s$ ). La Tabla 7 muestra los valores de esos parámetros y sus respectivas desviaciones estándares. Los resultados obtenidos fueron sorprendentes. En efecto y en primer lugar, los valores de  $K_s$  obtenidos por ajuste del modelo de Monod fueron no solamente muy variables sino también muy altos. Los pocos valores de  $K_s$  reportados por la literatura son del orden de 0.07 a 0.17 mg L<sup>-1</sup> (Lidstrom & Somers, 1984; Lofton, et al, 2013; Shelley, et al, 2015). En nuestro caso, los valores obtenidos fueron de 4 a 160 veces mayores (Tabla 7). Valores tan altos son difícilmente justificable y, en nuestra opinión, cuestionable. En efecto, el método que desarrollamos no permitió obtener un gran número de mediciones y por lo tanto, el ajuste del modelo de Monod a los datos experimentales está sujeto a un error probablemente importante. Adicionalmente, la literatura reporta baja identificabilidad de los parámetros  $K_s$  y  $R_{max}$  cuando se determinan en conjunto a partir de un solo set de experimentos (Vanrolleghem, et al., 1995; Vanrolleghem & Keesman, 1996). Adicionalmente, cabe mencionar que los valores de  $R_{max}$  son valores dependientes de la concentración de metanótrofos presente en la muestra.

Desconocemos esos valores y por lo tanto, los valores indicados en la Tabla 7 son sólo indicativos y de ninguna forma intrínsecos. Cabe destacar que la probable baja confiabilidad de los resultados de  $K_s$ , no afecta los valores de actividad. En efecto, los valores de actividades fueron determinados a partir de la pendiente al origen del perfil temporal de  $\text{CH}_4$  disuelto, insensible a los valores de  $K_s$  y/o  $R_{\text{max}}$ .

Tabla 7. Parámetros cinéticos obtenidos en los ensayos de metanotrofia.

		REAL				POTENCIAL			
		Ks	DE	Rmax	DE	Ks	DE	Rmax	DE
LH	Verano	0.795	0.155	0.021	0.018	0.760	0.366	0.046	0.030
	Invierno	0.835	0.156	0.012	0.015	NA	--	NA	--
LL	Primavera	0.894	0.056	0.019	0.009	0.933	0.049	0.028	0.010
	Verano	0.274	0.081	0.006	0.002	0.318	0.151	0.018	0.001
LG	Primavera	0.690	0.261	0.034	0.031	0.676	0.411	0.144	0.050
	Verano	0.935	0.075	0.096	0.100	0.897	0.230	0.183	0.171

También es importante mencionar que los ensayos de actividad metanotrófica real realizadas en jeringas de PP con muestras tomadas a profundidades anóxicas, mostraron un consumo significativo de  $\text{CH}_4$ . Cuando la actividad real fue determinada en jeringas de vidrio, no se observaron ninguna actividad en las mismas muestras. Para ilustrar lo anterior, la Figura 12 muestra un ejemplo de perfil de concentración de  $\text{CH}_4$  observado en jeringas de vidrio, con una muestra anóxica, tomada a 9 m de profundidad en el Lago de Guadalupe. En esa Figura, se muestra la ausencia de un consumo significativo de  $\text{CH}_4$ . Esos resultados son explicables por la permeabilidad de las jeringas de PP al oxígeno, que determinamos experimentalmente (ver Materiales y Métodos) e indican que en las jeringas de PP existía una entrada de oxígeno suficiente para la oxidación del  $\text{CH}_4$ . Lo anterior se confirmó mediante la observación de que las velocidades de oxidación metanotrófica observadas en muestras anóxicas eran constantes ( $0.026 \pm .015 \text{ mg L}^{-1} \text{ d}^{-1}$ ), cualquier que fuera la concentración observada de  $\text{CH}_4$  disuelto.

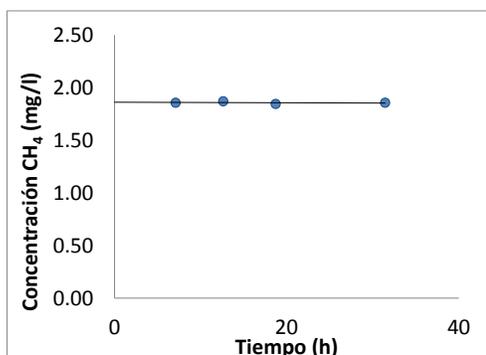


Figura 12. Muestra anóxica de 9 m de profundidad en LG.

Esos resultados indican que las velocidades de oxidación real en muestras anóxicas no son representativas de la actividad real existente en el ecosistema acuático y esos valores no fueron utilizadas para la determinación de los perfiles verticales de actividad metanotrófica (capítulo siguiente).

Finalmente, algunos resultados obtenidos fueron descartados porque mostraron una producción de CH<sub>4</sub>; i.e. aumento de la concentración de CH<sub>4</sub> disuelto durante el ensayo. Esta producción de CH<sub>4</sub> fue observada incluyendo en algunos casos de actividad potencial, es decir en presencia de oxígeno. La producción de metano en la columna óxica de agua ha sido previamente reportada (Grossart, et al., 2011; Bogard, et al., 2014) y ha sido el objeto de un debate intenso en la comunidad científica (Amaral & Knowles, 1995; Borrel, et al., 2011; Tang, et al., 2014). Este debate rebasa el marco estricto del presente trabajo enfocado al desarrollo metodológico, y cabe mencionar que la confirmación de la producción de CH<sub>4</sub> en la columna óxica de agua requeriría un estudio más amplio que el reportado aquí.

#### Perfiles verticales de actividad metanotrófica.

La Figura 13 muestra los diferentes perfiles verticales de las actividades reales y potenciales observados en 3 lagos y, cada uno en 2 estaciones diferentes. Los perfiles fueron muy variables, entre lagos, pero también entre fechas de análisis. En el lago Hambre, la Figura 13A muestra un marcado perfil de actividad potencial, pasando de

0.0072 mg L<sup>-1</sup> h<sup>-1</sup> en la superficie a 0.0694 mg L<sup>-1</sup> h<sup>-1</sup> en el hipolimnio, cerca del fondo (10 veces más importante en el fondo que en la superficie). De igual forma, en la columna óxica de agua, la actividad metanotrófica real fue aumentando en función de la profundidad, pasando de 0.00015 mg L<sup>-1</sup> h<sup>-1</sup> en la superficie a 0.01726 mg L<sup>-1</sup> h<sup>-1</sup> al límite entre la zona óxica y anóxica. Esos perfiles correspondieron al régimen de estratificación observado en esa época. En otoño-invierno (Figura 13B), a pesar de que el Lago Hambre era mezclado, se observó un gradiente de actividad real metanotrófica, de 0.00002 mg L<sup>-1</sup> h<sup>-1</sup> a la superficie a 0.0002 mg L<sup>-1</sup> h<sup>-1</sup> en el hipolimnio, cerca del fondo (10 veces más importante en el fondo que en la superficie). La Figura 13B no muestra datos de actividad potencial, porque observamos de forma sistemática una producción de CH<sub>4</sub>, difícilmente explicable considerando que toda la columna de agua era óxica y que las incubaciones se realizaron con un espacio de cabeza conteniendo aire. Tal como lo hemos comentado previamente, a pesar de que esos resultados fueron sistemáticamente observados, la discusión de esa observación rebasa el marco de este trabajo y requeriría un estudio más amplio que el reportado aquí.

Las Figuras 13C y 13D muestran los perfiles de actividad metanotrófica observados en el Lago de Guadalupe, en verano y en primavera, respectivamente. En ambas estaciones, se observaron perfiles marcados de actividad real en la zona óxica. En verano, el perfil de actividad pasó de 0.0004 mg L<sup>-1</sup> h<sup>-1</sup> en la superficie a 0.0071 mg L<sup>-1</sup> h<sup>-1</sup> al límite entre la zona óxica y anóxica. En primavera, el perfil pasó de 0.0001 mg L<sup>-1</sup> h<sup>-1</sup> en la superficie a 0.0155 mg L<sup>-1</sup> h<sup>-1</sup> al límite entre la zona óxica y anóxica. Los perfiles de actividad potencial fueron muy diferentes a los de actividad real. Durante el verano, la actividad potencial fue mayor en la zona óxica; 0.3800 y 0.3856 mg L<sup>-1</sup> h<sup>-1</sup> a 1 y 2 m de profundidad, que en el hipolimnio; 0.11437 mg L<sup>-1</sup> h<sup>-1</sup> en el fondo. En primavera, la misma observación fue hecha; 0.1863 mg L<sup>-1</sup> h<sup>-1</sup> en el fondo de la zona óxica (3 m) y 0.06603 mg L<sup>-1</sup> h<sup>-1</sup> en el fondo de lago. Haber observado actividades potenciales menores a mayores profundidades es sorprendente y contradictorio a lo observado en el Lago Hambre. La actividad potencial es un reflejo de la concentración de microorganismos metanótrofos y que dichos organismos son activos solamente en la zona óxica de la comuna de agua.

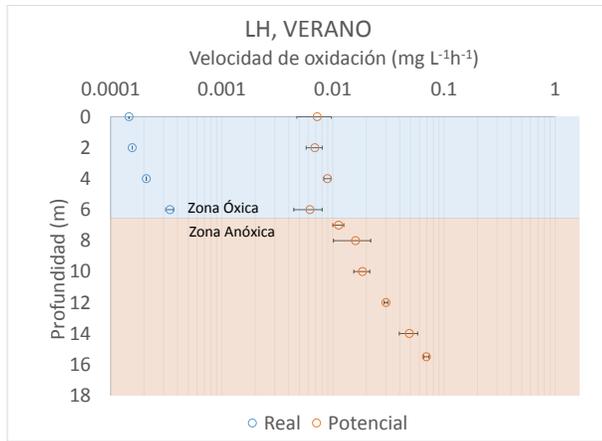
Por lo anterior y de acuerdo con la literatura, la actividad metanotrófica potencial encontrada en la zona anóxica de la columna de agua proviene de metanótrofos que migraron por sedimentación del epilimnio. De acuerdo con esa dinámica, se espera una mayor concentración de metanótrofos en las zonas profundas del lago y una tendencia inversa tal como la observada en el lago de Guadalupe es difícilmente explicable. Podría deberse a condiciones locales encontradas en el fondo del Lago de Guadalupe o la presencia de un posible inhibidor, incluyendo una inhibición por el propio CH<sub>4</sub> (Bédard & Knowles, 1989).

Las Figuras 13E y 13F muestran los perfiles de actividad metanotrófica observados en el Lago el Llano. En verano, cuando la columna de agua era mezclada, no se observó ningún perfil significativo de actividad potencial. No obstante lo anterior, se observó un claro perfil de actividad real, que se explica por la concentración de CH<sub>4</sub> disuelto. En efecto, se observaron concentraciones de metano disuelto de 0.003 mg L<sup>-1</sup> en la superficie y de 0.006 mg L<sup>-1</sup> en el límite entre la zona óxica y anóxica. En primavera, el Lago el Llano estaba parcialmente estratificado y se observaron perfiles diferentes a los observados en los otros lagos. Tanto en el perfil de actividad real como en el perfil de actividad potencial, se observó un aumento de las actividades con la profundidad, seguido por una disminución abrupta. Esa disminución abrupta es difícilmente explicable y podría deberse a condiciones locales encontradas en el fondo del Lago.

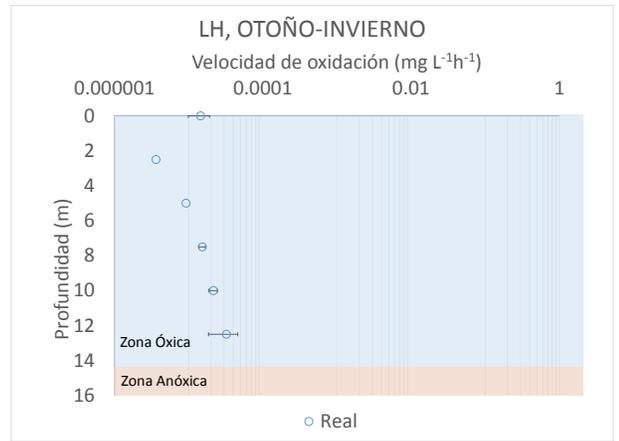
Los resultados obtenidos confirman que el método desarrollado permite determinar perfiles de actividad real en lagos estratificados y mezclados, lo cual no es posible con métodos tradicionales basados en análisis isotópicos y/o métodos de incubación con espacio de cabeza. En efecto, tal como mencionado en la introducción, los métodos isotópicos no permiten determinar perfiles de actividades en lagos mezclados mientras que los métodos de incubación se basan en actividades potenciales (viales enriquecidos con CH<sub>4</sub> y O<sub>2</sub>). El método desarrollado permite determinar las actividades tanto reales como potenciales. Observamos que las velocidades reales eran en promedio de 40 a 500 veces inferiores a las actividades potenciales. Estos valores sugieren que las estimaciones realizadas en estudios anteriores de la participación de la metanotrofia en el ciclo del

CH<sub>4</sub> fueron probablemente sobreestimadas. En efecto, los valores reportados de metanotrofia van desde 0.00003 hasta 0.018 mg L<sup>-1</sup>h<sup>-1</sup> (Bastviken, et al, 2002; Liikanen, et al, 2002; Lofton, et al, 2013; Brees, et al., 2014), variando según el tipo de lago y el estudio realizado (potencial metanotrófico o velocidad de oxidación en condiciones reales). Considerando estos valores, los que hemos obtenido en condiciones reales son entre 0.00004 y 0.004 mg L<sup>-1</sup>h<sup>-1</sup>, mientras que en condiciones potenciales obtuvimos valores desde 0.0007 hasta 0.5 mg L<sup>-1</sup>h<sup>-1</sup>. Por lo anterior, estudios cuyos valores reportados se encuentran dentro del rango de 10<sup>-3</sup> a 10<sup>-1</sup>, por ejemplo valores reportados por Lofton, et al. (2013), podrían estar sobreestimados. Otro factor a considerar sería el estado trófico, ya que como lo reportan Liikanen, et al. (2002), en un lago hipereutrófico las velocidades serán mayores, como observamos en LG comparándolo con LH y LL. El estado trófico influye en las concentraciones iniciales de CH<sub>4</sub>, y como se menciona en la literatura (Miller, et al, 2004; Duc, et al, 2010; Lofton, et al, 2013), las velocidades de metanotrofia están relacionadas en mayor medida con las concentraciones de CH<sub>4</sub> que con otros factores, como sería por ejemplo la temperatura o incluso el OD (Martinez-Cruz et al., 2015).

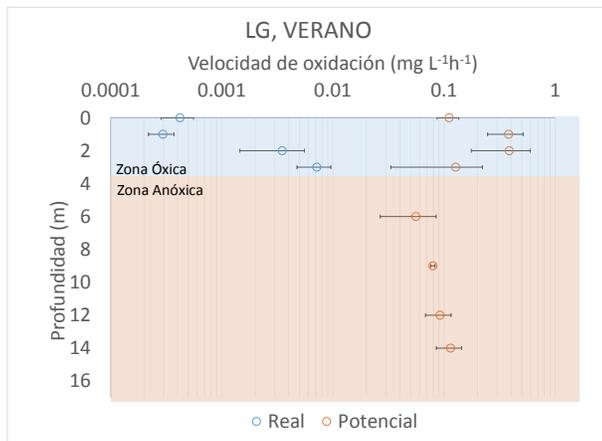
El método desarrollado permitió determinar actividades reales, bajo un amplio espectro de actividades; de 10<sup>-4</sup> a 10<sup>-1</sup> mg CH<sub>4</sub> L<sup>-1</sup>h<sup>-1</sup>, y de concentraciones; de 10<sup>-4</sup> a 10<sup>2</sup> mg L<sup>-1</sup>. Estos rangos permiten caracterizar lagos oligotróficos, donde las concentraciones de CH<sub>4</sub> y las actividades son bajas, por ejemplo Lago Hambre, así como también lagos hipereutróficos, donde las concentraciones de CH<sub>4</sub> y las actividades son altas, por ejemplo Lago de Guadalupe.



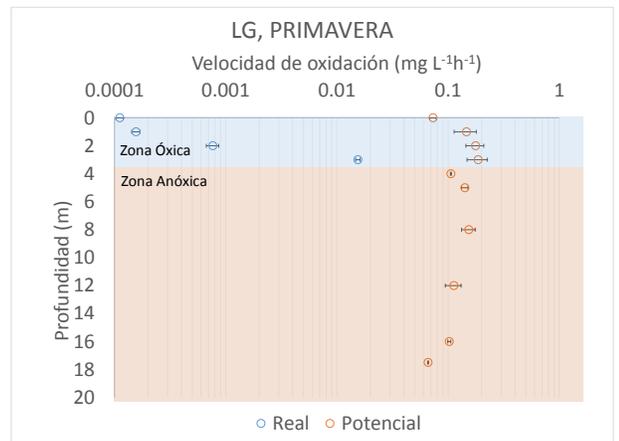
**A**



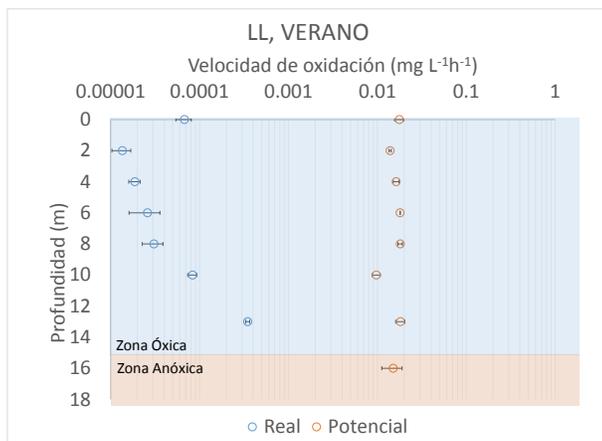
**B**



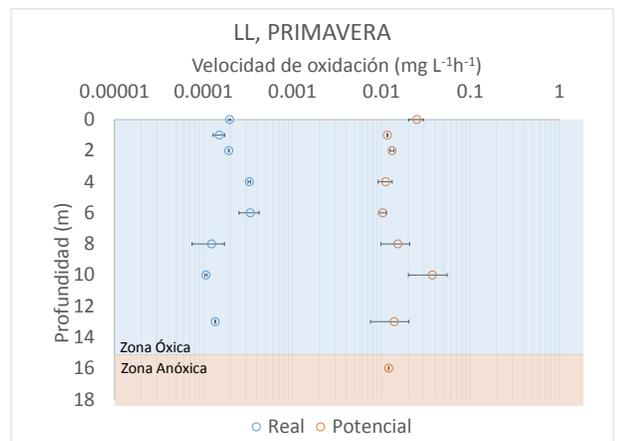
**C**



**D**



**E**



**F**

Figura 13. Perfiles verticales de Velocidad de Oxidación de Metano en distintos lagos.

## Conclusiones y perspectivas

Se logró desarrollar un método de determinación de actividades metanotróficas en condiciones tanto reales como potenciales mediante el uso de jeringas de vidrio y PP así como de la ausencia o presencia de un espacio de cabeza en dichas jeringas, midiendo con un espectrómetro láser de cavidad integrada. Este método permite caracterizar mejor el ciclo del  $\text{CH}_4$  en lagos con un amplio espectro de nivel trófico, de concentración de  $\text{CH}_4$  disuelto y de actividad metanotrófica. La primera aportación de nuestro trabajo fue por lo tanto ese método, que al contrario de los métodos previamente reportados, permite caracterizar lagos estratificados y mezclados y determinar tanto actividad real como potencial.

Se logró observar la variación de la actividad metanotrófica de acuerdo con las condiciones de estratificación o mezclado. Las velocidades mayores se encontraron, como era de esperarse en LG, ya que este lago cuenta con una concentración mayor de  $\text{CH}_4$  en comparación con los otros dos lagos estudiados. Aunado a lo anterior, el método permitió la determinación de actividad metanotrófica en lagos con bajas concentraciones de  $\text{CH}_4$ , como lo son LH y LL. Ello nos demuestra que el método permitirá caracterizar lagos con un amplio rango de concentraciones de  $\text{CH}_4$ , así como de diferentes estados tróficos.

Este método complementa los métodos de determinación de fluxes de  $\text{CH}_4$  y  $\text{CO}_2$  a la atmósfera y de determinación de la concentración de  $\text{CH}_4$  y  $\text{CO}_2$  disuelto en la columna de agua, desarrollado por nuestro grupo y basados en la misma plataforma tecnológica. La segunda aportación de nuestro trabajo fue por lo tanto el desarrollo de un método adicional a los previamente desarrollados, sin extender los requerimientos en equipos.

No obstante esas aportaciones, consideramos que el desarrollo del método no está concluido y los resultados obtenidos abrieron varias directrices para desarrollos futuros.

En primer lugar, hemos visto que el ajuste del modelo de Monod a los datos experimentales obtenidos por nuestro método no dio resultados con un nivel suficiente

de confianza. Por lo tanto el método permite determinar actividades pero no así la parametrización de la cinética microbiana asociada. Un esfuerzo mayor sería por lo tanto bienvenido bajo ese eje, para mejorar todavía nuestra apreciación del ciclo del CH<sub>4</sub> en lagos.

En segundo lugar, algunos ensayos mostraron la existencia de una posible actividad metanogénica en la columna óxica de agua. De forma teórica, la determinación de la actividad real, sin cambio de las condiciones de la muestra, tiene el potencial para determinar actividades reales metanogénicas. No obstante, las evidencias experimentales coleccionadas en este trabajo no fueron suficientes y una directriz para desarrollos futuros sería comprobar la factibilidad de dicho planteamiento.

En tercer lugar, un tercer eje de desarrollo futuro sería la realización de ensayos de actividad potencial (sin limitación de O<sub>2</sub> y CH<sub>4</sub>), de ensayos de actividad real con jeringas de vidrio (con posible limitación de CH<sub>4</sub> y de O<sub>2</sub>), y aunado a los anteriores, de ensayos semi-potenciales realizados sin espacio de cabeza pero con jeringas de PP (con posible limitación de CH<sub>4</sub> pero no de O<sub>2</sub>). En su conjunto, esa forma de poder permitiría determinar de forma clara el factor limitante de la metanotrófica (O<sub>2</sub> o CH<sub>4</sub>) y cuantificarlo.

## Bibliografía

- Adler, M., Eckert, W., & Sivan, O. (2011). Quantifying rates of methanogenesis and methanotrophy in Lake Kinneret sediments (Israel) using pore-water profiles. *Limnology and Oceanography*, *56*(4), 1525-1535.
- Amaral, J., & Knowles, R. (1995). Growth of methanotrophs in methane and oxygen counter gradients. *FEMS Microbiology Letters*, *126*(3), 215-220.
- Bastviken, D., Cole, J., Pace, M., & Tranvik, L. (2004). Methane emissions from lakes: Dependence of lake characteristics, two regional assessments, and a global estimate. *Global Biogeochemical Cycles*, *18*(4), GB4009.
- Bastviken, D., Eljertsson, J., & Tranvik, L. (2002). Measurement of methane oxidation in lakes: a comparison of methods. *Environmental Science Technology*, *36*, 3354-3361.
- Bastviken, D., Tranvik, L., Downing, J., Crill, P., & Enrich-Prast, A. (2011). Freshwater Methane Emissions Offset the Continental Carbon Sink. *Science*, *331*(6013), 50-50.
- Bédard, C., & Knowles, R. (1989). Physiology, biochemistry, and specific inhibitors of CH<sub>4</sub>, NH<sub>4</sub><sup>+</sup>, and CO oxidation by methanotrophs and nitrifiers. *Microbiological reviews*, *53*(1), 68-84.
- Bédard, C., & Knowles, R. (1997). Some properties of methane oxidation in a thermally stratified lake. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, *54*(7), 1639-1645.
- Blees, J., Niemann, H., Wenk, C. B., Zopfi, J., Schubert, C. J., Kirf, M. K., . . . Lehmann, M. F. (2014). Micro-aerobic bacterial methane oxidation in the chemocline and anoxic water column of deep south-Alpine Lake Lugano (Switzerland). *Limnology and Oceanography*, *59*(2), 311-324.
- Bogard, M., del Giorgio, P., Boutet, L., Garcia Chaves, M., Prairie, Y., Merante, A., & Derry, A. (2014). Oxidic water column methanogenesis as a major component of aquatic CH<sub>4</sub> fluxes. *Nature Communications*, *5*.
- Boreal-Laser. (15 de Julio de 2015). *The Technology Behind GasFinder*. Obtenido de <http://www.boreal-laser.com/info-center/technology>
- Borrel, G., Jézequel, D., Biderre-Petit, C., Morel-Desrosiers, N., Morel, J.-P., Peyret, P., . . . Lehours, A.-C. (2011). Production and consumption of methane in freshwater lake ecosystems. *Research in Microbiology*, *162*, 832-847.
- Branco, C. W., Kozłowski-Suzuki, B., Sousa-Filho, I., Guarino, A., & Rocha, R. (2009). Impact of climate on the vertical water column structure of Lajes Reservoir

- (Brazil): A tropical reservoir case. *Lakes & Reservoirs: Research and Management*, 14(3), 175-191.
- Carini, S., Nasreen, B., LeCleir, G., & Joye, S. (2005). Aerobic methane oxidation and methanotroph community composition during seasonal stratification in Monolake, California (USA). *Environmental Microbiology*, 7(8), 1127–1138.
- Cervantes, M. (2007). Conceptos fundamentales sobre ecosistemas acuáticos y su estado en México. En M. H. Óscar Sánchez, *Perspectivas sobre conservación de ecosistemas acuáticos en México* (págs. 37-67). México, DF: Instituto Nacional de Ecología-Secretaría de Medio Ambiente y Recursos Naturales.
- Deborde, J., Anschutz, P., Guérin, F., Poirier, D., Marty, D., Boucher, G., . . . Abril, G. (2010). Methane sources, sinks and fluxes in a temperate tidal Lagoon: The Arcachon lagoon (SW France). *Estuarine, Coastal and Shelf Science*, 89, 256-266.
- Downing, J., Prairie, Y., Cole, J., Duarte, C., Tranvik, L., Striegl, R., . . . Middelburg, J. (2006). The global abundance and size distribution of lakes, ponds, and impoundments. *Limnology and Oceanography*, 51(5), 2388–2397.
- Duc, N. T., Crill, P., & Bastviken, D. (2010). Implications of temperature and sediment characteristics on methane formation and oxidation in lake sediments. *Biogeochemistry*(100), 185-196.
- Ehhalt, D. (1974). The atmospheric cycle of methane. *Tellus*, 26(1-2), 58-70.
- Forsberg, C., & Ryding, S. (1980). Eutrophication parameters and trophic state indices in 30 swedish waste-receiving lakes. *Archiv für Hydrobiologie*, 89, 189-207.
- Frenzel, P., Thebrath, B., & Conrad, R. (1990). Oxidation of methane in the oxic surface layer of a deep lake sediment (Lake Constance). *FEMS Microbiology Ecology*, 73, 149-158.
- Garduño, R. (2003). *El veleidoso clima*. México, DF: Fondo de Cultura Económica.
- Gerardo Nieto, O. A. (2014). Análisis del ciclo del oxígeno en lagos templados. *Tesis de Maestría en Ciencias*. Ciudad de México, DF, México: CINVESTAV.
- González Valencia, R. (2014). Variaciones espaciales y temporales de las emisiones de metano de ecosistemas acuáticos y terrestres. *Tesis de Doctorado*. Ciudad de México, DF, México: CINVESTAV.
- Gonzalez-Valencia, R., Magana-Rodriguez, F., Gerardo-Nieto, O., Sepulveda-Jauregui, A., Martinez-Cruz, K., Walter-Anthony, K., . . . Thalasso, F. (2014). In situ measurement of dissolved methane and carbon dioxide in freshwater ecosystems by off-axis integrated cavity output spectroscopy. *Environmental Science Technology*, 48(19), 11421–11428.

- Gonzalez-Valencia, R., Sepulveda-Jauregui, A., Martinez-Cruz, K., Hoyos-Santillan, J., Dendooven, L., & Thalasso, F. (2014a). Methane emissions from Mexican freshwater bodies: correlations with water pollution. *Hydrobiologia*, *721*(1), 9-22.
- Granin, N., Mizandrontsev, I., Obzhairov, A., Vereshchagina, O., Gnatovskii, R., & Zhdanov, A. (Julio de 2013). Oxidation of Methane in the water column of Lake Baikal. (S. US, Ed.) *Doklady Earth Sciences*, *451*(1), 784-786.
- Grossart, H. P., Frindte, K., Dziallas, C., & Ecker, W. (2011). Microbial methane production in oxygenated water column of an oligotrophic lake. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *108*(49), 19657-19661.
- Gülzow, W., Rehder, G., Schneider, B., Deimling, J., & Sadkowiak, B. (2011). A new method for continuous measurement of methane and carbon dioxide in surface waters using off-axis integrated cavity output spectroscopy (ICOS): An example from the Baltic Sea. *Limnology and Oceanography*, *9*(5), 176-184.
- Gupta, M. (2012). Cavity-Enhanced Laser Absorption Spectrometry for Industrial Applications. *Gases & Instrumentation International*, *6*(3), 23-28.
- He, R., Wooller, M., Pohlman, J., Quensen, J., Tiedje, J., & Leigh, M. (2012). Diversity of active aerobic methanotrophs along depth profiles of arctic and subarctic lake water column and sediments. *The ISME journal*, *6*(10), 1937-1948.
- Hedderich, R., & Witman, W. (2006). Physiology and biochemistry of the methane-producing archaea. In S. Falkow, E. Rosenberg, K.-H. Schleifer, E. Stackebrandt, & M. Dworkin (Eds.), *The Prokaryotes* (pp. 1050-1079).
- Heiling, G. (1994). The greenhouse gas methane (CH<sub>4</sub>): Sources and sinks, the impact of population growth, possible interventions. *Population and environment*, *16*(2), 109-137.
- Hernandez-Paniagua, I., Ramirez-Vargas, R., Ramos-Gomez, M., Dendooven, L., Avelar-Gonzalez, F., & Thalasso, F. (2014). Greenhouse gas emissions from stabilization ponds in subtropical climate. *Environmental Technology*, *35*(6), 727-734.
- Hershey, A., Northington, R., Hart-Smith, J., Bostick, M., & Whalen, S. (2015). Methane efflux and oxidation, and use of methane-derived carbon by larval Chironomini, in arctic lake sediments. *Limnology and Oceanography*, *60*, 276-285.
- Hershey, A., Northington, R., Hart-Smith, J., Bostick, M., & Whalen, S. (2015). Methane efflux and oxidation, and use of methane-derived carbon by larval Chironomini, in arctic lake sediments. *Limnology and Oceanography*, 276-285.
- Horne, A., & Goldman, C. (1994). *Limnology*. McGraw Hill, Inc.

- Hutchinson, T. C. (1999). Capítulo 9. Ecología. En G. W. J. Glynn Henry, *Ingeniería Ambiental* (págs. 303-336). México: Prentice Hall.
- INE. (2012). *Síntesis geográfica regional. Compendio estadístico 2012*. Recuperado el 15 de Julio de 2015, de Instituto Nacional de Estadística, INE. Chile.: [http://www.ine.cl/canales/menu/publicaciones/compendio\\_estadistico/pdf/2012/3\\_sint\\_regional.pdf](http://www.ine.cl/canales/menu/publicaciones/compendio_estadistico/pdf/2012/3_sint_regional.pdf)
- IPCC. (2007). *Climate Change 2007: The Physical Science Basis, Contribution of Working Group 1 to the Fourth Assessment Report of the Intergovernmental Panel on Climate Change*. (S. Solomon, D. Qin, M. Manning, M. Marquis, K. Averyt, M. M. Tignor, . . . Z. Chen, Eds.) United Kingdom and New York, USA: Cambridge University Press.
- IPCC. (2007). *Climate Change 2007: The Physical Science Basis, Contribution of Working Group 1 to the Fourth Assessment Report of the Intergovernmental Panel on Climate Change*. (S. Solomon, D. Qin, M. Manning, M. Marquis, K. Averyt, M. M. Tignor, . . . Z. Chen, Edits.) United Kingdom and New York, USA: Cambridge University Press.
- IPCC. (2013). *Climate Change 2013: The Physical Science Basis. Contribution of Working Group I to the Fifth Assessment Report of the Intergovernmental Panel on Climate Change*. (T. Stocker, D. Qin, G.-K. Plattner, M. Tignor, S. Allen, J. Boschung, . . . P. Midgley, Edits.) United Kingdom and New York, NY, USA: Cambridge University Press.
- Kampbell, D., Wilson, J., & Vandegrift, S. (1989). Dissolved Oxygen and Methane in Water by a GC Headspace Equilibration Technique. *International Journal of Environmental Analytical Chemistry*, 36(4), 249-257.
- Kankaala, P., Huotari, J., Peltomaa, E., Saloranta, T., & Ojala, A. (2006). Methanotrophic activity in relation to methane efflux and total heterotrophic bacterial production in a stratified, humic, boreal lake. *Limnology and Oceanography*, 51(2), 1195-1204.
- Khali, M., & Shearer, M. (1993). Sources of Methane: An Overview. En M. Khali, *Atmospheric methane: sources, sinks, and role in global change* (págs. 180-198). Springer Berlin Heidelberg.
- Lidstrom, M., & Somers, L. (1984). Seasonal Study of Methane Oxidation in Lake Washington. *Appl. Environ. Microbiol.*, 47(6), 1255-1260.
- Liikanen, A., Huttunen, J., Valli, K., & Martikainen, P. (2002). Methane cycling in the sediment and water column of mid-boreal hyper-eutrophic Lake Kevätön, Finland. *Arch. Hydrobiol.*, 154 (4), 585-603.

- Lofton, D. D., Whalen, S. C., & Hershey, A. E. (2014). Effect of temperature on methane dynamics and evaluation of methane oxidation kinetics in shallow Arctic Alaskan lakes. *Hydrobiologia*, 721, 209-222.
- Madigan, M., Martinko, J., & Parker, J. (2003). *Brock. Biología de los Microorganismos*. España: Prentice Hall.
- Magaña Rodríguez, F. (2013). *Mapeo de la concentración de metano en lagos eutrofizados. Tesis de Maestría en Ciencias*. México, DF.: CINVESTAV.
- Martinez-Cruz, K., Sepulveda-Jauregui, A., Escobar-Orozco, N., & Thalasso, F. (2012). Methanogenic activity tests by Infrared Tunable Diode Laser Absorption Spectroscopy. *Journal of Microbiological Methods*, 91(1), 89-92.
- Martinez-Cruz, K., Sepulveda-Jauregui, A., Walter Anthony, K., & Thalasso, F. (2015). Geographic and seasonal variation of dissolved methane and aerobic methane oxidation in Alaskan lakes. *Biogeosciences Discussions*, 12(5), 4213-4243.
- Miller, D., Yavitt, J., Madsen, E., & Ghiorse, W. (2004). Methanotrophic Activity, Abundance, and Diversity in Forested Swamp Pools: Spatiotemporal Dynamics and Influences on Methane Fluxes. *Geomicrobiology Journal*, 21(4), 257-271.
- Morana, C., Borges, A., Roland, F., Darchambeau, F., Descy, J.--., & Bouillon, S. (2015). Methanotrophy within the water column of a lagre meromictic tropical lake (Lake Kivu, East Africa). *Biogeoscience*, 12, 2077-2088.
- Moreno Franco, D., Quintero Manzano, J., & López Cuevas, A. (2010). Métodos para identificar, diagnosticar y evaluar el grado de eutrofía. *ContactoS*, 78, 25-33.
- Murrel, J., & Smith, T. (2010). Biochemistry and Molecular Biology of Methane Monooxygenase. En *Handbook of hydrocarbon and lipid microbiology* (págs. 1045-1055). Springer Berlin Heidelberg.
- Naselli-Flores, L., & Barone, R. (2005). Water-level fluctuations in Mediterranean reservoirs: setting a dewatering threshold as a management tool to improve water quality. *Hydrobiologia*(548), 85-99.
- NIST. (2011). *National Institute of Standards and Technology*. Recuperado el 2 de Febrero de 2015, de NIST Chemistry Web book: <http://webbook.nist.gov/chemistry>
- Nixon, S. (1995). Coastal marine eutrophication: A definition, social causes, and future concerns. *Ofelia*, 41(1), 199-219.
- Osudar, R., Matou, A., Alawi, M., & Wagner, D. (2015). Environmental factors affecting methane distribution and bacterial methane oxidation in the German Bight (North Sea). *Estuarine, Coastal and Shelf Science*, 160, 10-21.

- Rozzi, R., Armesto, J., Gutiérrez, J., Anderson, C., Poole, A., Moses, K., . . . Arroyo, M. (2012). Integrating Ecology and Environmental Ethics: Earth Stewardship in the Souther end of the Americas. *BioSciences*, 62(3), 226-236.
- Rudd, J., Hamilton, R., & Campbell, N. (1974). Measurement of microbial oxidation of methane in lake water. *Limnology and Oceanography*, 19(3), 519-524.
- Sanders, M., & de Ridder, I. (s.f.). *Metabolic network modeling: Rate Laws and Parameter Estimation*.
- Schindler, D. W. (1966). A liquid scintillation method for measuring carbon-14 uptake in photosynthesis. *Nature*, 211, 844-845.
- Schmale, O., Blumenberg, M., Kießlich, K., Jakobs, G., Berndmeyer, C., & Labre, M. (2012). Aerobic methanotrophy within the pelagic redox-zone of the Gotland Deep (central Baltic Sea). *Biogeosciences*, 4969-4977.
- Schubert, C., Lucas, F., Durisch-Kaiser, E., Stierli, R., Diem, T., Scheidegger, O., . . . Müller, B. (2010). Oxidation and emission of methane in a monomictic lake (Rotsee, Switzerland). *Aquatic Sciences*, 72, 455-466.
- Sepulveda-Jauregui, A., Hoyos-Santillan, J., Gutierrez-Mendieta, F., Torres-Alvarado, R., Dendooven, L., & Thalasso, F. (2013). The impact of anthropogenic pollution on limnological characteristics of a subtropical highland reservoir “Lago de Guadalupe”, Mexico. *Knowledge and Management of Aquatic Ecosystems*, 410, 04.
- Sepulveda-Jauregui, A., Martinez-Cruz, K., Strohm, A., Walter Anthony, K., & Thalasso, F. (2012). A new method for field measurement of dissolved methane in water using infrared tunable diode laser absorption spectroscopy. *Limnology and Oceanography: Methods*, 10(7), 560-567.
- Sepulveda-Jauregui, A., Walter Anthony, K., Martinez-Cruz, K., Greene, S., & Thalasso, F. (2015). Methane and carbon dioxide emissions from 40 lakes along a north–south latitudinal transect in Alaska. *Biogeosciences*(12), 3197-3223.
- Shelley, F., Abdullahi, F., Grey, J., & Trimmer, M. (2015). Microbial methane cycling in the bed of a chalk river: oxidation has the potential to match methanogenesis enhanced by warming. *Freshwater Biology*, (60), 150-160.
- Siljanen, H., Saari, A., Krause, S., Lensu, A., Abell, G., Bodrossy, L., . . . Martikainen1, P. (2011). Hydrology is reflected in the functioning and community composition ofmethanotrophs in the littoralwetland of a boreal lake. *FEMS microbiology ecology*, 75(3), 430-445.

- Tanaka, M., Girard, G., Davis, R., Peuto, A., & Bignell, N. (2001). Recommended table for the density of water between 0 C and 40 C based on recent experimental reports. *Metrologia*, 38(4), 301.
- Tang, K., McGinnis, D., Findte, K., Brüchert, V., & Grossart, H.-P. (2014). Paradox reconsidered: Methane oversaturation in well-oxygenated lake waters. *Limnology and Oceanography*, 59(1), 275-284.
- Thauer, R., Kaster, A.-K., Seedorf, H., Buckel, W., & Hedderich, R. (2008). Methanogenic archaea: ecologically relevant differences in energy conservation. *Nature Reviews Microbiology*, 6(8), 579-591.
- Utsumi, M., Nojiri, Y., Nakamura, T., Takeshi, N., Otsuki, A., & Seki, H. (1998). Oxidation of dissolved methane in a eutrophic, shallow lake: Lake Kasumigaura, Japan. *Limnology and Oceanography*, 43(3), 471-480.
- Valentine, D., Blanton, D., Reeburgh, W., & Kastner, M. (2001). Water column methane oxidation adjacent to an area of active hydrate dissociation, Eel River Basin. *Geochimica et Cosmochimica Acta*, 65(16), 2633-2640.
- Van Bodegom, P., Stams, F., Mollema, L., Boeke, S., & Leffelaar, P. (2001). Methane Oxidation and the Competition for Oxygen in the Rice Rhizosphere. *Applied and Environmental Microbiology*, 67(8), 3586-3597.
- Vanrolleghem, P., Van Daele, M., & Dochain, D. (1995). Practical identifiability of a biokinetic model of activated sludge respiration. *Water Research*, 29(11), 2561-2570.
- Wetzel, R. (2001). Oxygen. En R. Wetzel, *Limnology: lake and river ecosystems* (págs. 151-168). Gulf Professional Publishing.
- Zehnder, A., Huser, B., & Brock, T. (1979). Measuring Radioactive Methane with the Liquid Scintillation. *Applied and Environmental Microbiology*, 897-899.