



**Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del Instituto Politécnico
Nacional**

Unidad Mérida

Departamento de Recursos del Mar

Análisis de las comunidades de arqueas metanogénicas y bacterias
metanotróficas en sedimentos asociados a *Avicennia germinans* de la
Península de Yucatán

Tesis que presenta:

Miriam Carrillo Díaz de León

Para obtener el grado de:

Maestría en Ciencias

En la especialidad de:

Biología Marina

Directores de la Tesis:

Dr. José Quinatzin García Maldonado

Dr. Alejandro López Cortés

« Life on Earth is such a good story you cannot afford to miss the beginning...

Beneath our superficial differences we are all of us walking communities of bacteria.

The world shimmers, a pointillist landscape made of tiny living beings. »

- Lynn Margulis

AGRADECIMIENTOS

Al Dr. José Quinatzin García Maldonado, por aceptarme en el Laboratorio de Patología Acuática, por todas sus enseñanzas, su disponibilidad y su paciencia para la realización de este trabajo.

Al Dr. Alejandro López Cortés, por toda la asesoría y las herramientas brindadas en la realización de este trabajo y por su buena disponibilidad.

Al comité sinodal: la Dra. Ma Leopoldina Aguirre Macedo; el Dr. Jorge Alfredo Herrera Silveira y la Dra. Rocío Jetzabel Alcántara Hernández por el apoyo brindado durante mi maestría y por sus contribuciones y comentarios para mejorar el escrito.

A Silvia Granados y a César Puerto, por su apoyo con los análisis de química marina.

A Abril Gamboa y Rosa Canul, por toda su guía y paciencia para enseñarme a utilizar los equipos y distintos métodos en el Laboratorio de Patología Acuática y por su amistad.

Al Dr. Jorge Luis Montero Muñoz por su disponibilidad y su asesoría brindada para los análisis estadísticos de este trabajo.

A Alonso de la Garza, Jacqueline Ramírez y Zita Arriaga por toda su ayuda con los análisis bioinformáticos; y a Román Espinal, José María Ahuatzin y Aaron Núñez por su ayuda con el análisis filogenético.

A Mauricio Parra, por su apoyo incondicional, sus porras y por estar siempre, gracias infinitas.

A mi familia, principalmente a mi papá, mi mamá, mi hermana Sofía y Claudia Moya, por estar siempre presentes a la distancia, echarme porras y alentarme a seguir mis sueños.

A las amigas que hice en la maestría y en el laboratorio: Linda Marmolejo, Nayeli Badillo, Karen Arjona, Arantxa Espinosa e Ixchel Ruiz, por todo su apoyo dentro y fuera del laboratorio y por hacer más ligero el tiempo de trabajo.

A mi generación de maestría: Oswaldo González, Sabina Escobedo, Wendy Nicolás y Erika Celis, por su apoyo desde el inicio en los momentos difíciles de la maestría, por su amistad y por todos los buenos momentos con ustedes.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por la beca otorgada (CVU 1144234) para realizar de mis estudios de Maestría en Ciencias.

Al Cinvestav Mérida, por las oportunidades que tuve a través de la Beca Elisa Acuña y por brindarme el espacio y las herramientas para realizar de manera satisfactoria mis estudios de posgrado.

RESUMEN

Los manglares son una de las principales fuentes naturales de emisión de metano hacia la atmósfera. Este gas es producido biológicamente exclusivamente por arqueas metanogénicas, cuya actividad es promovida por las condiciones anaerobias que generalmente están relacionadas con los periodos de inundación y las altas tasas de acumulación de materia orgánica. Sin embargo, en manglares en buen estado una gran parte de este metano se encuentra almacenado en los sedimentos y puede ser consumido por bacterias metanotróficas, cuya actividad se ve favorecida por la presencia de neumatóforos y otros factores como la bioturbación, que oxigenan la superficie de los sedimentos y ayudan a disminuir las emisiones hacia la atmósfera. Actualmente, existe poca información sobre la presencia y actividad de estos microorganismos en sedimentos de manglares de la Península de Yucatán. Por lo tanto, el objetivo de este trabajo fue analizar la estructura, composición y actividad potencial de comunidades de arqueas metanogénicas y bacterias metanotróficas en sedimentos asociados a *Avicennia germinans* en tres sitios con acciones de restauración: manglar restaurado de Progreso cerca del sitio conservado (PC), manglar restaurado de Progreso cerca de la carretera (PR) y manglar restaurado de Yucalpetén (YR). En cuanto a los factores abióticos de los sedimentos superficiales se encontraron principalmente diferencias en el potencial redox y los niveles de N y P total. Los análisis bioinformáticos del gen *16S rRNA* indicaron que la diversidad alfa en los 3 sitios fue similar. Sin embargo, la estructura de las comunidades microbianas presentó diferencias significativas, debido principalmente a grupos de bacterias sulfatoreductoras como *Desulfotignum*, *Desulfosarcinaceae* y *Desulfocapsaceae*. Además, las secuencias del gen *mcrA* indicaron dominancia de arqueas metanogénicas metilotróficas principalmente del orden *Methanosarcinales*. Sin embargo, también se detectaron secuencias relacionadas con los otros tres tipos de metabolismo metanogénico en el sitio PC. Finalmente, con base en el análisis de qPCR, se registró que las bacterias metanotróficas pueden estar mejor representadas en el sitio PC, contribuyendo a una mejor oxidación biológica del metano en este sitio. Este estudio contribuye con la comprensión de comunidades metanogénicas y metanotróficas en manglares, que será de gran importancia para futuros estudios de los niveles de emisiones de metano en manglares de la Península de Yucatán.

ABSTRACT

Mangroves are one of the main sources of methane emissions to the atmosphere. This gas is biologically produced exclusively by methanogenic archaea, whose activity is promoted by the anaerobic conditions that are generally related to flooding periods and high accumulation rates of organic matter. However, in conserved mangroves a great part of this methane is stored in the sediments and can be consumed by methanotrophic bacteria, whose activity is favored by the presence of pneumatophores and other factors like bioturbation, that oxygenate the surface of the sediments and help reduce the emissions to the atmosphere. At present, there is scarce information about the presence and activity of these microorganisms in mangrove sediments from the Yucatán Peninsula. Therefore, the objective of this work was to analyze the structure, composition, and potential activity of methanogenic archaeal and methanotrophic bacterial communities in sediments associated to *Avicennia germinans* in three sites with restoration actions: restored mangroves from Progreso close to the conserved site (PC), restored mangroves from Progreso close to the highway (PR) and restores mangroves from Yucalpetén (YR). Regarding the abiotic factors from the superficial sediments, we mainly found differences in the redox potential and the levels of total N and P. The bioinformatic analysis of the *16S rRNA* gene showed that the alpha diversity in the 3 sites was similar. However, the structure of the microbial communities showed significant differences, mainly due to groups of sulfate reducing bacteria such as *Desulfotignum*, *Desulfosarcinaceae* and *Desulfocapsaceae*. Moreover, sequences of the *mcrA* gene showed a dominance of methylotrophic methanogenic archaea mainly from the *Methanosarcinales* order. However, sequences related to the other three metabolisms were also detected in the PC site. Finally, based in the qPCR analysis, we registered that the methanotrophic bacteria are better represented in the PC site, contributing to a better biological methane oxidation in this site. This study contributes to the comprehension of methanogenic and methanotrophic communities in mangroves, which will be of great importance for future studies of methane emission levels in mangroves of the Yucatán Peninsula.

TABLA DE CONTENIDO

AGRADECIMIENTOS	ii
RESUMEN	iv
ABSTRACT.....	v
TABLA DE CONTENIDO	vi
LISTA DE TABLAS	ix
LISTA DE FIGURAS.....	x
INTRODUCCIÓN	1
MARCO TEÓRICO	3
Metano: gas de efecto invernadero	3
Humedales costeros: ecosistemas de carbono azul	4
Manglares como fuente y sumidero de gases de efecto invernadero	5
Flujos de metano en manglares	6
Metanogénesis	8
Oxidación anaerobia del metano	9
Oxidación aerobia del metano	11
ANTECEDENTES	13
Comunidades metanotróficas y metanogénicas en sedimentos de manglares	13
Factores que afectan los flujos de metano en manglares	14
Manglares de la Península de Yucatán	18
JUSTIFICACIÓN	23
HIPÓTESIS	25
OBJETIVOS	26

General	26
Específicos	26
MATERIALES Y MÉTODOS	27
Sitio de estudio	27
<i>Progreso Antiguo</i>	27
<i>Curva Yucalpetén</i>	28
Diseño de muestreo	28
Medición de variables fisicoquímicas del agua superficial	30
Extracción de DNA de sedimentos	32
Secuenciación de amplicones	32
qPCR	35
Análisis bioinformáticos y estadísticos	39
RESULTADOS	41
VARIABLES AMBIENTALES	41
Determinaciones fisicoquímicas	41
Composición de comunidades microbianas	44
<i>16S rRNA</i>	44
<i>mcrA</i>	52
<i>pmoA</i>	57
<i>mmoX</i>	59
Cuantificación de la actividad potencial metanogénica y metanotrófica	59
DISCUSIÓN	63
Factores abióticos en sedimentos superficiales de manglares	64
Comunidades microbianas en los sedimentos de manglares	68

Comunidades metanogénicas y metanotróficas en sedimentos de manglares	71
<i>Arqueas metanogénicas</i>	<i>71</i>
<i>Bacterias metanotróficas</i>	<i>76</i>
Potencial genético de las rutas metanogénicas y metanotróficas	78
CONCLUSIONES	81
PERSPECTIVAS	83
REFERENCIAS.....	85
ANEXOS	104
Anexo 1. Resultados de la prueba de Kruskall Wallis para variables fisicoquímicas. ...	104
Anexo 2. Valores promedio \pm desviación estándar e IC (Lim. Inferior – Lim. Superior) al 95% de determinaciones fisicoquímicas analizadas en sedimentos de manglares restaurados.....	106
Anexo 3. Valores promedio \pm desviación estándar e IC (Lim. Inferior – Lim. Superior) al 95% de la riqueza y diversidad observadas en las comunidades microbianas de sedimentos de manglares restaurados.	107
Anexo 4. Resultados de la prueba de Kruskall Wallis para diversidad alfa.	108
Anexo 5. Diagrama de Venn de ASVs compartidas y exclusivas para cada sitio de estudio.	109
Anexo 6. Abundancia de bacterias a nivel de género obtenidas a partir de la secuenciación del gen <i>16S rRNA</i>	110
Anexo 7. Abundancia de bacterias a nivel de familia obtenidas a partir de la secuenciación del gen <i>16S rRNA</i>	110
Anexo 8. Tabla de abundancias de secuencias del gen <i>mcrA</i> sin asignar.....	111

LISTA DE TABLAS

Tabla 1. Principales fuentes de emisiones de metano durante el año 2021.	3
Tabla 2. Primers utilizados para amplificación por PCR y posterior secuenciación Illumina de los amplicones de los genes <i>16S rRNA</i> , <i>mcrA</i> , <i>pmoA</i> y <i>mmoX</i>	33
Tabla 3. Primers utilizados para qPCR de los genes <i>mcrA</i> y <i>pmoA</i>	36
Tabla 4. Diluciones utilizadas para la curva estándar del gen <i>mcrA</i>	38
Tabla 5. Diluciones utilizadas para la curva estándar del gen <i>pmoA</i>	38
Tabla 6. Valores encontrados de distintas variables ambientales en manglares restaurados.	41
Tabla 7. Resultados de la influencia de las variables ambientales en la estructura de las comunidades microbianas según el análisis dbRDA.	48
Tabla 8. Cuantificación de las bandas obtenidas del gen <i>pmoA</i> en el gel de electroforesis.	58
Tabla 9. Abundancia relativa de bacterias metanotróficas encontradas con el gen <i>16S rRNA</i>	59
Tabla 10. Número de copias del gen <i>mcrA</i> obtenidas por qPCR.	61
Tabla 11. Número de copias del gen <i>pmoA</i> obtenidas por qPCR.	62

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Flujos de metano en manglares a) conservados y b) perturbados. Elaboración propia.	8
Figura 2. Factores naturales y antrópicos que actúan como controladores de los flujos de metano. Los signos indican un aumento (+) o disminución (-) del factor natural o antrópico. Las flechas hacia arriba indican un aumento y las flechas hacia abajo indican una disminución en la producción/liberación de metano (naranja) o en la oxidación de metano (azul). Elaboración propia.	17
Figura 3. Mapa con los sitios de muestreo. PC= Progreso-Restaurado (cerca del sitio conservado), PR= Progreso-Restaurado (cerca de la carretera), YR= Yucalpetén-Restaurado. Elaborado en el Software QGIS 3.22.5.....	29
Figura 4. Equipos utilizados para la medición de variables fisicoquímicas en campo: multiparámetro YSI (izquierda) y potenciómetro (derecha).....	30
Figura 5. Comparación de variables fisicoquímicas encontradas para cada sitio. A) Nitrógeno total. B) Fósforo total. C) Carbono total. D) Contenido de materia orgánica. PC= Progreso-Restaurado (cerca del sitio conservado), PR= Progreso-Restaurado (cerca de la carretera), YR= Yucalpetén-Restaurado. En el gráfico las cajas muestran la mediana, el primer cuartil (Q1) en la parte inferior de la caja y el tercer cuartil (Q3) en la parte superior de la caja; las líneas representan los intervalos de confianza al 95% estimados por el método Bootstrap (BCa, B=10,000).	42
Figura 6. Triángulo Textural de Sheppard con el contenido de arena, limo y arcilla (%) para cada sitio. Progreso-C= Progreso-Restaurado (cerca del sitio conservado), Progreso-R= Progreso-Restaurado (cerca de la carretera), Yucalpetén-R= Yucalpetén-Restaurado.	43
Figura 7. Curvas de rarefacción para a) la riqueza y b) la diversidad de especies en cada muestra. PC= Progreso-Restaurado (cerca del sitio conservado), PR= Progreso-Restaurado (cerca de la carretera), YR= Yucalpetén-Restaurado.	45
Figura 8. Comparación de los valores de a) riqueza de ASVs e b) índice de Shannon para cada sitio. PC= Progreso-Restaurado (cerca del sitio conservado), PR= Progreso-Restaurado (cerca de la carretera), YR= Yucalpetén-Restaurado. En el gráfico las cajas muestran la	

mediana, el primer cuartil (Q1) en la parte inferior de la caja y el tercer cuartil (Q3) en la parte superior de la caja; las líneas representan los intervalos de confianza al 95% estimados por el método Bootstrap (BCa, B=10,000).	46
Figura 9. Análisis de Redundancia basado en distancias (dbRDA) utilizando el índice de Bray-Curtis. Sitios: Progreso-C= Progreso-Restaurado (cerca del sitio conservado), Progreso-R= Progreso-Restaurado (cerca de la carretera), Yucalpetén-R= Yucalpetén-Restaurado.	47
Figura 10. Abundancias relativas (%) a nivel de filo y clase de las comunidades de (a y b) bacterias y (c y d) arqueas. Se muestran los datos por triplicado para cada uno de los sitios de muestreo. PC= Progreso-Restaurado (cerca del sitio conservado), PR= Progreso-Restaurado (cerca de la carretera), YR= Yucalpetén-Restaurado.	50
Figura 11. Valores LDA de los taxa diferenciales de cada sitio. Grupos: Progreso-C= Progreso-Restaurado (cerca del sitio conservado), Progreso-R= Progreso-Restaurado (cerca de la carretera), Yucalpetén-R= Yucalpetén-Restaurado.	51
Figura 12. Curvas de rarefacción para a) la riqueza de ASVs y b) la diversidad de especies en cada muestra. PC= Progreso-Restaurado (cerca del sitio conservado), PR= Progreso-Restaurado (cerca de la carretera), YR= Yucalpetén-Restaurado.	52
Figura 13. Abundancias relativas (%) a nivel de a) filo, b) clase, c) orden y d) género de las comunidades de arqueas metanogénicas. Se muestran los datos por triplicado para cada uno de los sitios de muestreo. PC= Progreso-Restaurado (cerca del sitio conservado), PR= Progreso-Restaurado (cerca de la carretera), YR= Yucalpetén-Restaurado.	55
Figura 14. Árbol filogenético con los ASVs no asignados. Las secuencias de referencia corresponden a las secuencias asignadas hasta género dentro de este estudio (verde) y secuencias obtenidas del NCBI (azul), con el número de acceso de GenBank en paréntesis. El resto de las secuencias corresponden a las secuencias con asignación hasta el filo Euryarchaeota (negro) y a las secuencias con asignación hasta el dominio Archaea (azul). Se utilizó como grupo externo una secuencia ambiental relacionada a arqueas metanotróficas anaerobias grupo 1 (rojo). Los colores en las ramas indican los 8 distintos clados en los que se agruparon las secuencias. Los asteriscos representan valores Bootstrap >60%. La escala representa 0.08 cambios por aminoácido.	56

Figura 15. Visualización de la amplificación del gen *pmoA* por electroforesis en gel de agarosa al 1%. MPM= Marcador de Peso Molecular de 1 kb. PC= Progreso-Restaurado (cerca del sitio conservado), PR= Progreso-Restaurado (cerca de la carretera), YR= Yucalpetén-Restaurado, CTL+= Control positivo. B= Blanco (Control sin templado). La flecha indica el tamaño esperado de 461 pb.....57

Figura 16. Curva estándar CT para cuantificación por qPCR de los genes: a) *mcrA* y b) *pmoA*. CT= ciclo umbral.....60

INTRODUCCIÓN

Los manglares son ecosistemas de tipo humedal caracterizados por ser ricos en carbono y altamente productivos (Gao et al., 2021). Estos sistemas tienen la capacidad de almacenar carbono a largo plazo en forma de biomasa por encima y por debajo del suelo, teniendo un rol importante en la mitigación del cambio climático (Cameron et al., 2019). Además, los manglares secuestran una gran cantidad de carbono en los suelos debido a sus condiciones anaerobias y las altas tasas de acumulación de materia orgánica. Sin embargo, estas condiciones también promueven la producción de gases de efecto invernadero como el metano, el cual puede ser liberado nuevamente a la atmósfera. El metano es un gas de efecto invernadero con un potencial de calentamiento global más de 25 veces mayor al del CO₂ en un periodo de 100 años (Zheng et al., 2018). La síntesis y el consumo de este gas puede ocurrir por actividad microbiana (Upadhyay et al., 2020). Las arqueas metanogénicas producen metano bajo condiciones anaerobias y, posteriormente, este puede ser oxidado de forma anaerobia, por metanótrofos anaerobios (en su mayoría arqueas, aunque también hay bacterias del orden Methylospirales), o principalmente de forma aerobia, por bacterias metanotróficas (Arai et al., 2021).

Se ha reportado que la degradación de manglares genera mayores emisiones de gases de efecto invernadero al provocar cambios en la diversidad de comunidades microbianas y en las rutas metabólicas que estas llevan a cabo (Padhy et al., 2022). Además, la entrada de nutrientes por actividades antrópicas promueve las condiciones anaerobias y una mayor disponibilidad de sustratos para la metanogénesis. Se ha visto que manglares afectados por actividades antrópicas cuentan con emisiones de metano de hasta 14 veces mayores a las de manglares no perturbados (Zheng et al., 2018).

A pesar de que los humedales son una de las principales fuentes naturales de metano hacia la atmósfera, existe mucha incertidumbre sobre la magnitud de las emisiones de este gas en sedimentos de manglares y su contribución al cambio climático. Además, pocos estudios se han enfocado en identificar la abundancia, estructura y composición de las comunidades metanotróficas y metanogénicas en estos sedimentos (Shiau & Chiu, 2020).

En este trabajo se analizó la estructura, composición y actividad de comunidades de arqueas metanogénicas y bacterias metanotróficas en sedimentos de manglares restaurados de la Península de Yucatán, con el fin de aportar información sobre la diversidad de microorganismos y las potenciales emisiones de metano en sedimentos de manglares, lo cual puede ser útil dentro de las estrategias de mitigación de gases de efecto invernadero y conservación de estos ecosistemas.

MARCO TEÓRICO

Metano: gas de efecto invernadero

El metano es uno de los principales gases de efecto invernadero (GEI). Este gas, junto con el dióxido de carbono, el óxido nitroso, los compuestos halogenados, el ozono troposférico y el vapor de agua, absorben la radiación infrarroja proveniente de la Tierra. Desafortunadamente, su aumento en la atmósfera desde la Revolución Industrial ha contribuido a acelerar el cambio climático (Ballesteros & Aristizabal, 2007). Después del dióxido de carbono, el metano cuenta con las mayores tasas de emisiones a nivel global. Se estima que su concentración atmosférica fue de 1895.7 ppb durante el 2021, lo cual es aproximadamente 162% mayor que los niveles preindustriales (NOAA, 2022).

El metano es más eficiente que el CO₂ en capturar la radiación infrarroja. De hecho, cuenta con un potencial de calentamiento global 25 veces mayor al CO₂ en un periodo de 100 años. El metano es emitido a partir de diversas fuentes naturales y antrópicas (Tabla 1). Las principales fuentes antrópicas son la fermentación entérica del ganado, la producción y distribución de gas natural y petróleo, y los vertederos. Por otro lado, la mayor fuente natural de metano son los humedales. Otras fuentes naturales con menores emisiones incluyen las termitas, los océanos, los sedimentos, entre otros (Ballesteros & Aristizabal, 2007).

Tabla 1. Principales fuentes de emisiones de metano durante el año 2021.

Tipo	Fuente	Emisiones (Mt)
Antrópico (~60%)	Agricultura	141.4
	Energía (gas, petróleo, etc.)	135.2
	Vertederos	73
	Quema de biomasa	7.3
Natural (~40%)	Humedales	194
	Otras	39

Mt= Megatoneladas. Fuente: (IEA, 2022)

El metano se origina de forma biológica o no biológica. El metano no biológico es liberado por volcanes o el subsuelo, generado bajo grandes temperaturas y presiones. Estos procesos

geológicos involucran la transformación de rocas que son derretidas con calor y agua. Sin embargo, el 90-95% del metano liberado a la atmósfera es producido de forma biológica, por acción de microorganismos llamadas arqueas metanogénicas. De igual manera, el metano puede ser degradado de forma biológica y no biológica. Alrededor del 90% de la degradación ocurre de forma no biológica por reacciones químicas debido a la radiación ultravioleta en la tropósfera y estratósfera, que son las capas más bajas de la atmósfera. Por otro lado, de forma biológica la conversión del metano a CO₂ es llevada a cabo por bacterias y arqueas metanotróficas (Cadena Rodríguez, 2021).

Humedales costeros: ecosistemas de carbono azul

Los humedales se definen según la Convención Internacional de RAMSAR como “ecosistemas tanto naturales como artificiales que se encuentran permanente o temporalmente inundados, ya sea por aguas dulces, salobres o salinas, estancadas o corrientes y, que incluyen regiones ribereñas, costeras o marinas, que no excedan los seis metros de profundidad”. Estos ecosistemas actúan como interfase entre los ecosistemas terrestres y acuáticos o marinos. Son ecosistemas ricos en biodiversidad, altos en productividad y cuentan con una gran variedad de servicios ecosistémicos. Dentro de los humedales costeros destacan los manglares, las marismas y los pastos marinos (Hernández & Moreno-Casasola Barceló, 2018); estos son conocidos como ecosistemas de carbono azul, debido a que secuestran GEI y almacenan más carbono orgánico a largo plazo que otros ecosistemas, cumpliendo un rol fundamental en la mitigación del cambio climático (Herrera-Silveira et al., 2020).

La remoción de CO₂ atmosférico por medio de la fotosíntesis para su transformación en biomasa vegetal y, posteriormente, su acumulación como materia orgánica en suelos se conoce como secuestro de carbono. Esta capacidad que tienen los humedales es debido a su alta productividad por encima, y por debajo del suelo, a las condiciones anóxicas y a las altas tasas de sedimentación. Sin embargo, mayor acumulación de carbono implica también mayores emisiones de carbono en forma de gases como el CO₂ y el metano, productos de la descomposición de la materia orgánica; estimándose que los humedales contribuyen con aproximadamente con el 40% de las emisiones de metano a nivel mundial (Zheng et al.,

2018). Por lo tanto, el hecho de que un humedal actúe como fuente o sumidero de carbono depende principalmente de factores como la disponibilidad de carbono, las tasas de descomposición de la materia orgánica, los periodos de inundación y la temperatura. Por ello, el cambio climático actúa como una perturbación adicional a los humedales, ya que provoca cambios en la temperatura, en la precipitación y en el nivel del mar, lo cual se espera que tenga como consecuencia cambios en la capacidad funcional y en la localización geográfica de estos ecosistemas (Upadhyay et al., 2020).

Manglares como fuente y sumidero de gases de efecto invernadero

Los manglares son ecosistemas intermareales conformados por árboles y arbustos con adaptaciones a altos niveles de salinidad y a periodos de inundación constante. Se caracterizan por ser ecosistemas con una alta productividad primaria, por tener sedimentos anaerobios y por tener un gran contenido de carbono orgánico en los suelos; de hecho, logran acumular de 3 a 5 veces más carbono por hectárea que otros tipos de bosques terrestres (Chuang et al., 2017). Además, cuentan con otros servicios ecosistémicos como protección contra tormentas y huracanes, prevención de la erosión costera, regulación de la calidad del agua, reciclaje de nutrientes y provisión de hábitat para diversas especies (Herrera-Silveira et al., 2020).

A pesar de que los manglares tan solo ocupan el 0.5% de las áreas costeras globales, contribuyen con un 10-15% (24 Tg C y^{-1}) al almacenamiento de carbono en los sedimentos costeros y exportan 10-11% del carbono terrestre particulado al océano, jugando un papel importante en la mitigación del cambio climático (Alongi, 2014). Sin embargo, el carbono almacenado puede ser liberado de nuevo a la atmósfera en forma de productos gaseosos como el CO_2 y el metano. Al ser humedales, los manglares son considerados como una de las principales fuentes de metano a la atmósfera, emitiendo entre $177\text{-}284 \text{ Tg CH}_4 \text{ y}^{-1}$, lo cual corresponde al 40% de las emisiones totales de metano (Zheng et al., 2018). Por lo tanto, los manglares pueden ser fuentes o sumideros de GEI dependiendo de la compleja interacción entre la producción autotrófica, la respiración en las raíces y la respiración heterotrófica microbiana y de la macrofauna. Además, la magnitud y dirección de los flujos de GEI varían en múltiples escalas temporales y espaciales y son controlados por variables biogeoquímicas

que interactúan a escala local, regional y latitudinal (Zheng et al., 2018). Por ejemplo, el cambio de uso de suelo se ha reconocido como el conductor más significativo de emisiones de GEI en manglares (Cameron et al., 2021).

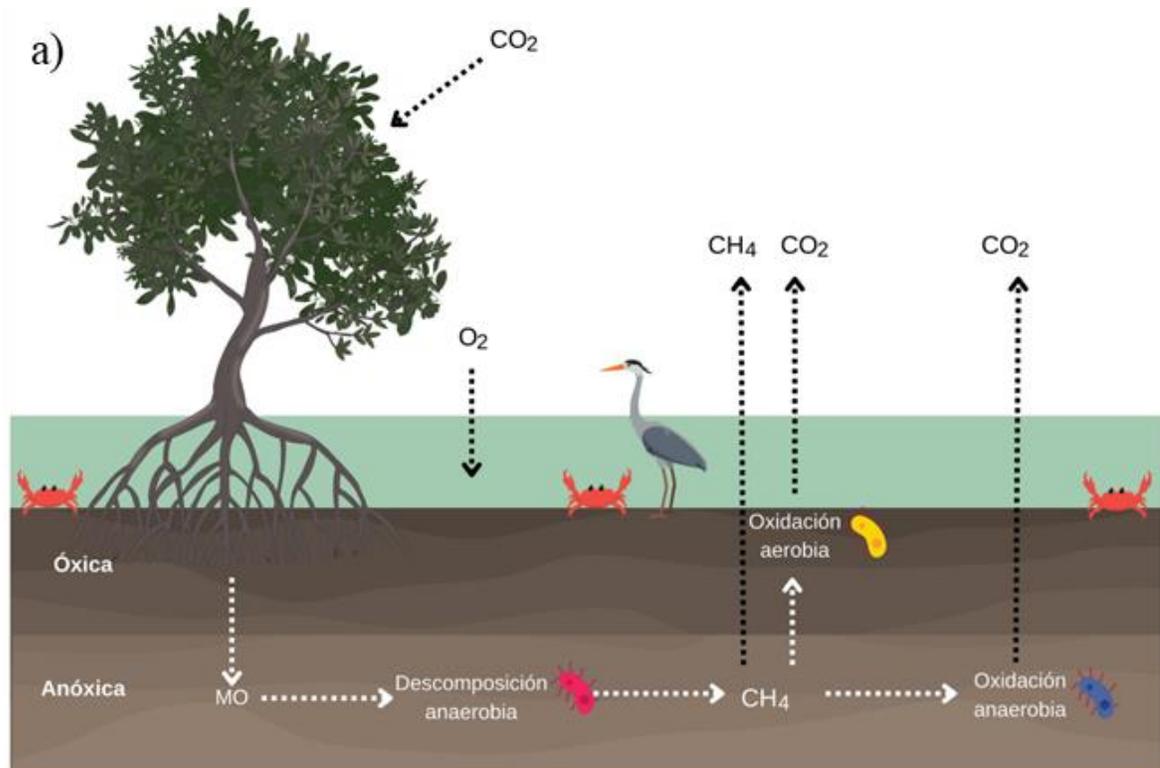
Los manglares, a pesar de todos los beneficios que aportan, se encuentran dentro de los ecosistemas más amenazados a nivel mundial, lo cual es resultado de su fragilidad natural, así como de los diversos impactos antrópicos a los que se ven expuestos (Herrera-Silveira et al., 2020). Así, estos ecosistemas se ven principalmente amenazados por el cambio de uso de suelo, la deforestación, el cambio climático, el aumento en el nivel del mar y las especies invasoras (Biswas & Biswas, 2021). Estas amenazas, además de disminuir la cobertura de los bosques de manglar, promueven la producción y emisión de GEI. Se sugiere que las emisiones de CO₂, junto con el aumento en el nivel del mar y el aumento de temperatura causados por el calentamiento global, son la mayor amenaza para los manglares en las próximas décadas. Además, estos son considerados factores de aceleración de las emisiones de GEI, ya que aceleran los ciclos de carbono en los suelos de manglares (Arai et al., 2021).

Flujos de metano en manglares

La síntesis y la oxidación de metano en los manglares es llevado a cabo por comunidades de microorganismos metanogénicos y metanotróficos, respectivamente. Los niveles de inundación, así como las altas tasas de acumulación de materia orgánica, promueven las condiciones anaerobias en la columna del sedimento y, por lo tanto, los procesos de metanogénesis, acetogénesis y sulfato-reducción que generan gases de efecto invernadero como CH₄, CO₂ y H₂S, respectivamente. Una vez que el metano es producido en el suelo, existen tres vías principales para su liberación a la atmósfera: a través de la interfase suelo-atmósfera, agua-atmósfera y planta-atmósfera. Esto quiere decir que los árboles y arbustos de manglares son capaces de transportar y emitir el metano producido en el suelo a través de difusión o transporte por el xilema (Gao et al., 2021).

No todo el metano producido en los sedimentos de manglares es liberado a la atmósfera. En las zonas más superficiales del sedimento pueden existir condiciones aerobias gracias a la presencia de estructuras como los neumatóforos y a la actividad de organismos como cangrejos que, al hacer sus madrigueras, ayudan a oxigenar el sedimento, lo cual se conoce

como bioturbación. Estas condiciones permiten que ocurra la oxidación aerobia del metano y se evita que una gran parte de este sea liberado a la atmósfera (Lyimo & Pol, 2002) (Fig. 1a). Sin embargo, las perturbaciones antrópicas alteran las emisiones de metano ya que el aumento del ingreso de nutrientes y/o la destrucción de los árboles del manglar provoca que aumenten las condiciones anaerobias del sedimento, por lo que se espera que en manglares perturbados aumenten las emisiones de metano (Zheng et al., 2018) (Fig. 1b).



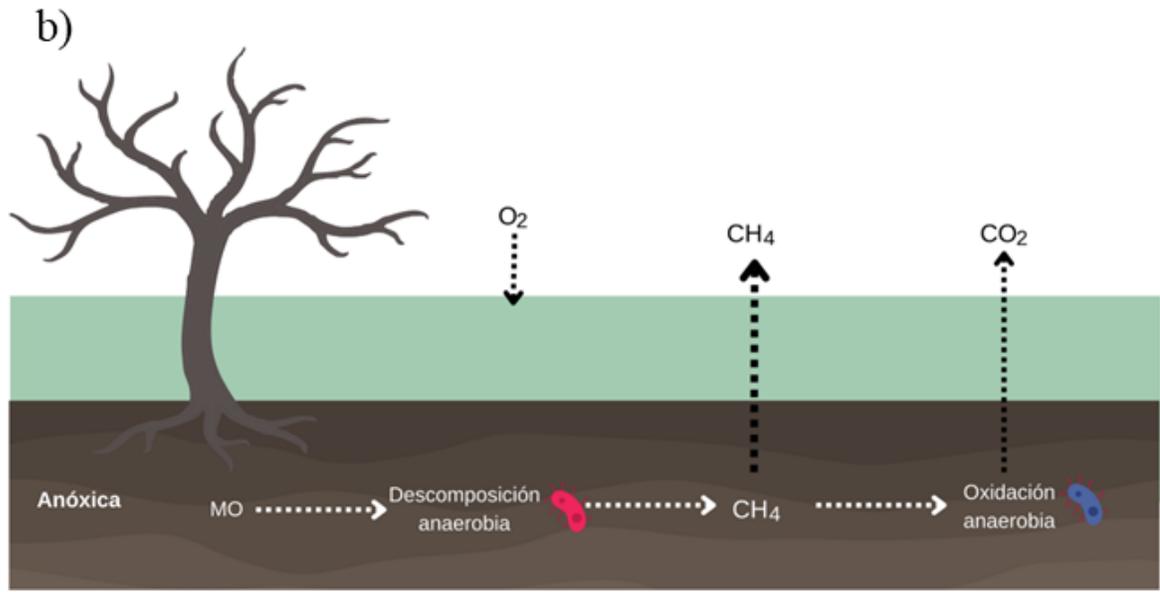


Figura 1. Flujos de metano en manglares a) conservados y b) perturbados. Elaboración propia.

Metanogénesis

Las arqueas metanogénicas son un grupo de microorganismos que habitan en condiciones estrictamente anaerobias y obtienen energía al reducir compuestos de C1 y C2, que incluyen CO_2 , formato, acetato, metanol, etanol, metil-aminas y metil-sulfuros, para producir el gas metano. El metano es el producto final de la descomposición anaerobia de la materia orgánica y su síntesis es catalizada por una serie de enzimas, siendo la metil coenzima M reductasa (MCR) clave para el proceso, ya que reduce metil coenzima M a metano. El gen que codifica la subunidad α de esta enzima (*mcrA*) es utilizado como marcador molecular para el estudio de las comunidades de arqueas metanogénicas (Evans et al., 2019).

Según el sustrato que utilizan, estos microorganismos se clasifican en: hidrogenotróficas, las que utilizan H_2 y CO_2 ; acetoclásticas, las que utilizan el acetato; metilotróficas, las que utilizan compuestos metilados; y metilotróficas dependientes de H_2 , las que utilizan H_2 y compuestos metilados (Evans et al., 2019).

Para llevar a cabo la metanogénesis estos organismos requieren condiciones extremadamente reducidas, con un potencial redox menor a -200 mV, condición que se genera tras la reducción de otros aceptores terminales de electrones como O_2 , NO_3^- y SO_4^{2-} . Por lo tanto,

son abundantes en ecosistemas como los sedimentos de humedales, los arrozales y los vertederos; además de estar presentes en la microbiota de rumiantes y termitas (Chowdhury & Dick, 2013). En humedales naturales de agua dulce tienden a dominar las arqueas metanogénicas hidrogenotróficas y acetoclásticas, mientras que, en humedales costeros, debido a la gran abundancia de organismos sulfatoredutores, y a que estos compiten por sustratos como el hidrógeno y el acetato con las arqueas metanogénicas, son más abundantes las arqueas metanogénicas metilotróficas, ya que utilizan un sustrato no competitivo (Arai et al., 2021).

Oxidación anaerobia del metano

Los metanótrofos anaerobios se han observado en dos tipos de microorganismos: i) arqueas metanotróficas anaerobias (ANME), y ii) bacterias del orden Methylospirales; ambos grupos utilizan el metano como aceptor electrónico al reducir directamente iones inorgánicos o al transferir electrones a otros microorganismos (Wu et al., 2011).

Las arqueas ANME llevan a cabo una metanogénesis hidrogenotrófica inversa, ya que cuentan con el complejo MCR al igual que las arqueas metanogénicas (Evans et al., 2019). La presencia de estas arqueas ha sido reportada principalmente en sedimentos anóxicos marinos y en suelos sumergidos y se estima que este proceso consume del 5-20% del flujo neto atmosférico de metano (Chowdhury & Dick, 2013).

Al ser organismos anaerobios, las arqueas ANME utilizan aceptores de electrones alternativos al oxígeno (Guerrero-Cruz et al., 2021), donde se ha observado que este proceso se acopla con otros procariontes para completar los pasos de transferencia electrónica. Un ejemplo es la oxidación anaerobia del metano (AOM) acoplada a reducción de sulfatos (S-DAOM). Este es un proceso metabólico donde se obtiene energía gracias al consorcio sintrófico entre arqueas ANME y bacterias sulfatoredutoras. Sin embargo, investigaciones recientes han sugerido que este proceso puede ser realizado por arqueas ANME de manera independiente, mientras que, por el contrario, el metano no puede ser utilizado directamente como un donador de electrones por las bacterias sulfatoredutoras, a menos que esté asociado con arqueas ANME. La sulfato-reducción utiliza comúnmente el hidrógeno como donador

de electrones y se encarga de reducir el sulfato a ácido sulfhídrico, el cual después puede precipitar con iones metálicos como el hierro.

También existe la AOM acoplada a diferentes compuestos sulfurados como aceptores de electrones. Las arqueas ANME que llevan a cabo S-DAOM pueden utilizar también azufre elemental o tiosulfato como aceptores finales de electrones para la AOM. Por otro lado, está la AOM acoplada a reducción de nitritos y nitratos (N-DAOM). Esta ocurre en arqueas ANME que acoplan la AOM con desnitrificación, ya sea reduciendo el nitrito a óxido nítrico, el cual después es convertido a nitrógeno y oxígeno y a su vez el oxígeno es utilizado para oxidar el metano a CO₂; o utilizando el nitrato como aceptor terminal de electrones para liberar nitrito, el cual posteriormente se reduce a nitrógeno. También existe la AOM acoplada a reducción de hierro y manganeso, los cuales son utilizados como aceptores de electrones. Sin embargo, en sedimentos marinos y salobres probablemente ocurre en un porcentaje muy bajo, ya que el sulfato es el anión más dominante en agua marina. Finalmente, se han descrito otros posibles aceptores de electrones como el arsénico, selenio, bromato y cromo (Bhattarai et al., 2019).

Filogenéticamente, los grupos ANME han sido agrupados en 3 clados distintos, llamados ANME-1, ANME-2 y ANME-3, los cuales están basados en el análisis del gen *16S rRNA*. Todos los grupos están relacionados filogenéticamente con distintos grupos de arqueas metanogénicas. Los clados ANME-2 y ANME-3 están agrupados dentro del orden de los Methanosarcinales, mientras que los ANME-1 pertenecen a un nuevo orden dentro de la clase Methanomicrobia (Kevorkian et al., 2021). El clado ANME-1 se subdivide en los grupos ANME-1a y ANME-1b, el clado ANME-2 se subdivide en 4 grupos: ANME-2a, ANME-2b, ANME-2c y ANME-2d, mientras que el clado ANME-3 no cuenta con subdivisiones (Bhattarai et al., 2019).

Las arqueas ANME están ampliamente distribuidas en hábitats marinos como los sistemas de emanaciones frías, las ventilas hidrotermales y los sedimentos ricos en materia orgánica. Los factores que controlan la distribución de estos microorganismos son principalmente la disponibilidad de metano y de sulfato u otros aceptores terminales de electrones. También influyen otros factores como la temperatura, la salinidad y la alcalinidad (Bhattarai et al., 2019). En humedales costeros, los ANME están dominados por metanótrofos sulfato

dependientes (Arai et al., 2021), aunque no existen muchos estudios al respecto. Aunque se encuentran en bajas abundancias en estos ecosistemas, existe evidencia de que pueden disminuir las emisiones de metano hasta en un 50%, consumiendo hasta 200 Tg CH₄ y⁻¹ (Valenzuela et al., 2017).

Por otro lado, está la AOM por bacterias del orden Methylospirales. Esta ocurre únicamente en bacterias que acoplan la AOM con la reducción de nitrito a NO y la dismutación de NO, el cual después es convertido a nitrógeno molecular y oxígeno, donde este último es utilizado para oxidar el metano a CO₂. Esta ruta al momento se ha afiliado a bacterias del orden Methylospirales como *Candidatus Methylospirillum oxyfera* (Wu et al., 2011), *C. Methylospirillum sónica*, *C. Methylospirillum limnetica* y *C. Methylospirillum lanthanidiphila* (Peres et al., 2023), principalmente encontradas en zonas mínimas de oxígeno con presencia de metano, como sedimentos de agua dulce.

Oxidación aerobia del metano

Las bacterias metanotróficas son microorganismos aerobios que obtienen energía a través de la oxidación aerobia del metano. Habitan comúnmente en suelos o sedimentos bajo la superficie, donde el metano es producido. Debido a esto, estas bacterias juegan un papel muy importante en mitigar las emisiones de metano hacia la atmósfera. Estos organismos utilizan la enzima metano monooxigenasa (MMO), la cual cataliza la oxidación de metano a metanol, el primer paso para la degradación de metano. Esta enzima se encuentra en dos formas distintas: una forma particulada unida a la membrana (pMMO) y una forma soluble citoplasmática (sMMO). Posteriormente, la enzima metanol deshidrogenasa oxida el metanol a formaldehído. La pMMO es una enzima que contiene hierro y cobre, mientras que la sMMO es una enzima que contiene un sitio di-hierro como centro catalítico (Farhan Ul Haque et al., 2018; Guerrero-Cruz et al., 2021). Los genes *pmoA* y *mmoX* son los más utilizados como marcadores moleculares para el estudio de bacterias metanotróficas, el primero codifica la subunidad α de la enzima pMMO (Chowdhury & Dick, 2013) y el segundo codifica la subunidad del sitio activo de la enzima sMMO (Farhan Ul Haque et al., 2018).

Las bacterias metanotróficas se dividen en tres grupos de acuerdo con la ruta de asimilación del carbono que utilizan: las tipo I pertenecen a la clase Gammaproteobacteria y utilizan la

ruta de la ribulosa monofosfato, algunas familias representativas son Methylococcaceae y Methylothermaceae; las tipo II pertenecen a la clase Alphaproteobacteria y utilizan el ciclo de la serina, algunas familias representativas son Methylocystaceae y Beijerinckiaceae; y las tipo X pertenecen al filo Verrucomicrobia y llevan a cabo el ciclo de Calvin-Benson-Bassham (CBB) e incluye a la familia Methylacidiphilaceae (Guerrero-Cruz et al., 2021). Todos los grupos de bacterias metanotróficas poseen la enzima pMMO, a excepción de los géneros *Methylocella* y *Methyloferula* dentro de las proteobacterias, que poseen exclusivamente la enzima sMMO. Los metanótrofos que contienen la enzima pMMO utilizan el cobre como metal catalítico en la oxidación del metano. Por otro lado, en los que contienen tanto la enzima pMMO como la sMMO, la presencia de cobre suprime la expresión de sMMO (Guerrero-Cruz et al., 2021).

Los metanótrofos tipo I tienden a dominar en ambientes naturales con suficientes nutrientes y sustratos, es decir, cuando existe una alta concentración de oxígeno y baja concentración de metano; mientras que, los tipo II tienden a ser abundantes en ambientes con recursos limitados con una gran afinidad por los nutrientes y los sustratos, es decir cuando existe una baja concentración de oxígeno y una alta concentración de metano. Por otro lado, los metanótrofos tipo X se han encontrado exclusivamente en ambientes extremos como zonas volcánicas y geotermales (Arai et al., 2021; Guerrero-Cruz et al., 2021).

Se estima que la oxidación aerobia del metano es el proceso que domina la captura del metano en humedales al oxidar entre el 43-90% de la producción neta de metano en estos ecosistemas. Al finalizar este proceso, el carbono del CH₄ se convierte a CO₂ o se asimila en la biomasa celular de estos microorganismos (Chowdhury & Dick, 2013; Valenzuela et al., 2017).

ANTECEDENTES

Comunidades metanotróficas y metanogénicas en sedimentos de manglares

Los estudios que se han realizado para medir los flujos de metano en manglares son limitados. Además, pocos consideran la actividad de comunidades metanotróficas y metanogénicas, cuyas abundancias relativas juegan un papel importante en los flujos netos de metano que van desde el suelo hacia la atmósfera y la proporción de metanotróficos:metanogénicos es un indicador que puede utilizarse para predecir el flujo neto del metano en un sistema (Padhy et al., 2022). Las emisiones de metano están fuertemente controladas por los niveles de oxígeno en el suelo, que promueven la oxidación aerobia del metano por parte de las bacterias metanotróficas. Por ejemplo, en experimentos que utilizan metilfluoruro como un inhibidor de metanotrofia se mostró que las emisiones de metano en ausencia de suelos oxidados serían de 5 a 10 veces mayor. Globalmente, se estima que las bacterias metanotróficas consumen del 7-10% de las emisiones netas anuales de metano (Chowdhury & Dick, 2013).

En un estudio realizado en zonas de manglares de India se observó que la actividad metanotrófica, independientemente de la ruta metabólica, es mayor en manglares conservados que en manglares degradados y la ruta dominante es la de la vía de la serina. Por otro lado, la actividad metanogénica presentó diferencias según el tipo de ruta metabólica. Por ejemplo, la ruta acetoclástica fue la dominante y esta fue mayor en manglares conservados, mientras que, la ruta hidrogenotrófica fue mayor en manglares degradados. Además, la proporción metanotróficos:metanogénicos fue mayor en manglares conservados, lo cual significa menores emisiones de metano (Padhy et al., 2022). En estos sitios se observó que la actividad metanogénica y metanotrófica se ve directamente afectada por el metabolismo del azufre y del nitrógeno, así como por las condiciones fisicoquímicas del suelo como la salinidad, el pH y el contenido de carbono orgánico en humedales costeros (Padhy et al., 2022).

En un estudio realizado en zonas de manglares de Singapur se observó una mayor diversidad de arqueas metanogénicas en las capas superficiales del sedimento en las localidades afectadas por actividades antrópicas, esto debido al enriquecimiento orgánico en la superficie, lo cual implica una mayor producción de metano en estos sedimentos. En la mayoría de las muestras dominaron grupos de arqueas metanogénicas metilotróficas, lo cual

era de esperarse debido a su capacidad para utilizar sustratos no competitivos. Sin embargo, los tres tipos de metabolismo pueden coexistir en estos sedimentos, ya que se observaron también grupos acetoclásticos e hidrogenotróficos. En este estudio se encontró que la temperatura y la concentración de NO_3^- , Co y Ni explican la mayoría de las variaciones espaciales en las comunidades metanogénicas. Se observó que el aumento en la temperatura estimula el crecimiento de arqueas metanogénicas e incluso puede inducir un cambio de metabolismo acetoclástico a una combinación de acetoclástico e hidrogenotrófico. Por otro lado, el NO_3^- inhibe la producción de metano ya que afecta el recambio de los precursores de la metanogénesis, como el H_2 y el acetato, y de los oxidantes como el sulfato y el hierro (Jing et al., 2016).

En un estudio realizado en zonas de manglares de Taiwán se detectó una mayor actividad metanotrófica en manglares chaparros, comparado con manglares de franja. Esto debido a la diferencia en la frecuencia de la marea entre ambos sitios, ya que los manglares chaparros se encuentran a una mayor elevación y se inundan solo en temporadas de marea alta; mientras que, los manglares de franja se encuentran a elevaciones bajas y ocurren ciclos de marea diariamente. Estas variaciones en el patrón de mareas provocan que existan diferencias en el potencial redox y menos oxígeno disponible en manglares de franja. Sin embargo, la abundancia absoluta de bacterias metanotróficas fue mayor en manglares de franja y se encontró que en ambos sitios dominaron las bacterias metanotróficas tipo I sobre el tipo II (Shiau et al., 2018).

En general, las emisiones de metano dependen de la actividad metanotrófica y metanogénica de los microorganismos en los sedimentos, la cual a su vez se ve influenciada por las características fisicoquímicas del ambiente en el que se encuentran.

Factores que afectan los flujos de metano en manglares

Los flujos de metano se ven afectados por diversos factores naturales y antrópicos (Fig. 2). En general, distintos estudios sugieren que la magnitud de los flujos de metano está determinada principalmente por factores como la penetración de oxígeno en el sedimento, la salinidad y la disponibilidad de donadores y aceptores de electrones (Wang et al., 2018; Arai et al., 2021; Cameron et al., 2021).

La oxigenación del sedimento permite la actividad de bacterias metanotróficas, es decir, aumenta la oxidación de metano. La disponibilidad de oxígeno se ve favorecida por la distribución espacial heterogénea de las raíces aéreas de árboles de manglar y las madrigueras creadas por cangrejos (Arai et al., 2021); mientras que se puede ver afectada negativamente por perturbaciones antrópicas como la tala de árboles, ya que, al dejar el área descubierta de raíces, existe una menor aireación en el sedimento y entonces se acumula metano y sulfuros tóxicos, volviendo el área inhabitable para plantas y animales (Lyimo & Pol, 2002).

Por otro lado, se ha visto que la salinidad y el potencial redox se correlacionan de manera negativa con la producción de metano. En zonas con menor salinidad disminuye la reducción de sulfato, lo cual crea condiciones más favorables para las arqueas metanogénicas. Mientras que, en zonas con mayor salinidad existen mayores niveles de sulfato y aumenta la presencia de bacterias sulfato-reductoras, que compiten con las arqueas metanogénicas por el mismo sustrato (Cameron et al., 2021). El potencial redox se utiliza como una medida para caracterizar el estado de oxidación-reducción de los sistemas ambientales. En sistemas oxidados el potencial redox será positivo, mientras que, en ambientes reducidos este será negativo (Søndergaard, 2009). En general, los aceptores de electrones son reducidos durante los periodos de humedad y son regenerados durante los periodos de sequía. Se ha visto que la presencia de neumatóforos aumenta el potencial redox en el suelo y la concentración de sulfato, lo cual inhibe las emisiones de metano (Wang et al., 2018).

Cabe destacar que la estacionalidad juega un rol importante en los flujos de metano, ya que provoca variaciones en las variables anteriormente mencionadas. En temporada de lluvias, aumentan los periodos de inundación, lo cual provoca que disminuya la salinidad, la disponibilidad de oxígeno y el potencial redox, ya que hay un ambiente mayormente reducido. Mientras que, en temporadas de sequía, disminuyen los periodos de inundación, lo cual provoca que aumente la salinidad, la disponibilidad de oxígeno y el potencial redox, ya que hay un ambiente mayormente oxidado. Además, el número de neumatóforos varía estacionalmente en algunos bosques de manglar, lo cual puede ser un factor importante en las dinámicas a largo plazo de la actividad metanogénica y metanotrófica (Arai et al., 2021).

Otras variables que se ha mencionado que pueden tener efectos en los flujos de metano son la temperatura, el pH, la textura del suelo o sedimento, la cantidad de materia orgánica, el

contenido de N y P; así como las actividades antrópicas y los efectos del cambio climático, tales como el aumento de temperatura, el aumento en el nivel del mar y los cambios en la precipitación. Las emisiones de metano son generalmente mayores durante temporadas con mayor temperatura, debido a que esto favorece el aumento en la actividad microbiana. Existe evidencia de que la producción de metano incrementa con la temperatura, sin embargo, no se han encontrado evidencias de que el consumo de metano también incremente con la temperatura (Al-Haj & Fulweiler, 2020).

Por otro lado, se ha visto que la producción de metano incrementa conforme el pH disminuye y se aproxima a los niveles óptimos para metanógenas (alrededor de 6.7). Por lo tanto, la disminución del pH del sedimento debido a la acidificación del océano tiene el potencial de promover las emisiones de metano en los suelos de manglares (Arai et al., 2016).

La textura del suelo también puede tener un efecto en las emisiones de metano ya que el tipo de grano determina el traspaso y la captura del gas metano producido en el suelo. Los granos más finos como la arcilla tienen mayor capacidad de retención, mientras que, granos más gruesos como la arena tienen mayor capacidad de infiltración (Lekphet et al., 2005).

En cuanto a la materia orgánica, cuando esta se encuentra de manera abundante en los sedimentos puede reducir la competencia entre bacterias sulfato-reductoras y arqueas metanogénicas al proporcionar más sustrato competitivo y/o proveer más sustrato no competitivo. Además, las plantas al realizar fotosíntesis depositan materia orgánica lábil en el sedimento alrededor de las raíces, brindando sustrato para estimular la producción de metano. Se ha visto que existe correlación positiva entre las tasas de producción de metano y la concentración de materia orgánica lábil en sedimentos de manglares y de marismas saladas (Al-Haj & Fulweiler, 2020).

En condiciones naturales los manglares son ricos en carbono, pero están limitados en nutrientes como nitrógeno y fósforo; entonces, la entrada de nutrientes provocada por la contaminación antrópica incrementa tanto los procesos metabólicos microbianos, como las condiciones anaerobias del suelo, lo cual promueve la producción de metano y su liberación desde los suelos hacia la atmósfera. Además, la destrucción de los bosques de manglar tiene como consecuencias, entre otras, la disminución en la oxigenación del sedimento y aumento de la temperatura (Romero-Uribe et al., 2022). Estos factores sugieren que en manglares

degradados aumente la producción y liberación de metano y, efectivamente, se ha visto que manglares afectados por actividades antrópicas cuentan con emisiones de hasta 14 veces mayores a las de manglares no perturbados, sin embargo, existen muy pocos estudios al respecto (Zheng et al., 2018).

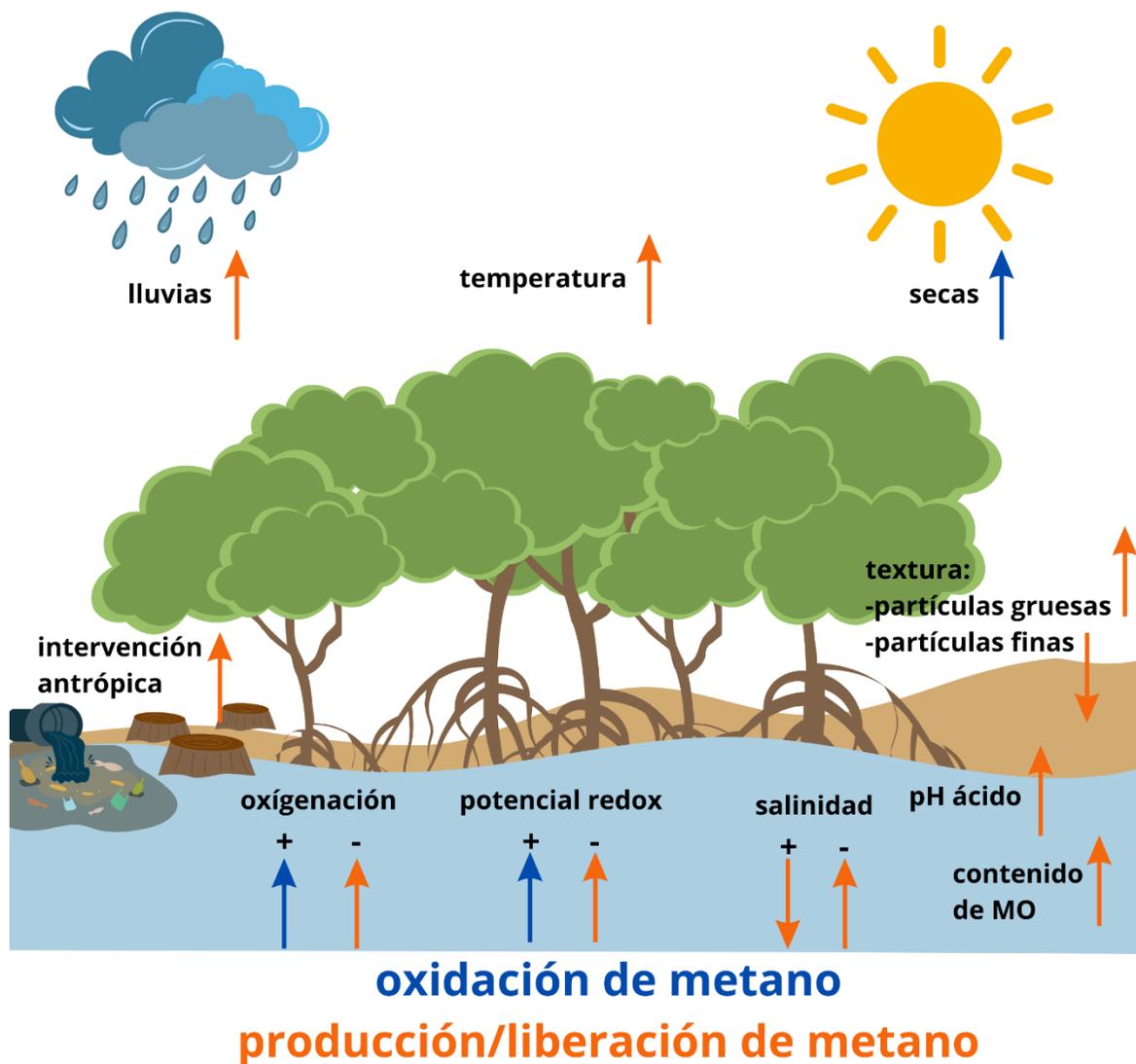


Figura 2. Factores naturales y antrópicos que actúan como controladores de los flujos de metano. Los signos indican un aumento (+) o disminución (-) del factor natural o antrópico. Las flechas hacia arriba indican un aumento y las flechas hacia abajo indican una disminución en la producción/liberación de metano (naranja) o en la oxidación de metano (azul). Elaboración propia.

En el estudio realizado por Romero-Urbe *et al.* (2022), observaron que, los principales factores que controlan los flujos de metano son la salinidad estacional y la disponibilidad de NO_2^- , NO_3^- y SO_4^{2-} en el suelo, favorecido por los altos niveles del agua y la temperatura en ausencia de neumatóforos. Además, se vio que la interacción entre la estación y el nivel de degradación afecta de manera relevante los flujos de metano, existiendo mayor liberación de este gas en temporada de lluvias y en zonas de manglar degradado, teniendo una diferencia de hasta 9 veces en comparación con los flujos de metano en las zonas de manglar conservado (Romero-Urbe *et al.*, 2022).

La información sobre la contribución de las emisiones de metano a partir de manglares al potencial total de calentamiento global aún es limitada. Se sabe que, en comparación con otros humedales, los manglares emiten cantidades negligibles de metano debido a la alta presencia de sulfato en los sedimentos de manglar, lo cual permite que las bacterias sulfato-reductoras desplacen a las arqueas metanogénicas. Sin embargo, si las actividades antrópicas continúan al ritmo actual sin medidas de protección, en el futuro estos ecosistemas podrían convertirse en fuentes principales de emisiones de metano y perder su habilidad para almacenar carbono (Zheng *et al.*, 2018).

En escenarios de cambio climático se prevé que disminuya la capacidad de los manglares de ser sumideros de gases de efecto invernadero ya que los efectos del cambio climático coinciden con los factores que promueven las emisiones de metano como el aumento de temperatura, las alteraciones en los patrones de lluvia, los cambios en la salinidad, el aumento en el nivel del mar y las variaciones en el hidropereodo (Romero-Urbe *et al.*, 2022). Por lo tanto, la protección, restauración y regeneración de manglares son cuestiones globales clave en escenarios de cambio climático. Sin embargo, para poder justificar esto es necesario realizar estudios sobre el efecto de la degradación de manglares en los ciclos biogeoquímicos involucrados en las emisiones de GEI llevados a cabo por comunidades microbianas (Al-Haj & Fulweiler, 2020).

Manglares de la Península de Yucatán

México cuenta con el 6% del total de manglares a nivel mundial, lo cual lo coloca en el cuarto lugar en extensión de estos ecosistemas por debajo de Indonesia, Australia y Brasil. En el

estudio más reciente en el 2020, se estimó una superficie total de 905,086 ha de manglares en México, distribuidas a lo largo de 17 estados de la república y de las cuales el 55% se registran en la Península de Yucatán (CONABIO, 2021; Osorio-Olvera et al., 2023).

Las especies de manglares que predominan en el país son *Rhizophora mangle* (mangle rojo), *Laguncularia racemosa* (mangle negro), *Avicennia germinans* (mangle blanco) y *Conocarpus erectus* (mangle botoncillo). Todas las especies de mangle están listadas en la NOM-059-SEMARNAT-2010 con la categoría de Amenazadas (Acosta Velázquez et al., 2013). La especie *Rhizophora mangle* es la especie de mangle que se encuentra en las condiciones de mayor inmersión, y se considera una especie pionera en los límites terrestres y marinos, con tolerancia a niveles de inundación de 0 a 0.60 m y salinidades menores a 40 g kg⁻¹. Dentro de sus mecanismos de adaptación, *R. mangle* cuenta con un mecanismo de exclusión de sales a partir de la transpiración cuticular de las hojas, así como un complejo sistema de raíces aéreas, llamados zancos, que parten del mismo tronco o de las ramas laterales y bajan para anclarse y sostenerse en el sedimento. Además estas raíces cuentan con protuberancias sobre la epidermis llamadas lenticelas, que permiten captar el oxígeno atmosférico y una gran cantidad de taninos con capacidad antioxidante y de resistencia a la pudrición (Agraz-Hernández, 2006; Núñez Farfán et al., 1997).

La especie *Avicennia germinans* se encuentra en las condiciones de menor inmersión del suelo, en las mareas más altas y de mayor salinidad, con tolerancia a niveles de inundación de 0 a 0.60 m y salinidades mayores a 60 g kg⁻¹. Dentro de sus mecanismos de adaptación presentan un mecanismo de secreción de sales a través de glándulas excretoras en la superficie de las hojas, así como raíces aéreas llamadas neumatóforos y lenticelas, que le permiten capturar el oxígeno atmosférico y tolerar tiempos de residencia bajo condiciones hipóxicas. Es la especie de manglar más resistente a las condiciones extremas de salinidad, hipoxia y sequía prolongada (Agraz-Hernández et al., 2022).

La especie *Laguncularia racemosa* se encuentra en las condiciones de mayor inmersión del suelo, mayor tiempo de residencia del agua y de menor salinidad, con tolerancia a niveles de inundación de 0 a 0.30 m y salinidades de 25 a 35 g kg⁻¹. Presenta un mecanismo de excreción de sales a través de glándulas y lenticelas en sus neumatóforos para captar el oxígeno atmosférico. Finalmente, la especie *Conocarpus erectus* se encuentra ocasionalmente en

condiciones de inmersión del suelo y zonas de baja salinidad, con tolerancia a niveles de inundación <0.1 m y salinidades <30 g kg⁻¹. Al igual que las otras especies presenta un mecanismo de excreción de sales a través de glándulas (Agraz-Hernández, 2006).

Actualmente, los estudios sobre los flujos de metano en manglares de la Península de Yucatán son escasos. Chuang *et al.* (2017) realizaron estimaciones sobre los flujos de metano en lagunas costeras (Chelem, Celestún y Términos) de la Península de Yucatán con mediciones de las concentraciones de metano disuelto en agua superficial en los años 2000-2002. A pesar de las altas concentraciones de sulfato y de la alta salinidad, se registraron altas tasas de producción de metano en los sedimentos de manglares de Yucatán. El metano se acumula en el agua intersticial a profundidades bajas debido al alto contenido de materia orgánica en el sedimento y el uso de sustratos no competitivos por arqueas metanogénicas. En estas lagunas costeras se observaron concentraciones de 25 a 8378 nM de metano disuelto en aguas superficiales. Además, se encontró que la concentración de metano es mayor en áreas expuestas a contaminantes, lo cual se explica debido a que con la entrada de nutrientes se favorecen las condiciones anaerobias y aumenta la metanogénesis. Con estos datos los autores lograron estimar las emisiones totales atmosféricas anuales de agua de lagunas en México, la cual fue de 0.17 Tg CH₄ y⁻¹, y podría representar entre el 7 y 11% de las emisiones totales de humedales a la atmósfera. Sin embargo, este es un cálculo limitado ya que está basado únicamente en la información de 3 lagunas del país, por lo que es importante realizar más estudios al respecto (Chuang *et al.*, 2017).

Por otro lado, Agraz-Hernández *et al.* (2020) realizaron un estudio para estimar la cantidad de emisiones de metano en suelos de distintos bosques de manglares a lo largo de la costa de Campeche (Laguna de Términos, Río Champotón y Reserva de la Biósfera Los Petenes). Se registraron variaciones en las emisiones de metano de los distintos sitios debido a las diferencias en las dinámicas de carbono de la superficie del sedimento. Se encontró que las mayores emisiones de metano fueron de 673.24 ± 922 mg m⁻² h⁻¹ y fueron registradas en el bosque de manglar de la Laguna de Términos, lo cual ocurre como consecuencia del ingreso contante de nutrientes de origen terrígeno, la actividad antrópica y el gradiente topográfico. Además, se encontró que los niveles de metano se relacionaron inversamente con el pH del suelo. Sin embargo, el estudio se ve limitado ya que los datos fueron obtenidos solo en

temporada de lluvias, por lo que el secuestro de carbono y las emisiones de metano podrían ser diferentes a lo largo del año y ser influenciadas por otros parámetros fisicoquímicos (Agraz-Hernández et al., 2020).

Ambos estudios concuerdan en que la entrada de nutrientes en los ecosistemas costeros resulta en un aumento en las emisiones de metano. Además de que la cantidad de metano emitida en estos sitios se ve influenciada por distintas variables fisicoquímicas, así como por las presiones antrópicas a las que se ven expuestos los ecosistemas.

Finalmente, solamente se detectaron un par de estudios donde analizan la composición de microorganismos en bosques de manglares de la Península de Yucatán. Gómez-Acata *et al.* (2023) evaluaron la composición y estructura de las comunidades microbianas en sedimentos de distintos tipos ecológicos de manglares (franja, cuenca y chaparro) de Celestún. Dentro de los distintos tipos ecológicos encontraron metabolismos asociados como sulfato-reducción, nitrato-reducción, desnitrificación, oxidación de H₂ y oxidación de azufre. A pesar de que con el análisis del gen *16S rRNA* no se lograron identificar microorganismos metanotróficos o metanogénicos, los autores hipotetizan que miembros del filo Bathyarchaeota podrían desempeñar un papel fundamental en el ciclo del metano en estos ecosistemas de manglares, ya que está reportada en la literatura su capacidad de producción de metano utilizando compuestos metilados (Gómez-Acata et al., 2023). Por otro lado, Navarrete-Euan *et al.* (2021) realizaron un estudio de las comunidades microbianas en zonas costeras de la Península de Yucatán conservadas (El Palmar y Bocas de Dzilam) y contaminadas (Sisal y Progreso). Detectaron una mayor diversidad de microorganismos en zonas conservadas. Además, observaron que los cambios en las variables fisicoquímicas que ocurren a lo largo del año y entre distintos años tienen un mayor impacto en la estructura de las comunidades microbianas, que las variaciones causadas por impactos antrópicos. En todas las localidades se registró la presencia del metabolismo del metano, del azufre, entre otros utilizando un software de predicción de capacidades metabólicas. Además, se encontró que la abundancia relativa del metano y el azufre fue similar en todas las localidades. Sin embargo, no se menciona qué microorganismos son los responsables de realizar este metabolismo (Navarrete-Euan et al., 2021).

Se puede observar que hacen falta estudios de los microorganismos relacionados a los flujos de metano en manglares de la Península de Yucatán. Debido a que estos microorganismos se encuentran en abundancias muy bajas, para su identificación es necesario utilizar marcadores moleculares específicos de su actividad, ya que utilizando el gen *16S rRNA* solamente se identifican los taxa más abundantes.

JUSTIFICACIÓN

La Península de Yucatán cuenta con una extensión de manglares de aproximadamente 544,169 ha, lo cual corresponde al 55% de la extensión en todo el país (CONABIO, 2022). Estos ecosistemas se encuentran dentro de las principales fuentes naturales de metano hacia la atmósfera y se cree que estas emisiones pueden aumentar con la destrucción y/o contaminación de estos ecosistemas. En América, se ha estimado una tasa anual de deforestación de manglares entre 0.16-0.22%, y en Yucatán se reportaron en 2021 alrededor de 20 mil hectáreas de manglar degradado, lo cual se estima que representa una pérdida del 20% de la cobertura total de manglares (Osorio-Olvera et al., 2023). Actualmente, casi no existen investigaciones en la Península de Yucatán sobre las emisiones de metano en sedimentos de manglares ni sobre cómo estas emisiones contribuyen al presupuesto global de metano a nivel mundial.

Algunas zonas de manglar perturbadas en la Península de Yucatán se registran dentro de los sitios de Progreso Antiguo y Curva Yucalpetén. En estos sitios, con el proceso de restauración, se establecieron plantas de la especie *A. germinans* de manera natural (Teutli Hernández et al., 2020); lo cual es común en otros sitios restaurados al ser la especie de manglar más resistente a las condiciones extremas de salinidad, hipoxia y sequía prolongada (Agraz-Hernández et al., 2022). Además, la presencia de los neumatóforos en esta especie actúa como un conducto para las emisiones de metano (Kreuzwieser et al., 2003), por lo que los sedimentos asociados a esta especie son un buen punto de estudio para investigar a las comunidades microbianas implicadas en los flujos del metano.

Las comunidades microbianas que habitan en los sedimentos de manglares juegan un papel importante en los ciclos biogeoquímicos, en el recambio de la materia orgánica, en la disponibilidad de nutrientes, y en la mineralización y remoción de contaminantes (Padhy et al., 2022). El ciclo biogeoquímico del carbono en estos sitios incluye procesos de transformación como la síntesis y la oxidación del metano, los cuales son llevados a cabo, respectivamente, por comunidades de microorganismos metanogénicos y metanotróficos (Shiau & Chiu, 2020). El estudio de estas comunidades resulta relevante debido a que reflejan las potenciales emisiones de metano en el ecosistema; la relación entre la actividad metanotrófica y metanogénica puede funcionar como un indicador para predecir el flujo neto

de metano en el sistema (Padhy et al., 2022). Además, se ha visto que algunos miembros de estas comunidades cuentan con potenciales aplicaciones biotecnológicas como por ejemplo, la biorremediación de contaminantes y la producción de biopolímeros de importancia industrial como el biodiesel y el bioplástico (Guerrero-Cruz et al., 2021). Sin embargo, muy pocos estudios se han enfocado en estudiar la composición y la actividad de las comunidades metanotróficas y metanogénicas en sedimentos de manglares. En la Península de Yucatán estos grupos de microorganismos han sido muy poco estudiados, y hasta ahora no se encuentran reportados en estos sitios.

El conocimiento de las comunidades involucradas en los flujos de metano en sedimentos sirve como guía para desarrollar estrategias dentro de los esfuerzos de restauración de manglares y para mitigar las emisiones de gases de efecto invernadero hacia la atmósfera. Además, al comparar la presencia y actividad de estos microorganismos se puede obtener información sobre la variabilidad que puede existir entre sitios restaurados y se puede determinar si el sitio ha recuperado el servicio ecosistémico de capacidad de almacenamiento de gases de efecto invernadero, en este caso el metano, sumando así a las acciones de monitoreo del tiempo de recuperación de los servicios ecosistémicos en los manglares.

HIPÓTESIS

Existirán diferencias en la estructura y número de copias de genes funcionales de comunidades metanogénicas y metanotróficas en sedimentos asociados a *Avicennia germinans* de tres sitios restaurados, y dichas diferencias podrían estar relacionadas con las estimaciones de las variables ambientales de cada uno de los sitios. Además, será posible estimar una mayor producción de metano y menor oxidación de este gas por actividad microbiana en los sedimentos de manglares de los sitios con una menor recuperación aparente en comparación con los de una mayor recuperación aparente.

OBJETIVOS

General

Determinar la estructura, composición y actividad de comunidades de arqueas metanogénicas y bacterias metanotróficas en sedimentos asociados a *Avicennia germinans* en una laguna costera de la Península de Yucatán, México, con acciones previas de restauración del manglar.

Específicos

1. Caracterizar las comunidades microbianas en sedimentos asociados a *Avicennia germinans* en una laguna costera de la Península de Yucatán, México, en tres sitios con acciones de restauración, a través de la secuenciación de los genes *16S rRNA*, *mcrA*, *pmoA* y *mmoX*.
2. Analizar el efecto de las variables ambientales sobre la estructura y composición de comunidades microbianas en sedimentos asociados a *Avicennia germinans* en una laguna costera de la Península de Yucatán, México, en tres sitios con acciones de restauración.
3. Cuantificar la actividad potencial metanogénica y metanotrófica, con base en el número de copias de genes funcionales, en sedimentos asociados a *Avicennia germinans* en una laguna costera de la Península de Yucatán, México, en tres sitios con acciones de restauración, utilizando los marcadores moleculares *mcrA* y *pmoA*.

MATERIALES Y MÉTODOS

Sitio de estudio

La Península de Yucatán se ubica al sureste de México e incluye los Estados de Campeche, Yucatán y Quintana Roo. Cuenta con un gradiente climático que es de tipo semiárido en el norte (<400 mm al año) a húmedo en el sur (>1400 mm al año). Presenta tres estaciones climáticas: secas (marzo-mayo), lluvias (junio-octubre) y nortes (noviembre-febrero). El suelo es de tipo kárstico, superficial, poroso y delgado con una alta permeabilidad, por lo tanto, no existen corrientes de aguas superficiales, sino que existe un extenso acuífero subterráneo que descarga agua a la costa (Cinco-Castro & Herrera-Silveira, 2020).

En este trabajo se seleccionaron dos localidades que corresponden a Progreso Antiguo y Curva Yucalpetén, seleccionadas con base en el Programa API-Progreso “Monitoreo de sitios en restauración de manglares en la costa Norte de Yucatán”, los cuales han sido considerados sitios afectados por distintas presiones naturales y antrópicas y donde se han llevado a cabo acciones de restauración ecológica (Moreno Martínez, 2022). Ambas localidades se vieron afectadas con la construcción de la vía de comunicación Mérida-Progreso, debido a que modificó el flujo y escurrimiento superficial entre los dos lados de esta, ocasionando el azolvamiento de los canales naturales y consecuentemente modificó el hidropериodo del lugar. Asimismo, los largos periodos de inundación en el sitio propiciaron condiciones hipersalinas (>10%), que causó pérdida de la vegetación original. Las acciones de restauración ecológica y rehabilitación del sitio degradado se llevaron a cabo a partir del 2010 y consistieron en: rehabilitar los canales naturales de marea y construir 2118 m de canales nuevos, se removieron escombros y se realizó la nivelación topográfica con centros de dispersión y con la deposición del material resultante de los canales en los sitios de mayor profundidad observada en el mapa topográfico (Teutli Hernández et al., 2020).

Progreso Antiguo

El Puerto de Progreso se localiza al norte de la Península de Yucatán, a 32 kilómetros de la Ciudad de Mérida, entre los 21° 16' 48'' N y 89° 40' 12'' O. El clima predominante es cálido subhúmedo, presenta temperaturas entre los 21.3 y 30.4°C, una precipitación media anual de 638 mm y una evaporación media de 1694.1 mm al año. La zona de manglar es de tipo ciénega y presenta especies como *R. mangle* y *A. germinans*, además de especies pioneras como *Batis maritima* y *Salicornia virginica* (Teutli Hernández et al., 2020). La zona de

restauración y monitoreo se ubica al este sobre la carretera Mérida-Progreso y está dominada por *A. germinans*, mientras que la zona conservada se ubica al sur de la zona restaurada y está dominada por *R. mangle* (Moreno Martínez, 2022).

Curva Yucalpetén

El Puerto de Yucalpetén se ubica al noroeste de la Península de Yucatán entre los 21° 16' 31'' N y 89° 42' 27'' O. El clima predominante es cálido subhúmedo, presenta temperaturas entre los 21.3 y 30.4°C, una precipitación media anual de 638 mm y una evaporación media de 1694.1 mm al año. La zona de manglar es de tipo chaparro y presenta especies como *R. mangle* y *A. germinans* (Herrera-Silveira et al., 2012). La zona de restauración y monitoreo se ubica al oeste del Corredor industrial (Moreno Martínez, 2022).

Diseño de muestreo

Durante la temporada de lluvia (octubre) se tomaron muestras por triplicado de sedimentos superficiales (0–5 cm) asociados a neumatóforos de la especie de mangle *Avicennia germinans* en cada uno de los siguientes puntos de muestreo: una zona de manglar restaurado en Curva-Yucalpetén (YR), en las coordenadas 21° 16' 12.6282" N y 89° 42' 47.82528" O; una zona de manglar restaurado en Progreso Antiguo cercano a la carretera (PR), en las coordenadas 21° 16' 1.9866" N y 89° 39' 35.6166" O; y una zona de manglar restaurado en Progreso Antiguo cercano a la zona conservada (PC), en las coordenadas 21° 15' 54.61812" N y 89° 39' 27.54" O (Fig. 3).

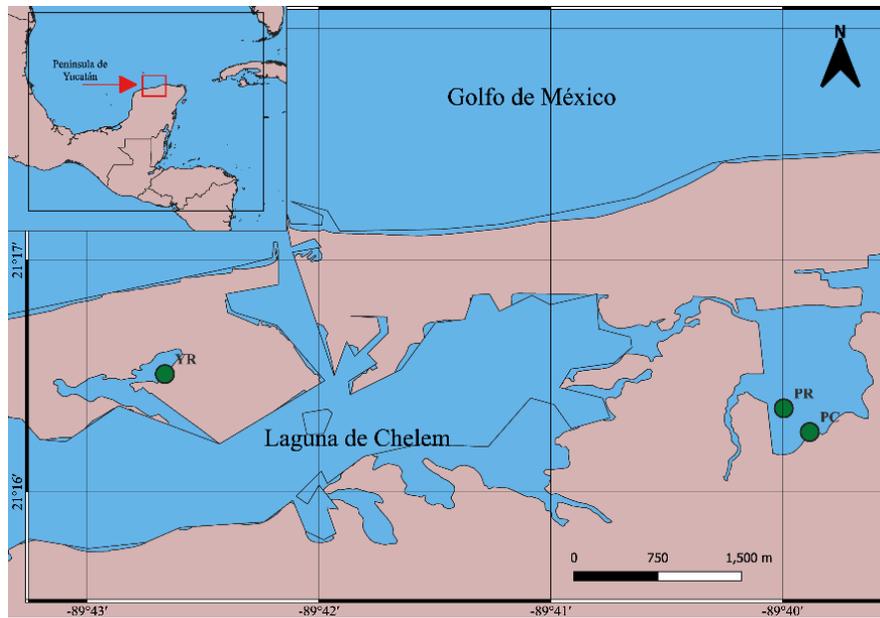


Figura 3. Mapa con los sitios de muestreo. PC= Progreso-Restaurado (cerca del sitio conservado), PR= Progreso-Restaurado (cerca de la carretera), YR= Yucalpetén-Restaurado. Elaborado en el Software QGIS 3.22.5.

El tamaño de muestra total fue de 9, es decir 3 por cada sitio (Ej. PC1, PC2, PC3); todos los sedimentos fueron tomados cerca de la vegetación, específicamente en neumatóforos de la especie *A. germinans* y fueron colectados directamente utilizando tubos Falcon o bolsas herméticas.

Medición de variables fisicoquímicas del agua superficial

Se utilizó el equipo multiparámetro YSI para cuantificar *in situ* la temperatura, el pH, la salinidad y el oxígeno disuelto de la columna de agua y se utilizó un potenciómetro para medir el potencial redox del sedimento (Fig. 4).



Figura 4. Equipos utilizados para la medición de variables fisicoquímicas en campo: multiparámetro YSI (izquierda) y potenciómetro (derecha).

Se colectaron muestras del sedimento en bolsas de cierre hermético o en tubos con *RNA later* para preservar el material genético y se mantuvieron a 4°C para analizar posteriormente en el laboratorio. Una vez en el laboratorio, las muestras de sedimento se colocaron en charolas para dejar secar. Una vez secas, se tamizaron utilizando un tamiz de malla fina. Posteriormente, se realizó la determinación del contenido de materia orgánica en sedimentos por el método de Jackson (1964), el cual se obtiene a partir de los siguientes cálculos (Jackson, 1964):

$$\% \text{ Materia orgánica} = \left(\frac{\left(1 - \frac{T}{S}\right)^3}{W} \right) (1.8)$$

T= ml de solución de FeSO₄ utilizados en la titulación de muestra

S= ml de solución de FeSO₄ utilizados en la titulación del blanco

W= Peso de la muestra en gramos

Se realizó la determinación de fósforo total según el método de Strickland & Parsons (1972), en el cual a las muestras se le añade un reactivo de digestión, así como un reactivo mixto, se lee la absorbancia a 885 nm en un espectrofotómetro y el fósforo total en ppm se obtiene a partir de los siguientes cálculos (Strickland & Parsons, 1972):

$$\text{Fósforo total en ppm} = \frac{A_p * F * V_t * 30.9}{gM}$$

$$F = \frac{3.00}{E_s - E_b}$$

E_s= Promedio de las absorbancias de los estándar

E_b= Promedio de las absorbancias de los blancos

A_p= Absorbancia promedio de las réplicas de las muestras

V= Volumen de agua añadida a la muestra

gM= Gramos de muestra analizados

Se realizó el análisis de la textura con el método de Hidrómetro Bouyoucos para determinar el contenido de arena, limo y arcilla, en el cual, la cantidad de materia en suspensión a un tiempo dado se mide con el hidrómetro. Después de 40 s las partículas de 0.05 mm y mayores se depositan en el fondo, mientras que después de 2 h cualquier partícula mayor de 2 μm ya se ha depositado y quedan en suspensión solo las arcillas (Bouyoucos, 1927).

Los contenidos de carbono y nitrógeno total se determinaron por el método de combustión seca, cada muestra se colocó en un autoanalizador elemental (Flash EA-1112), la muestra es calcinada a 1800°C, transformándola en una muestra de gases que pasan por diferentes

columnas y finalmente por una cromatografía de gases. Las concentraciones en porcentaje se detectaron a través de un software (Sollins et al., 1999; Thermo-Scientific, 2007).

Extracción de DNA de sedimentos

A partir de las muestras de sedimento preservadas con *RNA later* se pesaron 0.25 g y se realizó la extracción de DNA utilizando el kit *Powersoil DNA isolation* (Mobio Labs Inc.). La calidad del DNA extraído fue verificada por electroforesis en geles de agarosa al 1% y las concentraciones finales fueron cuantificadas por Qubit® 3.0 de Life Technologies (HS dsDNA) (Cotta et al., 2019).

Secuenciación de amplicones

Para la caracterización de las comunidades de bacterias y arqueas se llevó a cabo la amplificación por PCR y posterior secuenciación de los amplicones de los genes *16S rRNA*, *mcrA*, *pmoA* y *mmoX*, para lo cual se utilizaron los primers con adaptadores para Illumina listados en la Tabla 2.

Tabla 2. Primers utilizados para amplificación por PCR y posterior secuenciación Illumina de los amplicones de los genes *16S rRNA*, *mcrA*, *pmoA* y *mmoX*.

Gen	Primer	Secuencia (5'-3')	pb	Referencia
<i>16S rRNA</i>	515F-Y	<u>5'-TCGTCGGCAGCGTCAGATGTGTATAA</u> <u>GAGACAGGTGYCAGCMGCCGCGGTAA-3'</u>	411	(Parada et al., 2016)
	926R	<u>5'-GTCTCGTGGGCTCGGAGATGTGTATAA</u> <u>GAGACAGCCGYCAATTYMTTTRAGTTT-3'</u>		
<i>mcrA</i>	mlas-mod-F	<u>5'- TCGTCGGCAGCGTCAGATGTGTATAAGAG</u> <u>ACAGGGYGGTGTMGDDTTCACMCARTA-3'</u>	469	(Angel et al., 2012)
	mcrA-rev-R	<u>5'-GTCTCGTGGGCTCGGAGATGTGTATAA</u> <u>GGACAGCGTTCATBGCCTAGTTVGGRTAGT-3'</u>		
<i>pmoA</i>	A189F	<u>5'-TCGTCGGCAGCGTCAGATGTGTATA</u> <u>AGAGACAGGGNGACTGGGACTTCTGG-3'</u>	493	(Sengupta & Dick, 2017)
	A682	<u>5'- GTCTCGTGGGCTCGGAGATGTGTATA</u> <u>AGAGACAGGAASGCNGAGAAGAASGC-3'</u>		
	A189F	<u>5'-TCGTCGGCAGCGTCAGATGTGTATA</u> <u>AGAGACAGGGNGACTGGGACTTCTGG-3'</u>	461	
	A650	<u>5'-GTCTCGTGGGCTCGGAGATGTGTATA</u> <u>AGAGACAGACGTCCTTACCGAAGGT-3'</u>		
<i>mmoX</i>	mmoXLF	<u>5'-TCGTCGGCAGCGTCAGATGTGTATAA</u> <u>GAGACAGGAAGATTGGGGCGGCATCTG -3'</u>	450	(Farhan Ul Haque et al., 2018)
	mmoXLR	<u>5'-GTCTCGTGGGCTCGGAGATGTGTATAAG</u> <u>AGACAGCCCAATCATCGCTGAAGGAGT-3'</u>		
	mmoXLF2	<u>5'-TCGTCGGCAGCGTCAGATGTGTATAA</u> <u>GAGACAGTGC GCGACGCCAARAAG-3'</u>	389	
	mmoXLR	<u>5'-GTCTCGTGGGCTCGGAGATGTGTATAAG</u> <u>AGACAGCCCAATCATCGCTGAAGGAGT-3'</u>		

Las secuencias de los primers incluyen los adaptadores para Illumina (subrayado). pb= pares de bases.

Se llevó a cabo una primera reacción de PCR para cada gen de la siguiente manera:

Para el gen *16S rRNA* se realizó una reacción con 10 μ l de Master Mix (High-Fidelity), 0.5 μ l de cada primer a 10 μ M, 2 μ l de DNA y se completó con agua estéril para llegar a 20 μ l. El programa se llevó a cabo en un Termociclador Applied Biosystems bajo las siguientes condiciones: un paso inicial desnaturante a 95°C por 2 min, seguido de 25 ciclos de 95°C

por 45 s, 52°C por 45 s como temperatura de alineación y 68°C por 90 s como elongación y finalmente, una extensión final a 68°C por 5 min (Parada et al., 2016).

Para el gen *mcrA* se realizó una reacción con 10 μ l de Master Mix (High-Fidelity), 2.5 μ l de cada primer a 10 μ M, 1 μ l de DNA y se completó con agua estéril para llegar a 20 μ l. El programa se llevó a cabo en un Termociclador Applied Biosystems bajo las siguientes condiciones: un paso inicial desnaturizante a 95°C por 5 min, seguido de 5 ciclos *touchdown* de 95°C por 30 s, 60-55°C por 45 s como temperatura de alineación, disminuyendo 1°C en cada ciclo y 72°C por 1 min como elongación, seguido de 35 ciclos de 95°C por 30 s, 54.5°C por 30 s y 72°C por 1 min y finalmente, una extensión final a 72°C por 5 min (Angel et al., 2012).

Para el gen *pmoA* se realizó un PCR semi-anidado que consistió en una primera reacción de PCR con 12.5 μ l de GoTaq Master Mix (Promega, Madison, WI, USA), 1 μ l de cada primer A189F/A682 a 10 μ M, 2 μ l de DNA y se completó con agua estéril para llegar a 25 μ l. Posteriormente, utilizando el resultado del primer PCR como templado, se realizó una segunda reacción de PCR con 10 μ l de Master Mix (High-Fidelity), 1 μ l de cada primer A189F/A650 a 10 μ M, 3 μ l de templado y se completó con agua estéril para llegar a 20 μ l. Ambas reacciones se llevaron a cabo en un Termociclador Applied Biosystems bajo las siguientes condiciones: un paso inicial desnaturizante a 94°C por 5 min, seguido de 20 ciclos *touchdown* de 94°C por 30 s, 62-52°C por 30 s como temperatura de alineación, disminuyendo 0.5°C en cada ciclo y 72°C por 30 s como elongación, seguido de 15 ciclos de 94°C por 30 s, 52°C por 30 s y 72°C por 30 s y finalmente, una extensión final a 72°C por 10 min (Serrano-Silva et al., 2014).

Para el gen *mmoX* se realizó un PCR semi-anidado que consistió en una primera reacción de PCR con 12.5 μ l de GoTaq Master Mix (Promega, Madison, WI, USA), 1 μ l de cada primer *mmoXLF/mmoXLR* a 10 μ M, 2 μ l de DNA y se completó con agua estéril para llegar a 25 μ l. Posteriormente, utilizando el resultado del primer PCR como templado, se realizó una segunda reacción de PCR con 10 μ l de Master Mix (High-Fidelity), 1 μ l de cada primer *mmoXLF2/mmoXLR* a 10 μ M, 3 μ l de templado y se completó con agua estéril para llegar a 20 μ l. Ambas reacciones se llevaron a cabo en un Termociclador Applied Biosystems bajo las siguientes condiciones: un paso inicial desnaturizante a 95°C por 3 min, seguido de 10

ciclos *touchdown* de 94°C por 20 s, 70-61°C por 20 s como temperatura de alineación, disminuyendo 1°C en cada ciclo y 72°C por 20 s como elongación, seguido de 25 ciclos de 94°C por 20 s, 60°C por 20 s y 72°C por 20 s y finalmente, una extensión final a 72°C por 5 min (Farhan Ul Haque et al., 2018).

Posteriormente, las reacciones se purificaron con perlas AMPure XP para eliminar primers libres y especies de dímeros de primers. Después, se realizó una segunda reacción de PCR para añadir los índices y generar las librerías para la secuenciación utilizando el protocolo Illumina TruSeq DNA library. Cada reacción contenía 12.5 µl de Master Mix (High-Fidelity), 2 µl de cada índice, 5 µl del producto de PCR purificado y 3.5 µl de agua estéril para un total de 25 µl. El programa se llevó a cabo en un Termociclador Applied Biosystems bajo las siguientes condiciones: un paso inicial desnaturalizante a 95°C por 3 min, seguido de 8 ciclos de 95°C por 30 s, 52°C por 30 s como temperatura de alineación y 72°C por 30 s como elongación y finalmente, una extensión final a 72°C por 5 min.

Posteriormente, las reacciones se volvieron a purificar con perlas AMPure XP y se cuantificaron por Qubit® 3.0 de Life Technologies (HS dsDNA) para después llevar todas las muestras a una misma concentración. Las muestras se secuenciaron en la plataforma Illumina MiSeq (2 × 300 bp paired-end reads).

Adicionalmente, se realizó la cuantificación de algunas de las bandas obtenidas en los geles de electroforesis utilizando el programa ImageJ.

qPCR

Se realizó la cuantificación de los genes marcadores *mcrA* y *pmoA* por qPCR para la cuantificación del potencial genético metanogénico y metanotrófico, respectivamente. Se utilizaron los primers listados en la Tabla 3.

Tabla 3. Primers utilizados para qPCR de los genes *mcrA* y *pmoA*.

Gen	Primer	Secuencia (5'-3')	pb	Referencia
<i>mcrA</i>	MLf	5'-GGTGGTGTMGGATTCACACA RTAYGCWACAGC-3'	470	(Li et al., 2022)
	MLr	5'-TTCATTGCRTAGTTW GGRTAGTT-3'		
<i>pmoA</i>	A189F	5'-GGNGACTGGGACTTCTGG-3'	472	(Serrano-Silva et al., 2014)
	Mb661R	5'-CCGGMGCAACGTCYTTACC-3'		
	A189F	5'-GGNGACTGGGACTTCTGG-3'	493	
	A682	5'-GAASGCNGAGAAGAASGC-3'		
	A189F	5'-GGNGACTGGGACTTCTGG-3'	461	
	A650	5'-ACGTCCTTACCGAAGGT-3'		

pb=pares de bases.

Previo a la cuantificación se realizó la curva estándar. Para esto, se amplificó un control positivo de cada gen por PCR utilizando las siguientes condiciones: Para el gen *mcrA* se realizó una reacción de PCR con 10 μ l de Master Mix (High-Fidelity), 2.5 μ l de cada primer MLf/MLr a 10 μ M, 1 μ l de DNA y se completó con agua estéril para llegar a 20 μ l. El programa se llevó a cabo en un Termociclador Applied Biosystems bajo las siguientes condiciones: un paso inicial desnaturante a 95°C por 5 min, seguido de 35 ciclos de 95°C por 1 min, 55°C por 45 s como temperatura de alineación y 72°C por 1 min como elongación, seguido una extensión final a 72°C por 5 min (Li et al., 2022). Para el gen *pmoA* se realizó un PCR anidado que consistió en una primera reacción de PCR con 12.5 μ l de GoTaq Master Mix (Promega, Madison, WI, USA), 1 μ l de cada primer A189F/A682 a 10 μ M, 2 μ l de DNA y se completó con agua estéril para llegar a 25 μ l. Posteriormente, utilizando el resultado del primer PCR como templado, se realizó una segunda reacción de PCR con 12.5 μ l de Master Mix, 1 μ l de cada primer A189F/mb661+A650 a 10 μ M, 3 μ l de templado y se completó con agua estéril para llegar a 25 μ l. Ambas reacciones se llevaron a cabo en un Termociclador Applied Biosystems bajo las siguientes condiciones: un paso inicial desnaturante a 94°C por 5 min, seguido de 20 ciclos *touchdown* de 94°C por 30 s, 62-52°C por 30 s como temperatura de alineación, disminuyendo 0.5°C en cada ciclo y 72°C por 30 s como

elongación, seguido de 15 ciclos de 94°C por 30 s, 52°C por 30 s y 72°C por 30 s y finalmente, una extensión final a 72°C por 10 min (Serrano-Silva et al., 2014).

Posteriormente, las reacciones se purificaron con perlas AMPure XP para eliminar primers libres y especies de dímeros de primers. Después se procedió a hacer una clonación utilizando el protocolo del kit ClonJet de ThermoScientific, el cual consiste en una reacción de ligación para unir el producto de PCR al vector pJET1.2/blunt y, posteriormente, una reacción de transformación por choque térmico donde se utilizaron las células competentes *E. coli* Mix & Go de Zymo Research. Se colocaron 50, 100 y 200 μ l de las células transformadas en medio de cultivo LB con ampicilina, ya que el vector contiene un gen de resistencia a la ampicilina, para asegurar que solo crecieran colonias transformadas. Se incubaron durante 48 h a 37°C y, posteriormente, se picaron las colonias que crecieron y se resuspendieron en 5 μ l de agua ultrapura, para utilizar como templado en una reacción de PCR con el mismo protocolo de ligación para confirmar la transformación de las colonias que crecieron. Las colonias transformadas se colocaron en medio líquido LB con ampicilina, se incubaron otras 24 h a 37°C y, posteriormente, se les realizó la extracción del plásmido con el protocolo del kit Zyppy™ Plasmid Miniprep de Zymo Research. Se realizó un PCR con el protocolo de ligación y, posteriormente, se realizó la purificación del producto de PCR con perlas AMPure XP. La purificación se cuantificó en Qubit® 3.0 de Life Technologies (HS dsDNA).

Para realizar la curva estándar se utilizaron los cálculos basados en el tutorial “Creating Standard Curves with Genomic DNA or Plasmid DNA Templates for Use in Quantitative PCR” de Applied Biosystems (Tablas 4 y 5).

Tabla 4. Diluciones utilizadas para la curva estándar del gen *mcrA*.

# Dilución	Fuente de DNA	Concentración Inicial (pg/μl)	Volumen de DNA (μl)	Volumen de Agua (μl)	Volumen Final (μl)	Concentración Final (pg/μl)	# Final de copias por reacción de PCR	Copias/μl
1	Stock	5.37E+03	9.59	90.41	100	5.15E+02	1,000,000,000	500,000,000
2	Dilución 1	5.15E+02	10.00	90.00	100	5.15E+01	100,000,000	50,000,000
3	Dilución 2	5.15E+01	10.00	90.00	100	5.15E+00	10,000,000	5,000,000
4	Dilución 3	5.15E+00	10.00	90.00	100	5.15E-01	1,000,000	500,000
5	Dilución 4	5.15E-01	10.00	90.00	100	5.15E-02	100,000	50,000
6	Dilución 5	5.15E-02	10.00	90.00	100	5.15E-03	10,000	5,000
7	Dilución 6	5.15E-03	10.00	90.00	100	5.15E-04	1,000	500
8	Dilución 7	5.15E-04	10.00	90.00	100	5.15E-05	100	50
9	Dilución 8	5.15E-05	10.00	90.00	100	5.15E-06	10	5
10	Dilución 9	5.15E-06	10.00	90.00	100	5.15E-07	1	0.5
11	Dilución 10	5.15E-07	10.00	90.00	100	5.15E-08	0.1	0.05

Cada dilución se realizó por triplicado para realizar la curva estándar.

Tabla 5. Diluciones utilizadas para la curva estándar del gen *pmoA*.

# Dilución	Fuente de DNA	Concentración Inicial (pg/μl)	Volumen de DNA (μl)	Volumen de Agua (μl)	Volumen Final (μl)	Concentración Final (pg/μl)	# Final de copias por reacción de PCR	Copias/μl
1	Stock	7.25E+03	2.35	97.65	100	1.70E+02	1,000,000,000	500,000,000
2	Dilución 1	1.70E+02	10.00	90.00	100	1.70E+01	100,000,000	50,000,000
3	Dilución 2	1.70E+01	10.00	90.00	100	1.70E+00	10,000,000	5,000,000
4	Dilución 3	1.70E+00	10.00	90.00	100	1.70E-01	1,000,000	500,000
5	Dilución 4	1.70E-01	10.00	90.00	100	1.70E-02	100,000	50,000
6	Dilución 5	1.70E-02	10.00	90.00	100	1.70E-03	10,000	5,000
7	Dilución 6	1.70E-03	10.00	90.00	100	1.70E-04	1,000	500
8	Dilución 7	1.70E-04	10.00	90.00	100	1.70E-05	100	50
9	Dilución 8	1.70E-05	10.00	90.00	100	1.70E-06	10	5
10	Dilución 9	1.70E-06	10.00	90.00	100	1.70E-07	1	0.5
11	Dilución 10	1.70E-07	10.00	90.00	100	1.70E-08	0.1	0.05

Cada dilución se realizó por triplicado para realizar la curva estándar.

Para cada gen se generaron las diluciones por triplicado y se realizaron las reacciones de qPCR de la siguiente manera: Para el gen *mcrA* se realizó una reacción de 12.5 μ l con 6.25 μ l de Qiagen Master Mix, 1 μ l de cada primer, 3.25 μ l de agua estéril y 1 μ l de DNA. El programa se llevó a cabo en un Termociclador Rotor Gene bajo las siguientes condiciones: un paso inicial desnaturante a 95°C por 10 min, seguido de 40 ciclos de 95°C por 30 s, 55°C por 45 s como temperatura de alineación y 68°C por 45 s como elongación y donde se produce la adquisición, seguido una extensión final a 81°C por 8 s (Freitag et al., 2010). Para el gen *pmoA* se realizó una reacción de 12.5 μ l con 6.25 μ l de Qiagen Master Mix, 1 μ l de cada primer (A189/mb661), 1.25 μ l de agua estéril y 3 μ l de DNA. El programa se llevó a cabo en un Termociclador RotorGene bajo las siguientes condiciones: un paso inicial desnaturante a 95°C por 10 min, seguido de 40 ciclos de 95°C por 30 s, 64°C por 45 s como temperatura de alineación y 68°C por 45 s como elongación y donde se produce la adquisición, seguido una extensión final a 86.5°C por 16 s (Freitag et al., 2010). Las curvas de disociación se adquirieron en un rango de 50-95°C para el gen *mcrA* (Deutzmann et al., 2011) y en un rango de 60-95°C para el gen *pmoA* (Steinberg & Regan, 2009).

Una vez generada la curva estándar para cada gen, se procedió a llevar las muestras a una concentración de 3.55 ng/ μ l para amplificar el gen *mcrA* y a una concentración de 4.89 ng/ μ l para amplificar el gen *pmoA*. Las muestras se amplificaron por triplicado por qPCR utilizando las mismas condiciones que las de la curva estándar.

Análisis bioinformáticos y estadísticos

Las secuencias demultiplexadas obtenidas de la secuenciación Illumina fueron importadas al flujo de trabajo de QIIME2 (Quantitative Insights Into Microbial Ecology). El filtrado de calidad, el *trimming* y el *denoising* se llevaron a cabo utilizando el plugin DADA2 (Divisive Amplicon Denoising Algorithm 2), con el método “consensus” para la remoción de quimeras. La asignación de ASVs (Amplicon Sequence Variants) se realizó con la base de datos genética SILVA 138 para el gen *16S rRNA*, mientras que, para el resto de los genes se utilizó la base de datos de UniProt.

Se utilizó el ambiente de R para la remoción de cloroplastos, mitocondrias y secuencias sin asignar con las paqueterías phyloseq y MetagMisc (McMurdie & Homes, 2013; Mikryukov,

2023). Posteriormente, se estandarizaron las lecturas a la menor profundidad de secuenciación y se utilizó la paquetería MicrobiotaProcess (Xu & Yu, 2022) para realizar curvas de rarefacción y gráficos de abundancias relativas, para los cuales se separaron las secuencias de bacterias y arqueas para obtener los taxa más abundantes de cada Dominio.

Para analizar las variables ambientales y las medidas de alfa diversidad se utilizó la paquetería boot (Canty & Ripley, 2022) para calcular los intervalos de confianza Bootstrap no paramétrico utilizando el método de sesgo corregido y acelerado (BCa, B= 10,000) con nivel de confianza del 95%. Adicionalmente, se realizó un Triángulo Textural de Sheppard con los datos de textura utilizando la paquetería Ternary (Smith, 2017). También se realizó la prueba de Kruskal-Wallis con corrección de Dunn para determinar diferencias entre sitios utilizando la paquetería microeco y ggplot2 (Wickham, 2016; Liu et al., 2021). Con estas mismas paqueterías se realizó un análisis de redundancia basado en distancias (dbRDA) para determinar diferencias en la diversidad beta (distancias Bray-Curtis) y se realizó el análisis discriminante lineal con efecto del tamaño (LEFSE) utilizando un nivel de confianza del 95% ($\alpha=0.05$) para determinar los taxa significativos de cada uno de los distintos sitios.

Se construyó un árbol filogenético con las secuencias no asignadas del gen *mcrA* utilizando como referencia algunas de las secuencias asignadas y secuencias obtenidas del NCBI. A partir de las secuencias en formato FASTA, se realizó la alineación utilizando el software ClustalW y el árbol filogenético se construyó utilizando el software MEGA7 (Kumar et al., 2016) con el método de máxima verosimilitud basado en el modelo Tamura-Nei (Tamura & Nei, 1993). La robustez de las topologías del árbol inferido se evaluó mediante Bootstrap con 10,000 remuestreos de los datos. Finalmente, para la visualización y exportación del árbol se utilizó la herramienta iTOL (Interactive Tree of Life).

RESULTADOS

VARIABLES AMBIENTALES

Las muestras de los tres sitios tuvieron temperatura similar, siendo la mínima de 31.93°C en el sitio PR y la mayor de 32.38 °C en el sitio PC. Los tres sitios presentaron condiciones de salinidad mayores a la del agua de mar, siendo la menor de 36.48 UPS en el sitio PC y la mayor de 43.69 en el sitio YR. El sedimento fue alcalino en los 3 sitios, con un pH de 8 en los sitios PC y PR y un pH de 12 en el sitio YR. El nivel de oxígeno disuelto fue menor en el sitio YR, de 5.91 mg/L, y mayor en el sitio PR, de 8.16 mg/L. Finalmente, los tres sitios contaron con niveles distintos del potencial redox, teniendo un ambiente mayormente reducido en el sitio PR con -248 mV, seguido del sitio YR con -157 mV y un ambiente mayormente oxidado en el sitio PC con 17 mV (Tabla 6).

Tabla 6. Valores encontrados de distintas variables ambientales en manglares restaurados.

Sitio	Temp (°C)	pH	Salinidad (UPS)	Oxígeno disuelto (mg/L)	Potencial redox (mV)
PC	32.38	8.61	36.48	8.07	17
PR	31.93	8.22	38.43	8.16	-248
YR	32.09	12.38	43.69	5.91	-157

PC= Progreso-Restaurado (cerca del sitio conservado), PR= Progreso-Restaurado (cerca de la carretera), YR= Yucalpetén-Restaurado.

Determinaciones fisicoquímicas

Para las variables analizadas en laboratorio se observó que el sitio YR tuvo el menor contenido promedio de N total (0.83%), y el sitio PC el mayor (1.42%). De igual manera, el contenido promedio de C total fue menor en el sitio YR (13.99%), y mayor en el sitio PC (16.56%). El contenido promedio de materia orgánica fue menor en el sitio YR (6.79%), y mayor en el sitio PR (9.89%). El contenido promedio de P total fue menor en el sitio PR (2.57 µmol/g), y mayor en el sitio YR (4.81 µmol/g) (Fig. 5).

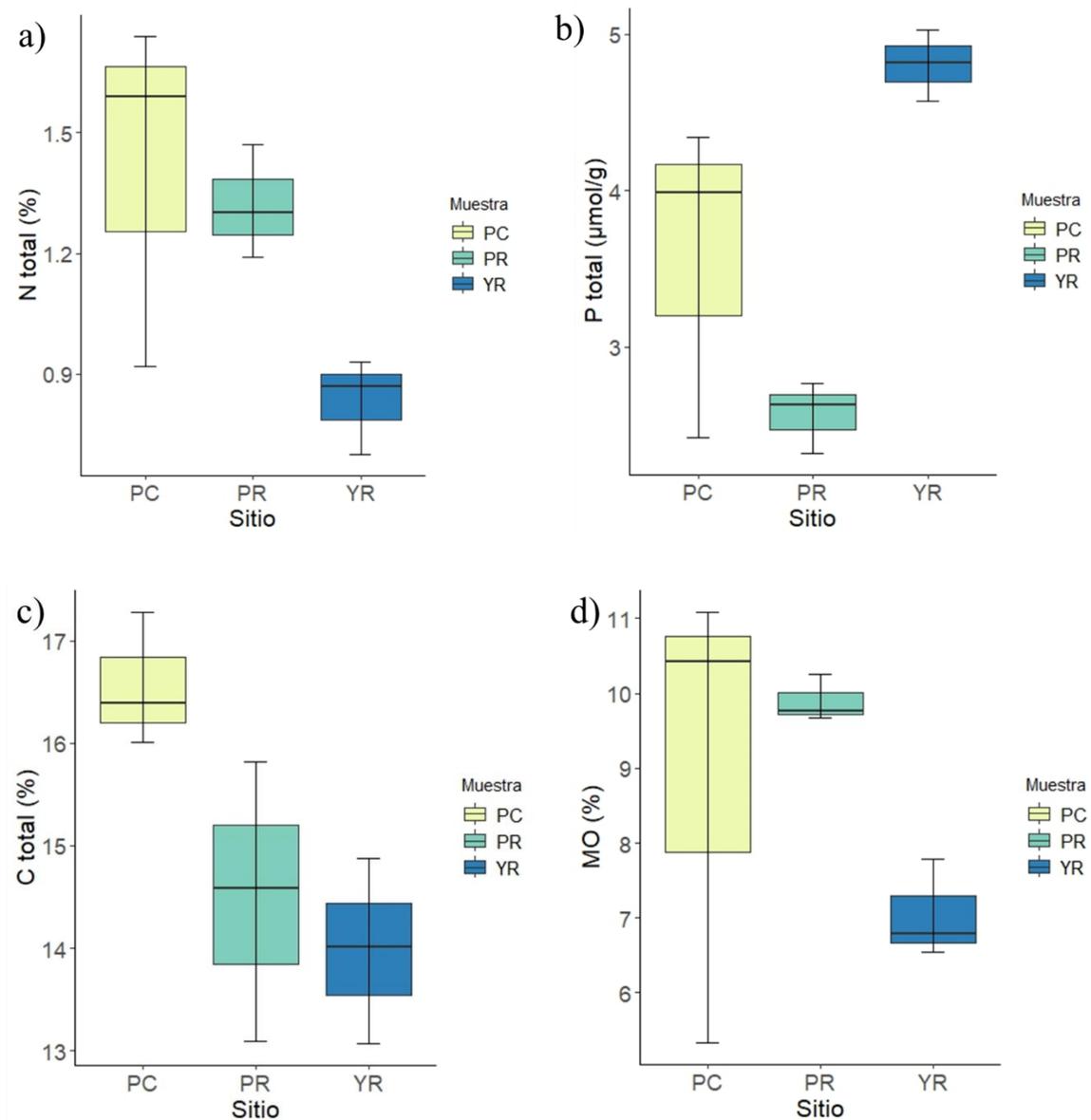


Figura 5. Comparación de variables fisicoquímicas encontradas para cada sitio. A) Nitrógeno total. B) Fósforo total. C) Carbono total. D) Contenido de materia orgánica. PC= Progreso-Restaurado (cerca del sitio conservado), PR= Progreso-Restaurado (cerca de la carretera), YR= Yucalpetén-Restaurado. En el gráfico las cajas muestran la mediana, el primer cuartil (Q1) en la parte inferior de la caja y el tercer cuartil (Q3) en la parte superior de la caja; las líneas representan los intervalos de confianza al 95% estimados por el método Bootstrap (BCa, B=10,000).

En cuanto a la textura, en general los tres sitios mostraron un alto contenido de arena y un bajo contenido de arcilla. El sitio PC mostró una mayor variación entre las muestras, mientras

que los sitios PR y YR fueron más homogéneos. El contenido de arena promedio fue menor en el sitio YR (57.17%), y mayor en el sitio PR (76.48%); el contenido promedio de limo fue menor en el sitio PR (9.76%), y mayor en el sitio YR (28.87%) y el contenido promedio de arcilla fue menor en el sitio PR (13.77%), y mayor en el sitio PC (15.07%). Lo anterior indica que el sitio PC mostró una textura arena arcillosa, el sitio PR una textura arenosa y el sitio YR una textura arena limosa (Fig. 6).

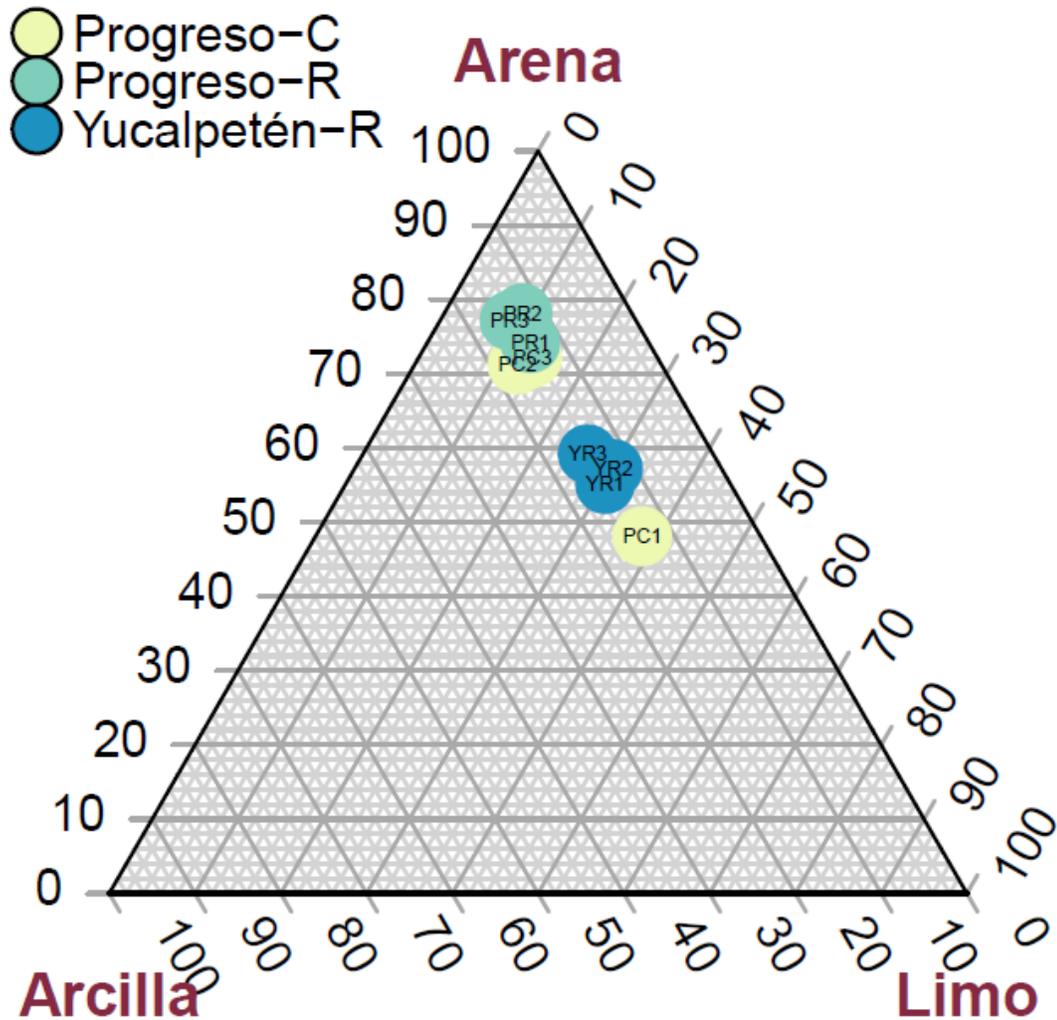


Figura 6. Triángulo Textural de Sheppard con el contenido de arena, limo y arcilla (%) para cada sitio. Progreso-C= Progreso-Restaurado (cerca del sitio conservado), Progreso-R= Progreso-Restaurado (cerca de la carretera), Yucalpetén-R= Yucalpetén-Restaurado.

Debido a que fueron pocas réplicas por sitio, al realizar la prueba de Kruskal-Wallis con corrección de Dunn no se encontraron diferencias estadísticamente significativas ($p > 0.05$) entre los sitios para las variables anteriormente mencionadas (Anexo 1). Sin embargo, al analizar las estimaciones obtenidas de los intervalos de confianza, se observó que el sitio YR difiere de los otros dos sitios en cuanto al contenido de N y P total. Además, el sitio PC es diferente de los demás en cuanto al contenido de C total, mientras que, el sitio PR se distingue por su contenido de arena en comparación con los otros sitios. Por último, se determinó que los sitios PR y YR presentan diferencias en cuanto al contenido de materia orgánica y limo (Anexo 2).

Composición de comunidades microbianas

16S rRNA

Después de haber aplicado los filtros de calidad y eliminación de lecturas de cloroplastos, mitocondrias y no asignadas, se obtuvieron un máximo de 5457 lecturas y un mínimo de 4055. Al obtener las curvas de rarefacción con la normalización de los datos se observó que las diversidades alfa y la riqueza no lograron llegar a una asíntota en todas las muestras, lo cual indica que hizo falta un mayor esfuerzo de secuenciación (Fig. 7).

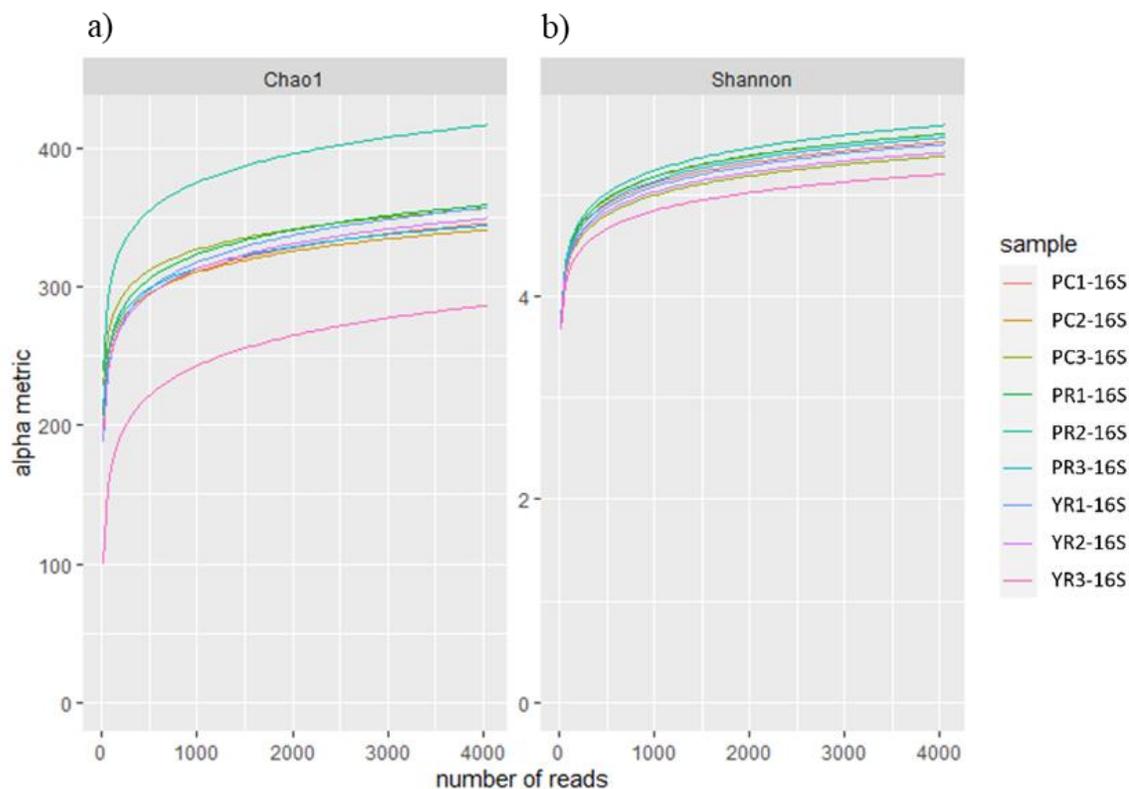


Figura 7. Curvas de rarefacción para a) la riqueza y b) la diversidad de especies en cada muestra. PC= Progreso-Restaurado (cerca del sitio conservado), PR= Progreso-Restaurado (cerca de la carretera), YR= Yucalpetén-Restaurado.

Se registraron un total de 1837 ASVs, de las cuales el 89% correspondieron a bacterias y el 11% correspondieron a arqueas. Las ASVs se asignaron taxonómicamente con confiabilidad a 53 fila, 104 clases, 185 órdenes, 230 familias, 273 géneros y 20 especies.

Los sitios no presentaron diferencias estadísticamente significativas en cuanto a riqueza y diversidad ($p > 0.05$) (Anexo 3). En el sitio PC se observó una riqueza promedio de 327 ASVs, siendo este el sitio con la menor riqueza y un valor de índice de Shannon de 5.34; en el sitio PR se observó una riqueza promedio de 349 ASVs y un valor de índice de Shannon de 5.45 siendo este el sitio con la mayor diversidad y riqueza; y en el sitio YR se observó una riqueza promedio de 310 ASVs y un valor de índice de Shannon de 5.22, siendo este el sitio con menor diversidad (Fig. 8). Asimismo, con las estimaciones obtenidas de los intervalos de confianza se encontró que los sitios son similares en cuanto a la riqueza, sin embargo, el sitio

PR es distinto al sitio YR en cuanto a la diversidad obtenida por el índice de Shannon (Anexo 4).

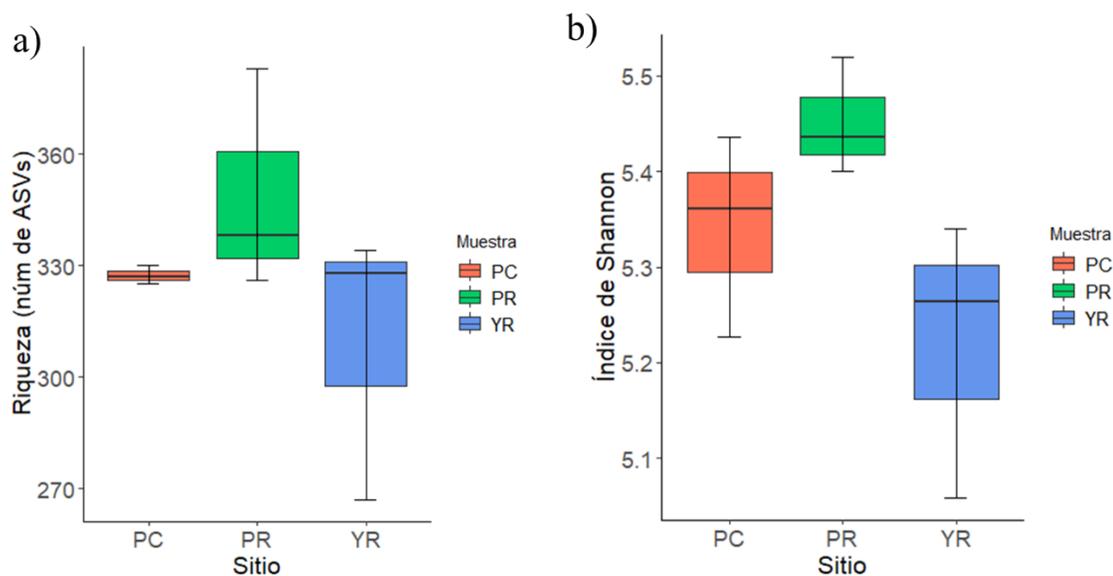


Figura 8. Comparación de los valores de a) riqueza de ASVs e b) índice de Shannon para cada sitio. PC= Progreso-Restaurado (cerca del sitio conservado), PR= Progreso-Restaurado (cerca de la carretera), YR= Yucalpetén-Restaurado. En el gráfico las cajas muestran la mediana, el primer cuartil (Q1) en la parte inferior de la caja y el tercer cuartil (Q3) en la parte superior de la caja; las líneas representan los intervalos de confianza al 95% estimados por el método Bootstrap (BCa, B=10,000).

En cuanto a la diversidad beta, con el análisis dbRDA se observó que el primer eje explicó el 39.3% de la variación y el segundo eje explica el 23.4% de la variación (Fig. 9). Las variables que explican en mayor medida la variabilidad en las comunidades microbianas son el P total, el C total y el contenido de arena (Tabla 7). Además, con la prueba de bondad de ajuste se encontró que el factor sitio explica de manera estadísticamente significativa la variación en la estructura de las comunidades microbianas ($R^2=0.9623$, $p=0.004$).

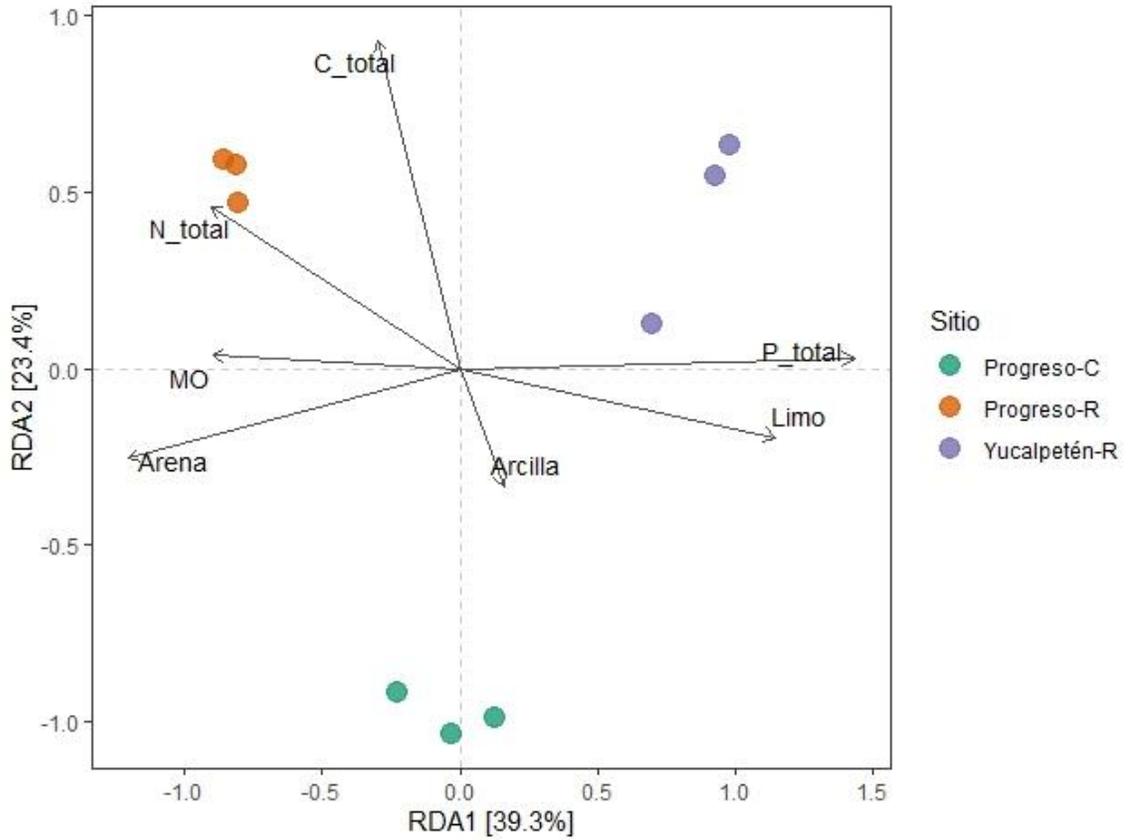


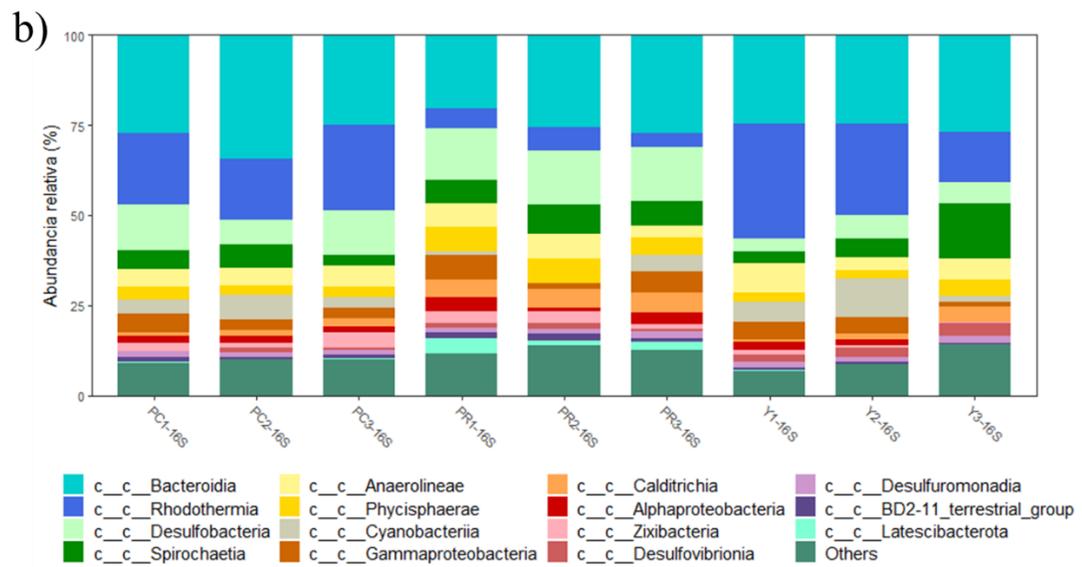
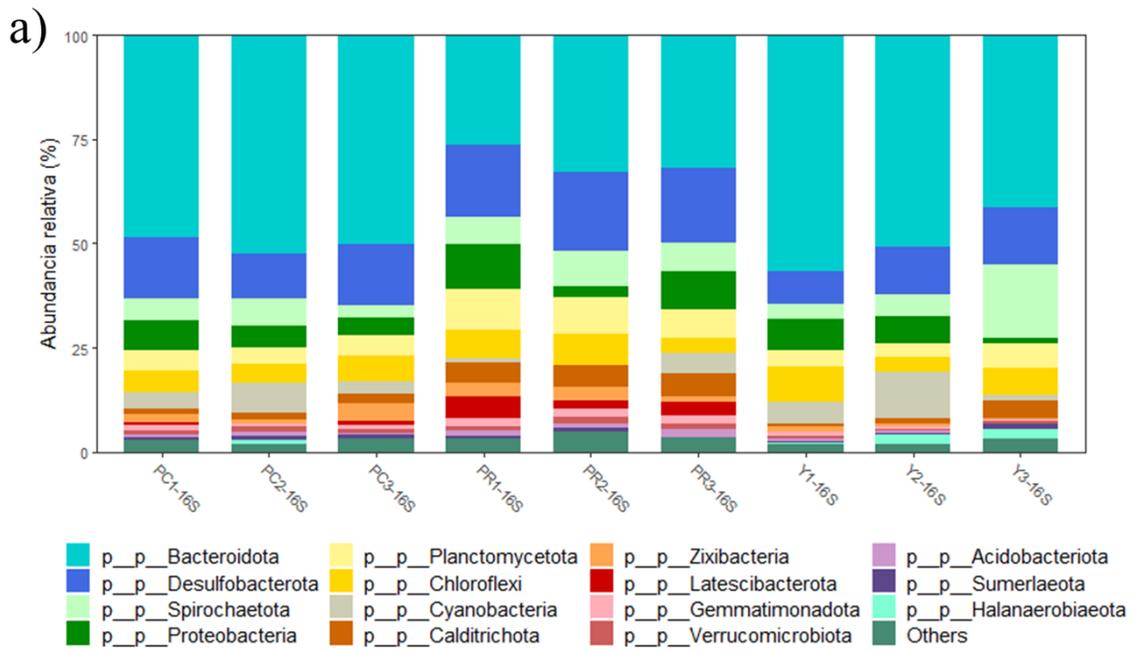
Figura 9. Análisis de Redundancia basado en distancias (dbRDA) utilizando el índice de Bray-Curtis. Sitios: Progreso-C= Progreso-Restaurado (cerca del sitio conservado), Progreso-R= Progreso-Restaurado (cerca de la carretera), Yucalpetén-R= Yucalpetén-Restaurado.

Tabla 7. Resultados de la influencia de las variables ambientales en la estructura de las comunidades microbianas según el análisis dbRDA.

Vector	dbRDA1	dbRDA2	R²	Pr (>r)
MO	-0.99834	-0.05751	0.34	0.309
P total	0.99949	0.03207	0.77	0.019
N total	-0.83825	-0.54529	0.47	0.196
C total	-0.24852	-0.96863	0.62	0.062
Arena	-0.96715	0.25419	0.60	0.092
Limo	0.97856	-0.20594	0.54	0.128
Arcilla	0.34767	-0.93762	0.16	0.579

MO= Materia orgánica. Número de permutaciones: 999.

En cuanto a la composición de bacterias, los fila más abundantes fueron Bacteroidota (24.04 – 54.08%), Desulfobacterota (7.74 – 17.11%), Spirochaetota (2.69 – 16.92%) y Proteobacteria (1.38 – 9.81%); mientras que, las clases más abundantes fueron Bacteroidia (18.72 – 32.97%), Rhodothermia (3.77 – 30.58%), Desulfobacteria (3.3 – 14.08%) y Spirochaetia (2.69 – 14.72%). En cuanto a la composición de arqueas, los fila más abundantes fueron Halobacterota (0.2 – 2.54% del total de la comunidad procariota), Nanoarchaeota (0.34 – 2.74%), Asgardarchaeota (0.56 – 2.17%) y Thermoplasmata (0.02 – 1.5%); mientras que, las clases más abundantes fueron Halobacteria (0.2 – 2.49%), Nanoarchaeia (0.34 – 2.74%), Lokiarchaeia (0.25 – 0.94%) y Thermoplasmata (0.02 – 1.5%) (Fig. 10).



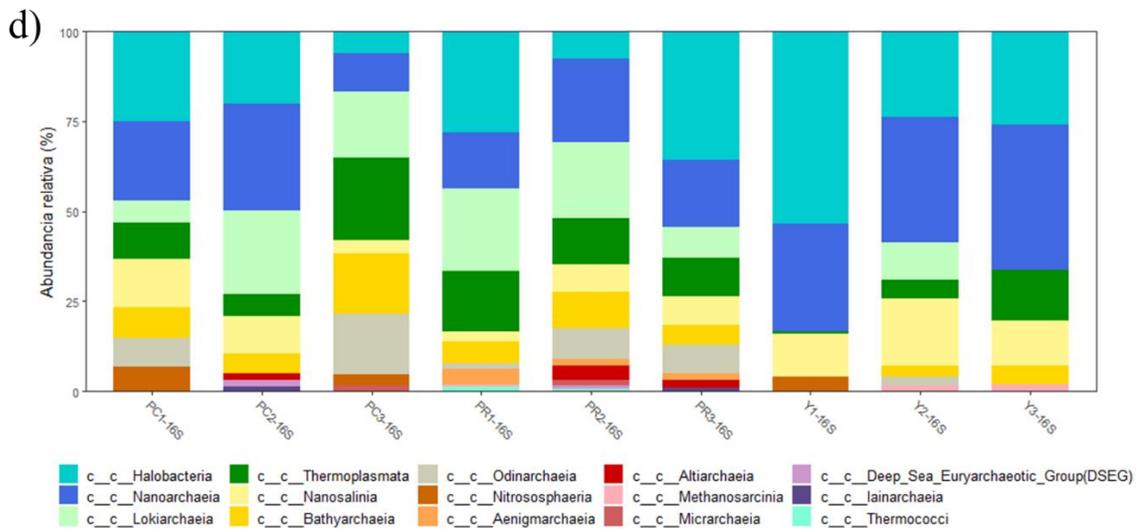
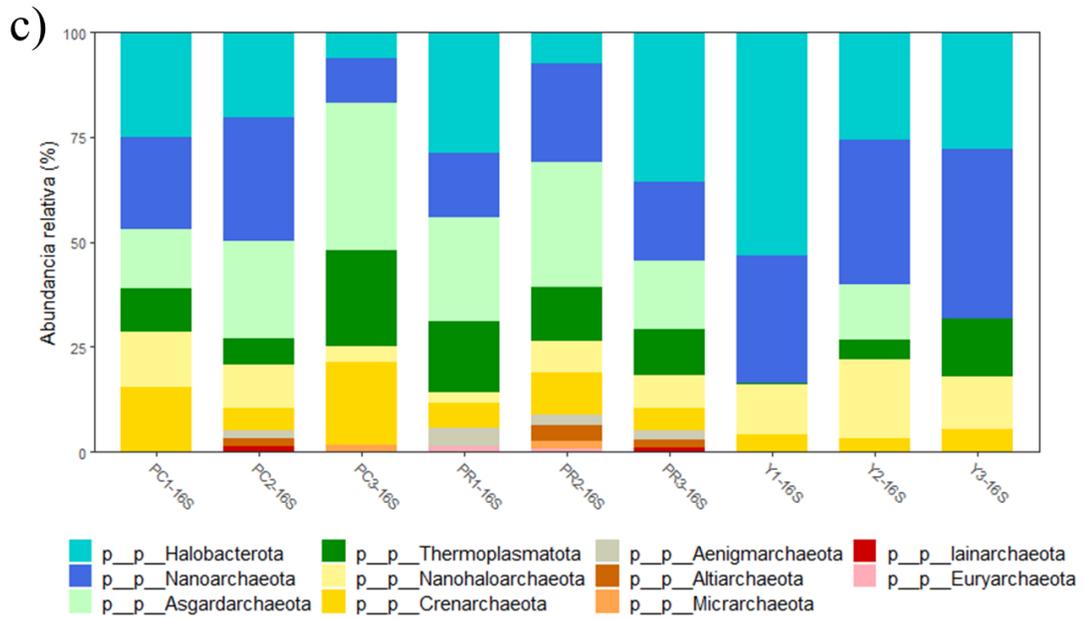


Figura 10. Abundancias relativas (%) a nivel de filo y clase de las comunidades de (a y b) bacterias y (c y d) arqueas. Se muestran los datos por triplicado para cada uno de los sitios de muestreo. PC= Progreso-Restaurado (cerca del sitio conservado), PR= Progreso-Restaurado (cerca de la carretera), YR= Yucalpetén-Restaurado.

Para el análisis de abundancias diferenciales (LEFSE) no se realizó ningún ajuste en los valores de p debido a que al corregirlo con cualquier método no se encontraban diferencias

significativas entre sitios. Al realizar la prueba con un nivel de confianza del 95% y sin corrección del valor de p , se encontraron 64 taxa significativamente diferentes entre los sitios. Se registró un score LDA mínimo de 3.1 y uno máximo de 4.67 (Fig. 11).

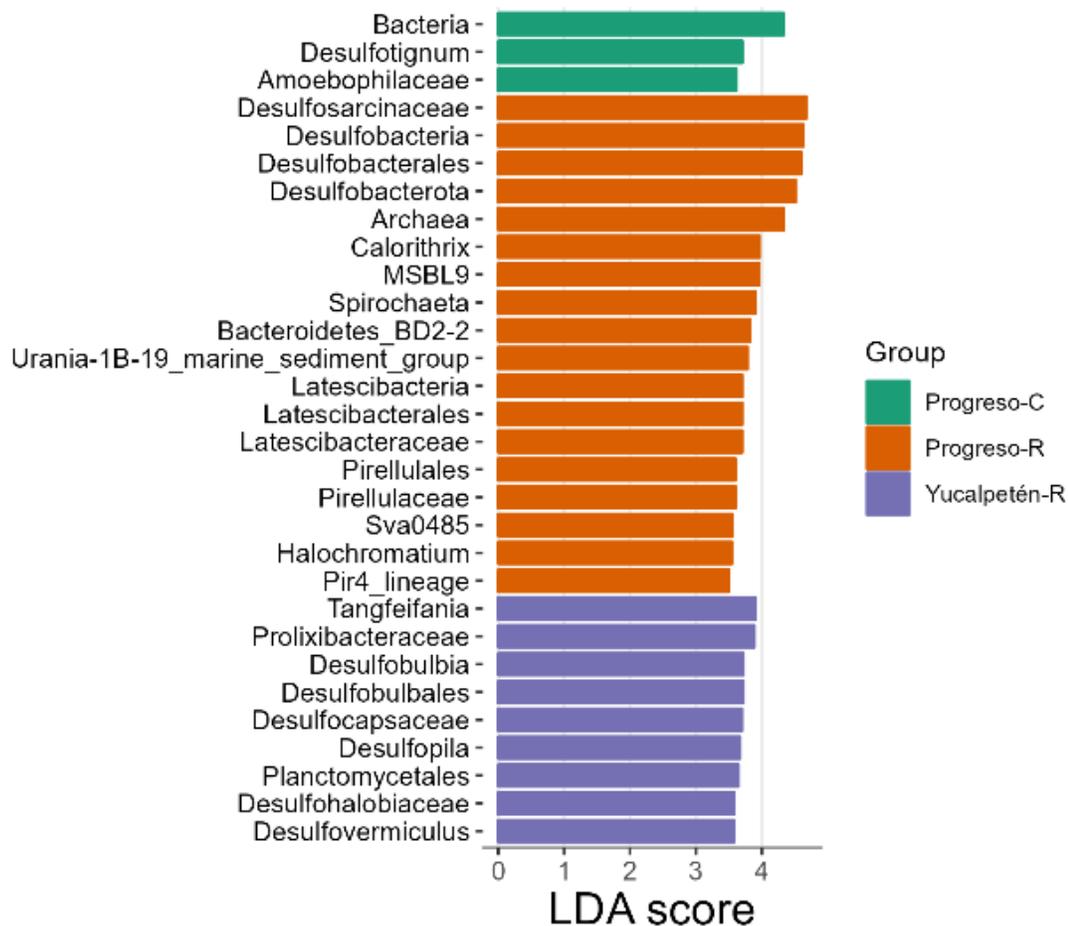


Figura 11. Valores LDA de los taxa diferenciales de cada sitio. Grupos: Progreso-C= Progreso-Restaurado (cerca del sitio conservado), Progreso-R= Progreso-Restaurado (cerca de la carretera), Yucalpetén-R= Yucalpetén-Restaurado.

El sitio PC se diferenció de los otros por tener mayor abundancia de bacterias, por lo tanto, una menor abundancia de arqueas que los otros dos sitios y por una mayor abundancia del género *Desulfotignum* y la familia Amoebophilaceae. El sitio PR destacó principalmente por una mayor abundancia de la familia Desulfosarcinaceae, dentro del orden Desulfobacterales y la clase Desulfobacteria; y por una mayor abundancia de la clase Desulfobacterota. El sitio

YR se distingue de los otros por una mayor abundancia del género *Tangfeifania*, la familia Prolixibacteraceae y de la familia Desulfocapsaceae, dentro del orden Desulfobulbales y la clase Desulfobulbia.

mcrA

Después de haber aplicado los filtros de calidad y eliminación de lecturas no asignadas se obtuvo un máximo de 19305 lecturas y un mínimo de 1596. Al obtener las curvas de rarefacción con la normalización de los datos se observa que la diversidad alfa y la riqueza llegan a una asíntota en la mayoría de las muestras, sin embargo, en tres de las muestras (PC2, YR2 y YR3) hizo falta un mayor esfuerzo de secuenciación (Fig. 12).

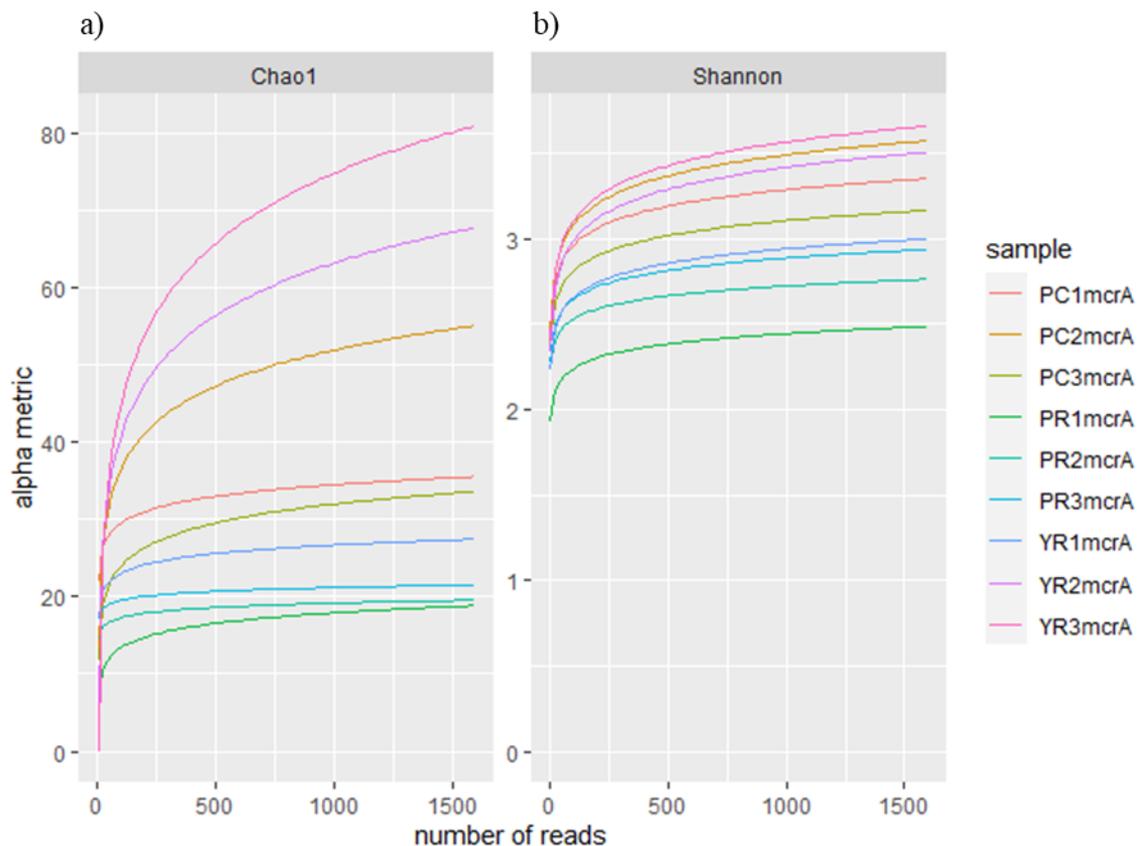
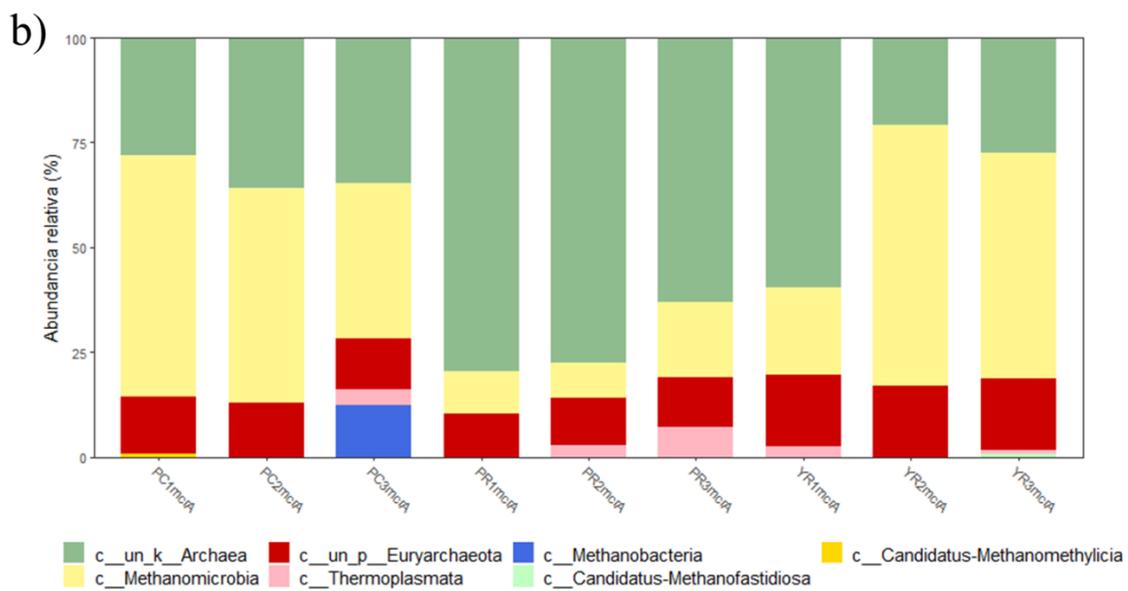
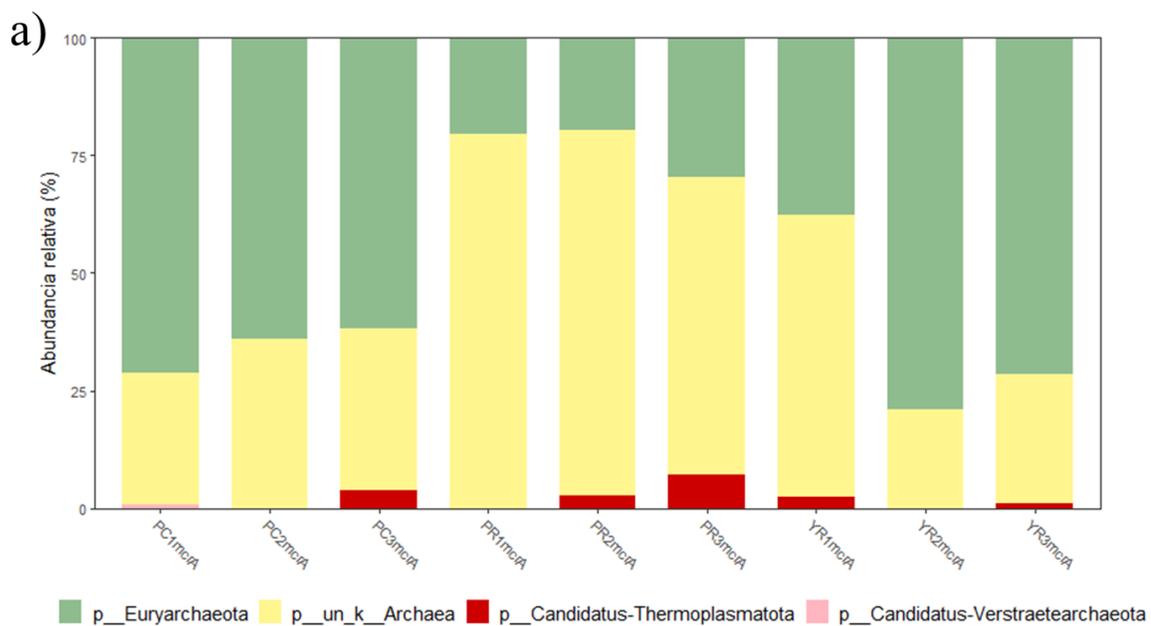


Figura 12. Curvas de rarefacción para a) la riqueza de ASVs y b) la diversidad de especies en cada muestra. PC= Progreso-Restaurado (cerca del sitio conservado), PR= Progreso-Restaurado (cerca de la carretera), YR= Yucalpetén-Restaurado.

Se registraron un total de 224 ASVs, asignados con confiabilidad a un total de 3 fila, 5 clases, 6 órdenes, 5 familias y 10 géneros. En cuanto a la composición, el filo más abundante fue Euryarchaeota, el cual estuvo presente en todas las muestras. Se encontró también el filo Candidatus-Thermoplasmata, en 5 de las muestras y en los tres sitios; y el filo Candidatus-Verstraetearchaeota se encontró solo en una muestra del sitio PC. Sin embargo, se observó que del 21-80% de las secuencias no se asignaron a ningún filo (Fig. 13a). A nivel de clase, Methanomicrobia fue la más abundante y estuvo presente en todas las muestras; seguido de la clase Thermoplasmata, presente en los tres sitios, pero no en todas las muestras. Las clases Methanobacteria y Candidatus-Methanomethylica solo estuvieron presentes en una muestra del sitio PC y la clase Candidatus-Methanofastidiosa solo estuvo presente en una muestra del sitio YR (Fig. 13b). A nivel de orden, el más abundante fue el de Methanosarcinales, el cual estuvo presente en todas las muestras, seguido del orden Methanomassilicoccales, el cual estuvo presente en los tres sitios, pero no en todas las muestras. Los órdenes Methanotrichales, Methanobacteriales y Candidatus-Methanomethylicaes estuvieron presentes solo en una muestra del sitio PC. El orden Methanomicrobiales solo estuvo presente en una muestra del sitio PC y en una del sitio YR (Fig. 13c). El género más abundante fue *Methanolobus*, el cual estuvo presente en todas las muestras, seguido del género *Methanohalobium*, presente únicamente en el sitio YR y el género *Methanotherix*, presente únicamente en el sitio PC. Otros géneros como *Methanobacterium*, *Methanosarcina* y *Candidatus-Methanosuratincola* se encontraron únicamente en el sitio PC. Mientras que, los géneros *Methanosalsum* y *Methanococcoides* se encontraron únicamente en el sitio YR. Los géneros *Methanohalophilus* y *Methanomicrobium* se encontraron en ambos sitios (Fig. 13d).



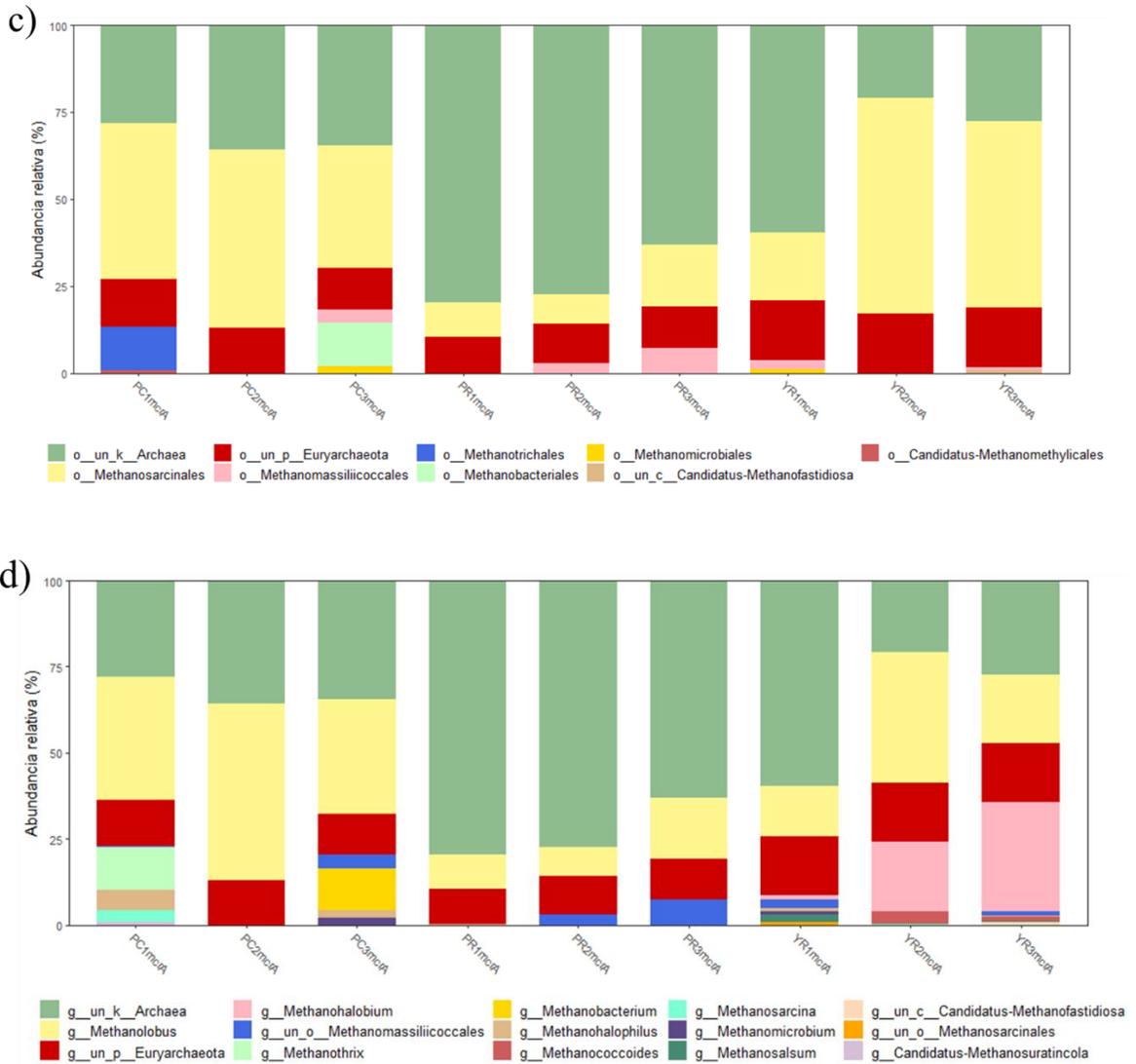


Figura 13. Abundancias relativas (%) a nivel de a) filo, b) clase, c) orden y d) género de las comunidades de arqueas metanogénicas. Se muestran los datos por triplicado para cada uno de los sitios de muestreo. PC= Progreso-Restaurado (cerca del sitio conservado), PR= Progreso-Restaurado (cerca de la carretera), YR= Yucalpetén-Restaurado.

Debido a que se observaron muchos grupos sin asignación taxonómica más allá de dominio o filo, se construyó un árbol filogenético utilizando secuencias de referencia de los taxones que se lograron asignar hasta género y algunas secuencias obtenidas del NCBI, basado en las utilizadas por García-Maldonado *et al* (García-Maldonado et al., 2015) (Fig. 14).

siguiente clado que se observa del ASV2 al ASV63 estuvo mayormente asociado al género *Methanosalsum* (naranja oscuro). El ASV66 estuvo mayormente asociado al género *Methanococcoides* (naranja claro). Los ASV 64 y 73 estuvieron cercanamente asociados a *Methanomicrobium* y *Methanobolus* (amarillo). Los ASV 76, 69, 67 y 68 formaron un clado y se encontraron mayormente asociados al género *Methanohalobium* (verde claro). El ASV40 estuvo mayormente asociado a *Methanocella paludicola* y al género *Methanothrix* (verde). Finalmente, se formó un clado que se observa del ASV50 al ASV49 y estuvo mayormente relacionado con el género *Methanobacterium* (turquesa) y otro clado que se observa en el árbol del ASV39 al ASV42 y estuvo mayormente relacionado con *Methanocaldococcus jannaschii* (azul).

pmoA

Para el gen *pmoA* se lograron obtener amplicones solo de cuatro de las nueve muestras: tres del sitio PC y una del sitio YR (Fig. 15). Sin embargo, no fue posible realizar la secuenciación debido a que la mayoría de las bandas observadas eran muy tenues y después de la primera purificación ya no se observaba el producto por electroforesis.

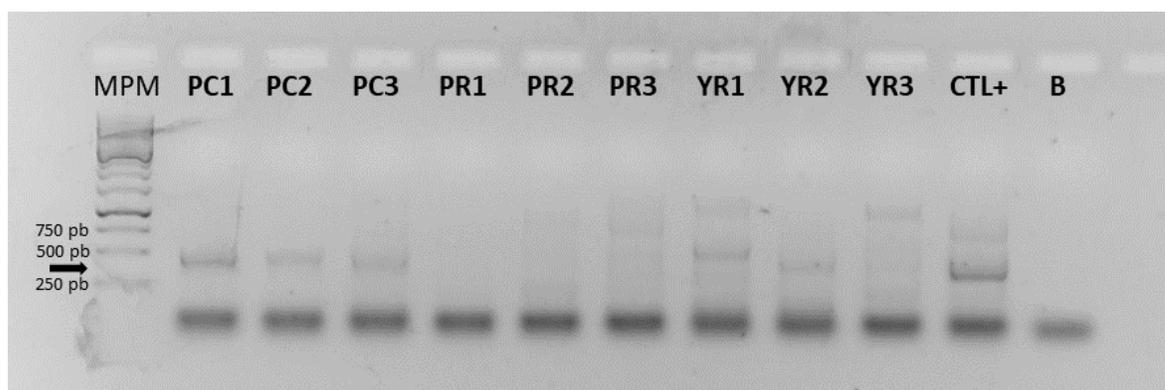


Figura 15. Visualización de la amplificación del gen *pmoA* por electroforesis en gel de agarosa al 1%. MPM= Marcador de Peso Molecular de 1 kb. PC= Progreso-Restaurado (cerca del sitio conservado), PR= Progreso-Restaurado (cerca de la carretera), YR= Yucalpetén-Restaurado, CTL+= Control positivo. B= Blanco (Control sin templado). La flecha indica el tamaño esperado de 461 pb.

Se utilizó el programa ImageJ para cuantificar las bandas de las muestras que amplificaron el gen *pmoA* y se obtuvo el número de píxeles de cada una con la imagen gel de electroforesis (Tabla 8). Se observó que el sitio PC presenta una densidad promedio de 11798.41 píxeles, mientras que, para el sitio YR el gen amplificó únicamente en una de las muestras y se obtuvo una densidad de 5691.024 píxeles.

Tabla 8. Cuantificación de las bandas obtenidas del gen *pmoA* en el gel de electroforesis.

Muestra	Número de píxeles
PC1	19359.472
PC2	9913.007
PC3	6122.752
YR2	5691.024

PC= Progreso-Restaurado (cerca del sitio conservado), PR= Progreso-Restaurado (cerca de la carretera), YR= Yucalpetén-Restaurado.

Se realizó una prueba para intentar secuenciar la muestra PC1 sin hacer la primera purificación, es decir, añadiendo los índices directamente después del PCR anidado. Sin embargo, se observó que la calidad de las muestras fue muy baja y al realizar la alineación de las secuencias con la base de datos fue muy poco significativa, haciendo que la asignación taxonómica arrojara grupos que no correspondían a bacterias metanotróficas. El único grupo que se logró asignar fue la clase Verrucomicrobiae, dentro del filo Verrucomicrobiota.

Al analizar la tabla de abundancias obtenida por la secuenciación del gen *16S rRNA*, se encontraron dos grupos de bacterias metanotróficas con abundancias menores al 1% (0.15 – 0.07%) (Tabla 9). La familia Methyacidiphilaceae estuvo presente en una muestra del sitio PC y una del sitio YR y la familia Methylomirabilaceae estuvo presente únicamente en una muestra del sitio PR.

Tabla 9. Abundancia relativa de bacterias metanotróficas encontradas con el gen *16S rRNA*.

Taxa	Abundancia relativa (%)								
	PC1	PC2	PC3	PR1	PR2	PR3	YR1	YR2	YR3
Methylacidiphilaceae (f)	4.9 $\times 10^{-4}$	0	0	0	0	0	0	1.5 $\times 10^{-3}$	0
Methylomirabilaceae (f)	0	0	0	0	7.4 $\times 10^{-4}$	0	0	0	0

PC= Progreso-Restaurado (cerca del sitio conservado), PR= Progreso-Restaurado (cerca de la carretera), YR= Yucalpetén-Restaurado; f= familia.

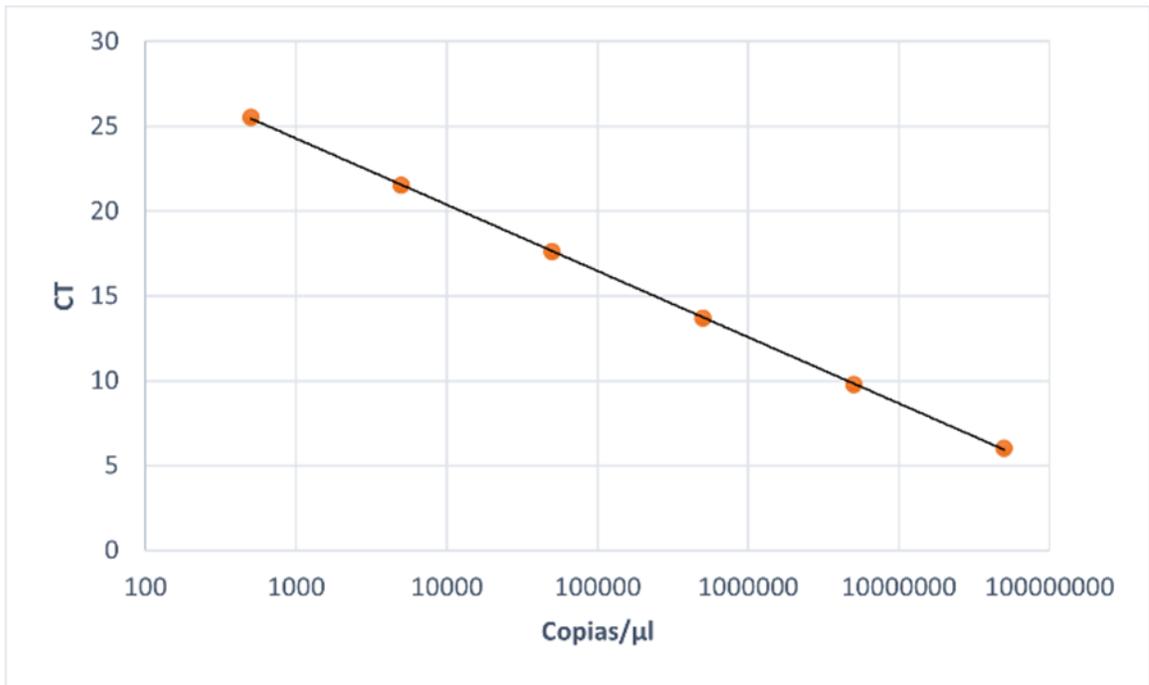
mmoX

No fue posible realizar la amplificación del gen (datos no mostrados), lo cual puede ser debido a que no está presente en ninguna de las muestras o que se encuentra en muy bajas abundancias para ser detectado.

Cuantificación de la actividad potencial metanogénica y metanotrófica

Se obtuvieron las curvas estándar para los marcadores moleculares *mcrA* y *pmoA* utilizando las diluciones entre 500 y 50,000,000 número de copias por μl (Fig. 16). Para el gen *mcrA* se obtuvo la ecuación $CT = -3.905 \cdot \log(\text{conc}) + 35.999$ y un coeficiente de determinación $R^2 = 0.99$ y para el gen *pmoA* se obtuvo la ecuación $CT = -4.248 \cdot \log(\text{conc}) + 37.301$ y un coeficiente de determinación $R^2 = 0.99$.

a)



b)

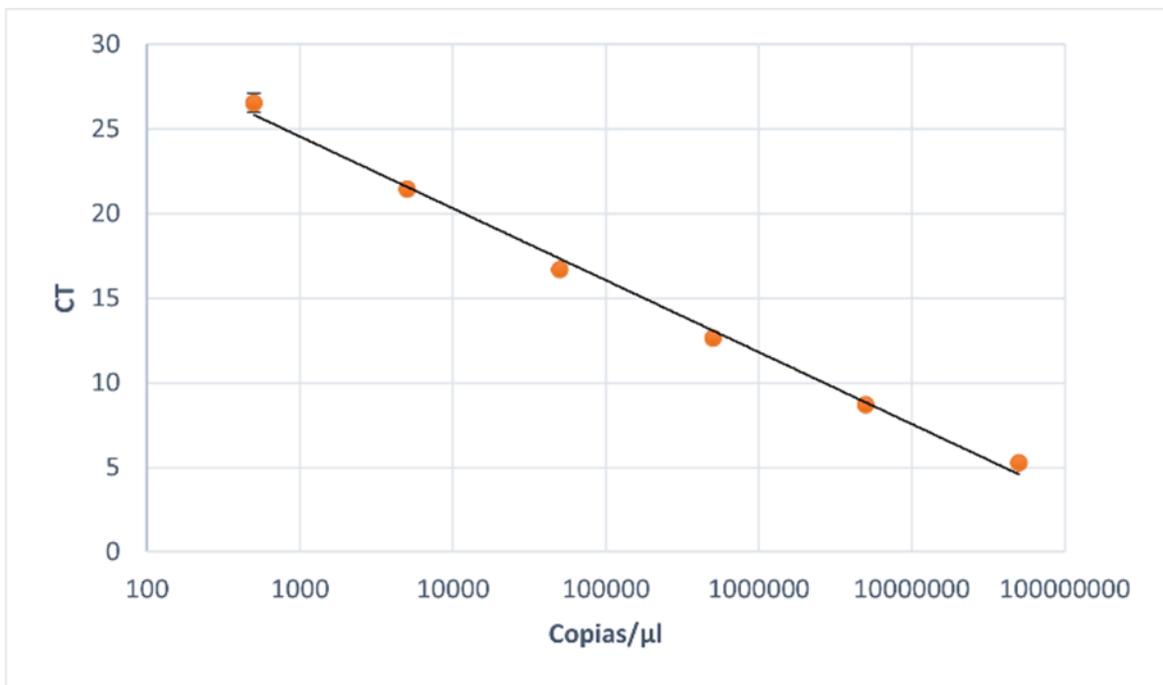


Figura 16. Curva estándar CT para cuantificación por qPCR de los genes: a) *mcrA* y b) *pmoA*. CT= ciclo umbral.

En la cuantificación del número de copias de ambos genes a partir de las muestras de los tres sitios se observó la formación de dímeros de primers en algunos de los ensayos, introduciendo sesgo a los resultados. Debido a esto, solo se muestran los resultados de algunas muestras para cada uno de los genes. Para el gen *mcrA* se obtuvo el mayor número promedio de copias en dos muestras del sitio YR (1143.5 y 425 copias/ μ l, respectivamente), seguido del sitio PC1 con 308.5 copias/ μ l y finalmente el sitio PR2 con 243.05 copias/ μ l (Tabla 10).

Tabla 10. Número de copias del gen *mcrA* obtenidas por qPCR.

Sitio	CT	Copias/ μ l
PC1	26.97	205
	25.79	412
PR2	25.85	397
	28.38	89.1
YR2	24.76	757
	23.56	1530
YR3	26.79	228
	25.09	622

PC= Progreso-Restaurado (cerca del sitio conservado), PR= Progreso-Restaurado (cerca de la carretera), YR= Yucalpetén-Restaurado. CT= ciclo umbral.

Por el lado contrario, para el gen *pmoA* se obtuvo el mayor número promedio de copias en dos muestras del sitio PC (2400 y 1255 copias/ μ l, respectivamente), seguido del sitio PR2 con 1043.5 copias/ μ l y finalmente el sitio YR3 con 41.05 copias/ μ l (Tabla 11).

Tabla 11. Número de copias del gen *pmoA* obtenidas por qPCR.

Sitio	CT	Copias/μl
PC1	23.44	1830
	22.55	2970
PC3	24.18	1230
	24.09	1280
PR2	24.95	807
	24.1	1280
YR3	30.43	41.5
	30.47	40.6

PC= Progreso-Restaurado (cerca del sitio conservado), PR= Progreso-Restaurado (cerca de la carretera), YR= Yucalpetén-Restaurado. CT= ciclo umbral.

DISCUSIÓN

Con los resultados obtenidos en este trabajo se cumplió una gran parte de los objetivos planteados: i) se analizó la relación entre las variables ambientales y las comunidades microbianas, encontrando que están mayormente influenciadas por el contenido de fósforo y carbono total, así como por la textura del sedimento; ii) se caracterizaron las comunidades microbianas en los sedimentos superficiales de los distintos sitios, con limitaciones en cuanto a los genes *pmoA* y *mmoX*, por lo que se necesitarán más estudios para lograr describir las comunidades de bacterias metanotróficas en estos sitios; y, finalmente, iii) se cuantificó el potencial genético para la producción y oxidación de metano en muestras de los distintos sitios a partir del número de copias obtenidas de los genes *mcrA* y *pmoA*, encontrando diferencias entre ellos.

Se pudo confirmar la hipótesis planteada, ya que a partir de la secuenciación del gen *mcrA* se registraron diferencias en la composición de arqueas metanogénicas en los distintos sitios. Mientras que, a pesar de las limitaciones, con la secuenciación del gen *16S rRNA* se lograron identificar algunos grupos de bacterias metanotróficas, los cuales tuvieron distintas abundancias en los sitios de estudio. Sin embargo, hace falta más información para inferir si existe una mayor liberación de metano en estos sitios.

Una de las preguntas que surgieron en este trabajo fue si los sitios, a pesar de haber tenido las mismas acciones de restauración en un mismo intervalo de tiempo, presentaban variabilidad entre las condiciones ambientales y la composición de la microbiota. Se observó que los sitios PC y PR mostraron una mayor similitud para la mayoría de las variables fisicoquímicas; únicamente el contenido de carbono total y el potencial redox mostraron valores más similares entre los sitios PR y YR (Fig. 5, Tabla 6). En cuanto a la microbiota, los tres sitios mostraron diferencias en su estructura (Fig. 9); los sitios PC y PR compartieron un mayor porcentaje de ASVs en común (16.6%), mientras que los sitios PR y YR tuvieron el menor porcentaje de ASVs en común (3.8%) (Anexo 5). En cuanto a la comunidad de arqueas metanogénicas, se encontró que los sitios PC y YR contaron con algunos grupos exclusivos y otros grupos compartidos (Fig. 13). Finalmente, en cuanto a la comunidad de bacterias metanotróficas, dentro de los pocos grupos detectados se detectó una familia compartida entre los sitios PC y YR (Tabla 9). Lo anterior indica que, los sitios restaurados

no siguen la misma trayectoria y existe una heterogeneidad entre los sitios. Sin embargo, es necesario comparar más sitios con esta condición.

Factores abióticos en sedimentos superficiales de manglares

Las zonas de manglar se ven influenciadas por distintos factores ambientales que regulan su estructura y función, estos factores se organizan en: gradientes de recursos, los cuales contribuyen en la productividad de los manglares; gradientes reguladores, que influyen en el crecimiento de los manglares; y el hidropериodo, el cual está determinado por el nivel, tiempo y frecuencia de la inundación (Twilley & Rivera-Monroy, 2005). Dentro de los gradientes de recursos que se analizaron en este trabajo se encuentra el contenido de materia orgánica, el contenido de nutrientes (carbono, fósforo y nitrógeno total) y la textura (contenido de arena, limo y arcilla) (Fig. 5 y 6).

Los tres sitios mostraron un contenido similar de materia orgánica (Fig. 5D). El sitio YR contó con un contenido promedio ligeramente menor de carbono total y materia orgánica que los sitios de Progreso, lo cual puede estar asociado a su tipo ecológico, debido a que estos árboles son de menor tamaño y esto puede contribuir a una menor acumulación de materia orgánica.

Los sitios presentan un menor contenido de materia orgánica comparado con otros sitios (Sanders et al., 2012; Moreno Martínez, 2022; Gómez-Acata et al., 2023), a excepción de manglares restaurados de Vietnam (Dung et al., 2016), lo cual puede indicar una baja actividad metanogénica al haber un menor aporte de material orgánico autóctono y por lo tanto poca disponibilidad de sustrato para la metanogénesis. Además del hecho de la alta salinidad observada en estos sitios, que favorece la actividad sulfatoreductora y aumenta la competencia entre bacterias sulfatoreductoras y arqueas metanogénicas.

El contenido de carbono total analizado incluye carbono orgánico e inorgánico. En la Península de Yucatán, al estar caracterizada por condiciones kársticas, existe un gran aporte de material inorgánico proveniente de organismos calcáreos y de procesos de disolución de carbonatos, por lo que se puede esperar que un componente importante del carbono total observado sea de tipo inorgánico (Twilley et al., 2018; Saderne et al., 2019). En otros trabajos

realizados en Progreso y Curva Yucalpetén se ha reportado que una cuarta parte del carbono total almacenado en el sedimento corresponde a carbono inorgánico (Moreno Martínez, 2022).

Se encontró que los sitios analizados cuentan con un contenido de carbono total dentro del rango de otros sitios (Lovelock et al., 2014; Sidik et al., 2019; Moreno Martínez, 2022; Gómez-Acata et al., 2023). Incluso, a pesar de ser restaurados, los tres sitios muestran mayores niveles de carbono total en comparación con los sedimentos de manglares conservados en Australia (Lovelock et al., 2014), lo cual muestra que con la restauración se recupera la habilidad de almacenamiento de carbono en los sedimentos. Sin embargo, sería importante analizar los porcentajes de carbono orgánico e inorgánico para obtener resultados más claros.

Debido a las condiciones kársticas de la Península de Yucatán, el aporte de nutrientes como nitrógeno y fósforo es principalmente interno. El principal aporte externo es por las excretas de aves (guano) y por descargas de agua subterráneas. Además, al carecer del aporte de nutrientes por la descarga de ríos, los manglares de estos sitios se caracterizan por estar limitados en fósforo (Twilley et al., 2018).

Se encontró que los sitios PC y PR contaron con cantidades de nitrógeno total mayores al 1%, lo cual es mayor a lo reportado en otros sitios (Lekphet et al., 2005; Rivera-Monroy et al., 2017; Agraz-Hernández et al., 2020; Moreno Martínez, 2022). Se ha reportado que estos sitios se caracterizan principalmente por tener sedimentos inorgánicos “Sascab”, ya que fueron usados como depósito del material de dragado proveniente del Puerto de Yucalpetén y la Pista de canotaje (Herrera-Silveira, 2012), por lo que de ahí pudiera venir el aporte de nitrógeno. El sitio YR tuvo el menor contenido de nitrógeno de los tres sitios (Fig. 5A). Esto se podría explicar porque el manglar de tipo chaparro está caracterizado por tener un déficit de nutrientes, el cual limita su desarrollo y capacidad de almacenamiento de carbono en biomasa (Zaldivar-Jimenez et al., 2010). Sin embargo, este sitio contó con el mayor porcentaje promedio de fósforo total en el sedimento (Fig. 5B), lo cual puede implicar que exista un aumento de nutrientes por contaminación antrópica o porque este sitio sea seleccionado por aves para su anidación. Los tres sitios presentan niveles de P total similares

a los observados en manglares perturbados de Brasil (Mater et al., 2004) y niveles más bajos comparados con manglares perturbados de India y Bangladesh (Madhav et al., 2022).

El nitrógeno y el fósforo actúan como nutrientes limitantes que pueden regular la productividad en los ecosistemas. Un alto contenido de materia orgánica puede estar asociado a un alto contenido de nitrógeno, ya que el proceso de nitrificación se hace más lento y permite que este se acumule. Por otro lado, se ha reportado que el contenido de fósforo puede incrementar en suelos más ácidos y reducidos y también se ha relacionado a baja salinidad, la cual facilita la acumulación de P en el suelo (Torres et al., 2018). Los sitios analizados cuentan con niveles altos de pH y salinidad (Tabla 6), lo cual podría explicar los bajos niveles de P total observados y este puede actuar como nutriente limitante, disminuyendo la productividad en estos sitios.

En los sitios de estudio los suelos tuvieron un mayor porcentaje de arena comparado a otros sitios (Lekphet et al., 2005; Nyangon et al., 2019; Sulochanan et al., 2022), lo cual sumado a las altas temperaturas y la alta diversidad de microorganismos encontrada, permite una rápida degradación de la materia orgánica y evita que se acumule. La textura del suelo es un factor importante en la estabilización y acumulación de la materia orgánica. Un mayor contenido de materia orgánica se ha asociado a sitios con dominancia de arcillas y limos, debido a que estas partículas finas, de menor tamaño y menor porosidad pueden absorber la materia orgánica que se incorpora al suelo, protegiéndola de la descomposición por microorganismos (Zhou et al., 2019). De los tres sitios, el sitio PR tuvo el mayor porcentaje de arena y el menor porcentaje de limo y arcilla (Fig. 6), por lo que pudiera ser el sitio más propenso a una rápida degradación de materia orgánica y liberación de GEI.

Dentro de los gradientes reguladores que se analizaron en este trabajo se encuentra la temperatura, la salinidad, el pH y el potencial redox (Tabla 6). Se observó que los sitios tuvieron valores distintos a los de otros sitios estudiados para la mayoría de las variables. Se observó, por ejemplo, una mayor temperatura en comparación a otros sitios (Lekphet et al., 2005; Joson et al., 2021; Moreno Martínez, 2022), lo cual puede deberse a que en los sitios restaurados existe una menor cobertura vegetal, la cual protege contra la radiación solar y hace que la incidencia de los rayos solares sea menos directa en el suelo y agua superficial (Banerjee et al., 2018). También se registraron valores altos de salinidad comparado con

otros sitios (Joson et al., 2021; Moreno Martínez, 2022; Padhy et al., 2022), lo cual pudo deberse a que estos sitios cuentan con el aporte de agua salada de la Laguna de Chelem que puede llegar a ser hipersalina (Herrera-Silveira & Morales-Ojeda, 2010).

Al igual, se observaron niveles de pH más alcalinos en los sitios estudiados comparados con otros sitios (Lekphet et al., 2005; Joson et al., 2021; Moreno Martínez, 2022; Padhy et al., 2022). Se ha reportado que niveles alcalinos de pH en manglares se puede atribuir a factores como la actividad del fitoplancton, por la degradación de bicarbonato; mientras que un pH ácido se atribuye a la liberación de ácidos orgánicos por la descomposición de la materia orgánica (Oxmann et al., 2010; Kumar et al., 2017). Por otro lado, otros estudios reportan que un mayor pH refleja una rápida descomposición de materia orgánica (He et al., 2018), lo cual contribuye a explicar los niveles bajos de contenido de materia orgánica observada en estos sitios. Además, en sitios donde existe una mayor acumulación de materia orgánica junto con la inundación provocan suelos altamente reducidos y esto debería disminuir el pH (Zhou et al., 2019), lo cual no fue el caso en estos sitios.

Finalmente, el potencial redox en el sitio PC alcanza niveles más positivos que otros sitios (Lekphet et al., 2005; Joson et al., 2021; Moreno Martínez, 2022). Este sitio cuenta con un mayor desarrollo de vegetación de la especie *A. germinans*, cuyos neumatóforos ayudan a oxigenar el sedimento y esto se ha visto que puede favorecer la actividad de bacterias metanotróficas (Arai et al., 2021). Mientras que en los otros sitios se observó un potencial redox negativo, lo cual se ha visto que favorece la actividad de arqueas metanogénicas.

Es importante mencionar que estas condiciones ambientales fueron observadas durante una temporada específica. A lo largo de las distintas temporadas existen variaciones en las condiciones ambientales. Además, el hidropериодо en estos sitios varía espacial y temporalmente, lo cual afecta directa o indirectamente algunas variables ambientales como las condiciones de salinidad y el potencial redox, así como algunos procesos como la descomposición de materia orgánica y la captura de carbono a largo plazo (Moreno Martínez, 2022). Sumado al hecho de que en los ecosistemas de manglar pueden ocurrir cambios en los procesos microbianos y fisiológicos incluso en una escala de minutos u horas (Alongi, 2002). Debido a esto, es importante considerar en futuros estudios un muestreo donde se midan estas

variables durante distintos periodos estacionales para observar el comportamiento de las variables ambientales y la actividad microbiana a largo plazo.

Comunidades microbianas en los sedimentos de manglares

Dado que las bacterias y arqueas juegan un papel vital en los ciclos biogeoquímicos y la transformación de nutrientes en manglares (Ghizelini et al., 2012), era esperado que los tres sitios contaran con una alta diversidad microbiana debido a que estos ecosistemas proporcionan nutrientes y condiciones óptimas para la colonización microbiana. Los valores elevados de potencial redox, los niveles de salinidad, la gran reserva de materia orgánica y las tasas de reciclaje de nutrientes de estos ecosistemas facilitan que abunden los recursos microbianos, haciéndolos *hotspots* para la diversidad microbiana (Palit et al., 2022).

Dentro de las clases de bacterias más abundantes en los tres sitios se encontraron Bacteroidia, Desulfobacteria, Spirochaetia, Anaerolineae y Cyanobacteria (Fig. 10b). Estas también han sido reportadas como las más abundantes en otras zonas de manglares de México, Brasil, India y Malasia; los primeros 4 taxa tienen un papel importante en procesos como la descomposición de la materia orgánica, y la clase Cyanobacteria en la productividad primaria a través de la fotosíntesis oxigénica (Zhang et al., 2017; Mai et al., 2021; Palit et al., 2022; Gómez-Acata et al., 2023). Por otro lado, la clase Rhodothermia tuvo una gran abundancia en todos los sitios, pero en estudios previos no se ha reportado dentro de las más abundantes en otras zonas de manglar. Los miembros de esta clase son bacterias aerobias quimiotróficas y se han reportado principalmente en lagos hipersalinos y ambientes con temperaturas elevadas (Munoz et al., 2016; Çinar & Mutlu, 2020).

A niveles taxonómicos más bajos se detectaron principalmente géneros de bacterias que también se han reportado en sedimentos de manglares de otros sitios (Anexo 6), como *Spirochaeta_2*, las cuales participan en la oxidación del azufre (Muwawa et al., 2021); *SB-5*, que se han detectado en sedimentos superficiales de manglares contaminados con aceites (Iturbe-Espinoza et al., 2022); y *Phaeodactylibacter*, que son bacterias aerobias quimioheterotróficas (Gómez-Acata et al., 2023). También se detectó, dentro de las más abundantes, la familia Lentimicrobiaceae (Anexo 7), que hasta donde se sabe no se encuentra reportada en sedimentos de manglares, pero sí en otros sedimentos de ambientes acuáticos y

participa en la degradación anaerobia de la materia orgánica (Dai et al., 2021). Sin embargo, alrededor del 50% de los géneros se agruparon como “otros”, lo cual indica que la biósfera rara en estos sitios debe de jugar un papel importante.

En cuanto a la composición de arqueas, los fila más abundantes fueron Halobacterota, Nanoarchaeota, Asgardarchaeota y Thermoplasmata (Fig. 10c). Estas también han sido reportadas como las más abundantes en otras zonas de manglares de Brasil, México y China, entre otros (Pires et al., 2012; De Santana et al., 2021; Meng et al., 2022; Gómez-Acata et al., 2023). Los fila Halobacterota y Asgardarchaeota se caracterizan por ser halófilos y juegan un papel importante en procesos como el ciclo del azufre (sulfato-reducción) y el carbono, se ha visto que algunos miembros de Asgardarchaeota son capaces de asimilar el carbono inorgánico (Banciu et al., 2022; Qin et al., 2023). Por otro lado, el filo Nanoarchaeota se sugiere que presenta una relación simbiótica con arqueas metanogénicas y es capaz de degradar algunos contaminantes (Kutty et al., 2023), mientras que, el filo Thermoplasmata participa en el ciclo del hierro y del azufre; ambos se caracterizan por ser termófilos (Pires et al., 2012).

La estructura de estas comunidades microbianas presentó diferencias significativas (Fig. 9). Se ha visto que la estructura de las comunidades microbianas en manglares es altamente compleja debido al número infinitamente grande de nichos que los microorganismos pueden habitar (Ghizelini et al., 2012). Con el análisis LEFSE se identificaron características microbianas relevantes biológicamente para cada sitio (Fig. 11).

El sitio PC presentó una mayor abundancia de bacterias con respecto a los otros dos sitios. Esto puede deberse a que las arqueas aumentan su abundancia en ambientes más “extremos”, debido a su metabolismo y adaptaciones a ambientes hostiles, por lo que los mayores niveles de salinidad y el potencial redox observados en los sitios PR y YR pudieron contribuir a una mayor abundancia de grupos de arqueas extremófilas. Este sitio también presentó una mayor abundancia de la familia Amoebophilaceae, la cual se encuentra dentro del filo Bacteroidetes y son capaces de degradar moléculas orgánicas complejas (Lezcano et al., 2017), y del género *Desulfotignum*, que son bacterias sulfatoreductoras que se ha visto que son capaces de degradar algunos hidrocarburos. Además, su abundancia se ha visto que aumenta con el contenido de nitratos (Wang et al., 2016), lo cual sugiere que en este sitio la cantidad de

nitrógeno total detectado incluya una cantidad elevada de nitratos, además de otras formas del nitrógeno como nitritos, amonio y nitrógeno orgánico, favoreciendo el crecimiento de microorganismos dentro de este género.

El sitio PR presentó una mayor abundancia de la familia Desulfosarcinaceae, las cuales habitan en ambientes marinos y sedimentos y son bacterias anaerobias que participan en el ciclo del azufre, liberando sulfuro de hidrógeno (Fonseca et al., 2022). Además, este sitio presenta una mayor abundancia de arqueas, por lo que pudiera considerarse el que cuenta con las características más “extremas” anteriormente mencionadas. También contó con una mayor abundancia del género *Calorithrix*, el cual se encuentra dentro del filo Calditrichota, son bacterias termófilas, anaerobias organoheterotróficas. Se han aislado de ventilas hidrotermales y se ha visto que son capaces de degradar sustratos proteicos (Marshall et al., 2017).

Finalmente, el sitio YR presentó una mayor abundancia del género *Tangfeifania*, el cual se encuentra dentro del filo Bacteroidetes. Son bacterias anaerobias facultativas, quimiorganotróficas y se han registrado exclusivamente en ambientes salinos (Liu et al., 2014). También se presentó una mayor abundancia de la familia Prolixibacteraceae, la cual se encuentra dentro del filo Bacteroidetes. Estas se han reportado en ambientes marinos e incluyen grupos de bacterias fijadoras de nitrógeno (Huang et al., 2014). En el caso de la clase Desulfobulbia, que también presentaron abundancias importantes, son bacterias sulfatoreductoras que se han detectado en sedimentos marinos y ambientes costeros. En sedimentos de manglares se ha visto que facilitan el crecimiento de las plantas al acelerar la transformación de nutrientes con la producción de sustancias extracelulares poliméricas (EPS) (Cheng et al., 2022).

Los tres sitios se distinguieron principalmente por la presencia de grupos de bacterias sulfatoreductoras, indicando que existe una redundancia funcional debido a que distintos grupos llevan a cabo el mismo rol en el ecosistema. Está reportado que los manglares que sufren largos periodos de sequía, lo cual ocurrió en estos sitios por la interrupción del flujo hidrológico, experimentan un aumento en la salinidad intersticial, una disminución en el potencial redox y un aumento en la concentración de sulfuros (Zaldivar-Jimenez et al., 2010). Esto se puede correlacionar con la presencia de los grupos anteriormente mencionados de

bacterias sulfatoreductoras en los sitios restaurados, que se vieron favorecidos y han permanecido a pesar de que ya se realizaron acciones para recuperar el flujo hidrológico.

Comunidades metanogénicas y metanotróficas en sedimentos de manglares

Arqueas metanogénicas

Este trabajo presenta la primera descripción de las comunidades de arqueas metanogénicas que habitan en sedimentos de manglares de la Península de Yucatán (Fig. 13). La mayoría de las arqueas metanogénicas conocidas se encuentran dentro del filo Euryarchaeota, el cual recientemente se creía que era el único (Vanwonterghem et al., 2016). Este filo fue el más abundante en los tres sitios, con una abundancia de aproximadamente del 70% en los sitios PC y YR, mientras que en el sitio PR aproximadamente el 70% de los ASVs correspondieron a grupos sin asignar más allá del Reino Archaea. Se encontró también el filo Candidatus-Thermoplasmatota en todos los sitios y este filo también se detectó en el análisis del gen *16S rRNA* como uno de los más abundantes dentro de las arqueas. El filo Candidatus-Verstraetearchaeota se detectó únicamente en el sitio PC, este se ha reportado en otros sitios como ventilas hidrotermales, depósitos de hidrocarburos, pantanos (Evans et al., 2019) y salineras (García-Maldonado et al., 2023). En general, estos tres filo están comúnmente reportados dentro de las arqueas más abundantes en distintos humedales (Vanwonterghem et al., 2016; Bräuer et al., 2020; Palit et al., 2022).

Se encontraron 6 distintos órdenes: 4 dentro del filo Euryarchaeota (Methanosarcinales, Methanotrichales, Methanomicrobiales y Methanobacteriales), uno dentro del filo Ca.-Thermoplasmatota (Methanomassilicoccales) y uno dentro del filo Ca.-Verstraetearchaeota (Ca.-Methanomethylales). Los Methanosarcinales fueron el orden más abundante en los tres sitios, lo cual también se ha reportado en manglares de Singapur (Jing et al., 2016). Las arqueas metanogénicas dentro de este orden son principalmente metilotróficas, pero también existen grupos acetoclásticos e hidrogenotróficos; y además incluye arqueas metanotróficas de los grupos ANME-2 y ANME-3. Los Methanomassilicoccales fueron el segundo grupo más abundante en los tres sitios, a pesar de que estos cuentan con salinidad alta, ya que en otro estudio se vio que la presencia de este grupo aumenta conforme disminuye la salinidad (Kallistova et al., 2020); estos llevan a cabo un metabolismo metilotrófico dependiente de

hidrógeno. El orden Methanomicrobiales estuvo presente en los sitios PC y YR, estos llevan a cabo un metabolismo exclusivamente hidrogenotrófico. Finalmente, el sitio PC fue el único con la presencia de los órdenes Methanotrichales, que son acetoclásticos; Methanobacteriales, que son principalmente hidrogenotróficos, pero también pueden ser metilotróficos; y Candidatus-Methanomethylicaes, que son metilotróficos dependientes de hidrógeno (Liu & Whitman, 2008; Evans et al., 2019; Wang et al., 2021).

A niveles taxonómicos más bajos se encontraron 10 géneros. El más abundante en los tres sitios y el único género detectado en el sitio PR fue *Methanolobus*, que cuenta con un metabolismo metilotrófico, se han reportado como organismos moderadamente halófilos y presentan una correlación positiva con el carbono y nitrógeno total (Kallistova et al., 2020; Yu et al., 2020). Este género se registró también como el más abundante en manglares de Singapur (Jing et al., 2016). Los géneros *Methanohalophilus* y *Methanomicrobium* se detectaron en los sitios PC y YR en bajas abundancias, el primero cuenta con un metabolismo metilotrófico y el segundo hidrogenotrófico. Por otro lado, algunos géneros estuvieron exclusivamente en el sitio PC, entre ellos *Methanothrix*, que son acetoclásticos y se ha reportado que aumentan conforme disminuye la salinidad (Kallistova et al., 2020); *Methanobacterium*, que son hidrogenotróficos; *Methanosarcina*, que son el único género reportado que pueden llevar a cabo tres tipos de metabolismo (metilotrófico, hidrogenotrófico y acetoclástico) y predomina en ambientes con alta concentración de acetato (Jing et al., 2016); y *Candidatus-Methanosuratincola*, que son metilotróficos dependientes de hidrógeno (Hatzenpichler et al., 2023). También se encontraron géneros que estuvieron exclusivamente en el sitio YR, que fueron *Methanohalobium*, *Methanosalsum* y *Methanococcoides*; los dos primeros son halófilos y están confinados exclusivamente a ambientes hipersalinos y el último es moderadamente halófilo. Los tres géneros llevan a cabo un metabolismo metilotrófico (Kallistova et al., 2020).

La competencia con las bacterias sulfatoreductoras y los mecanismos de osmoadaptación son los factores más importantes que afectan a la metanogénesis en ambientes salinos. Se ha detectado una mayor diversidad filogenética y metabólica de arqueas metanogénicas en sitios moderadamente salinos que en los hipersalinos, ya que las altas salinidades decrementan la diversidad de comunidades metanogénicas y metanotróficas (Zhang et al., 2019; Kallistova

et al., 2020). En este estudio se observó una menor diversidad de arqueas metanogénicas que en otros estudios en sitios de manglares, sin embargo, muchos de los géneros más abundantes observados se comparten. Por ejemplo, Padhy *et al.* (2022) encontraron alrededor de 22 géneros distintos de arqueas metanogénicas, de los cuales *Methanosarcina*, *Methanothrix* y *Methanlobus* fueron los más dominantes tanto en manglares conservados como perturbados de India. Además, observaron que el metabolismo acetoclástico fue el dominante tanto en manglares perturbados como en conservados, posiblemente debido a que la salinidad en estos sitios es muy baja (<2 ppt) (Padhy et al., 2022). En el estudio de Yu *et al.* (2020) encontraron 31 géneros distintos de arqueas metanogénicas en manglares de China, de los cuales los más abundantes fueron *Methanobacterium*, *Methanlobus*, *Methanococcoides* y *Methanosarcina*. En estos sitios la salinidad también fue baja (<12 ppt) (Yu et al., 2020). En manglares de Singapur se identificaron algunas especies de arqueas metanogénicas como las más abundantes, como *Methanlobus profundus*, seguido de *Methanococcoides methylutens* y *Methanobacterium bryantii*. Además, se detectó la presencia de géneros distintos a los observados en este trabajo como *Methanoculleus* y *Methanogenium* (Jing et al., 2016).

El efecto que tuvo la perturbación de los manglares definitivamente pudo haber ocasionado un cambio en la presencia de algunos grupos de arqueas metanogénicas que se vieron favorecidas por el aumento en la salinidad. Las arqueas metanogénicas con metabolismo metilotrófico son las más halotolerantes, que correspondieron a las principales observadas en este estudio; mientras que las de metabolismo acetoclástico son las más vulnerables a la salinidad, de las cuales solo se detectó un género en este estudio (*Methanothrix*), en el sitio con menor salinidad. Por otro lado, en el sitio YR que fue el más hipersalino se encontraron géneros exclusivos de ambientes hipersalinos, como *Methanohalobium* y *Metanosalsum* (Kallistova et al., 2020).

Por lo que se ha podido determinar, es la primera vez que los géneros *Methanohalobium*, *Ca.-Methanosuratincola* y *Methanomicrobium* son reportados en manglares. El género *Methanohalobium* es el más halófilo dentro de las arqueas metanogénicas reportado hasta la fecha, capaz de crecer a concentraciones de hasta 300 g/L de NaCl y también es moderadamente termófilo (temperatura óptima a 40-55°C) (Kallistova et al., 2020). En este trabajo se detectó únicamente en el sitio YR como el segundo más abundante. El género *Ca.-*

Methanosuratincola se encontró únicamente en el sitio PC, este grupo casi no ha sido reportado, únicamente por el estudio de Hatzenpichler *et al.* (2023), donde fue aislado de fuentes hidrotermales y mencionan que son organismos termófilos y llevan a cabo un metabolismo metilotrófico dependiente de hidrógeno (Hatzenpichler *et al.*, 2023). El género *Methanomicrobium* ha sido reportado principalmente en sedimentos de acuíferos, crecen a una temperatura óptima de 35°C y a un pH de 7-7.5 (Mochimaru *et al.*, 2016), por lo que las condiciones de los sedimentos de manglares observadas en este estudio pudieron favorecer su crecimiento.

El gen *mcrA* está conservado filogenéticamente tanto en arqueas metanogénicas como en arqueas metanotróficas (Jing *et al.*, 2016). Con las lecturas obtenidas de este gen se lograron identificar solo grupos de arqueas metanogénicas, lo cual podría indicar que no hay presencia de arqueas metanotróficas o estas se encuentran en abundancias muy bajas. Se encontró que, en general, el metabolismo que predomina es el metilotrófico. Los compuestos metilados utilizados como sustrato por estas arqueas metanogénicas se generan en los sedimentos marinos a partir de osmolitos de bacterias, algas, fitoplancton y algunas plantas (Liu & Whitman, 2008). En diversos estudios se ha reportado que las arqueas metanogénicas metilotróficas son las que principalmente contribuyen a la producción de metano en sitios ricos en sulfato (Sela-Adler *et al.*, 2017; Xiao *et al.*, 2018; Li *et al.*, 2020). Sin embargo, este trabajo aporta evidencia de que en ambientes hipersalinos pueden coexistir grupos de arqueas metanogénicas con metabolismo hidrogenotrófico y acetoclástico a pesar de la competencia con las bacterias sulfatoreductoras; lo cual también se ha reportado en otros ambientes hipersalinos del país como los tapetes microbianos en Guerrero Negro, Baja California Norte (García-Maldonado *et al.*, 2023). El sitio PC es el único donde se observaron los 4 tipos de metabolismos, el sitio YR carece de metabolismo acetoclástico y el sitio PR cuenta únicamente con metabolismo metilotrófico; lo cual sugiere que el sitio con una mayor recuperación aparente cuenta con una mayor diversidad metabólica de arqueas metanogénicas.

Es importante mencionar que esta información se obtiene dentro de lo que se observó con las secuencias asignadas, sin embargo, se detectaron bastantes secuencias que no correspondieron a ningún grupo conocido de arqueas metanogénicas en la base de datos

utilizada, lo cual sugiere la presencia de algunos *clusters* específicos de estos sitios que podrían pertenecer a cualquiera de los 4 metabolismos. En otros estudios de arqueas metanogénicas es común que se encuentren muchos grupos sin asignar debido a la falta de secuencias ambientales del gen *mcrA* en las bases de datos, a que en la mayoría de los ecosistemas estos microorganismos forman parte de la biósfera rara y a que muchos grupos no son cultivables, dificultando su estudio a nivel filogenético (Liu & Whitman, 2008; García-Maldonado et al., 2023; Jia et al., 2023).

Se optó por construir un árbol filogenético para obtener información sobre las relaciones filogenéticas de las secuencias sin asignar del gen *mcrA* (Fig. 14). La mayoría de las secuencias (24/76) conformaron un clado que no se relacionó filogenéticamente con ninguno de los grupos de referencia, lo cual sugiere la presencia de nuevos *clusters* de arqueas metanogénicas sin descripción previa, posiblemente específicos de estos ecosistemas. Algo interesante es que las secuencias de este clado estuvieron presentes principalmente en el sitio YR y un poco menos abundantes en el sitio PC, sin embargo, no estuvieron presentes en el sitio PR (Anexo 8). El segundo clado con mayor número de secuencias (22/76) estuvo mayormente relacionado al género *Methanosalsum*, este incluyó a los ASVs con mayor abundancia en los tres sitios, pero solo se asignaron hasta nivel de Dominio (Archaea). El género *Methanosalsum* se encuentra dentro del filo Euryarchaeota, por lo que lo más probable es que estos ASVs, así como la mayoría, estén dentro de este filo, pero no se haya logrado asignar. Se puede inferir entonces que estos ASVs de gran abundancia tengan un metabolismo metilotrófico, lo cual es esperado en estos ecosistemas (Sela-Adler et al., 2017). Los siguientes clados estuvieron principalmente relacionados a *Methanocaldococcus jannaschii* (12/76 secuencias) y al género *Methanobacterium* (10/76 secuencias); los ASVs que conformaron a estos clados estuvieron presentes en los tres sitios, pero con mayor abundancia en el sitio PR. Ambos grupos son hidrogenotróficos (Susanti et al., 2019; Yu et al., 2020), por lo que se puede inferir que este metabolismo esté presente en el sitio PR. Finalmente, se encontró un clado de 4 secuencias asociadas al género *Methanohalobium*, presentes únicamente en el sitio YR, reafirmando la inferencia de que en este sitio la alta salinidad favoreció el crecimiento de grupos de arqueas metanogénicas halófilas (Kallistova et al., 2020). También se observaron secuencias únicas cercanas a *Methanocella paludicola* en el sitio PC, al género *Methanococcoides* en el sitio YR y a los géneros *Methanomicrobium*

y *Methanlobus* en estos dos sitios, lo cual sugiere la presencia de grupos principalmente metilotróficos e hidrogenotróficos (Sakai et al., 2011; Jing et al., 2016), mientras que el metabolismo acetoclástico no se vio representado en estas secuencias.

Bacterias metanotróficas

Se infiere que los sedimentos de manglares de la Península de Yucatán analizados en este trabajo cuentan con bajas abundancias de bacterias metanotróficas, debido a la baja detección del gen *pmoA* (Fig. 15) y a que no fue posible secuenciar ninguno de los genes marcadores (*pmoA* y *mmoX*) para ninguna de las muestras. En otros trabajos se reportan mayores abundancias de bacterias metanotróficas que arqueas metanogénicas en sedimentos de manglares (Padhy et al., 2022), por lo que las condiciones fisicoquímicas en los sitios analizados en este trabajo pudieron favorecer mayormente la presencia de arqueas metanogénicas.

El gen *pmoA* fue mayormente detectado en el sitio PC (Fig. 15), por lo que se espera que sea más abundante en sitios de manglar con un mayor desarrollo de la vegetación, como se ha visto en otros estudios (Padhy et al., 2022). Es posible que las bacterias metanotróficas en este sitio se hayan visto favorecidas por las condiciones de oxidación observadas por el nivel de potencial redox más alto que en los otros sitios de estudio (Tabla 6). Por otro lado, el gen *mmoX* no fue detectado en ninguno de los sitios. Este gen está presente en los metanótrofos de tipo II y algunos del tipo I del género *Methylococcus*, además está presente de manera exclusiva en los géneros *Methylocella* y *Methyloferula*, es decir que estos son los únicos géneros que carecen del gen *pmoA* (Inagaki et al., 2004). Al no haber sido detectado este gen en ninguna de las muestras se sugiere que en los sitios estudiados existe una menor presencia de bacterias metanotróficas tipo II. Las bacterias metanotróficas tipo I son más comunes en suelos con menor contenido de agua, es decir en ambientes ricos en oxígeno, mientras que, el tipo II sobrevive en condiciones con poco oxígeno (Henckel et al., 2001).

A partir de las secuencias obtenidas del gen *16S rRNA* se detectó la presencia de únicamente dos grupos de bacterias metanotróficas (Tabla 9). La familia Methylacidiphilaceae, que pertenece al filo Verrucomicrobia, las cuales son bacterias metanotróficas tipo X, fue detectada en muestras de los sitios PC y YR. Los miembros de esta familia son mesofílicos

o termofílicos y está reportado que crecen a pH 0.6 – 6.0, además de que todos los géneros de esta familia han sido detectados en ecosistemas volcánicos ácidos (Awala et al., 2023), por lo que este trabajo aporta evidencia de su detección en sedimentos de manglares con pH alcalino. Por otro lado, se observó la presencia de la familia Methylospiraceae únicamente en el sitio PR. Los miembros de esta familia son bacterias metanotróficas anaerobias que han sido detectados en distintos ecosistemas terrestres y marinos, utilizan nitrito como aceptor de electrones para la oxidación de metano (Gontijo et al., 2021; Shi et al., 2022; Peres et al., 2023) lo cual se puede relacionar con los niveles altos de nitrógeno total encontrados en este sitio. Estas dos familias podrían ser las principales responsables del consumo de metano producido por las arqueas metanogénicas.

La presencia de bacterias metanotróficas tipo X en bajas abundancias relativas en sedimentos de manglares es inusual debido a que son acidófilas y generalmente habitan ambientes geotermales (Op Den Camp et al., 2009). En otros estudios en manglares se reportan únicamente bacterias metanotróficas de tipo I y tipo II (Shiau et al., 2018; Do Carmo Linhares et al., 2021; Padhy et al., 2022), mientras que en este estudio se pudo haber favorecido la presencia de las tipo X por las altas temperaturas observadas (Tabla 6), lo cual ya se ha reportado en otros estudios (Roldán et al., 2022).

En el estudio de Shiau *et al.* (2018) las secuencias dominantes correspondieron a bacterias metanotróficas del *cluster deep-sea-5* (tipo I) y este fue más abundante en manglares de franja que en manglares chaparros de Taiwán, mientras que los géneros *Methylobacter* (tipo I) y *Methylocystis* (tipo II) fueron más abundantes en el manglar chaparro (Shiau et al., 2018). En manglares de India se encontró que *Methylobacterium* (tipo II) fue el género dominante en manglares perturbados, mientras que *Methylophaga* (tipo I) fue el género dominante en manglares conservados, seguido de *Methylobacterium* y *Methyloligella* (ambos tipo II). Además, la abundancia total de bacterias metanotróficas fue mayor en manglares degradados comparado con manglares conservados. Sin embargo, la proporción de metanótrofos:metanogénas fue mayor en manglares conservados que en perturbados (Padhy et al., 2022). Debido a la falta de secuenciación de los genes *pmoA* y *mmoX*, con este trabajo aún no se tiene claro qué otros grupos de bacterias metanotróficas están presentes en los sedimentos de manglares de la Península de Yucatán y contribuyen a la oxidación de metano

en estos sitios. Para lograr la secuenciación de los genes marcadores se propone hacer enriquecimientos de estas poblaciones en medios de cultivo para que se logren amplificar de mejor manera, lo cual ya se ha hecho en otros estudios (Shiau et al., 2018).

Se espera que con la secuenciación de los genes marcadores se detecten grupos de bacterias metanotróficas tipo I, ya que estos habitan en suelos con un suministro limitado de metano, lo cual se puede esperar en estos sitios ya que los ecosistemas costeros liberan menos metano que los de agua dulce por la presencia de sulfato (Shiau et al., 2018) y debido a que se observó una menor diversidad de arqueas metanogénicas comparado con otros sitios (Yu et al., 2020; Padhy et al., 2022), lo cual se puede correlacionar con una baja producción de metano. Sin embargo, en otros sitios se reporta que el crecimiento y abundancia de bacterias metanotróficas tipo I se ve inhibido por niveles altos de nitrógeno total y de salinidad (Jang et al., 2011; Yu et al., 2020), condiciones que fueron observadas en los sitios de estudio y que pudieron haber provocado una disminución en las poblaciones de estas bacterias.

Finalmente, se ha reportado que las comunidades metanotróficas en estos ecosistemas se ven afectadas principalmente por la salinidad, el sulfato, el pH y el contenido de nitrógeno (Yu et al., 2020). Es posible que las diferencias fisicoquímicas entre los sitios hayan afectado la composición de bacterias metanotróficas, resultando en diferencias en la actividad de oxidación del metano. En el estudio de Zhang *et al.* (2019) se vio que las copias detectadas del gen *pmoA* aumentaban en suelos más húmedos debido a que las condiciones anóxicas hacen que aumente la actividad metanogénica y esto facilita la actividad metanotrófica cerca de la interfase óxica (Zhang et al., 2019). Posiblemente entonces en estos sitios sea más fácil detectarlos cuando el nivel de inundación es mayor.

Potencial genético de las rutas metanogénicas y metanotróficas

Al comparar las abundancias de los genes *mcrA* y *pmoA* en los distintos sitios se observó que en los sitios PC y PR está mayormente representada la actividad de oxidación del metano, mientras que en el sitio YR está mayormente representado el potencial de actividad metanogénica (Tabla 10 y 11). La diversidad y abundancia de comunidades metanogénicas y metanotróficas se correlacionan de forma positiva, respectivamente, con la producción y oxidación de metano, es decir que una alta diversidad de comunidades metanogénicas y

metanotróficas promueve una mayor actividad (Schnyder et al., 2018; Sierocinski et al., 2018; Meyer et al., 2019).

Las muestras analizadas del sitio PC fueron las que tuvieron un mayor número promedio de copias del gen *pmoA* (Tabla 11), lo cual se esperaba ya que fue el sitio donde se detectó una mayor abundancia de este gen. Sin embargo, a pesar de que también fue el sitio con la mayor diversidad metabólica de arqueas metanogénicas, el sitio YR fue en el que se encontró un mayor número de copias del gen *mcrA* (Tabla 10), sugiriendo que existe una mayor actividad potencial de metanogénesis. Por otro lado, en el sitio PR se vio una contradicción entre la abundancia de bacterias metanotróficas y su actividad potencial observada. Sin embargo, fue el sitio donde se detectó una menor diversidad de arqueas metanogénicas, lo cual se correlaciona con lo observado por qPCR, ya que en la muestra de este sitio se observó el menor número de copias del gen *mcrA*, lo cual sugiere que en este sitio la actividad metanogénica es baja.

Estudios previos han mostrado que los contenidos altos de nutrientes pueden decrementar la diversidad de comunidades microbianas involucradas en el ciclo del metano, pero puede aumentar sus abundancias y también puede cambiar su composición. Además, se ha visto que las salinidades altas decrementan la abundancia de bacterias metanotróficas, mientras que aumenta la abundancia relativa de arqueas metanogénicas metilotróficas (Yu et al., 2020), lo cual coincide con lo observado en este estudio. En este estudio el fósforo total, el carbono total y el contenido de arena fueron los factores que tuvieron una mayor influencia en las comunidades microbianas entre sitios (Fig. 9), por lo que también pudieron tener un efecto en la abundancia y actividad de comunidades relacionadas con el ciclo del metano.

Además, los sitios se caracterizaron por bajos niveles de materia orgánica, altos niveles de nitrógeno y una alta abundancia de grupos de bacterias sulfatoreductoras, lo cual pudo decrementar la abundancia de bacterias metanotróficas y cambiar la composición de arqueas metanogénicas entre sitios, posiblemente teniendo un efecto en la actividad de estas. Se ha visto que las diferencias en la composición de arqueas metanogénicas resulta en diferencias en la capacidad de producción de metano en humedales (Yuan et al., 2014), lo cual se espera que ocurra en estos sitios. Además, el contenido de nitrógeno total ha sido correlacionado negativamente con la diversidad de bacterias metanotróficas (Zhang et al., 2019) y se ha

reportado que las altas concentraciones de amonio tienen un efecto inhibitorio en la actividad de bacterias metanotróficas debido a que las enzimas metano monooxigenasas (MMO) no solo oxidan el metano, sino que también actúan sobre los iones de amonio (Jang et al., 2011; Broman et al., 2020).

En general, el aumento en la diversidad de comunidades metanogénicas y decremento en abundancia de metanotróficas observado a lo largo de los sitios podría resultar en una mayor producción de metano y una menor oxidación. Sin embargo, es importante tener en cuenta que la detección de estos genes marcadores en muestras de DNA de los sedimentos no necesariamente implica que la actividad que estos representan está presente, debido a que el DNA puede permanecer estable en células muertas y aparte estos genes pueden estar presentes pero sin ser expresados (Cebren et al., 2007). Con un análisis de los transcritos de estos marcadores (RT-qPCR) se podría tener resultados más claros del número de copias de genes que están siendo expresados por las comunidades microbianas y que representan de manera más directa la actividad de síntesis y consumo de metano.

CONCLUSIONES

En este trabajo, se reporta por primera vez la estructura, composición y la actividad potencial, basado en el número de copias de genes funcionales, de comunidades de arqueas metanogénicas y bacterias metanotróficas en sedimentos asociados a *Avicennia germinans* en tres sitios restaurados de la Península de Yucatán. Los análisis de comunidades microbianas sugieren que estas comunidades de microorganismos corresponden a la biósfera rara de estos ecosistemas, por ser grupos extremadamente diversos, pero con muy baja abundancia relativa.

Los tres sitios analizados en este trabajo se caracterizaron por tener condiciones hipersalinas, pH alcalino, una alta temperatura en el agua circundante y mostraron un bajo contenido de materia orgánica y un alto contenido de nitrógeno. Además, a pesar de que los tres sitios analizados en este estudio tuvieron las mismas acciones de restauración ecológica alrededor del año 2010, se observaron diferencias en algunas variables ambientales, que potencialmente pueden estar influenciando la composición y actividad microbiana. El sitio YR presentó un mayor contenido de P total, lo cual sugiere un mayor aporte de nutrientes; mientras que, el sitio PC presentó un mayor contenido de materia orgánica y carbono total comparado con los otros sitios, lo cual indica un mayor almacenamiento de carbono.

La diversidad y riqueza de las comunidades microbianas fueron similares para los tres sitios analizados, sin embargo, se detectaron diferencias en su estructura y composición que, con base en el análisis de dbRDA, estuvieron relacionadas principalmente con el contenido de fósforo total, de carbono total y de arenas. Los grupos de microorganismos abundantemente diferenciales entre sitios correspondieron principalmente a grupos de bacterias sulfatoreductoras como *Desulfotignum*, Desulfosarcinaceae y Desulfocapsaceae.

Las comunidades de arqueas metanogénicas estuvieron dominadas por miembros del orden Methanosarcinales en todos los sitios de estudio, por lo que se considera que el metabolismo metanogénico a partir de compuestos metilados puede ser el mejor representado en los tres sitios analizados. No obstante, en este trabajo se reportó la presencia de los 4 tipos de metabolismos para el sitio PC, sugiriendo que estos microorganismos pueden coexistir junto con las bacterias sulfatoreductoras a pesar de la competencia por sustratos. El sitio YR se

caracterizó por la presencia de arqueas metanogénicas halófilas y el sitio PR tuvo la menor diversidad metabólica de arqueas metanogénicas.

Se reportó por primera vez la presencia de los géneros *Methanohalobium*, *Ca.-Methanosuratincola* y *Methanomicrobium* en sedimentos de manglares y se sugiere la presencia de nuevos *clusters* de arqueas metanogénicas sin descripción previa, posiblemente específicos de estos ecosistemas.

Se detectó la presencia de dos familias de bacterias metanotróficas a partir de las secuencias obtenidas del gen *16S rRNA*: la familia Methylacidiphilaceae (tipo X), en los sitios PC y YR y la familia Methylomirabilaceae (ANME), en el sitio PR. Además, se detectó el gen *pmoA* principalmente en el sitio PC, mientras que el gen *mmoX* no fue detectado en ninguno de los sitios; lo cual indica una mayor abundancia de bacterias metanotróficas en sitios con una mayor recuperación de la vegetación.

Con base en la cuantificación de genes funcionales, se sugiere una mayor actividad de oxidación aerobia del metano en el sitio PC, sin embargo, estos microorganismos se encontraron en bajas abundancias. Para el sitio PR también se detectó la presencia del gen funcional relacionado con la oxidación aerobia del metano, sin embargo, no se logró detectar la presencia de estos microorganismos; mientras que, para el sitio YR se estimó una mayor potencial actividad metanogénica y se detectó la presencia de bacterias metanotróficas, aunque estuvieron en bajas abundancias y con baja actividad.

PERSPECTIVAS

Los resultados presentados en esta tesis conforman un avance en el conocimiento de las comunidades de arqueas metanogénicas y bacterias metanotróficas en sedimentos de manglares de la Península de Yucatán. Sin embargo, estos resultados están limitados a lo que se pudo observar durante un único muestreo durante una temporada específica del año. Es necesario hacer un estudio con escala temporal, tomando muestras de los sedimentos durante cada temporada (lluvias, secas y nortes) para analizar cómo varían estas comunidades junto con las variaciones ambientales a lo largo de estas temporadas. Además, se podrían hacer comparaciones entre distintos sitios, donde se podrían incluir sitios como Sisal, Celestún y Dzilam de Bravo, ya que, al igual que Progreso y Yucalpetén corresponden a sitios donde ocurrió una perturbación en los manglares y después se llevaron a cabo acciones de restauración.

En futuros estudios es necesario un mayor tamaño de muestra para la medición de las variables fisicoquímicas, para tener una mayor representatividad de los sitios y disminuir la variación dentro de cada sitio. Se recomienda tomar en cuenta la medición del hidropериодо (tiempo, duración y nivel de inundación), la densidad aparente, y la cantidad de carbono orgánico e inorgánico.

Además, para llevar a cabo el muestreo en cada sitio se recomienda tomar en cuenta las distintas condiciones del manglar: conservado, restaurado y degradado; lo cual permite tener una mejor comparación, tanto de los efectos de la degradación del manglar, como de los efectos de las acciones de restauración en las comunidades microbianas relacionadas al ciclo del metano y su actividad. Se propone también la medición de metano *in situ* con la utilización de cámaras medidores de gas en campo para correlacionarlo con la diversidad, la composición y la actividad de arqueas metanogénicas y bacterias metanotróficas; así como tomar muestras de sedimento a distintas profundidades para medir cómo cambia la producción de metano en estas zonas.

Finalmente, se propone realizar enriquecimientos de bacterias metanotróficas en medios de cultivo para lograr la secuenciación de los genes marcadores *pmoA* y *mmoX* y obtener información sobre la diversidad taxonómica de estos microorganismos encontrada en sedimentos de manglares de la Península de Yucatán. Además, con estos enriquecimientos

se podrían seguir líneas de investigación sobre aplicaciones biotecnológicas de estos microorganismos, como la biorremediación de distintos contaminantes o la producción de polihidroxicanoatos.

REFERENCIAS

Acosta Velázquez, J., Cerdeira Estrada, S., Cruz López, M. I., Díaz Gallegos, J., Galindo Leal, C., Jiménez Rosenberg, R., Márquez Mendoza, J. D., Ressler, R., Rodríguez Zúñiga, M. T., & Troche Souza, C. (2013). Manglares de México: Extensión, distribución y monitoreo. Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad (CONABIO).

Agraz-Hernández, C. M., Noriega-Trejo, R., López-Portillo, J., Flores-Verdugo, F.J., Jiménez-Zacariás, J.J., (2006). Identificación de los manglares en México: Guía de campo. Universidad Autónoma de Campeche. 45p.

Agraz-Hernández, C. M., Chan-Keb, C. A., Muñoz-Salazar, R., Pérez-Balan, R. A., Osti-Sáenz, J., Gutiérrez-Alcántara, E. J., Reyes-Castellano, J. E., May-Colli, L. O., Conde-Medina, K. P., & Ruiz-Hernández, J. (2020). Relationship between blue carbon and methane and the hydrochemistry of mangroves in southeast Mexico. *Applied Ecology and Environmental Research*, 18(1), 1091-1106. https://doi.org/10.15666/aeer/1801_10911106

Agraz-Hernández, C. M., Chan-Keb, C. A., Muñoz-Salazar, R., Pérez-Balan, R. A., Vanegas, G. P., Manzanilla, H. G., Osti-Sáenz, J., & del Río Rodríguez, R. (2022). Pore Water Chemical Variability and Its Effect on Phenological Production in Three Mangrove Species under Drought Conditions in Southeastern Mexico. *Diversity*, 14(8), 668. <https://doi.org/10.3390/d14080668>

Al-Haj, A. N., & Fulweiler, R. W. (2020). A synthesis of methane emissions from shallow vegetated coastal ecosystems. *Global Change Biology*, 26(5), 2988-3005. <https://doi.org/10.1111/gcb.15046>

Alongi, D. M. (2002). Present state and future of the world's mangrove forests. *Environmental Conservation*, 29(3), 331-349. <https://doi.org/10.1017/S0376892902000231>

Alongi, D. M. (2014). Carbon Cycling and Storage in Mangrove Forests. *Annual Review of Marine Science*, 6(1), 195-219. <https://doi.org/10.1146/annurev-marine-010213-135020>

Angel, R., Claus, P., & Conrad, R. (2012). Methanogenic archaea are globally ubiquitous in aerated soils and become active under wet anoxic conditions. *The ISME Journal*, 6(4), 847-862. <https://doi.org/10.1038/ismej.2011.141>

Arai, H., Inubushi, K., & Chiu, C.-Y. (2021). Dynamics of Methane in Mangrove Forest: Will It Worsen with Decreasing Mangrove Forests? *Forests*, 12(9), 1204. <https://doi.org/10.3390/f12091204>

Arai, H., Yoshioka, R., Hanazawa, S., Minh, V. Q., Tuan, V. Q., Tinh, T. K., Phu, T. Q., Jha, C. S., Rodda, S. R., Dadhwal, V. K., Mano, M., & Inubushi, K. (2016). Function of the methanogenic community in mangrove soils as influenced by the chemical properties of the hydrosphere. *Soil Science and Plant Nutrition*, 62(2), 150-163. <https://doi.org/10.1080/00380768.2016.1165598>

Awala, S. I., Gwak, J.-H., Kim, Y., Seo, C., Strazzulli, A., Kim, S.-G., & Rhee, S.-K. (2023). *Methylacidiphilum caldifontis* gen. Nov., sp. Nov., a thermoacidophilic methane-oxidizing bacterium from an acidic geothermal environment, and descriptions of the family Methylacidiphilaceae fam. Nov. And order Methylacidiphilales ord. Nov. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 73(10). <https://doi.org/10.1099/ijsem.0.006085>

Ballesteros, H. O. B., & Aristizabal, G. E. L. (2007). Información técnica sobre gases de efecto invernadero y el cambio climático. Instituto de Hidrología y Estudios Ambientales – IDEAM. 102 p.

Banciu, H. L., Gridan, I. M., Zety, A. V., & Baricz, A. (2022). Asgard archaea in saline environments. *Extremophiles*, 26(2), 21. <https://doi.org/10.1007/s00792-022-01266-z>

Banerjee, K., Bal, G., & Mitra, A. (2018). How Soil Texture Affects the Organic Carbon Load in the Mangrove Ecosystem? A Case Study from Bhitarkanika, Odisha. En V. P. Singh, S. Yadav, & R. N. Yadava (Eds.), *Environmental Pollution* (Vol. 77, pp. 329-341). Springer Singapore. https://doi.org/10.1007/978-981-10-5792-2_27

Bhattacharai, S., Cassarini, C., & Lens, P. N. L. (2019). Physiology and Distribution of Archaeal Methanotrophs That Couple Anaerobic Oxidation of Methane with Sulfate Reduction. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 83(3), e00074-18. <https://doi.org/10.1128/MMBR.00074-18>

Biswas, P. L., & Biswas, S. R. (2021). Mangrove Forests: Ecology, Management, and Threats. <https://doi.org/10.1007/978-3-319-95981-8>

Bouyoucos, G. J. (1927). The hydrometer as a new method for the mechanical analysis of soils. *Soil Sci*, 343-354.

Bräuer, S., Basiliko, N., M. P. Siljanen, H., & H. Zinder, S. (2020). Methanogenic archaea in peatlands. *FEMS Microbiology Letters*, 367(20), fnaa172. <https://doi.org/10.1093/femsle/fnaa172>

Broman, E., Sun, X., Stranne, C., Salgado, M. G., Bonaglia, S., Geibel, M., Jakobsson, M., Norkko, A., Humborg, C., & Nascimento, F. J. A. (2020). Low Abundance of Methanotrophs in Sediments of Shallow Boreal Coastal Zones With High Water Methane Concentrations. *Frontiers in Microbiology*, 11, 1536. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.01536>

Cadena Rodriguez, S. (2021). Microbial Diversity in Coastal Ecosystems and Assessment of Elevated Water Temperature and Acidification in Microbial Mats. Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional Unidad Mérida. 131 p.

Cameron, C., Hutley, L. B., & Friess, D. A. (2019). Estimating the full greenhouse gas emissions offset potential and profile between rehabilitating and established mangroves. *Science of The Total Environment*, 665, 419-431. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2019.02.104>

Cameron, C., Hutley, L. B., Munksgaard, N. C., Phan, S., Aung, T., Thinn, T., Aye, W. M., & Lovelock, C. E. (2021). Impact of an extreme monsoon on CO₂ and CH₄ fluxes from mangrove soils of the Ayeyarwady Delta, Myanmar. *Science of The Total Environment*, 760, 143422. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.143422>

Canty, A., & Ripley, B. (2022). boot: Bootstrap R (S-Plus) Functions. R package version 1.3-28.1.

Cebron, A., Bodrossy, L., Chen, Y., Singer, A. C., Thompson, I. P., Prosser, J. I., & Murrell, J. C. (2007). Identity of active methanotrophs in landfill cover soil as revealed by DNA-stable isotope probing: Methanotrophs in landfill soil. *FEMS Microbiology Ecology*, 62(1), 12-23. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6941.2007.00368.x>

- Cheng, H., Mai, Z., Wang, Y., Liu, D., & Sun, Y. (2022). Role of extracellular polymeric substances in metal sequestration during mangrove restoration. *Chemosphere*, 306, 135550. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2022.135550>
- Chowdhury, T. R., & Dick, R. P. (2013). Ecology of aerobic methanotrophs in controlling methane fluxes from wetlands. *Applied Soil Ecology*, 65, 8-22. <https://doi.org/10.1016/j.apsoil.2012.12.014>
- Chu, Y.-X., Ma, R.-C., Wang, J., Zhu, J.-T., Kang, Y.-R., & He, R. (2020). Effects of oxygen tension on the microbial community and functional gene expression of aerobic methane oxidation coupled to denitrification systems. *Environmental Science and Pollution Research*, 27(11), 12280-12292. <https://doi.org/10.1007/s11356-020-07767-8>
- Chuang, P. -C., Young, M. B., Dale, A. W., Miller, L. G., Herrera-Silveira, J. A., & Paytan, A. (2017). Methane fluxes from tropical coastal lagoons surrounded by mangroves, Yucatán, Mexico. *Journal of Geophysical Research: Biogeosciences*, 122(5), 1156-1174. <https://doi.org/10.1002/2017JG003761>
- Çinar, S., & Mutlu, M. B. (2020). Prokaryotic Community Compositions of the Hypersaline Sediments of Tuz Lake Demonstrated by Cloning and High-Throughput Sequencing. *Microbiology*, 89(6), 756-768. <https://doi.org/10.1134/S0026261720060028>
- Cinco-Castro, S., & Herrera-Silveira, J. (2020). Vulnerability of mangrove ecosystems to climate change effects: The case of the Yucatan Peninsula. *Ocean & Coastal Management*, 192, 105196. <https://doi.org/10.1016/j.ocecoaman.2020.105196>
- CONABIO. (2021). Distribución de los manglares en México. Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad. 11 p.
- CONABIO. (2022). Extensión y distribución de manglares. Biodiversidad Mexicana. <https://www.biodiversidad.gob.mx/monitoreo/smmm/extensionDist>
- Cotta, S. R., Cadete, L. L., van Elsas, J. D., Andreote, F. D., & Dias, A. C. F. (2019). Exploring bacterial functionality in mangrove sediments and its capability to overcome anthropogenic activity. *Marine Pollution Bulletin*, 141, 586-594. <https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2019.03.001>

- Dai, L., Liu, C., Peng, L., Song, C., Li, X., Tao, L., & Li, G. (2021). Different distribution patterns of microorganisms between aquaculture pond sediment and water. *Journal of Microbiology*, 59(4), 376-388. <https://doi.org/10.1007/s12275-021-0635-5>
- De Santana, C. O., Spealman, P., Melo, V. M. M., Gresham, D., De Jesus, T. B., & Chinalia, F. A. (2021). Effects of tidal influence on the structure and function of prokaryotic communities in the sediments of a pristine Brazilian mangrove. *Biogeosciences*, 18(7), 2259-2273. <https://doi.org/10.5194/bg-18-2259-2021>
- Deutzmann, J. S., Wörner, S., & Schink, B. (2011). Activity and Diversity of Methanotrophic Bacteria at Methane Seeps in Eastern Lake Constance Sediments. *Applied and Environmental Microbiology*, 77(8), 2573-2581. <https://doi.org/10.1128/AEM.02776-10>
- Do Carmo Linhares, D., Saia, F. T., Duarte, R. T. D., Nakayama, C. R., De Melo, I. S., & Pellizari, V. H. (2021). Methanotrophic Community Detected by DNA-SIP at Bertioga's Mangrove Area, Southeast Brazil. *Microbial Ecology*, 81(4), 954-964. <https://doi.org/10.1007/s00248-020-01659-7>
- Dung, L. V., Tue, N. T., Nhuan, M. T., & Omori, K. (2016). Carbon storage in a restored mangrove forest in Can Gio Mangrove Forest Park, Mekong Delta, Vietnam. *Forest Ecology and Management*, 380, 31-40. <https://doi.org/10.1016/j.foreco.2016.08.032>
- Evans, P. N., Boyd, J. A., Leu, A. O., Woodcroft, B. J., Parks, D. H., Hugenholtz, P., & Tyson, G. W. (2019). An evolving view of methane metabolism in the Archaea. *Nature Reviews Microbiology*, 17(4), 219-232. <https://doi.org/10.1038/s41579-018-0136-7>
- Farhan Ul Haque, M., Crombie, A. T., Ensminger, S. A., Baciú, C., & Murrell, J. C. (2018). Facultative methanotrophs are abundant at terrestrial natural gas seeps. *Microbiome*, 6(1), 118. <https://doi.org/10.1186/s40168-018-0500-x>
- Fonseca, A., Espinoza, C., Nielsen, L. P., Marshall, I. P. G., & Gallardo, V. A. (2022). Bacterial community of sediments under the Eastern Boundary Current System shows high microdiversity and a latitudinal spatial pattern. *Frontiers in Microbiology*, 13, 1016418. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2022.1016418>

Freitag, T. E., Toet, S., Ineson, P., & Prosser, J. I. (2010). Links between methane flux and transcriptional activities of methanogens and methane oxidizers in a blanket peat bog: Methane flux and transcriptional activities in a peat bog. *FEMS Microbiology Ecology*, no-no. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6941.2010.00871.x>

Gao, C.-H., Zhang, S., Ding, Q.-S., Wei, M.-Y., Li, H., Li, J., Wen, C., Gao, G.-F., Liu, Y., Zhou, J.-J., Zhang, J.-Y., You, Y.-P., & Zheng, H.-L. (2021). Source or sink? A study on the methane flux from mangroves stems in Zhangjiang estuary, southeast coast of China. *Science of The Total Environment*, 788, 147782. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2021.147782>

García-Maldonado, J. Q., Bebout, B. M., Everroad, R. C., & López-Cortés, A. (2015). Evidence of Novel Phylogenetic Lineages of Methanogenic Archaea from Hypersaline Microbial Mats. *Microbial Ecology*, 69(1), 106-117. <https://doi.org/10.1007/s00248-014-0473-7>

García-Maldonado, J. Q., Latisnere-Barragán, H., Escobar-Zepeda, A., Cadena, S., Ramírez-Arenas, P. J., Vázquez-Juárez, R., Rojas-Contreras, M., & López-Cortés, A. (2023). Revisiting Microbial Diversity in Hypersaline Microbial Mats from Guerrero Negro for a Better Understanding of Methanogenic Archaeal Communities. *Microorganisms*, 11(3), 812. <https://doi.org/10.3390/microorganisms11030812>

Ghizelini, A. M., Mendonça-Hagler, L. C. S., & Macrae, A. (2012). Microbial diversity in Brazilian mangrove sediments: A mini review. *Brazilian Journal of Microbiology*, 43(4), 1242-1254. <https://doi.org/10.1590/S1517-83822012000400002>

Gómez-Acata, E. S., Teutli, C., Falcón, L. I., García-Maldonado, J. Q., Prieto-Davó, A., Yanez-Montalvo, A., Cadena, S., Chiappa-Carrara, X., & Herrera-Silveira, J. A. (2023). Sediment microbial community structure associated to different ecological types of mangroves in Celestún, a coastal lagoon in the Yucatan Peninsula, Mexico. *PeerJ*, 11, e14587. <https://doi.org/10.7717/peerj.14587>

Gontijo, J. B., Paula, F. S., Venturini, A. M., Yoshiura, C. A., Borges, C. D., Moura, J. M. S., Bohannon, B. J. M., Nüsslein, K., Rodrigues, J. L. M., & Tsai, S. M. (2021). Not just a methane source: Amazonian floodplain sediments harbour a high diversity of methanotrophs

with different metabolic capabilities. *Molecular Ecology*, 30(11), 2560-2572.
<https://doi.org/10.1111/mec.15912>

Guerrero-Cruz, S., Vaksmaa, A., Horn, M. A., Niemann, H., Pijuan, M., & Ho, A. (2021). Methanotrophs: Discoveries, Environmental Relevance, and a Perspective on Current and Future Applications. *Frontiers in Microbiology*, 12, 678057.
<https://doi.org/10.3389/fmicb.2021.678057>

Hatzenpichler, R., Kohtz, A., Krukenberg, V., Petrosian, N., Jay, Z., & Pilhofer, M. (2023). Cultivation and visualization of a methanogen of the phylum Thermoproteota [Preprint]. In Review. <https://doi.org/10.21203/rs.3.rs-2500102/v1>

He, Z., Peng, Y., Guan, D., Hu, Z., Chen, Y., & Lee, S. Y. (2018). Appearance can be deceptive: Shrubby native mangrove species contributes more to soil carbon sequestration than fast-growing exotic species. *Plant and Soil*, 432(1-2), 425-436.
<https://doi.org/10.1007/s11104-018-3821-4>

Henckel, T., Jäckel, U., & Conrad, R. (2001). Vertical distribution of the methanotrophic community after drainage of rice field soil. *FEMS Microbiology Ecology*, 34(3), 279-291.
<https://doi.org/10.1111/j.1574-6941.2001.tb00778.x>

Hernández, M. E., & Moreno-Casasola Barceló, P. (2018). Almacenes y flujos de carbono en humedales de agua dulce en México. *Madera y Bosques*, 24.
<https://doi.org/10.21829/myb.2018.2401881>

Herrera-Silveira, J. (2012). Rehabilitación de manglares en el Estado de Yucatán sometidos a diferentes condiciones hidrológicas y nivel de impacto: el caso de Celestún y Puerto Progreso. *Centro de Investigación y de Estudios Avanzados-Mérida*, 72.

Herrera-Silveira, J. A., & Morales-Ojeda, S. (2010). Lagunas Costeras. En R. Durán y M. Méndez (Eds.), *Biodiversidad y desarrollo humano en Yucatán*. Mérida: CICY, PPD-FMAM, CONABIO, SEDUMA.

Herrera-Silveira, J. A., Pech-Cardenas, M. A., Morales-Ojeda, S. M., Cinco-Castro, S., Camacho-Rico, A., Caamal Sosa, J. P., Mendoza-Martinez, J. E., Pech-Poot, E. Y., Montero,

- J., & Teutli-Hernandez, C. (2020). Blue carbon of Mexico, carbon stocks and fluxes: A systematic review. *PeerJ*, 8, e8790. <https://doi.org/10.7717/peerj.8790>
- Horz, H.-P., Rich, V., Avrahami, S., & Bohannan, B. J. M. (2005). Methane-Oxidizing Bacteria in a California Upland Grassland Soil: Diversity and Response to Simulated Global Change. *Applied and Environmental Microbiology*, 71(5), 2642-2652. <https://doi.org/10.1128/AEM.71.5.2642-2652.2005>
- Huang, X.-F., Liu, Y. J., Dong, J.-D., Qu, L.-Y., Zhang, Y.-Y., Wang, F.-Z., Tian, X.-P., & Zhang, S. (2014). *Mangrovibacterium diazotrophicum* gen. Nov., sp. Nov., a nitrogen-fixing bacterium isolated from a mangrove sediment, and proposal of *Prolixibacteraceae* fam. Nov. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 64(Pt_3), 875-881. <https://doi.org/10.1099/ijs.0.052779-0>
- IEA. (2022). *Global Methane Tracker 2022*, IEA, Paris. <https://www.iea.org/reports/global-methane-tracker-2022>
- Inagaki, F., Tsunogai, U., Suzuki, M., Kosaka, A., Machiyama, H., Takai, K., Nunoura, T., Nealson, K. H., & Horikoshi, K. (2004). Characterization of C1 -Metabolizing Prokaryotic Communities in Methane Seep Habitats at the Kuroshima Knoll, Southern Ryukyu Arc, by Analyzing *pmoA*, *mmoX*, *mxoF*, *mcrA*, and 16S rRNA Genes. *Applied and Environmental Microbiology*, 70(12), 7445-7455. <https://doi.org/10.1128/AEM.70.12.7445-7455.2004>
- Iturbe-Espinoza, P., Bonte, M., Gundlach, E., Brandt, B. W., Braster, M., & Van Spanning, R. J. M. (2022). Adaptive changes of sediment microbial communities associated with cleanup of oil spills in Nigerian mangrove forests. *Marine Pollution Bulletin*, 176, 113406. <https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2022.113406>
- Jackson, M. L. (1964). *Análisis Químico de Suelos*. Omega Barcelona. 4ª Edición. 662 p.
- Jang, I., Lee, S., Zoh, K.-D., & Kang, H. (2011). Methane concentrations and methanotrophic community structure influence the response of soil methane oxidation to nitrogen content in a temperate forest. *Soil Biology and Biochemistry*, 43(3), 620-627. <https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2010.11.032>

- Jia, Z., Lipus, D., Burckhardt, O., Bussert, R., Sondermann, M., Bartholomäus, A., Wagner, D., & Kallmeyer, J. (2023). Enrichment of rare methanogenic Archaea shows their important ecological role in natural high-CO₂ terrestrial subsurface environments. *Frontiers in Microbiology*, 14, 1105259. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2023.1105259>
- Jing, H., Cheung, S., Zhou, Z., Wu, C., Nagarajan, S., & Liu, H. (2016). Spatial Variations of the Methanogenic Communities in the Sediments of Tropical Mangroves. *PLOS ONE*, 11(9), e0161065. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0161065>
- Joson, M. P., Comia, M. J., Cureg, M. K., & Navarrete, I. A. (2021). Comparative Assessment of Natural, Colonized and Planted Mangroves Disturbed by Lahar Deposition in Sasmuan, Pampanga, Philippines. *Engineering Journal*, 14(02).
- Kallistova, A., Merkel, A., Kanapatskiy, T., Boltyanskaya, Y., Tarnovetskii, I., Perevalova, A., Kevbrin, V., Samylina, O., & Pimenov, N. (2020). Methanogenesis in the Lake Elton saline aquatic system. *Extremophiles*, 24(4), 657-672. <https://doi.org/10.1007/s00792-020-01185-x>
- Kevorkian, R. T., Callahan, S., Winstead, R., & Lloyd, K. G. (2021). ANME -1 archaea may drive methane accumulation and removal in estuarine sediments. *Environmental Microbiology Reports*, 13(2), 185-194. <https://doi.org/10.1111/1758-2229.12926>
- Kreuzwieser, J., Buchholz, J., & Rennenberg, H. (2003). Emission of Methane and Nitrous Oxide by Australian Mangrove Ecosystems. *Plant Biology*, 5(4), 423-431. <https://doi.org/10.1055/s-2003-42712>
- Kumar, S., Stecher, G., & Tamura, K. (2016). MEGA7: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 7.0 for Bigger Datasets. *Molecular Biology and Evolution*, 33(7), 1870-1874. <https://doi.org/10.1093/molbev/msw054>
- Kumar, S. D., Santhanam, P., Ananth, S., Kaviyarasan, M., Dhanalakshmi, B., Park, M. S., & Kim, M.-K. (2017). Seasonal variation of physico-chemical parameters and phytoplankton diversity in the Muthukuda mangrove environment, southeast coast of India. 59. [10.6024/jmbai.2017.59.2.1964-0x](https://doi.org/10.6024/jmbai.2017.59.2.1964-0x)

- Kutty, S. N., Paul, T., Nandakumar T, P., & Chempakassery Devasia, S. (2023). Comparison of culturable and non-culturable bacterial diversity through metagenomic sequencing from the mangrove sediments in Kannur district, Kerala, India. *Ecological Genetics and Genomics*, 27, 100175. <https://doi.org/10.1016/j.egg.2023.100175>
- Lekphet, S., Nitorisavut, S., & Adsavakulchai, S. (2005). Estimating methane emissions from mangrove area in Ranong Province, Thailand.
- Lezcano, M. Á., Velázquez, D., Quesada, A., & El-Shehawy, R. (2017). Diversity and temporal shifts of the bacterial community associated with a toxic cyanobacterial bloom: An interplay between microcystin producers and degraders. *Water Research*, 125, 52-61. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2017.08.025>
- Li, H., Yang, Q., & Zhou, H. (2020). Niche Differentiation of Sulfate- and Iron-Dependent Anaerobic Methane Oxidation and Methylotrophic Methanogenesis in Deep Sea Methane Seeps. *Frontiers in Microbiology*, 11, 1409. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.01409>
- Li, W., Sangeetha, T., Han, X., Yan, W.-M., Yang, L., Zhao, J., Cai, W., & Yao, H. (2022). Tracking the diversity and interaction of methanogens in the energy recovery process of a full-scale wastewater treatment plant. *Environmental Research*, 211, 113010. <https://doi.org/10.1016/j.envres.2022.113010>
- Liu, C., Cui, Y., Li, X., & Yao, M. (2021). microeco: An R package for data mining in microbial community ecology. *FEMS Microbiology Ecology*, 97(2), fiae255.
- Liu, Q.-Q., Li, X.-L., Rooney, A. P., Du, Z.-J., & Chen, G.-J. (2014). *Tangfeifania diversioriginum* gen. Nov., sp. Nov., a representative of the family Draconibacteriaceae. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 64(Pt_10), 3473-3477. <https://doi.org/10.1099/ijs.0.066902-0>
- Liu, Y., & Whitman, W. B. (2008). Metabolic, Phylogenetic, and Ecological Diversity of the Methanogenic Archaea. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1125(1), 171-189. <https://doi.org/10.1196/annals.1419.019>
- Lovelock, C. E., Adame, M. F., Bennion, V., Hayes, M., O'Mara, J., Reef, R., & Santini, N. S. (2014). Contemporary Rates of Carbon Sequestration Through Vertical Accretion of

- Sediments in Mangrove Forests and Saltmarshes of South East Queensland, Australia. *Estuaries and Coasts*, 37(3), 763-771. <https://doi.org/10.1007/s12237-013-9702-4>
- Lyimo, T. J., & Pol, A. (2002). Methane Emission, Sulphide Concentration and Redox Potential Profiles in Mtoni Mangrove Sediment, Tanzania. 10.
- Madhav, S., Nazneen, S., & Singh, P. (Eds.). (2022). Coastal Ecosystems: Environmental importance, current challenges and conservation measures (Vol. 38). Springer International Publishing. <https://doi.org/10.1007/978-3-030-84255-0>
- Mai, Z., Ye, M., Wang, Y., Foong, S. Y., Wang, L., Sun, F., & Cheng, H. (2021). Characteristics of Microbial Community and Function With the Succession of Mangroves. *Frontiers in Microbiology*, 12, 764974. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2021.764974>
- Marshall, I. P. G., Starnawski, P., Cupit, C., Fernández Cáceres, E., Ettema, T. J. G., Schramm, A., & Kjeldsen, K. U. (2017). The novel bacterial phylum Calditrichaeota is diverse, widespread and abundant in marine sediments and has the capacity to degrade detrital proteins: Expansion of Calditrichaeota diversity. *Environmental Microbiology Reports*, 9(4), 397-403. <https://doi.org/10.1111/1758-2229.12544>
- Mater, L., Alexandre, M. R., Hansel, F. A., & Madureira, L. A. S. (2004). Assessment of lipid compounds and phosphorus in mangrove sediments of Santa Catarina Island, SC, Brazil. *Journal of the Brazilian Chemical Society*, 15(5), 725-734. <https://doi.org/10.1590/S0103-50532004000500019>
- McMurdie, Paul. J., & Homes, S. (2013). phyloseq: An R package for reproducible interactive analysis and graphics of microbiome census data. *PLoS ONE*, 8(4), e61217.
- Meng, S., Peng, T., Liu, X., Pratush, A., Wang, H., Huang, T., Gu, J.-D., & Hu, Z. (2022). Archaeal Communities of South China Mangroves and Their Potential Roles in the Nitrogen Cycle. *Geomicrobiology Journal*, 39(8), 697-704. <https://doi.org/10.1080/01490451.2022.2069890>
- Mikryukov, V. (2023). metagMisc: Miscellaneous functions for metagenomic analysis. R package.

- Mochimaru, H., Tamaki, H., Katayama, T., Imachi, H., Sakata, S., & Kamagata, Y. (2016). *Methanomicrobium antiquum* sp. Nov., a hydrogenotrophic methanogen isolated from deep sedimentary aquifers in a natural gas field. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 66(11), 4873-4877. <https://doi.org/10.1099/ijsem.0.001444>
- Moreno Martínez, A. (2022). Captura de carbono en suelo superficial de manglares restaurados en ambiente kárstico en la costa Norte de Yucatán. Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional Unidad Mérida.
- Munoz, R., Rosselló-Móra, R., & Amann, R. (2016). Revised phylogeny of Bacteroidetes and proposal of sixteen new taxa and two new combinations including Rhodothermaeota phyl. Nov. *Systematic and Applied Microbiology*, 39(5), 281-296. <https://doi.org/10.1016/j.syapm.2016.04.004>
- Muwawa, E. M., Obieze, C. C., Makonde, H. M., Jefwa, J. M., Kahindi, J. H. P., & Khasa, D. P. (2021). 16S rRNA gene amplicon-based metagenomic analysis of bacterial communities in the rhizospheres of selected mangrove species from Mida Creek and Gazi Bay, Kenya. *PLOS ONE*, 16(3), e0248485. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0248485>
- Navarrete-Euan, H., Rodríguez-Escamilla, Z., Pérez-Rueda, E., Escalante-Herrera, K., & Martínez-Núñez, M. A. (2021). Comparing Sediment Microbiomes in Contaminated and Pristine Wetlands along the Coast of Yucatan. *Microorganisms*, 9(4), 877. <https://doi.org/10.3390/microorganisms9040877>
- NOAA. (2022). Increase in atmospheric methane set another record during 2021. National Oceanic and Atmospheric Administration. <https://www.noaa.gov/news-release/increase-in-atmospheric-methane-set-another-record-during-2021#:~:text=Atmospheric%20methane%20levels%20averaged%201%2C895.7,than%20the%201984%2D2006%20period.>
- Núñez Farfán, J., Domínguez, C. A., Dirzo, R., & Eguiarte Fruns, L. E. (1997). Estudio genético de las poblaciones de *Rhizophora mangle* en México. Informe final SNIB-CONABIO proyecto No. B214.

Nyangan, L., Zainal, A. N. S., Pazi, A. M. M., & Gandaseca, S. (2019). Heavy metals in mangrove sediments along the Selangor River, Malaysia. *Forest and Society*, 3(2), 278. <https://doi.org/10.24259/fs.v3i2.6345>

Op Den Camp, H. J. M., Islam, T., Stott, M. B., Harhangi, H. R., Hynes, A., Schouten, S., Jetten, M. S. M., Birkeland, N., Pol, A., & Dunfield, P. F. (2009). Environmental, genomic and taxonomic perspectives on methanotrophic Verrucomicrobia. *Environmental Microbiology Reports*, 1(5), 293-306. <https://doi.org/10.1111/j.1758-2229.2009.00022.x>

Osorio-Olvera, L., Rioja-Nieto, R., Torres-Irineo, E., & Guerra-Martínez, F. (2023). Natural Protected Areas effect on the cover change rate of mangrove forests in the Yucatan Peninsula, Mexico. *Wetlands*, 43(5), 52. <https://doi.org/10.1007/s13157-023-01697-0>

Oxmann, J. F., Pham, Q. H., Schwendenmann, L., Stellman, J. M., & Lara, R. J. (2010). Mangrove reforestation in Vietnam: The effect of sediment physicochemical properties on nutrient cycling. *Plant and Soil*, 326(1-2), 225-241. <https://doi.org/10.1007/s11104-009-0003-4>

Padhy, S. R., Bhattacharyya, P., Dash, P. K., Nayak, S. K., Parida, S. P., Baig, M. J., & Mohapatra, T. (2022). Elucidation of dominant energy metabolic pathways of methane, sulphur and nitrogen in respect to mangrove-degradation for climate change mitigation. *Journal of Environmental Management*, 303, 114151. <https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2021.114151>

Palit, K., Rath, S., Chatterjee, S., & Das, S. (2022). Microbial diversity and ecological interactions of microorganisms in the mangrove ecosystem: Threats, vulnerability, and adaptations. *Environmental Science and Pollution Research*, 29(22), 32467-32512. <https://doi.org/10.1007/s11356-022-19048-7>

Parada, A. E., Needham, D. M., & Fuhrman, J. A. (2016). Every base matters: Assessing small subunit rRNA primers for marine microbiomes with mock communities, time series and global field samples: Primers for marine microbiome studies. *Environmental Microbiology*, 18(5), 1403-1414. <https://doi.org/10.1111/1462-2920.13023>

Peres, F. V., Paula, F. S., Bendia, A. G., Gontijo, J. B., De Mahiques, M. M., & Pellizari, V. H. (2023). Assessment of prokaryotic communities in Southwestern Atlantic deep-sea

sediments reveals prevalent methanol-oxidising Methylomirabilales. *Scientific Reports*, 13(1), 12782. <https://doi.org/10.1038/s41598-023-39415-9>

Pires, A. C. C., Cleary, D. F. R., Almeida, A., Cunha, Â., Dealtry, S., Mendonça-Hagler, L. C. S., Smalla, K., & Gomes, N. C. M. (2012). Denaturing gradient gel electrophoresis and barcoded pyrosequencing reveal unprecedented Archaeal diversity in mangrove sediment and rhizosphere samples. *Applied and Environmental Microbiology*, 78(16), 5520-5528. <https://doi.org/10.1128/AEM.00386-12>

Qin, Y., Wang, N., Zheng, L., Li, Q., Wang, L., Xu, X., & Yin, X. (2023). Study of Archaeal diversity in the Arctic Meltwater Lake Region. *Biology*, 12(7), 1023. <https://doi.org/10.3390/biology12071023>

Rivera-Monroy, V. H., Lee, S. Y., Kristensen, E., & Twilley, R. R. (Eds.). (2017). *Mangrove Ecosystems: A Global Biogeographic Perspective: Structure, Function, and Services*. Springer International Publishing. <https://doi.org/10.1007/978-3-319-62206-4>

Roldán, D. M., Carrizo, D., Sánchez-García, L., & Menes, R. J. (2022). Diversity and Effect of Increasing Temperature on the Activity of Methanotrophs in Sediments of Fildes Peninsula Freshwater Lakes, King George Island, Antarctica. *Frontiers in Microbiology*, 13, 822552. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2022.822552>

Romero-Uribe, H. M., López-Portillo, J., Reverchon, F., & Hernández, M. E. (2022). Effect of degradation of a black mangrove forest on seasonal greenhouse gas emissions. *Environmental Science and Pollution Research*, 29(8), 11951-11965. <https://doi.org/10.1007/s11356-021-16597-1>

Saderne, V., Geraldi, N. R., Macreadie, P. I., Maher, D. T., Middelburg, J. J., Serrano, O., Almahasheer, H., Arias-Ortiz, A., Cusack, M., Eyre, B. D., Fourqurean, J. W., Kennedy, H., Krause-Jensen, D., Kuwae, T., Lavery, P. S., Lovelock, C. E., Marba, N., Masqué, P., Mateo, M. A., Duarte, C. M. (2019). Role of carbonate burial in Blue Carbon budgets. *Nature Communications*, 10(1), 1106. <https://doi.org/10.1038/s41467-019-08842-6>

Sakai, S., Takaki, Y., Shimamura, S., Sekine, M., Tajima, T., Kosugi, H., Ichikawa, N., Tasumi, E., Hiraki, A. T., Shimizu, A., Kato, Y., Nishiko, R., Mori, K., Fujita, N., Imachi, H., & Takai, K. (2011). Genome Sequence of a Mesophilic Hydrogenotrophic Methanogen

- Methanocella paludicola, the First Cultivated Representative of the Order Methanocellales. PLoS ONE, 6(7), e22898. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0022898>
- Sanders, C. J., Smoak, J. M., Waters, M. N., Sanders, L. M., Brandini, N., & Patchineelam, S. R. (2012). Organic matter content and particle size modifications in mangrove sediments as responses to sea level rise. *Marine Environmental Research*, 77, 150-155. <https://doi.org/10.1016/j.marenvres.2012.02.004>
- Sela-Adler, M., Ronen, Z., Herut, B., Antler, G., Vigderovich, H., Eckert, W., & Sivan, O. (2017). Co-existence of Methanogenesis and Sulfate Reduction with Common Substrates in Sulfate-Rich Estuarine Sediments. *Frontiers in Microbiology*, 8, 766. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.00766>
- Sengupta, A., & Dick, W. A. (2017). Methanotrophic bacterial diversity in two diverse soils under varying land-use practices as determined by high-throughput sequencing of the pmoA gene. *Applied Soil Ecology*, 119, 35-45. <https://doi.org/10.1016/j.apsoil.2017.05.031>
- Serrano-Silva, N., Valenzuela-Encinas, C., Marsch, R., Dendooven, L., & Alcántara-Hernández, R. J. (2014). Changes in methane oxidation activity and methanotrophic community composition in saline alkaline soils. *Extremophiles*, 18(3), 561-571. <https://doi.org/10.1007/s00792-014-0641-1>
- Shi, M., Li, Q., Zhang, H., Sun, J., Zhang, J., & Song, X. (2022). Agroforestry alters the fluxes of greenhouse gases of Moso bamboo plantation soil. *Environmental Research Letters*, 17(11), 115003. <https://doi.org/10.1088/1748-9326/ac9acb>
- Shiau, Y.-J., Cai, Y., Lin, Y.-T., Jia, Z., & Chiu, C.-Y. (2018). Community Structure of Active Aerobic Methanotrophs in Red Mangrove (*Kandelia obovata*) Soils Under Different Frequency of Tides. *Microbial Ecology*, 75(3), 761-770. <https://doi.org/10.1007/s00248-017-1080-1>
- Shiau, Y.-J., & Chiu, C.-Y. (2020). Biogeochemical Processes of C and N in the Soil of Mangrove Forest Ecosystems. *Forests*, 11(5), 492. <https://doi.org/10.3390/f11050492>

- Sidik, F., Fernanda Adame, M., & Lovelock, C. E. (2019). Carbon sequestration and fluxes of restored mangroves in abandoned aquaculture ponds. *Journal of the Indian Ocean Region*, 15(2), 177-192. <https://doi.org/10.1080/19480881.2019.1605659>
- Smith. (2017). Ternary: An R Package for Creating Ternary Plots. Comprehensive R Archive Network. doi: 10.5281/zenodo.1068996
- Sollins, P., Glassman, C., Paul, E. A., Swanston, C., Lajtha, K., Heil, J. W., & Elliott, E. T. (1999). Soil Carbon and Nitrogen Pools and Fractions. En G. P. Robertson, D. C. Coleman, C. S. Bledsoe, & P. Sollins (Eds.), *Standard Soil Methods for Long-Term Ecological Research* (pp. 89-105). Oxford University Press New York, NY. <https://doi.org/10.1093/oso/9780195120837.003.0005>
- Søndergaard, M. (2009). Redox Potential. En *Encyclopedia of Inland Waters* (1a ed., pp. 852-859). Gene E. Likens.
- Steinberg, L. M., & Regan, J. M. (2009). mcrA -Targeted Real-Time Quantitative PCR Method To Examine Methanogen Communities. *Applied and Environmental Microbiology*, 75(13), 4435-4442. <https://doi.org/10.1128/AEM.02858-08>
- Strickland, J. D. H., & Parsons, T. R. (1972). *A Practical Handbook of Seawater Analysis* (2a ed.). Fisheries research board of Canada.
- Sulochanan, B., Ratheesh, L., Veena, S., Padua, S., Prema, D., Rohit, P., Kaladharan, P., & Kripa, V. (2022). Water and sediment quality parameters of the restored mangrove ecosystem of Gurupura River and natural mangrove ecosystem of Shambhavi River in Dakshina Kannada, India. *Marine Pollution Bulletin*, 176, 113450. <https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2022.113450>
- Susanti, D., Frazier, M. C., & Mukhopadhyay, B. (2019). A Genetic System for *Methanocaldococcus jannaschii*: An Evolutionary Deeply Rooted Hyperthermophilic Methanarchaeon. *Frontiers in Microbiology*, 10, 1256. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.01256>

Tamura, K., & Nei, M. (1993). Estimation of the number of nucleotide substitutions in the control region of mitochondrial DNA in humans and chimpanzees. *Molecular Biology and Evolution*. <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.molbev.a040023>

Teutli Hernández, C., Herrera-Silveira, J. A., Cisneros-de la Cruz, D. J., & Roman-Cuesta, R.-C. (2020). Guía para la restauración ecológica de manglares: Lecciones aprendidas. Center for International Forestry Research (CIFOR). <https://doi.org/10.17528/cifor/007794>

Thermo-Scientific. (2007). FlashEA 1112 Nitrogen and Carbon Analyzer for Soils, Sediments and Filters. Thermo Fisher Scientific.

Torres V., J. R., Infante-Mata, D., Sánchez, A. J., Espinoza-Tenorio, A., & Barba, E. (2018). Degradación de hojarasca y aporte de nutrientes del manglar en la Laguna Mecocacán, Golfo de México. *Revista de Biología Tropical*, 66(2), 892. <https://doi.org/10.15517/rbt.v66i2.33421>

Twilley, R. R., & Rivera-Monroy, V. H. (2005). Developing Performance Measures of Mangrove Wetlands Using Simulation Models of Hydrology, Nutrient Biogeochemistry, and Community Dynamics.

Twilley, R. R., Rovai, A. S., & Riul, P. (2018). Coastal morphology explains global blue carbon distributions. *Frontiers in Ecology and the Environment*, 16(9), 503-508. <https://doi.org/10.1002/fee.1937>

Upadhyay, A. K., Singh, R., & Singh, D. P. (Eds.). (2020). Restoration of Wetland Ecosystem: A Trajectory Towards a Sustainable Environment. Springer Singapore. <https://doi.org/10.1007/978-981-13-7665-8>

Valenzuela, E. I., Prieto-Davó, A., López-Lozano, N. E., Hernández-Eligio, A., Vega-Alvarado, L., Juárez, K., García-González, A. S., López, M. G., & Cervantes, F. J. (2017). Anaerobic Methane Oxidation Driven by Microbial Reduction of Natural Organic Matter in a Tropical Wetland. *Applied and Environmental Microbiology*, 83(11), e00645-17. <https://doi.org/10.1128/AEM.00645-17>

Vanwonterghem, I., Evans, P. N., Parks, D. H., Jensen, P. D., Woodcroft, B. J., Hugenholtz, P., & Tyson, G. W. (2016). Methylophilic methanogenesis discovered in the archaeal

phylum Verstraetearchaeota. *Nature Microbiology*, 1(12), 16170. <https://doi.org/10.1038/nmicrobiol.2016.170>

Wang, B., Zheng, X., Zhang, H., Yu, X., Lian, Y., Yang, X., Yu, H., Hu, R., He, Z., Xiao, F., & Yan, Q. (2021). Metagenomic insights into the effects of submerged plants on functional potential of microbial communities in wetland sediments. *Marine Life Science & Technology*, 3(4), 405-415. <https://doi.org/10.1007/s42995-021-00100-3>

Wang, L., Huang, X., & Zheng, T.-L. (2016). Responses of bacterial and archaeal communities to nitrate stimulation after oil pollution in mangrove sediment revealed by Illumina sequencing. *Marine Pollution Bulletin*, 109(1), 281-289. <https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2016.05.068>

Wang, W., Zeng, C., Sardans, J., Wang, C., Tong, C., & Peñuelas, J. (2018). Soil Methane Production, Anaerobic and Aerobic Oxidation in Porewater of Wetland Soils of the Minjiang River Estuarine, China. *Wetlands*, 38(3), 627-640. <https://doi.org/10.1007/s13157-018-1006-9>

Wickham, H. (2016). *ggplot2: Elegant Graphics for Data Analysis*. Springer-Verlag New York. <https://ggplot2.tidyverse.org>

Wu, M. L., Ettwig, K. F., Jetten, M. S. M., Strous, M., Keltjens, J. T., & van Niftrik, L. (2011). A new intra-aerobic metabolism in the nitrite-dependent anaerobic methane-oxidizing bacterium *Candidatus 'Methyloirabilis oxyfera'*. *Biochemical Society Transactions*, 39.

Xiao, K., Beulig, F., Røy, H., Jørgensen, B. B., & Risgaard-Petersen, N. (2018). Methylotrophic methanogenesis fuels cryptic methane cycling in marine surface sediment. *Limnology and Oceanography*, 63(4), 1519-1527. <https://doi.org/10.1002/lno.10788>

Xu, S., & Yu, G. (2022). *MicrobiotaProcess: A comprehensive R package for managing and analyzing microbiome and other ecological data within the tidy framework*. <https://github.com/YuLab-SMU/MicrobiotaProcess/>

Yu, X., Yang, X., Wu, Y., Peng, Y., Yang, T., Xiao, F., Zhong, Q., Xu, K., Shu, L., He, Q., Tian, Y., Yan, Q., Wang, C., Wu, B., & He, Z. (2020). *Sonneratia apetala* introduction alters

methane cycling microbial communities and increases methane emissions in mangrove ecosystems. *Soil Biology and Biochemistry*, 144, 107775. <https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2020.107775>

Yuan, J., Ding, W., Liu, D., Xiang, J., & Lin, Y. (2014). Methane production potential and methanogenic archaea community dynamics along the *Spartina alterniflora* invasion chronosequence in a coastal salt marsh. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 98(4), 1817-1829. <https://doi.org/10.1007/s00253-013-5104-6>

Zaldivar-Jimenez, M. A., Herrera-Silveira, J. A., Teutli-Hernandez, C., Comin, F. A., Andrade, J. L., Molina, C. C., & Ceballos, R. P. (2010). Conceptual Framework for Mangrove Restoration in the Yucatan Peninsula. *Ecological Restoration*, 28(3), 333-342. <https://doi.org/10.3368/er.28.3.333>

Zhang, L., Adams, J. M., Dumont, M. G., Li, Y., Shi, Y., He, D., He, J.-S., & Chu, H. (2019). Distinct methanotrophic communities exist in habitats with different soil water contents. *Soil Biology and Biochemistry*, 132, 143-152. <https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2019.02.007>

Zhang, Y., Yang, Q., Ling, J., Van Nostrand, J. D., Shi, Z., Zhou, J., & Dong, J. (2017). Diversity and Structure of Diazotrophic Communities in Mangrove Rhizosphere, Revealed by High-Throughput Sequencing. *Frontiers in Microbiology*, 8, 2032. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.02032>

Zheng, X., Guo, J., Song, W., Feng, J., & Lin, G. (2018). Methane Emission from Mangrove Wetland Soils Is Marginal but Can Be Stimulated Significantly by Anthropogenic Activities. *Forests*, 9(12), 738. <https://doi.org/10.3390/f9120738>

Zhou, W., Han, G., Liu, M., & Li, X. (2019). Effects of soil pH and texture on soil carbon and nitrogen in soil profiles under different land uses in Mun River Basin, Northeast Thailand. *PeerJ*, 7, e7880. <https://doi.org/10.7717/peerj.7880>

ANEXOS

Anexo 1. Resultados de la prueba de Kruskal Wallis para variables fisicoquímicas.

	Measure	Test_Method	Group	Comparison	Z	P.unadj	P.adj	Significance
1	MO	Dunn's Kruskal-Wallis Multiple Comparisons	Progreso-C	Progreso-C - Progreso-R	0	1	1	ns
2	MO	Dunn's Kruskal-Wallis Multiple Comparisons	Progreso-C	Progreso-C - Yucalpetén-R	1.341	0.179	0.539	ns
3	MO	Dunn's Kruskal-Wallis Multiple Comparisons	Progreso-R	Progreso-R - Yucalpetén-R	1.341	0.179	0.359	ns
4	P_total	Dunn's Kruskal-Wallis Multiple Comparisons	Progreso-C	Progreso-C - Progreso-R	0.745	0.456	0.456	ns
5	P_total	Dunn's Kruskal-Wallis Multiple Comparisons	Yucalpetén-R	Progreso-C - Yucalpetén-R	-1.63	0.101	0.202	ns
6	P_total	Dunn's Kruskal-Wallis Multiple Comparisons	Yucalpetén-R	Progreso-R - Yucalpetén-R	-2.38	0.017	0.051	ns
7	N_total	Dunn's Kruskal-Wallis Multiple Comparisons	Progreso-C	Progreso-C - Progreso-R	0.298	0.765	0.765	ns
8	N_total	Dunn's Kruskal-Wallis Multiple Comparisons	Progreso-C	Progreso-C - Yucalpetén-R	1.937	0.052	0.157	ns
9	N_total	Dunn's Kruskal-Wallis Multiple Comparisons	Progreso-R	Progreso-R - Yucalpetén-R	1.639	0.101	0.202	ns
10	C_total	Dunn's Kruskal-Wallis Multiple Comparisons	Progreso-C	Progreso-C - Progreso-R	1.788	0.073	0.147	ns
11	C_total	Dunn's Kruskal-Wallis Multiple Comparisons	Progreso-C	Progreso-C - Yucalpetén-R	2.236	0.025	0.076	ns
12	C_total	Dunn's Kruskal-Wallis Multiple Comparisons	Progreso-R	Progreso-R - Yucalpetén-R	0.447	0.654	0.654	ns

13	Arena	Dunn's Kruskal-Wallis Multiple Comparisons	Progreso-R	Progreso-C - Progreso-R	-1.788	0.073	0.147	ns
14	Arena	Dunn's Kruskal-Wallis Multiple Comparisons	Progreso-C	Progreso-C - Yucalpetén-R	0.447	0.654	0.654	ns
15	Arena	Dunn's Kruskal-Wallis Multiple Comparisons	Progreso-R	Progreso-R - Yucalpetén-R	2.236	0.025	0.076	ns
16	Limo	Dunn's Kruskal-Wallis Multiple Comparisons	Progreso-C	Progreso-C - Progreso-R	1.490	0.136	0.272	ns
17	Limo	Dunn's Kruskal-Wallis Multiple Comparisons	Yucalpetén-R	Progreso-C - Yucalpetén-R	-0.596	0.550	0.550	ns
18	Limo	Dunn's Kruskal-Wallis Multiple Comparisons	Yucalpetén-R	Progreso-R - Yucalpetén-R	-2.086	0.036	0.110	ns
19	Arcilla	Dunn's Kruskal-Wallis Multiple Comparisons	Progreso-C	Progreso-C - Progreso-R	0.606	0.544	1	ns
20	Arcilla	Dunn's Kruskal-Wallis Multiple Comparisons	Progreso-C	Progreso-C - Yucalpetén-R	0.758	0.448	1	ns
21	Arcilla	Dunn's Kruskal-Wallis Multiple Comparisons	Yucalpetén-R	Progreso-R - Yucalpetén-R	0.151	0.879	0.879	ns

Anexo 2. Valores promedio \pm desviación estándar e IC (Lim. Inferior – Lim. Superior) al 95% de determinaciones fisicoquímicas analizadas en sedimentos de manglares restaurados.

Sitio	N total (%)	P total ($\mu\text{mol/g}$)	C total (%)	MO (%)
PC	1.42 \pm 0.44 (IC 95% [0.92 – 1.74])	3.58 \pm 1.02 (IC 95% [2.42 – 4.34])	16.56 \pm 0.65 (IC 95% [16.01 – 17.28])	8.95 \pm 3.15 (IC 95% [5.33 – 11.09])
PR	1.32 \pm 0.14 (IC 95% [1.19 – 1.47])	2.57 \pm 0.23 (IC 95% [2.32 – 2.77])	14.5 \pm 1.36 (IC 95% [13.1 – 15.82])	9.89 \pm 0.31 (IC 95% [9.67 – 10.25])
YR	0.83 \pm 0.12 (IC 95% [0.70 – 0.93])	4.81 \pm 0.23 (IC 95% [4.57 – 5.03])	13.99 \pm 0.9 (IC 95% [13.07 – 14.88])	7.04 \pm 0.66 (IC 95% [6.55 – 7.79])
Sitio	Arena (%)	Limo (%)	Arcilla (%)	
PC	63.81 \pm 13.61 (IC 95% [48.1 – 72.1])	21.12 \pm 14.72 (IC 95% [11.98 – 38.1])	15.07 \pm 1.54 (IC 95% [13.8 – 16.8])	
PR	76.48 \pm 2.09 (IC 95% [74.13 – 78.15])	9.76 \pm 2.05 (IC 95% [8.1 – 12.05])	13.77 \pm 1.01 (IC 95% [12.73 – 14.75])	
YR	57.17 \pm 2.02 (IC 95% [55.13 – 59.18])	28.87 \pm 2.31 (IC 95% [26.2 – 30.25])	13.97 \pm 1.14 (IC 95% [12.65 – 14.63])	

Anexo 3. Valores promedio \pm desviación estándar e IC (Lim. Inferior – Lim. Superior) al 95% de la riqueza y diversidad observadas en las comunidades microbianas de sedimentos de manglares restaurados.

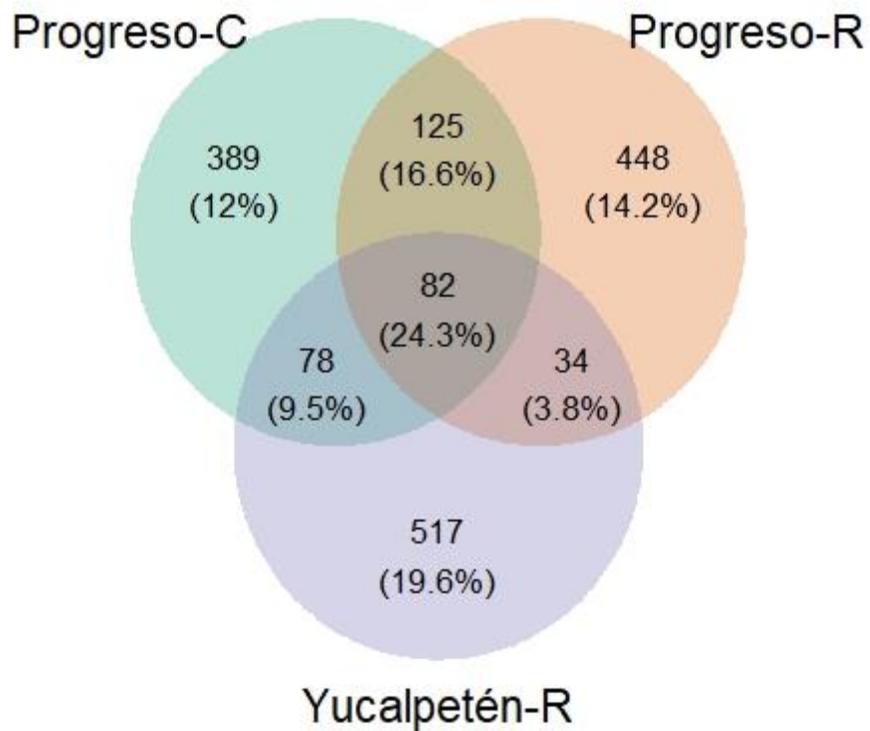
Sitio	Riqueza (núm. de ASVs)	Índice de Shannon (diversidad)
PC	327.33 \pm 2.52 (IC 95% [325 – 330])	5.34 \pm 0.1 (IC 95% [5.227 – 5.436])
PR	349 \pm 30.05 (IC 95% [326 – 383])	5.45 \pm 0.06 (IC 95% [5.40 – 5.52])
YR	309.67 \pm 37.07 (IC 95% [267 – 334])	5.22 \pm 0.14 (IC 95% [5.058 – 5.34])

Anexo 4. Resultados de la prueba de Kruskal Wallis para diversidad alfa.

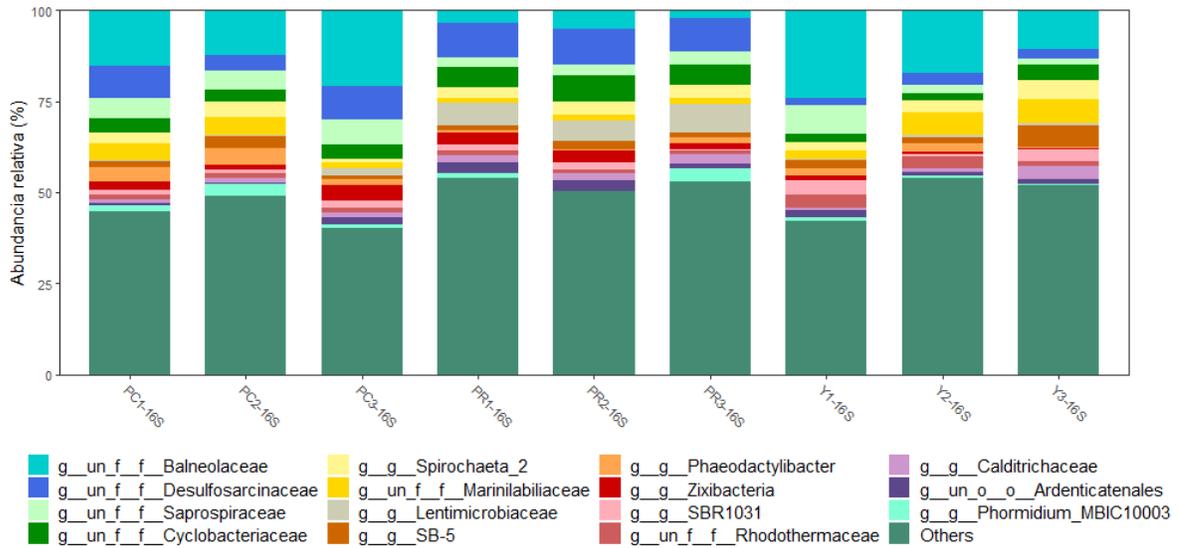
	Comparison	Z	P.unadj	P.adj	Significance
1	Progreso-C - Progreso-R	-1.1925696	0.23303798	0.6991139	ns
2	Progreso-C - Yucalpetén-R	-0.1490712	0.88149745	0.8814975	ns
3	Progreso-R - Yucalpetén-R	1.0434984	0.29671753	0.5934351	ns
4	Progreso-C - Progreso-R	-1.1925696	0.23303798	0.6991139	ns
5	Progreso-C - Yucalpetén-R	-0.1490712	0.88149745	0.8814975	ns
6	Progreso-R - Yucalpetén-R	1.0434984	0.29671753	0.5934351	ns
7	Progreso-C - Progreso-R -	1.1925696	0.23303798	0.6991139	ns
8	Progreso-C - Yucalpetén-R	-0.1490712	0.88149745	0.8814975	ns
9	Progreso-R - Yucalpetén-R	1.0434984	0.29671753	0.5934351	ns
10	Progreso-C - Progreso-R	-1.0434984	0.29671753	0.2967175	ns
11	Progreso-C - Yucalpetén-R	1.0434984	0.29671753	0.5934351	ns
12	Progreso-R - Yucalpetén-R	2.0869968	0.03688843	0.1106653	ns
13	Progreso-C - Progreso-R	-1.3416408	0.17971249	0.3594250	ns
14	Progreso-C - Yucalpetén-R	0.4472136	0.65472085	0.6547208	ns
15	Progreso-R - Yucalpetén-R	1.7888544	0.07363827	0.2209148	ns

16	Progreso-C - Progreso-R	-1.3416408	0.17971249	0.3594250	ns
17	Progreso-C - Yucalpetén-R	0.4472136	0.65472085	0.6547208	ns
18	Progreso-R - Yucalpetén-R	1.7888544	0.07363827	0.2209148	ns
19	Progreso-C - Progreso-R	-1.1925696	0.23303798	0.6991139	ns
20	Progreso-C - Yucalpetén-R	-0.1490712	0.88149745	0.8814975	ns
21	Progreso-R - Yucalpetén-R	1.0434984	0.29671753	0.5934351	ns

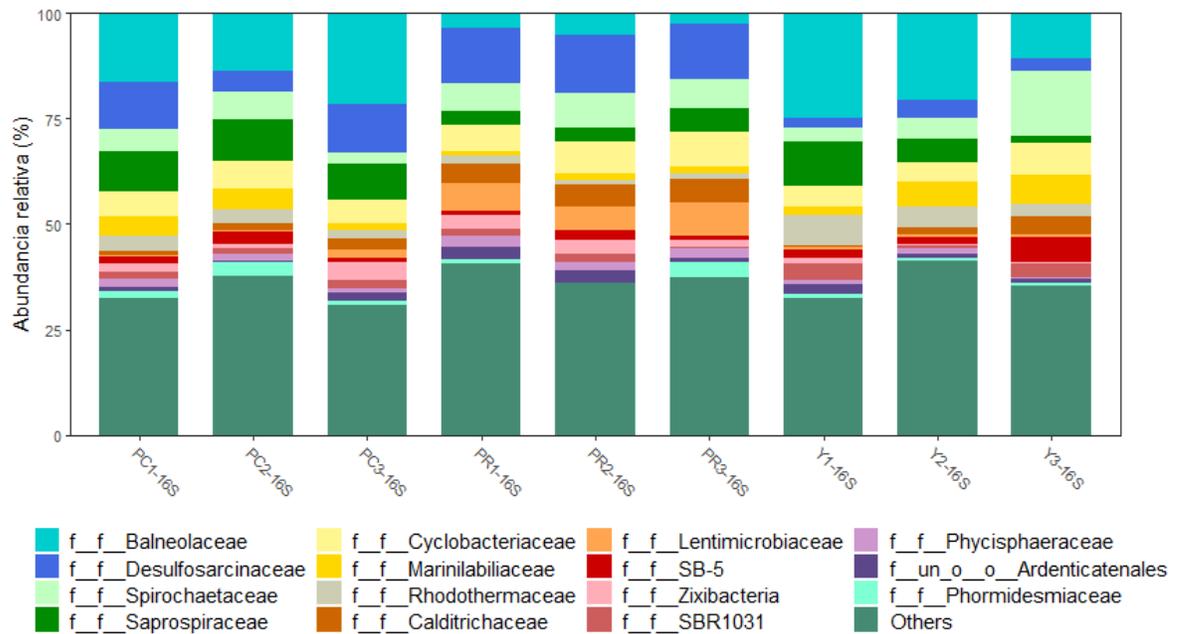
Anexo 5. Diagrama de Venn de ASVs compartidas y exclusivas para cada sitio de estudio.



Anexo 6. Abundancia de bacterias a nivel de género obtenidas a partir de la secuenciación del gen *16S rRNA*.



Anexo 7. Abundancia de bacterias a nivel de familia obtenidas a partir de la secuenciación del gen *16S rRNA*.



Anexo 8. Tabla de abundancias de secuencias del gen *mcrA* sin asignar.

#ASV	PC1	PC2	PC3	PR1	PR2	PR3	YR1	YR2	YR3
ASV1	26	41	5	3080	91	81	250	0	68
ASV2	186	105	140	2265	267	220	249	0	73
ASV3	20	22	0	2659	92	93	247	10	161
ASV4	174	109	121	1906	241	220	223	0	76
ASV5	184	70	0	1881	221	245	269	17	122
ASV6	36	47	3	2447	95	59	200	0	69
ASV7	106	133	249	1272	201	161	116	57	0
ASV8	0	134	178	0	436	364	0	45	106
ASV9	0	154	187	0	366	328	0	96	73
ASV10	0	69	276	0	328	343	0	33	0
ASV11	0	0	0	729	0	0	0	0	0
ASV12	0	0	0	513	0	0	0	0	0
ASV13	0	47	21	0	150	122	0	63	99
ASV14	0	0	0	330	0	0	43	0	0
ASV15	0	0	0	328	0	0	0	0	0
ASV16	0	111	138	0	0	0	0	0	0
ASV17	0	0	0	0	0	0	74	33	138
ASV18	0	0	0	0	0	209	0	0	0
ASV19	0	0	0	0	0	0	84	0	122
ASV20	61	24	0	0	0	0	64	50	0
ASV21	0	0	0	0	164	0	0	0	0
ASV22	0	0	0	0	159	0	0	0	0
ASV23	0	0	151	0	0	0	0	0	0
ASV24	0	0	0	0	0	140	0	0	0
ASV25	0	0	126	0	0	0	0	0	0
ASV26	0	0	0	0	0	0	0	0	103
ASV27	0	0	0	0	0	0	0	0	95
ASV28	0	0	0	75	0	0	0	0	0

ASV29	70	0	0	0	0	0	0	0	0
ASV30	70	0	0	0	0	0	0	0	0
ASV31	0	0	0	0	0	0	67	0	0
ASV32	50	0	0	0	0	0	0	0	0
ASV33	0	50	0	0	0	0	0	0	0
ASV34	47	0	0	0	0	0	0	0	0
ASV35	0	0	0	0	0	0	0	45	0
ASV36	0	0	0	0	0	0	0	45	0
ASV37	0	0	0	0	0	44	0	0	0
ASV38	0	0	0	0	0	0	44	0	0
ASV39	0	42	0	0	0	0	0	0	0
ASV40	41	0	0	0	0	0	0	0	0
ASV41	0	0	0	0	0	0	0	41	0
ASV42	0	0	0	0	40	0	0	0	0
ASV43	0	0	0	0	0	0	0	0	39
ASV44	0	35	0	0	0	0	0	0	0
ASV45	0	32	0	0	0	0	0	0	0
ASV46	0	0	0	0	0	0	32	0	0
ASV47	0	0	0	0	0	0	32	0	0
ASV48	0	0	0	0	0	0	0	22	0
ASV49	17	0	0	0	0	0	0	0	0
ASV50	0	0	0	0	0	0	0	0	16
ASV51	0	14	0	0	0	0	0	0	0
ASV52	0	0	0	13	0	0	0	0	0
ASV53	0	0	0	0	0	0	0	0	11
ASV54	0	0	0	0	0	0	0	0	11
ASV55	0	7	0	0	0	0	0	0	0
ASV56	0	0	0	0	0	0	0	7	0
ASV57	0	0	0	0	0	0	0	0	7
ASV58	0	0	0	0	0	0	0	6	0

ASV59	0	0	0	0	0	0	0	0	6
ASV60	0	0	0	0	0	0	0	5	0
ASV61	0	0	0	0	0	0	0	0	5
ASV62	0	4	0	0	0	0	0	0	0
ASV63	0	3	0	0	0	0	0	0	0
ASV64	0	3	0	0	0	0	0	0	0
ASV65	0	0	0	0	0	0	0	3	0
ASV66	0	0	0	0	0	0	0	3	0
ASV67	0	0	0	0	0	0	0	3	0
ASV68	0	0	0	0	0	0	0	3	0
ASV69	0	0	0	0	0	0	0	3	0
ASV70	0	0	0	0	0	0	0	0	3
ASV71	0	0	0	0	0	0	0	0	3
ASV72	0	0	2	0	0	0	0	0	0
ASV73	0	0	0	0	0	0	0	2	0
ASV74	0	0	0	0	0	0	0	2	0
ASV75	0	0	0	0	0	0	0	0	2
ASV76	0	0	0	0	0	0	0	0	2