



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO  
FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES ZARAGOZA  
INSTITUTO DE CIENCIAS DEL MAR Y LIMNOLOGÍA  
LABORATORIO DE ECOLOGÍA MICROBIANA ACUÁTICA

**Distribución espacial y temporal de bacterias  
desnitrificantes aisladas en sedimentos de la zona de  
mínimo oxígeno del Pacífico Mexicano**

***T E S I S***

Que para obtener el grado de

**Bióloga**

Presenta:

**Andrea Coss Alcantar**

**Dra. Silvia Pajares Moreno**  
Directora de Tesis

**Dr. Jorge Antonio Valdivia**  
**Anistro**

Asesor Interno de Tesis

**Dra. Eloísa Adriana Guerra**  
**Hernández**

Asesora Interna de Tesis



**Cd. Mx. 2024**



Universidad Nacional  
Autónoma de México



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

## **Agradecimientos**

Agradezco a la Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM) por ofrecerme un lugar lleno de conocimiento, diversidad, educación y experiencias. A la Facultad de Estudios Superiores Zaragoza (FESZ) por formarme profesionalmente y brindarme momentos que atesoraré siempre. Al Instituto de Ciencias del Mar y Limnología (ICML-UNAM) por abrirme las puertas y ofrecerme lo necesario para llevar a cabo este trabajo de investigación. Al Consejo Nacional de Humanidades, Ciencias y Tecnologías (CONAHCYT) por la beca que me otorgó durante un periodo de 6 meses y por el financiamiento de este estudio a través del proyecto Ciencia de Frontera “*Dinámica de la comunidad microbiana que controla el ciclo del nitrógeno en la zona de mínimo oxígeno del Pacífico Tropical Mexicano*” (CF-2019-2266) de la Dra. Silvia Pajares Moreno.

Extiendo también mi más sincero agradecimiento a la Dra. Silvia Pajares Moreno (ICML-UNAM) por su guía, acompañamiento, dedicación, confianza y, sobre todo, paciencia a lo largo de este proyecto. Le agradezco la entrega que tiene con cada una y uno de sus estudiantes, reconozco su trayectoria y agradezco sus ganas de compartir los conocimientos que ha adquirido a lo largo de ella.

Agradezco profundamente a Karla Zeferino García y a Pedro Peña Zúñiga por su apoyo y acompañamiento en el laboratorio, gracias por hacer de este trabajo una experiencia mucho más amena. Karla, gracias por tu paciencia, por tu guía y por las risas. Pedro, gracias por tu confianza, por escucharme y apoyarme en todo lo que necesitaba, definitivamente fuiste pieza clave para la elaboración de este trabajo.

## **Agradecimientos personales**

Agradezco a mis padres, Gilda y Gerardo, porque soy gracias a ellos. Mamá, gracias por tu apoyo incondicional, por sostenerme siempre y por apoyarme tanto, te llevas el crédito de mis logros, porque sin tu cariño y tu guía ninguno sería posible. Papá, gracias por el sustento y por ser una figura merecedora de admiración. Gracias a ustedes he llegado lejos y tengo la confianza de seguir avanzando gracias a las herramientas que me han brindado. Los quiero siempre.

A mis hermanos, por ser unos excelentes compañeros de vida. Mauricio, que la vida nos siga permitiendo compartir este camino y apoyarnos el uno al otro, para echarnos porras y para disfrutar mil conciertos más. Gerardo, que sigan existiendo excelentes películas y series para compartir, gracias por echarme porras siempre y por creer en mi potencial.

Agradezco al Dr. Jorge Antonio Valdivia por su acompañamiento durante toda la carrera, por sus consejos, sus palabras de aliento y sobre todo sus excelentes recomendaciones de grupos, películas y series que me siguen acompañando en este camino, gracias por escucharme y por ayudarme a confiar en mis capacidades.

También agradezco el acompañamiento que he recibido de mis amistades, para mí es fundamental e indispensable su presencia en mi vida, no me arriesgaré a dejar de lado alguna mención, entonces lo hago de manera general. Pero sepan que cada una y uno de ustedes tiene un lugar sumamente especial en mi ser. Gracias por ser parte de mí y permitirme ser parte de ustedes. Porque como dice mi íntimo amigo (¿o enemigo?) BoJack Horseman: “in this terrifying world, all we have are the connections that we make.”

Agradezco haber tomado la decisión de emprender este camino en la biología, porque me ayudó a ver la vida de otra manera, a apreciar la belleza que nos rodea todos los días, también me dio la oportunidad de vivir experiencias increíbles, conocer lugares hermosos y puso en mi camino un montón de personas que aportaron demasiado a mi persona.

Sin más espero que, si les llega una copia de esta investigación, la lean completa y me pregunten cosas (no tan difíciles) porque me costó mucho trabajo y por poco no se logra. Salu2 cálí2.

# Índice

<b>Resumen</b> .....	<b>1</b>
<b>Introducción</b> .....	<b>2</b>
<b>Antecedentes</b> .....	<b>4</b>
EL CICLO DE N MARINO.....	4
PROCESOS DE PÉRDIDA DE NITRÓGENO EN SISTEMAS MARINOS .....	5
<i>Desnitrificación</i> .....	5
ZONAS DE MÍNIMO OXÍGENO (ZMO) .....	8
DESNITRIFICACIÓN EN ZMO Y SEDIMENTOS ANÓXICOS .....	9
ORGANISMOS DESNITRIFICANTES AISLADOS EN SISTEMAS MARINOS .....	11
<b>Justificación</b> .....	<b>12</b>
<b>Preguntas de Investigación</b> .....	<b>12</b>
<b>Hipótesis</b> .....	<b>13</b>
<b>Objetivos</b> .....	<b>13</b>
OBJETIVO GENERAL.....	13
OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	13
<b>Material y Método</b> .....	<b>14</b>
ZONA DE ESTUDIO Y MUESTREO.....	14
ANÁLISIS CLIMÁTICOS, FÍSICO-QUÍMICOS .....	15
CULTIVO Y AISLAMIENTO DE BACTERIAS DESNITRIFICANTES AEROBIAS .....	15
ANÁLISIS MOLECULARES.....	16
<i>Extracción de ADN</i> .....	16
<i>Amplificación de genes desnitrificantes (nirS, nirK y nosZ)</i> .....	16
<i>Amplificación del gen 16S ARNr, secuenciación y análisis bioinformático</i> .....	17
<i>Presencia de genes desnitrificantes, análisis de diversidad y estadística</i> .....	17
<i>Ensayo de actividad potencial de los genes desnitrificantes en condiciones aerobias</i> .....	18
<b>Resultados</b> .....	<b>19</b>
CONDICIONES CLIMÁTICAS.....	19
CARACTERÍSTICAS FÍSICO-QUÍMICAS DE LOS SEDIMENTOS.....	19
<i>pH</i> .....	19
<i>Porcentaje de materia orgánica</i> .....	20
<i>Nutrientes durante El Niño</i> .....	21
AISLAMIENTO DE BACTERIAS EN LOS SEDIMENTOS DE LA ZMO DEL PACÍFICO MEXICANO .....	22
DISTRIBUCIÓN DE BACTERIAS AISLADAS CON GENES DESNITRIFICANTES <i>NIRS, NIRK Y NOSZ</i> .....	22
DIVERSIDAD ALFA .....	27
CLASIFICACIÓN TAXONÓMICA DE LAS BACTERIAS PORTADORAS DE GENES DESNITRIFICANTES .....	27
DISTRIBUCIÓN DE LAS ESPECIES DE BACTERIAS DESNITRIFICANTES AISLADAS .....	30
FILOGENIA DE LAS BACTERIAS DESNITRIFICANTES AISLADAS .....	32
CORRELACIÓN ENTRE LA ABUNDANCIA DE ESPECIES DE BACTERIAS DESNITRIFICANTES Y LAS VARIABLES AMBIENTALES .....	37
ESTRUCTURA DE LA COMUNIDAD BACTERIANA DESNITRIFICANTE EN LA ZMO DEL PACÍFICO MEXICANO .....	39
ENSAYO DE ACTIVIDAD EN CONDICIONES AEROBIAS DE LOS GENES DESNITRIFICANTES .....	40
<b>Discusión</b> .....	<b>41</b>

CARACTERÍSTICAS FÍSICO-QUÍMICAS DE LOS SEDIMENTOS DE LA ZMO DEL PACÍFICO MEXICANO .....	41
DISTRIBUCIÓN DE GENES DESNITRIFICANTES EN LOS SEDIMENTOS DE LA ZMO DEL PACÍFICO MEXICANO .....	42
IDENTIFICACIÓN DE BACTERIAS DESNITRIFICANTES AEROBIAS .....	44
DIVERSIDAD Y DISTRIBUCIÓN DE LAS ESPECIES BACTERIANAS DESNITRIFICANTES AEROBIAS EN LOS SEDIMENTOS DE LA ZMO DEL PACÍFICO MEXICANO .....	46
ACTIVIDAD DESNITRIFICANTE AEROBIA EN LOS REPRESENTANTES BACTERIANOS PORTADORES DE GENES DESNITRIFICANTES ....	47
<b>Conclusiones .....</b>	<b>48</b>
<b>Referencias .....</b>	<b>50</b>

## Índice de figuras, tablas y anexos

Figura 1. Diagrama simplificado del ciclo del N, tomado de Zhang et al. (2020a).	3
Figura 2. Distribución del contenido de O <sub>2</sub> global del océano a 200 m de profundidad. Los colores representan la concentración de O <sub>2</sub> expresada en $\mu\text{mol Kg}^{-1}$ . Las zonas resaltadas indican la ubicación de las principales ZMO. Los datos fueron extraídos de la base de datos WOA (World Ocean Atlas, <a href="https://www.nodc.noaa.gov">https://www.nodc.noaa.gov</a> ).	9
Figura 3. Localización de las estaciones de muestreo a lo largo de un transecto frente al Puerto de Mazatlán: costera (C), intermedia (I) y oceánica (O).	14
Figura 4. Serie de tiempo del Índice Multivariado ENSO versión 2 (MEI v2, por sus siglas en inglés) para los últimos 13 años. Los períodos fríos (en color azul) o cálidos (en color rojo) indican la ocurrencia de La Niña o El Niño, respectivamente. MAZ IV (—); MAZ V (—). Tomado de <a href="https://psl.noaa.gov/enso/mei/">https://psl.noaa.gov/enso/mei/</a> .	19
Figura 5. pH de las muestras de sedimentos. El número que se observa sobre las barras corresponde al valor de pH.	20
Figura 6. Porcentaje de materia orgánica en las muestras de sedimento. El número que se observa sobre las barras indica el valor del % de materia orgánica.	20
Figura 7. Concentraciones de a) NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> , b) NO <sub>2</sub> <sup>-</sup> y c) NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> en los sedimentos a lo largo del transecto durante El Niño. S: superficial, P: profundo.	21
Figura 8. a) Número de aislados bacterianos con genes desnitrificantes. El número encima de la barra refleja la abundancia registrada y entre paréntesis se indica el número de representantes para cada gen; b) Distribución de los aislados portadores de uno o varios genes desnitrificantes.	23
Figura 9. a) Número de aislados portadores del gen <i>nirS</i> en cada estación durante La Niña y El Niño. b) Número de aislados con el gen <i>nirS</i> por estación (C: costera, I: intermedia, O: oceánica) y profundidad durante las dos fases climáticas.	24
Figura 10. a) Número de aislados portadores del gen <i>nirK</i> en cada estación durante La Niña y El Niño. b) Número de aislados con el gen <i>nirK</i> por estación (C: costera, I: intermedia, O: oceánica) y profundidad durante las dos fases climáticas.	25
Figura 11. a) Número de aislados portadores del gen <i>nosZ</i> en cada estación durante La Niña y El Niño. b) Número de aislados con el gen <i>nosZ</i> por estación (C: costera, I: intermedia, O: oceánica) y profundidad durante las dos fases climáticas.	26
Figura 12. Número de bacterias desnitrificantes aisladas por especie representadas en una gráfica de barras (el número al lado la barra muestra el número de aislados por especie). Porcentaje de bacterias desnitrificantes aisladas a nivel de género representado en un gráfico de pastel.	29
Figura 13. Distribución de las especies desnitrificantes en las tres estaciones durante: a) La Niña y b) El Niño.	30
Figura 14. Distribución de las especies desnitrificantes para cada estación en las distintas profundidades y fases climáticas: La Niña representada en azul (■ superficial, ■ profundo) y El Niño en rojo (■ superficial, ■ profundo), a) estación costera, b) estación intermedia, c) estación oceánica y entre paréntesis en número total de especies presentes.	31
Figura 15. Árbol filogenético a partir de secuencias de 16S ARNr de los 61 representantes desnitrificantes construido con el método neighbor-joining con un Bootstrap de 10,000 repeticiones. Los géneros se agrupan en distintos colores, las ramas en color negro indican las especies pertenecientes a la clase Bacilli y en color rojo indican a la clase Actinobacteria. Después del nombre de la especie, se indica en paréntesis la etiqueta de la muestra de la cual fue aislada (IV: La Niña, V: El Niño, C: estación costera, I: estación intermedia, O:	

estación oceánica, S: muestra superficial, F: muestra profunda). Las barras apiladas muestran la abundancia de cada especie por estación y por fase climática (■ La Niña, ■ El Niño). El sistema binario indica la presencia (■) o ausencia (□) de los distintos genes desnitrificantes. .... 35

Figura 16. Correlación de Pearson entre la abundancia de las especies desnitrificantes y determinados parámetros ambientales durante a) La Niña y b) El Niño. El color de los círculos representa el valor de la correlación, el tamaño indica la significancia de los valores obtenidos y las celdas tachadas corresponden a los valores no significativos ( $p \geq 0.05$ ). .... 38

Figura 17. Gráfica NMDS basada en el índice de disimilitud de Bray-Curtis de la distribución de las muestras en función de la abundancia de los aislados desnitrificantes obtenidos en cada especie a lo largo del transecto en las dos fases ENSO (nivel de estrés: 0.168). .... 39

Tabla 1- Primers para la identificación de genes desnitrificantes *nirK*, *nirS* y *nosZ* y la amplificación del gen 16s ARNr. .... 16

Tabla 2- Condiciones de termociclado para cada par de primers usado. .... 17

Tabla 3- Número de representantes seleccionados para la extracción de ADN (en paréntesis el número total de aislados representantes), en las muestras superficiales y profundas en las dos fases climáticas y en los dos medios de cultivo. .... 22

Tabla 4. Diversidad alfa a lo largo del transecto costa-océano en las distintas profundidades durante las dos fases climáticas. .... 27

Tabla 5. Consulta de la presencia de genes desnitrificantes en los genomas disponibles en el NCBI. .... 36

Tabla 6. Aislados representantes cuya actividad de genes desnitrificantes identificados por PCR pudo ser comprobada mediante la prueba de reducción de  $\text{NO}_3^-$  y  $\text{NO}_2^-$ . .... 40

Anexo 1. Características de los medios de cultivo utilizados. .... 58

Anexo 2. Criterios utilizados para la caracterización morfológica de las colonias bacterianas. .... 59

Anexo 3. Prueba de reducción de nitratos y nitritos (modificado de  *Holding y Colle, 1971*). .... 60

Anexo 4. Preparación de reactivos  $\alpha$  y  $\beta$  para la prueba de reducción de nitratos y nitritos. .... 61

Anexo 5. Distribución de aislados bacterianos desnitrificantes aerobios en los sedimentos a lo largo del transecto durante las dos fases ENSO y en las dos profundidades. .... 62

Anexo 6. Distribución de las especies de bacterias desnitrificantes aerobias en las distintas fases ENSO. .... 64

Anexo 7. Caracterización morfológica de bacterias aisladas con genes desnitrificantes. .... 65

Anexo 8. Representantes desnitrificantes aerobios pertenecientes a la misma especie. .... 68

Anexo 9. Resultados del ensayo de actividad en condiciones aerobias de los genes desnitrificantes. .... 70

## Resumen

El ciclo del nitrógeno es uno de los ciclos biogeoquímicos más importantes para los ecosistemas marinos, ya que la disponibilidad de este elemento limita la productividad primaria en los océanos. Entre los procesos que conforman este ciclo, la desnitrificación desempeña un papel clave al reducir los nitratos a nitrógeno molecular mediante la respiración de microorganismos heterótrofos anaerobios facultativos. A pesar de que el proceso es principalmente anaerobio, se ha detectado la presencia de microorganismos desnitrificantes aerobios en sedimentos marinos. Dado que la pérdida de nitrógeno en los sedimentos de las Zonas de Mínimo Oxígeno (ZMO) se produce a través de este proceso, el objetivo de este estudio fue investigar la distribución y actividad de bacterias aerobias desnitrificantes aisladas de sedimentos en un transecto de la ZMO del Pacífico Mexicano, a dos profundidades (0 y 20 cm) y en dos fases contrastantes del fenómeno climático ENSO (La Niña y El Niño). Se aislaron 1034 bacterias en condiciones aerobias, que fueron asignadas a 213 representantes por sus rasgos morfológicos. De éstas, 67 (44.87% de los aislados) presentaron genes desnitrificantes (*nirS*, *nirK* y/o *nosZ*), detectados mediante la reacción en cadena de la polimerasa. El gen *nirS* fue el más abundante (46.52%), seguido por *nirK* (27.20%), mientras que *nosZ* fue el menos frecuente (26.28%). Además, el 33.8% de las bacterias desnitrificantes aisladas presentaron más de un gen desnitrificante, siendo *nirS/nirK* la combinación más común (18.7%) a pesar de que estos genes se han considerado mutuamente excluyentes. La mayor abundancia de bacterias aerobias desnitrificantes se encontró en las muestras superficiales de la estación costera durante La Niña, mientras que la menor abundancia se registró en la estación intermedia durante El Niño. Se identificaron 40 especies de bacterias aeróbicas desnitrificantes pertenecientes a 12 géneros, siendo *Bacillus* el predominante (50.4%). Además, se confirmó la actividad desnitrificante bajo condiciones aerobias en cinco especies: *Bacillus tequilensis*, *B. humi*, *B. timonensis*, *B. thaonhiensis* y *Cytobacillus oceanisediminis*. Los resultados resaltan la necesidad de profundizar en el estudio de la comunidad desnitrificante en los sedimentos de esta ZMO para comprender su diversidad genética y su potencial para llevar a cabo la desnitrificación ante intrusiones eventuales de oxígeno.

## Introducción

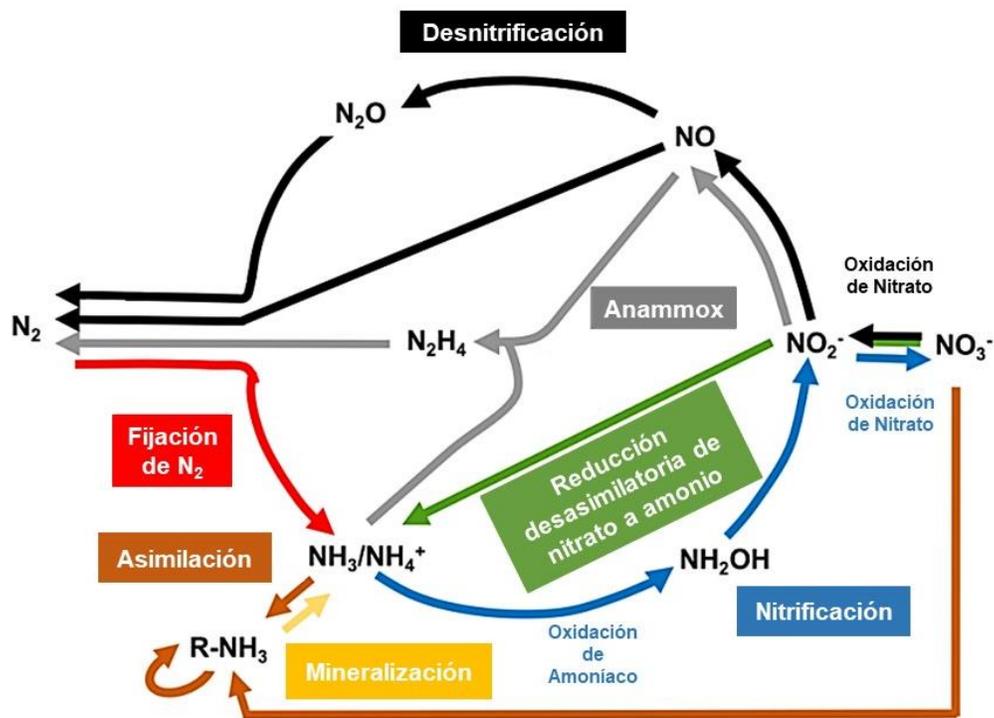
El nitrógeno (N) es el cuarto elemento químico más abundante en la biosfera y es un componente importante en la mayoría de las macromoléculas biológicas, incluidas las proteínas, ácidos nucleicos y clorofila. Por lo tanto, este elemento es un nutriente clave para la vida y es esencial para todos los organismos que habitan en la Tierra (Stein y Klotz, 2016; Zhang *et al.*, 2020a). El reservorio de N más grande en la superficie terrestre se encuentra en la atmósfera, en forma de gas dinitrógeno ( $N_2$ ). También existe una gran reserva geológica de N dentro de la corteza terrestre y en los sedimentos oceánicos, ya sea como material orgánico o como  $NH_4^+$  (Johnson y Goldblatt, 2015).

El N es un elemento limitante para la productividad biológica y juega un papel central en la biogeoquímica oceánica, ejerciendo una influencia significativa en los ciclos de otros elementos, en particular el carbono y el fósforo (Gruber, 2008; Pajares y Ramos, 2019). Este elemento se encuentra en múltiples formas y estados de oxidación, pero la mayoría del N en ambientes marinos está presente en las siguientes formas:  $N_2$ ,  $NH_4^+$ , nitrato ( $NO_3^-$ ), nitrito ( $NO_2^-$ ), N particulado y N orgánico disuelto (Capone *et al.*, 2008).

Las principales fuentes de N en el océano son la fijación biológica de  $N_2$  y la deposición atmosférica, mientras que la pérdida de N se da principalmente a través de los procesos de oxidación anaerobia del amonio (anammox) y desnitrificación (Pajares y Ramos, 2019). Antes del descubrimiento de la anammox, la desnitrificación era considerada como el principal mecanismo de pérdida de N en los ecosistemas acuáticos (Seitzinger, 1988).

La desnitrificación es un proceso respiratorio realizado por un grupo diverso de microorganismos aerobios facultativos y heterótrofos, los cuales utilizan  $NO_3^-$ , óxido nítrico (NO) y óxido nitroso ( $N_2O$ ) como aceptores de electrones y el producto final es  $N_2$ , aunque el  $N_2O$  también se puede liberar cuando el proceso reductivo es incompleto (Zehr y Kudela, 2011). El proceso está mediado por distintas enzimas, las cuales son codificadas por diferentes genes (*nar*, *nap*, *nir* y *nos*) (Zumft, 1997), e inicia con la reducción de  $NO_3^-$  a  $NO_2^-$ , seguido de la reducción del  $NO_2^-$  a NO. Posteriormente, el NO es reducido a  $N_2O$ , culminando con la última etapa donde el  $N_2O$  es reducido a  $N_2$  (Knowles, 1982; De Sousa y Bhosle, 2012).

La desnitrificación ocurre cuando se dan tres condiciones principales: disponibilidad de  $\text{NO}_3^-$ ,  $\text{NO}_2^-$ ,  $\text{NO}$  y  $\text{N}_2\text{O}$ , concentraciones reducidas o nulas de oxígeno ( $\text{O}_2$ ) y donadores de electrones disponibles, que generalmente es la materia orgánica (Seitzinger *et al.*, 2006). La desnitrificación en sistemas marinos ocurre predominantemente en los sedimentos y aguas anóxicas/subóxicas, como el Mar Negro, la Cuenca Cariaco y las Zonas de Mínimo Oxígeno (ZMO) (Hulth *et al.*, 2005). Las ZMO se forman cuando los niveles de  $\text{O}_2$  se reducen por debajo de  $60 \mu\text{M}$  y las principales regiones oceánicas con esta característica se encuentran en el mar Árabe, en el Pacífico Norte tropical oriental (ETNP) y el Pacífico Sur tropical oriental (ETSP) (Paulmier y Ruiz-Pino, 2009; Revsbech *et al.*, 2011).



**Figura 1.** Diagrama simplificado del ciclo del N, tomado de Zhang *et al.* (2020a).

A pesar de que la desnitrificación se considera un proceso exclusivo de ambientes subóxicos y anóxicos, se ha observado que se puede llevar a cabo en condiciones aerobias (Joo *et al.*, 2005; Ji *et al.*, 2015, Yang *et al.*, 2020a). De hecho, se ha registrado la existencia de microorganismos que son capaces de utilizar  $\text{NO}_3^-$  y  $\text{O}_2$  simultáneamente como aceptores terminales de electrones (Robertson y Kuenen, 1983; Zhang *et al.*, 2018; Zhang *et al.*, 2020b; Yang *et al.*, 2020b). Sin embargo, la mayoría de los desnitrificantes aerobios se han

encontrado en cuerpos de agua dulce o en suelos (Bonin *et al.*, 1989; Patureau *et al.*, 1998; Chen *et al.*, 2003; Joo *et al.*, 2005; Kim *et al.*, 2005). Aunque se ha estudiado la desnitrificación aerobia en sedimentos marinos (Gao *et al.*, 2010; Marchant *et al.*, 2017), la investigación sobre este proceso es aún limitada, sobre todo en ZMO.

## Antecedentes

### El ciclo de N marino

El N es un elemento clave para la vida en los océanos, ya que controla la productividad primaria en muchas partes del océano global, desempeñando un papel crucial en la absorción de dióxido de carbono atmosférico y, por tanto, en la bomba biológica del carbono (Falkowski, 1997).

En comparación con muchos ciclos biogeoquímicos, el ciclo del N es relativamente complejo, con especies biológicamente importantes de N que ocurren en fases gaseosas, disueltas y particuladas, en formas inorgánicas y orgánicas, y con diferentes estados de oxidación (Capone *et al.*, 2008). Los estados de oxidación de N en el océano van desde III<sup>-</sup> en las formas más reducidas, como el NH<sub>4</sub><sup>+</sup> y el N orgánico, hasta V<sup>+</sup> en la forma más oxidada, como el NO<sub>3</sub><sup>-</sup> (Pajares y Ramos, 2019). Por lo tanto, el N puede actuar como donador o aceptor de electrones para el metabolismo de procariontes en los ecosistemas marinos (Gruber, 2008).

El ciclo del N marino está mediado por procesos microbianos y pueden clasificarse como aquellos que contribuyen a la fijación de N y lo retienen (fijación del N<sub>2</sub>, asimilación de N, nitrificación y la reducción desasimiladora de NO<sub>3</sub><sup>-</sup> a NH<sub>4</sub><sup>+</sup>), y los que contribuyen a la pérdida de N (desnitrificación, anammox y oxidación anaeróbica del metano dependiente del NO<sub>3</sub><sup>-</sup>/NO<sub>2</sub><sup>-</sup>) (Figura 1) (Hutchins y Capone, 2022).

La gran mayor parte del N existe como N<sub>2</sub>, que solo está disponible para bacterias y arqueas que fijan N<sub>2</sub>. Por lo tanto, la principal fuente de N en el océano es mediante la fijación biológica de N<sub>2</sub> y la deposición atmosférica (Voss *et al.*, 2013).

## Procesos de pérdida de nitrógeno en sistemas marinos

La eliminación de N de los ecosistemas oceánicos es importante a nivel mundial, ya que afecta al balance del N marino, con retroalimentación sobre la productividad primaria y, localmente, porque puede mitigar la eutrofización (Brin *et al.*, 2014). De acuerdo con Codispoti (2007), el balance del presupuesto de N oceánico se inclina más hacia mayores pérdidas de N que de entradas. La liberación de N del océano es causada principalmente por la desnitrificación y la anammox. El factor más importante sobre la pérdida de N marino es el O<sub>2</sub>, dado que la desnitrificación y la anammox ocurren en ambientes donde el O<sub>2</sub> está casi o completamente agotado, como las ZMO y los sedimentos, que son responsables del 30-50% y 50-70% de la pérdida de N, respectivamente (DeVries *et al.*, 2013; Devol, 2015).

Las contribuciones relativas de la pérdida de N por la desnitrificación y la anammox en los sistemas marinos han sido un punto de discusión clave desde hace más de dos décadas. Por ejemplo, algunos estudios han mostrado que hasta el 67% de la producción oceánica de N<sub>2</sub> se atribuye al anammox (Dalsgaard *et al.*, 2012; Kuypers *et al.*, 2003), mientras que se ha demostrado que la desnitrificación es el principal proceso de eliminación de N<sub>2</sub> en una de las ZMO más largas e intensas del océano mundial que se encuentra en el mar Arábigo (Ward *et al.*, 2009; Bulow *et al.*, 2010). Las bacterias anammox, las cuales pertenecen al filo Planctomycetes, oxidan NH<sub>4</sub><sup>+</sup> usando NO<sub>2</sub><sup>-</sup> como aceptor de electrones, generando N<sub>2</sub> como producto final (Zhang *et al.*, 2020a). Las bacterias anammox son autótrofas y requieren iones de NH<sub>4</sub><sup>+</sup> y NO<sub>2</sub><sup>-</sup> producidos a partir de la remineralización de la materia orgánica. En cambio, los desnitrificantes son mayoritariamente heterótrofos y obtienen el carbono de la materia orgánica y su sustrato respiratorio del NO<sub>3</sub><sup>-</sup>, que es abundante en las profundidades del océano (Bulow *et al.*, 2010).

### Desnitrificación

La desnitrificación se refiere a la reducción secuencial de NO<sub>3</sub><sup>-</sup> a productos gaseosos (N<sub>2</sub>O y/o N<sub>2</sub>) vía la oxidación de NO<sub>2</sub><sup>-</sup> y NO (Zumft, 1997). Éste es un proceso principalmente heterótrofo de respiración anaerobia conducido por microorganismos facultativos que también son capaces de llevar a cabo una respiración aerobia (Huang *et al.*, 2017; Elkarrach *et al.*, 2021). Estos organismos son diversos y ubicuos, por lo que la desnitrificación puede ocurrir en una gran variedad de ambientes donde se presenta una combinación de condiciones

como lo son la disponibilidad de  $\text{NO}_3^-$  y  $\text{NO}_2^-$ , concentraciones bajas de  $\text{O}_2$  y materia orgánica suficiente. Generalmente la desnitrificación ocurre a concentraciones de  $\text{O}_2 < 0.2 \text{ mg L}^{-1}$ , característica principal de las ZMO (Lam y Kuypers, 2011). Cuando el proceso está incompleto se produce  $\text{N}_2\text{O}$ , un potente gas de efecto invernadero (Griffis *et al.*, 2017). Los sistemas marinos deficientes en  $\text{O}_2$ , incluidas las zonas costeras y las zonas de surgencia, contribuyen con alrededor del 30% al presupuesto atmosférico de  $\text{N}_2\text{O}$  y, por lo tanto, son una fuente importante de este gas a la atmósfera (Voss *et al.*, 2013).

El proceso de la desnitrificación involucra la participación de cuatro enzimas para formar el producto final ( $\text{N}_2$ ): nitrato reductasa, nitrito reductasa, óxido nítrico reductasa y óxido nitroso reductasa (De Sousa y Bhosle, 2012):



El paso inicial en la desnitrificación es catalizado por la enzima nitrato reductasa y se encarga de la reducción de  $\text{NO}_3^-$  a  $\text{NO}_2^-$ . Existen dos tipos de nitrato reductasa: la NAR, unida a la membrana plasmática, y la NAP, que se encuentra en el periplasma, y son codificadas por los genes *nar/nap*. La enzima nitrito reductasa es la enzima clave de la desnitrificación, ya que participa en la reducción de  $\text{NO}_2^-$  para formar un intermedio gaseoso ( $\text{NO}$ ), gracias a dos genes diferentes de nitrito reductasa, que contienen cobre (*nirK*) o citocromo *cd1* (*nirS*). Ambas enzimas son diferentes en cuanto a estructura y sitio catalítico, a pesar de ser funcional y fisiológicamente equivalentes. Para que el proceso de desnitrificación conduzca a la formación de  $\text{N}_2$ , la reacción de la enzima nitrito reductasa se complementa con la actividad de dos metaloenzimas distintas: óxido nítrico reductasa, que utiliza  $\text{NO}$  como sustrato, y óxido nitroso reductasa, que utiliza  $\text{N}_2\text{O}$ , y son codificadas por los genes *nor* y *nos*, respectivamente (Moura y Moura, 2001; Heylen *et al.*, 2006; Jones *et al.*, 2008; De Sousa y Bhosle, 2012).

Se ha sugerido que la desnitrificación es una ruta modular en la que algunos organismos no siempre poseen el conjunto completo de enzimas y, por lo tanto, llevan a cabo un proceso de desnitrificación incompleto (Zumft, 1997). La única enzima conocida capaz de reducir  $\text{N}_2\text{O}$

es la óxido nitroso reductasa, codificada por el gen *nosZ*. Se han descrito bacterias portadoras del gen *nosZ* que reducen  $\text{N}_2\text{O}$  a  $\text{N}_2$  y, a su vez, carecen de los otros genes desnitrificantes (Zhu *et al.*, 2013).

Distintos factores ambientales controlan el proceso de desnitrificación en los sistemas marinos. Estos incluyen la disponibilidad de  $\text{O}_2$ ,  $\text{NO}_3^-$ ,  $\text{NO}_2^-$  y materia orgánica, así como la salinidad, pH y temperatura (Pajares y Ramos, 2019). Las bacterias desnitrificantes, al ser principalmente heterótrofas, dependen del suministro de la materia orgánica (Ward *et al.*, 2008), esto combinado con la salinidad y el pH, controlan la desnitrificación y la distribución de la comunidad desnitrificante en los sistemas costeros. Por ejemplo, la diversidad de organismos portadores de *nirK* mantienen una relación inversamente proporcional con la salinidad, y se ha demostrado que el rango óptimo de pH para la desnitrificación es de 6.5 a 7.5, por lo tanto, las disminuciones en la desnitrificación parecen ocurrir por aumentos en la salinidad y la alcalinidad (Mosier y Francis, 2010; Nakano *et al.*, 2010; Zhang *et al.*, 2020a).

Otros factores que promueven la desnitrificación son la temperatura y los nutrientes disponibles. Se ha demostrado que en sedimentos la tasa de desnitrificación aumenta exponencialmente con el aumento de temperatura, y mejora cuando se añaden nutrientes (Nowicki, 1994; Pfenning y McMahon, 1997). También, una alta disponibilidad de  $\text{NO}_3^-$  y  $\text{NO}_2^-$  estimulan la desnitrificación y podría aumentar la diversidad de bacterias desnitrificantes (Jayakumar *et al.*, 2009).

En cuanto al  $\text{O}_2$ , las bajas concentraciones de este compuesto están asociadas con la pérdida de N vía desnitrificación y anammox; por lo tanto, se espera que una alta concentración de  $\text{O}_2$  inhiba la actividad desnitrificante e indirectamente reduzca la abundancia de estos microorganismos (Dalsgaard *et al.*, 2014). Sin embargo, en los últimos años se ha demostrado que la desnitrificación puede ocurrir en condiciones aerobias, tanto en cultivos bacterianos como en entornos naturales, como por ejemplo en sedimentos marinos (Gao *et al.*, 2010; Yang *et al.*, 2020b). La desnitrificación aerobia sigue el mismo conjunto de reducciones que la desnitrificación anaerobia, pero en la desnitrificación aerobia la reducción de  $\text{NO}_3^-$  suele ser catalizada por la enzima NAP (Yang *et al.*, 2020a).

## **Zonas de Mínimo Oxígeno (ZMO)**

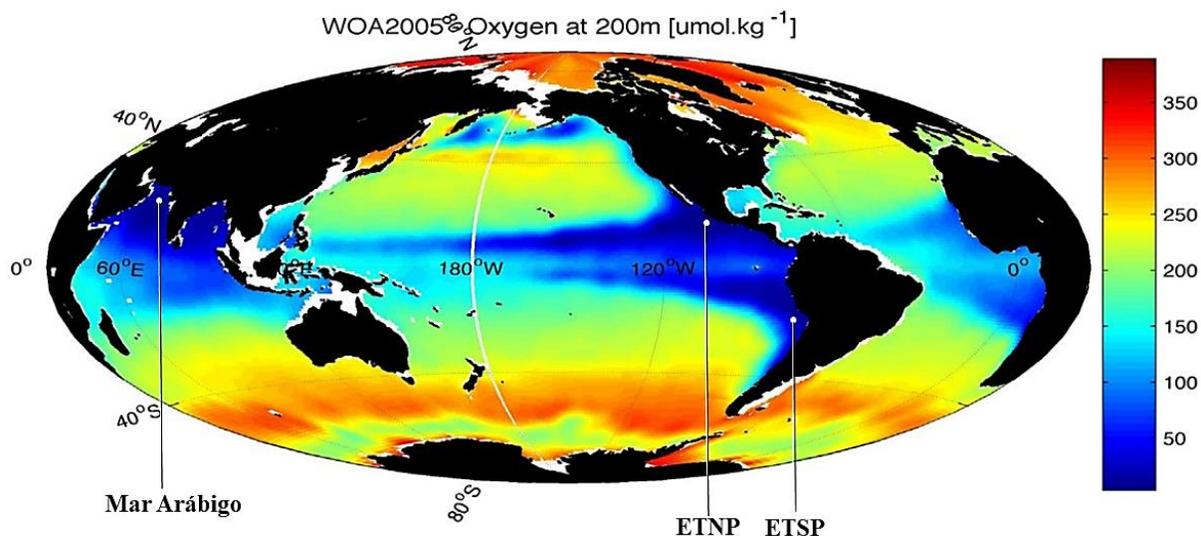
Las ZMO son regiones oceánicas que comprenden masas de aguas subóxicas, con concentraciones de O<sub>2</sub> disuelto menores a 20 µM, que se encuentran aproximadamente entre 100 y 1,000 m de profundidad (Paulmier y Ruiz-Pino, 2009). La mayoría de las ZMO están asociadas con áreas de surgencia que promueven una alta productividad y un mayor consumo de O<sub>2</sub> a través de la descomposición de la materia orgánica (Codispoti *et al.*, 2001). Esta alta demanda de O<sub>2</sub>, en combinación con una circulación lenta, desarrollan concentraciones de O<sub>2</sub> muy bajas en la zona mesopelágica (Wyrski, 1962; Kamykowski y Zentara, 1990).

Las ZMO están casi desprovistas de vida multicelular y están dominadas por microorganismos que llevan a cabo metabolismos anaerobios (Bertagnolli y Stewart, 2018). Estas regiones juegan un papel muy importante en el ciclo del N marino y son las principales zonas de pérdida de N reactivo en el océano asociadas especialmente a la desnitrificación (Gruber y Sarmiento 1997; Codispoti *et al.*, 2001). Las principales ZMO se encuentran en el Mar Arábigo y a lo largo de los límites orientales del Océano Pacífico en el ETNP y el ETSP (Figura 2). La ZMO más grande se encuentra en el ETNP frente a México, donde la respiración microbiana agota las concentraciones de O<sub>2</sub> a anoxia (Tiano *et al.*, 2014).

Estas zonas deficientes en O<sub>2</sub> son clave para comprender el actual desequilibrio en el ciclo del N global y el papel de los océanos en el control del efecto invernadero atmosférico. El agotamiento del O<sub>2</sub> cambia la estructura y la función de las comunidades microbianas marinas; en consecuencia, los ciclos de los nutrientes y el presupuesto del carbono marino se alteran, lo que conduce a la pérdida de N y la producción de gases de efecto invernadero (Stramma *et al.*, 2010; Wright *et al.*, 2012). Además, en la actualidad se han encontrado evidencias de pérdidas de O<sub>2</sub> en general en todos los océanos, lo cual propicia incrementos en la extensión regional de las ZMOs, que sugieren una desoxigenación general de los océanos (Stramma *et al.*, 2008; Breitburg *et al.*, 2018; Levin, 2018).

Uno de los fenómenos que afecta a la extensión de las aguas deficientes en O<sub>2</sub> en el Pacífico oriental es el fenómeno climático interanual de El Niño/Oscilación del Sur (ENSO por sus siglas en inglés) (Yang *et al.*, 2017; Espinoza-Morriberón *et al.*, 2019). Durante El Niño en 1997-1998, alrededor del 61% del volumen de la ZMO del ETSP se redujo, al igual que la disponibilidad de nutrientes y los procesos de pérdida de N (Helly y Levin, 2004; Graco *et*

*al.*, 2017). Por otro lado, durante La Niña la surgencia se intensifica en el ETNP frente a México, llevando masas de agua fría y rica en nutrientes desde el fondo hacia la superficie, que fomenta la producción primaria y la red alimentaria pelágica y conduce a un aumento de la capa superior de la ZMO, contrario a lo que sucede durante El Niño, donde la intensidad de surgencia disminuye y hay un aporte de aguas cálidas bajas en nutrientes (Pajares *et al.*, 2023).



**Figura 2.** Distribución del contenido de O<sub>2</sub> global del océano a 200 m de profundidad. Los colores representan la concentración de O<sub>2</sub> expresada en µmol Kg<sup>-1</sup>. Las zonas resaltadas indican la ubicación de las principales ZMO. Los datos fueron extraídos de la base de datos WOA (World Ocean Atlas, <https://www.nodc.noaa.gov>).

### Desnitrificación en ZMO y sedimentos anóxicos

El O<sub>2</sub> controla los procesos que forman parte del ciclo del N, ya que algunas reacciones microbianas requieren O<sub>2</sub> y otras son inhibidas por él (Voss *et al.*, 2013). Los procesos que llevan a la pérdida de N (desnitrificación y anammox) ocurren principalmente en ambientes donde las concentraciones de O<sub>2</sub> son nulas o muy bajas (Zehr y Kudela, 2011), como en las ZMO (Canfield y Kraft, 2022).

Las ZMO abarcan más de  $1.0 \times 10^6$  Km<sup>2</sup> del lecho marino y en la columna de agua de estas regiones es donde se produce el 30-50% de la pérdida total de N, atribuida principalmente a la desnitrificación (DeVries *et al.*, 2013). Aunque los microorganismos desnitrificantes son anaerobios facultativos y, por tanto, pueden estar en cualquier ambiente marino, se ha

encontrado que la respiración dependiente de  $\text{NO}_3^-$  es dominante sobre la respiración aerobia cuando la concentración de  $\text{O}_2$  está por debajo de 2-4  $\mu\text{M}$ , por lo que la desnitrificación está típicamente restringida a ambientes subóxicos o anóxicos, como los sedimentos marinos (Devol, 1978; Pajares y Ramos, 2019). Sin embargo, se ha demostrado la respiración simultánea de  $\text{NO}_3^-$  y  $\text{O}_2$ , lo que implica la realización de una desnitrificación aerobia, en cultivos (Robertson y Kuenen, 1984; Robertson *et al.*, 1995; Patureau *et al.*, 2000; Kim *et al.*, 2008) y en sedimentos permeables (Gao *et al.*, 2010; Marchant *et al.*, 2017).

En la parte superior de la columna de agua de algunas ZMO, en particular en el ETNP, se ha demostrado la ocurrencia de un ciclo críptico del oxígeno en donde ciertas cianobacterias fotosintéticas (*Prochlorococcus*) producen oxígeno, que es rápidamente consumido por microorganismos aerobios facultativos (García-Robledo *et al.*, 2017). También se ha demostrado que en aguas anóxicas de estas ZMO un grupo de bacterias (linaje NC10) son capaces de llevar a cabo la oxidación del metano acoplada a la desnitrificación, mediante la reducción de  $\text{NO}_2^-$  a  $\text{NO}$ , que luego dismutan a  $\text{N}_2$  y  $\text{O}_2$  para utilizar este último en la oxidación de metano (Ettwig *et al.*, 2010; Padilla *et al.*, 2016). Estos hallazgos indican que ciertos procesos aerobios pueden llevarse a cabo por bacterias especializadas en estas ZMO. A la fecha no se han registrado estos fenómenos en sedimentos de ZMO, que además, no son a priori un ambiente propicio para el crecimiento de bacterias aerobias. Sin embargo, se ha demostrado la presencia de microorganismos desnitrificantes aerobios en sedimentos marinos (p. ej., Carter *et al.*, 1995; Rao *et al.*, 2007; Gao *et al.*, 2010) e incluso se ha encontrado una gran diversidad de microeucariontes aerobios, como hongos, en los sedimentos de la ZMO del Pacífico Mexicano (Posadas *et al.*, 2024). Por lo tanto, también podría ser posible encontrar bacterias aerobias desnitrificantes en sedimentos de esta ZMO, que podrían estar activas cuando el oxígeno se origina por ciertos procesos microbianos (ej., dismutación de  $\text{NO}$ ) o se producen eventuales llegadas de oxígeno por difusión (Canfield y Kraft, 2022).

Los sedimentos presentan un entorno ideal para la desnitrificación, ya que son ambientes donde la materia orgánica procedente de la columna de agua se deposita y sirve como sustrato para los organismos desnitrificantes, proporcionando la fuente de carbono necesaria para su metabolismo durante dicho proceso. También, al descomponerse, se libera  $\text{NH}_4^-$ , el cual

queda disponible para la nitrificación, produciendo los sustratos ( $\text{NO}_3^-$  y  $\text{NO}_2^-$ ) necesarios para que se lleve a cabo la desnitrificación (Blackburn y Henriksen, 1983). Además, el  $\text{NO}_3^-$  presente en la columna de agua puede difundirse en los sedimentos (Andersen *et al.*, 1984). La combinación de estas características, junto con las bajas concentraciones de  $\text{O}_2$ , conducen a una alta actividad desnitrificante en los sedimentos. Aquí es donde se produce el 50-70% de la desnitrificación marina y la principal pérdida de N se da, específicamente, en sedimentos poco profundos y hemipelágicos (Knowles, 1982; Devol, 2015).

### **Organismos desnitrificantes aislados en sistemas marinos**

La capacidad de llevar a cabo el proceso de desnitrificación se ha identificado en distintos microorganismos, entre ellos, un grupo muy diverso de bacterias no relacionadas filogenéticamente (Zumft, 1997), arqueas (Philippot, 2002), algunos hongos (Shoun *et al.*, 1992; Tanimoto *et al.*, 1992) y foraminíferos (Risgaard-Petersen *et al.*, 2006).

Las bacterias desnitrificantes pertenecen a más de 50 géneros, incluyendo miembros de *Proteobacteria*, *Firmicutes*, *Actinobacteria*, *Bacteroidetes* y *Planctomycetes*. Los géneros de bacterias desnitrificantes más comunes aislados y estudiados incluyen a *Pseudomonas*, *Paracoccus*, *Alcaligenes*, *Bacillus*, *Achromobacter*, *Thiobacillus* y *Hyphobacterium* (Gamble *et al.*, 1977; Zumft, 1997; Thamdrup y Dalsgaard., 2008). Algunos géneros bacterianos que llevan a cabo la desnitrificación aerobia han sido identificados como *Thiosphaera* (Robertson y Kuenen, 1984), *Alcaligenes* (Joo *et al.*, 2005), *Bacillus* (Kim *et al.*, 2005; Yang *et al.*, 2011), *Pseudomonas* (Chen *et al.*, 2020) y *Paracoccus* (Zhang *et al.*, 2018).

La mayoría de los estudios sobre comunidades bacterianas desnitrificantes que habitan en las ZMO se han llevado a cabo en la columna de agua mediante técnicas independientes de cultivo (Jayakumar *et al.*, 2004; Castro-González *et al.*, 2005; Jayakumar *et al.*, 2013; Bandekar *et al.*, 2018), por lo que la comprensión de los organismos que llevan a cabo la desnitrificación en los sedimentos de las ZMO sigue siendo limitada. Sin embargo, los escasos estudios sobre genes nitrito y óxido nitroso reductasa (*nirS*, *nirK* y *nosZ*) han demostrado que los microorganismos desnitrificantes en los sedimentos marinos son un grupo muy diverso (Braker *et al.*, 2000; Liu *et al.*, 2003; Thamdrup y Dalsgaard, 2008). Por ejemplo, en sedimentos de la ZMO del Mar Árabe se han aislado mediante técnicas

dependientes de cultivo bacterias desnitrificantes pertenecientes a *Firmicutes*, *Gammaproteobacteria*, *Actinobacteria*, *Bacteroidetes* y *Alphaproteobacteria* (Amberkar *et al.*, 2021), mientras que mediante técnicas independientes de cultivo se han encontrado bacterias desnitrificantes pertenecientes a *Proteobacteria*, *Acidobacteria*, *Chloroflexi* y *Nitrospira* (Divya *et al.*, 2017).

Existen factores ambientales que pueden influir en la estructura de la comunidad desnitrificante en sedimentos marinos, como las propiedades biogeoquímicas de los sedimentos (en especial las concentraciones de materia orgánica y  $\text{NO}_3^-$ ) y las concentraciones de  $\text{O}_2$  (Liu *et al.*, 2003; Mills *et al.*, 2008; Dang *et al.*, 2009).

## **Justificación**

En los sedimentos de las ZMO ocurre la principal pérdida de N marino a través de la desnitrificación, un proceso llevado a cabo por microorganismos cuya composición, diversidad y distribución en estas regiones aún se desconocen en gran medida. Además, es posible que la ruta de desnitrificación sea parcial en estos sistemas anóxicos, lo que podría resultar en la producción y liberación de  $\text{N}_2\text{O}$ , un gas de efecto invernadero. Los estudios sobre los microorganismos desnitrificantes en el ETNP son limitados, por lo que este trabajo busca contribuir al conocimiento de las bacterias desnitrificantes aerobias que habitan los sedimentos de esta ZMO mediante técnicas dependientes de cultivo, evaluando su potencial para realizar este proceso en presencia de oxígeno.

## **Preguntas de Investigación**

¿Es posible aislar bacterias desnitrificantes bajo condiciones aerobias de sedimentos ubicados en una ZMO? De ser así, ¿cuál es la distribución de bacterias desnitrificantes aerobias aisladas de sedimentos a lo largo del transecto costa-océano abierto en la ZMO del Pacífico Central Mexicano en dos fases ENSO contrastantes (La Niña y El Niño)? Además, ¿las bacterias aisladas de dichos sedimentos tienen el potencial para llevar a cabo la desnitrificación aerobia?

## Hipótesis

Si la mayoría de las bacterias desnitrificantes son aerobias facultativas, entonces será posible aislarlas bajo condiciones aerobias de sedimentos de una ZMO. Por otro lado, si los principales sitios de desnitrificación marina se encuentran en sedimentos costeros y durante el fenómeno climático de La Niña se da una mayor intensidad de la surgencia, incrementando el aporte de aguas frías y ricas en nutrientes, entonces se espera encontrar una mayor abundancia y diversidad de bacterias desnitrificantes aerobias aisladas en sedimentos costeros durante La Niña que durante El Niño en la ZMO del Pacífico Central Mexicano. Si las bacterias desnitrificantes fueron aisladas bajo condiciones aerobias, entonces tendrán la capacidad de llevar a cabo la desnitrificación en presencia de oxígeno.

## Objetivos

### Objetivo general

Estudiar la distribución espacial y temporal de bacterias desnitrificantes aerobias aisladas de sedimentos en un transecto frente al Puerto de Mazatlán, situado en la ZMO del Pacífico Mexicano.

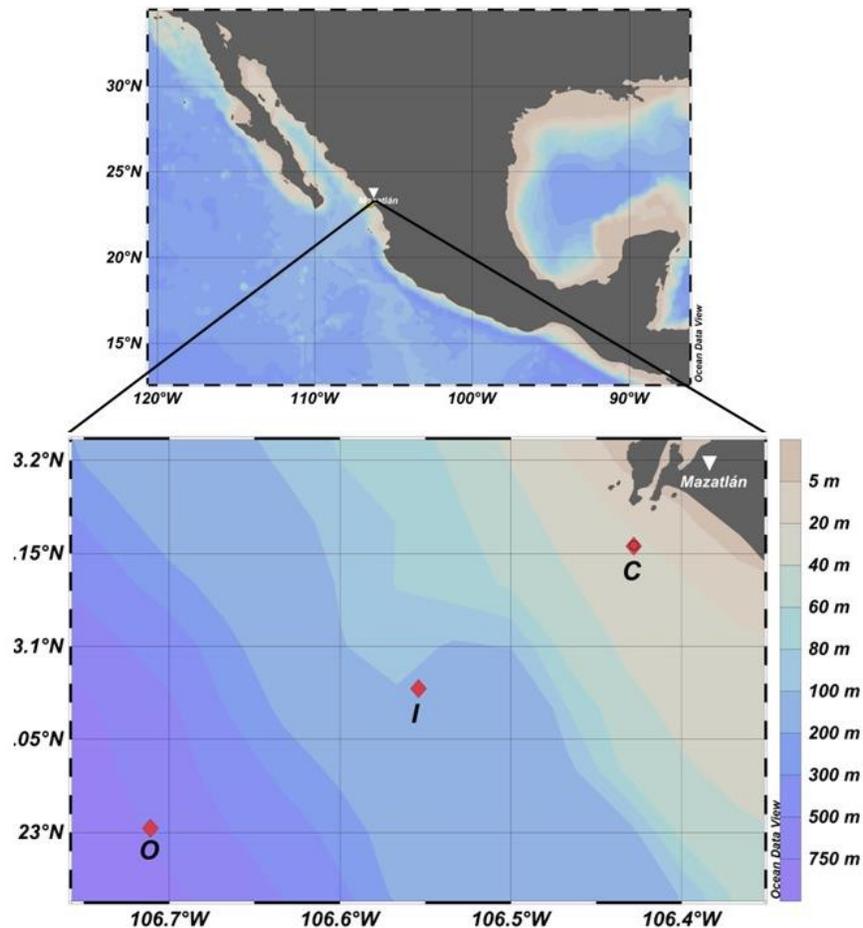
### Objetivos específicos

- Aislar bacterias desnitrificantes aerobias en muestras de sedimentos colectadas a dos profundidades en un transecto costa-océano en la ZMO del ETNP frente al Puerto de Mazatlán y en dos fases ENSO contrastantes (La Niña vs El Niño).
- Identificar las colonias bacterianas desnitrificantes aerobias mediante la amplificación por PCR de los genes desnitrificantes *nirK*, *nirS* y *nosZ*.
- Identificar taxonómica y filogenéticamente (secuenciación del gen ARNr 16S) a las bacterias desnitrificantes aerobias aisladas.
- Relacionar la distribución de las bacterias desnitrificantes aerobias aisladas en estos sedimentos con variables ambientales.
- Comprobar la actividad de los genes desnitrificantes *nirK*, *nirS* y *nosZ* en condiciones aerobias mediante una prueba de reducción de nitratos y nitritos.

## Material y Método

### Zona de estudio y muestreo

La zona de estudio se encuentra frente al Puerto de Mazatlán, en la zona de entrada del Sur del Golfo de California, la cual está en comunicación abierta con el Océano Pacífico Tropical Oriental. El muestreo se llevó a cabo a bordo del buque oceanográfico “El Puma” de la UNAM. Con ayuda de un nucleador se obtuvieron muestras de sedimento a dos profundidades (0 y 20 cm) en un transecto con tres estaciones en abril del 2018 (crucero MAZ IV) y en abril del 2019 (crucero MAZ V), el cual abarca de una zona costera a una oceánica en plena ZMO, con profundidades que van desde 32 hasta 690 m. En ambos cruceros la estación C representa la estación costera (32 m de profundidad), la I la estación intermedia (108 m de profundidad) y la O la estación oceánica (690 m de profundidad) (Figura 3).



**Figura 3.** Localización de las estaciones de muestreo a lo largo de un transecto frente al Puerto de Mazatlán: costera (C), intermedia (I) y oceánica (O).

### **Análisis climáticos, físico-químicos**

Se comprobó la presencia de los fenómenos de La Niña y El Niño durante los respectivos cruceros en el Pacífico Mexicano mediante el índice bimestral multivariado del ENSO (MEI.v2 por sus siglas en inglés) de la administración nacional oceánica y atmosférica (NOAA, por sus siglas en inglés, <https://psl.noaa.gov/enso/mei/>). Este índice toma en cuenta cinco variables oceánicas y atmosféricas (presión al nivel del mar, temperatura superficial del mar, componentes zonal y meridional de viento de superficie y radiación de onda larga saliente) de la cuenca del Pacífico tropical.

El pH de los sedimentos se midió mediante un potenciómetro Hanna (Mod. HI2020-01) en el Laboratorio de Ecología Microbiana Acuática del Instituto de Ciencias de Mar y Limnología (ICMyL). La medición del carbono orgánico se realizó en el laboratorio de Química Acuática del ICMyL con el método de Walkley-Black (1947), modificado por Jackson (1958), que optimiza la oxidación del carbono orgánico con dicromato de potasio.

Los nutrientes ( $\text{NH}_4^+$ ,  $\text{NO}_2^-$  y  $\text{NO}_3^-$ ) fueron analizados únicamente en las muestras de sedimentos del crucero MAZ V, con un autoanizador de flujo segmentado (Skalar San-Plus), usando el método estándar adaptado para análisis de agua marina (Hansen y Koroleff, 1999), en el Laboratorio de Biogeoquímica Acuática del ICMyL.

### **Cultivo y aislamiento de bacterias desnitrificantes aerobias**

Se realizaron diluciones en serie de  $10^{-1}$  y  $10^{-2}$  con 100 mg de sedimento de cada muestra en solución salina y se tomaron alícuotas de 100  $\mu\text{L}$  para la siembra de los microorganismos en dos medios de cultivo distintos en cajas Petri: medio marino (suplementado con nitrato de potasio y peptona de caseína) y medio Braker (suplementado con nitrato de potasio y extracto de levadura) (Anexo 1). Después de incubar en condiciones aerobias a  $28 \pm 1^\circ\text{C}$  durante 1-5 días se caracterizaron las colonias con base en los criterios de tamaño, forma, elevación, bordes, estructura, brillo, color y aspecto (Anexo 2). Posteriormente, se realizó la selección de las colonias bacterianas morfológicamente representativas para su resiembra y aislamiento, con el fin de obtener biomasa suficiente para la extracción de ADN.

## Análisis moleculares

### Extracción de ADN

La extracción de ADN se llevó a cabo utilizando la técnica de bromuro de hexadeciltrimetilamonio (CTAB por sus siglas en inglés) al 2% (Tris-HCL [10 mM] pH 8.0; Na<sub>2</sub>EDTA\*2H<sub>2</sub>O [20 mM] pH 8.0; CTAB 2%; NaCl [1.4 M]) (modificado de Surzycki, 2000). Se determinó la concentración y calidad del ADN por medio del espectrofotómetro *NanoDrop 2000c* (Thermo Scientific). Las muestras de ADN se estandarizaron a una misma concentración (25 ng  $\mu\text{L}^{-1}$ ).

### Amplificación de genes desnitrificantes (*nirS*, *nirK* y *nosZ*)

Los genes *nirK*, *nirS* y *nosZ* se amplificaron utilizando la técnica de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR por sus siglas en inglés), utilizando dos pares de primers distintos para cada gen y los siguientes reactivos: Buffer [0.9x] suplementado con MgCl<sub>2</sub> y dNTPs, primers específicos para cada gen (Tabla 1), My Taq-polimerasa [0.025 U  $\mu\text{L}^{-1}$ ], albúmina de suero bovino (BSA por sus siglas en inglés) [0.2  $\mu\text{g} \mu\text{L}^{-1}$ ], H<sub>2</sub>O de grado molecular y muestra de ADN [1.5 ng  $\mu\text{L}^{-1}$ ]. La PCR se llevó a cabo en un termociclador Eppendorf AG, con diferentes condiciones según los primers utilizados (Tabla 2).

**Tabla 1-** Primers para la identificación de genes desnitrificantes *nirK*, *nirS* y *nosZ* y la amplificación del gen 16s ARNr.

Gen	Primers	Región amplificada	Secuencia de primers	Concentración	Referencia
<i>nirK</i>	F1aCu	473 pb	5'- ATCATGGT(C/G)CTGCCGCG-3'	0.5 $\mu\text{M}$	(Hallin y Lindgren, 1999)
	R3Cu		5'- GCCTCGATCAG(A/G)TTGTGGTT-3'		
	1F	510 pb	GG(A/C) ATG GT(G/T) CC(C/G) TGG CA	0.5 $\mu\text{M}$	(Braker <i>et al.</i> , 1998)
	5R		GCC TCG ATC AG(A/G) TT(A/G) TGG		
<i>nirS</i>	cd3aF	425 pb	5'- GT(C/G)AACGT(C/G)AAGGA(A/G)AC(C/G)GG-3'	0.3 $\mu\text{M}$	(Michotey <i>et al.</i> , 2000)
	R3cd		5'-GA(C/G)TTCGG(A/G)TG(C/G)GTCTTGA-3'		
	1F	890 pb	5'-CCT A(C/T)T GGC CGC C(A/G)C A(A/G)T-3'	0.4 $\mu\text{M}$	(Braker <i>et al.</i> , 1998)
	6R		5'-CGT TGA ACT T(A/G)C CGG T-3'		
<i>nosZ</i>	nosZ-661F	1,140 pb	5'-CGG CTG GGG GCT GAC CAA-3'	0.5 $\mu\text{M}$	(Scala y Kerkhof, 1999)
	nosZ-1173 R		5'- AAC GA(A/C/G) CAG (T/C)TG ATC GA(T/C) AT-3'		
	nosZ1-2F	267 pb	5'-CGCRACGGCAASAAGGTSMSST-3'	0.5 $\mu\text{M}$	(Henry <i>et al.</i> , 2006)
	nosZ1-2R		5'-CAKRTGACKSGCRTGGCAGAA-3'		
16S ARNr	27F	1,465 pb	5'-TACCTTGTTACGACTT-3'	0.3 $\mu\text{M}$	(Lane <i>et al.</i> , 1985)
	1492R		5'-AGAGTTTGATCMTGGCTCAG-3'		

**Tabla 2-** Condiciones de termociclado para cada par de primers usado.

Gen	Primers	Condiciones de termociclado
<i>nirK</i>	F1aCu/R3cu	95° x 5 min, 6 ciclos (95° x 15 s, touchdown 63°-58° x 30 s, 72° x 30 s), 34 ciclos (95° x 15 s, 58° x 30 s, 72° x 30 s), 72° x 5 min
	1F/5R	95° x 5 min, 10 ciclos (95° x 30 s, touchdown 57°-52° x 30 s, 72° x 45 s), 30 ciclos (95° x 30 s, 54° x 30 s, 72° x 45 s), 72° x 7 min
<i>nirS</i>	cd3aF/R3cd	95° x 5 min, 12 ciclos (95° x 30 s, touchdown 55°-49° x 30 s, 72° x 45 s), 18 ciclos (95° x 30 s, 49° x 30 s, 72° x 30 s), 72° x 5 min
<i>nosZ</i>	nosZ-661F/nosZ-1773R	94° x 5 min, 35 ciclos (94° x 30 s, 55° x 1 min, 72° x 1 min), 72° x 10 min
	nosZI-2F/nosZI-2R	95° x 5 min, 40 ciclos (95° x 30 s, 60° x 30 s, 72° x 30 s), 72° x 5 min
16S ARNr	27F/1492R	94 x 5 min, 30 ciclos (94° x 1 min, 52° x 1 min, 72° x 1 min), 72° x 10 min

Para confirmar la presencia de los genes de interés, los productos de PCR se sometieron a una electroforesis de agarosa (1.5%), la cual se preparó con TAE [1x], agarosa y GelRed, y se visualizó con el Molecular Imager GelDoc XR (Biorad). Aquellas cepas identificadas con los genes desnitrificantes se registraron en una base de datos y se conservaron en glicerol 2.0% en el cepario del Laboratorio de Ecología Microbiana Acuática en el ICMyL.

#### ***Amplificación del gen 16S ARNr, secuenciación y análisis bioinformático***

Se realizó la amplificación del gen 16S ARNr a las muestras de ADN que portaron genes desnitrificantes con los primers 27F y 1492R (Lane *et al.*, 1985) (Tablas 1 y 2). Los productos de PCR obtenidos se mandaron a secuenciar por el método de Sanger al Instituto de Biología de la UNAM, CDMX.

La clasificación taxonómica de las secuencias obtenidas se llevó a cabo mediante la herramienta *Classifier* del *Ribosomal Database Project* (RDP): <https://rdp.cme.msu.edu/> (Cole *et al.*, 2014). Posteriormente, se realizó el alineamiento de las secuencias con el programa Bioedit mediante el algoritmo ClustalW y se llevó a cabo la reconstrucción de un árbol filogenético en el software MEGA X con el método de *Neighbour-joining* con un número de repeticiones Bootstrap de 10,000 (Tamura *et al.*, 2021). Por último, el árbol filogenético se visualizó y editó en el programa en línea *Tree of Life* (iTOL): <https://itol.embl.de/> (Ciccarelli *et al.*, 2006).

#### ***Presencia de genes desnitrificantes, análisis de diversidad y estadística***

Una vez obtenida la afiliación taxonómica de las bacterias desnitrificantes aerobias aisladas de estos sedimentos, se buscó la presencia de los genes desnitrificantes en los genomas

disponibles de estas bacterias en la base de datos del Centro Nacional para la Información Biotecnológica (NCBI, por sus siglas en inglés).

Los análisis estadísticos y de diversidad se llevaron a cabo en el programa *RStudio* v. 4.0.2 (R Core Team, 2020). Se calcularon los índices de diversidad alfa de riqueza (Chao1), diversidad específica (Shannon) y dominancia (Simpson), utilizando las paqueterías *vegan* (Oksanen *et al.*, 2022) y *fossil* (Vavrek, 2011). Se realizó un análisis de correlación de Pearson entre la abundancia de las distintas especies bacterianas que fueron identificadas y las variables ambientales con la paquetería *rstatix* (Kassambara, 2023). El análisis de la diversidad beta se realizó mediante un análisis de multiescalamiento dimensional no métrico (NMDS) con la matriz de disimilitud de Bray-Curtis utilizando las paqueterías *vegan* (Oksanen *et al.*, 2022) y *ggplot2* (Wickham, 2016).

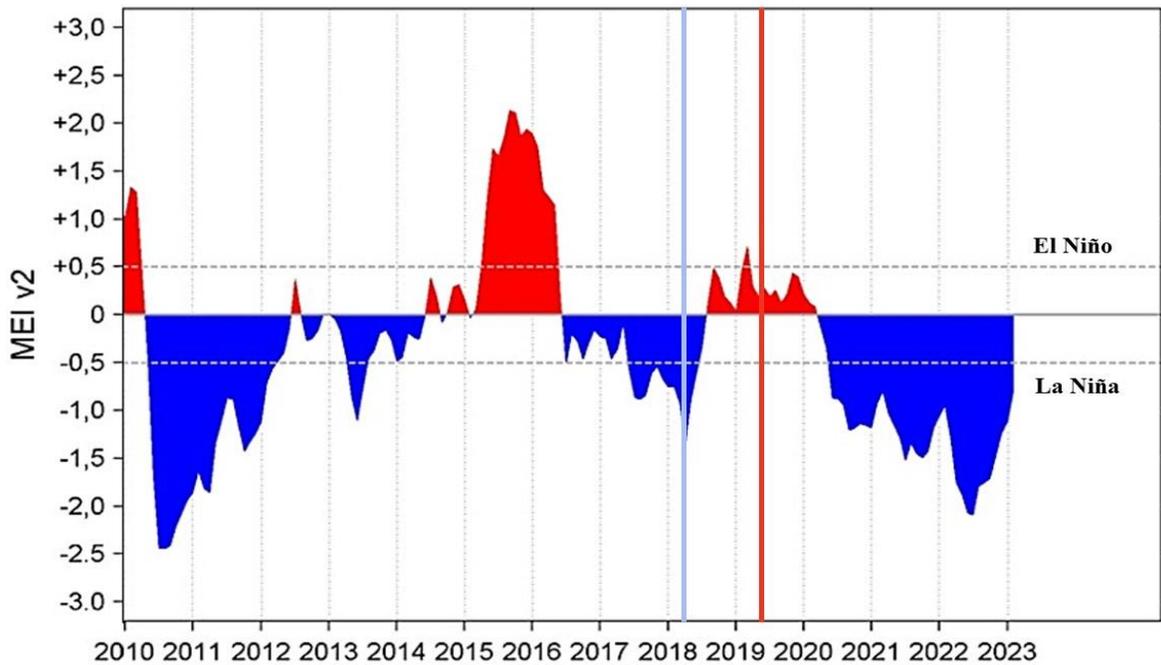
#### ***Ensayo de actividad potencial de los genes desnitrificantes en condiciones aerobias***

Se llevó a cabo una prueba colorimétrica de reducción de  $\text{NO}_3^-$  y  $\text{NO}_2^-$ , modificada de Holding y Colle (1971), en las cepas que portaron genes desnitrificantes para comprobar la actividad de los genes *nirS* y *nirK* en presencia de  $\text{O}_2$  mediante el uso de reactivos que reaccionan con la presencia de  $\text{NO}_3^-$  y/o  $\text{NO}_2^-$  (en el Anexo 3 se explica el posible resultado dependiendo de la reacción obtenida). Para detectar la posible actividad del gen *nosZ* y comprobar la reducción de  $\text{NO}_2^-$  a productos gaseosos ( $\text{N}_2$  y/o  $\text{N}_2\text{O}$ ) en condiciones aerobias se utilizó una campana Durham (Anexo 3). Para llevar a cabo esta prueba, se sembraron las cepas seleccionadas en tubos de ensayo con tapa de rosca y con el caldo correspondiente (marino o Braker), se les colocó una campana Durham y se incubaron en condiciones aerobias a  $28 \pm 1^\circ\text{C}$  de 1-5 días. Pasado el tiempo de incubación, se observó la presencia de gases en la campana, posteriormente se añadieron los reactivos  $\alpha$  (produce colorantes azoicos en medios con sales de diazonio) y  $\beta$  (forma sales de diazonio en medios con nitritos) (Anexo 4) y se registraron los cambios de coloración en el medio.

# Resultados

## Condiciones climáticas

Los dos años de muestreo presentaron condiciones climáticas distintas. El crucero MAZ IV, en 2018, coincidió con un evento moderado de La Niña (con un valor MEI.v2 de -1.3), mientras que, el crucero MAZ V, en 2019, coincidió con un evento débil de El Niño (con un valor MEI.v2 de 0.3) (Figura 4).

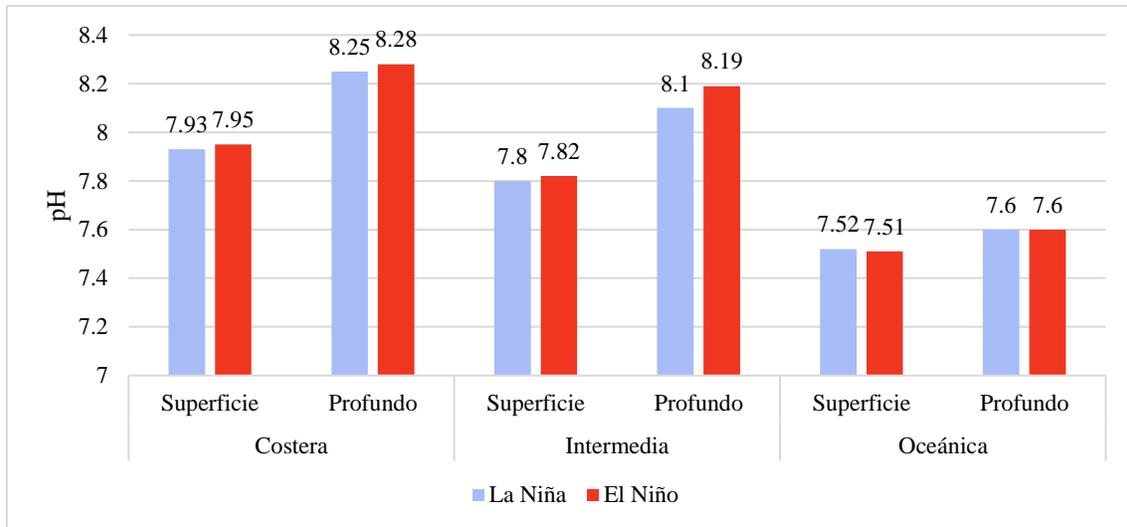


**Figura 4.** Serie de tiempo del Índice Multivariado ENSO versión 2 (MEI v2, por sus siglas en inglés) para los últimos 13 años. Los períodos fríos (en color azul) o cálidos (en color rojo) indican la ocurrencia de La Niña o El Niño, respectivamente. MAZ IV (—); MAZ V (—). Tomado de <https://psl.noaa.gov/enso/mei/>

## Características físico-químicas de los sedimentos

### *pH*

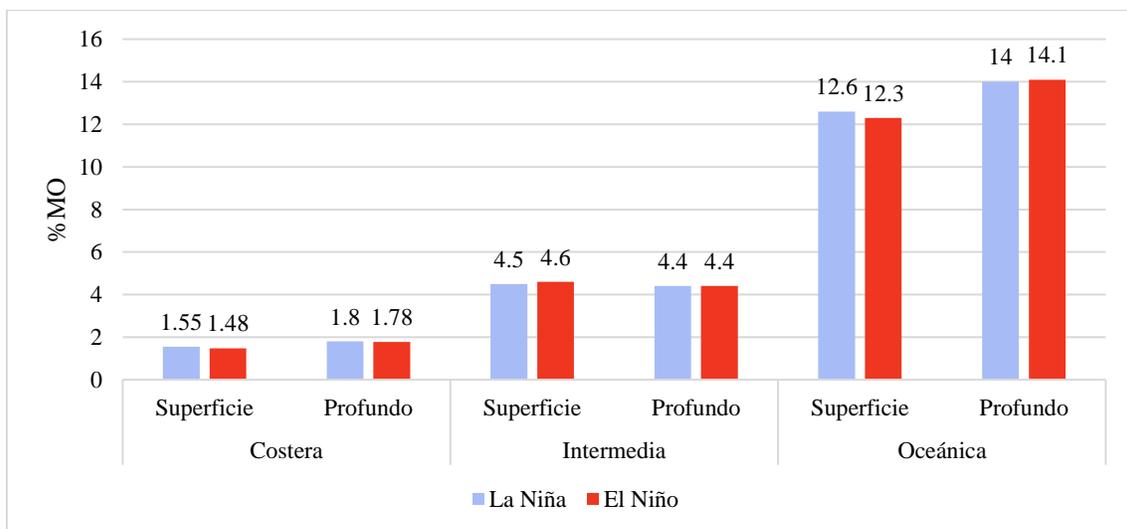
Los valores de pH en las muestras de sedimento se encontraron en un intervalo de 7.51 (en la superficie de la estación oceánica durante El Niño) a 8.28 (en la profundidad de la estación costera durante El Niño). En ambos cruceros, los valores fueron disminuyendo de la costa hacia la zona oceánica y fueron mayores en las muestras profundas que en las superficiales. En general, el pH fue muy similar en ambos eventos climáticos (Figura 5).



**Figura 5.** pH de las muestras de sedimentos. El número que se observa sobre las barras corresponde al valor de pH.

### *Porcentaje de materia orgánica*

El porcentaje de materia orgánica presentó un comportamiento contrario al pH, ya que aumentó de la costa hacia la zona oceánica (Figura 6). En ambas fases climáticas, los valores fueron similares entre las muestras superficiales y profundas. En la estación oceánica fue donde se encontró un mayor porcentaje de materia orgánica (~12.4% en la superficie y ~14% en la profundidad), mientras que en la estación costera se encontraron los valores más bajos (~1.51% en la superficie y ~1.79% en la profundidad).



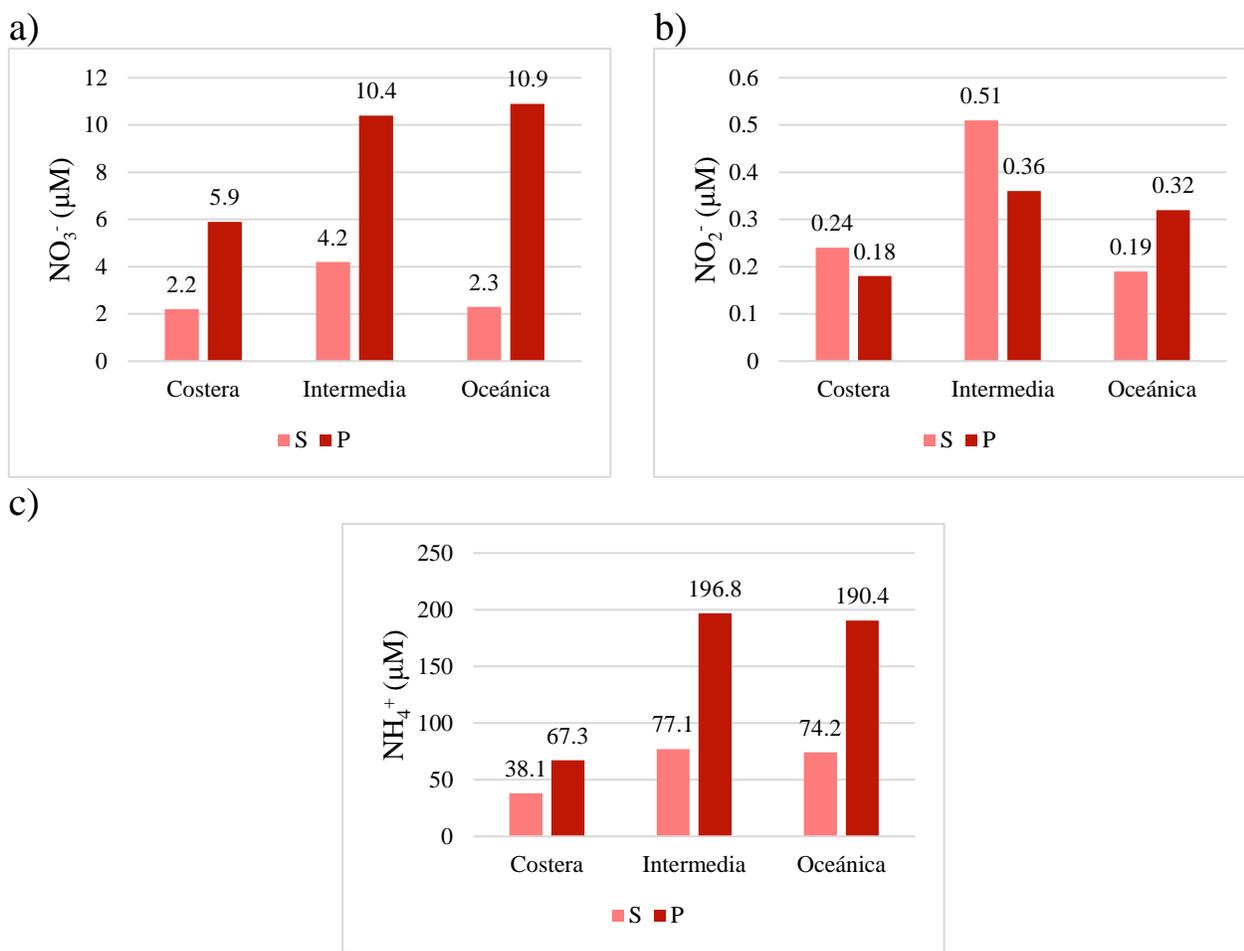
**Figura 6.** Porcentaje de materia orgánica en las muestras de sedimento. El número que se observa sobre las barras indica el valor del % de materia orgánica.

### Nutrientes durante El Niño

Durante el evento de El Niño, las concentraciones de  $\text{NO}_3^-$  fueron más altas en las muestras profundas, las cuales aumentaron de la estación costera a la oceánica (de 5.9 a 10.9  $\mu\text{M}$ ). Para las muestras superficiales, el valor más alto se encontró en la estación intermedia (4.2  $\mu\text{M}$ ), seguida de la oceánica (2.3  $\mu\text{M}$ ) y costera (2.2  $\mu\text{M}$ ) (Figura 7a).

En cuanto al  $\text{NO}_2^-$ , los valores más altos se encontraron en la estación intermedia, tanto para la muestra de superficial como la profunda (0.51 y 0.36  $\mu\text{M}$ , respectivamente) y el más bajo fue en la muestra profunda de la estación costera (0.18  $\mu\text{M}$ ) (Figura 7b).

Por otro lado, las concentraciones de  $\text{NH}_4^+$  fueron más altas en la estación intermedia en ambas profundidades (77.1  $\mu\text{M}$  en la superficie y 196.8  $\mu\text{M}$  en la profundidad), seguidas de la oceánica (74.1 y 190.4  $\mu\text{M}$ ) y por último las de la estación costera (38.1 y 67.3  $\mu\text{M}$ ) (Figura 7c).



**Figura 7.** Concentraciones de a)  $\text{NO}_3^-$ , b)  $\text{NO}_2^-$  y c)  $\text{NH}_4^+$  en los sedimentos a lo largo del transecto durante El Niño. S: superficial, P: profundo.

### **Aislamiento de bacterias en los sedimentos de la ZMO del Pacífico Mexicano**

Se obtuvo un total de 1034 aislados bacterianos, 615 en las muestras superficiales y 419 en las muestras profundas de ambas fases climáticas (555 para La Niña y 479 para El Niño), de las cuales se seleccionaron y resembraron 213 representantes para su posterior extracción de ADN (Tabla 3).

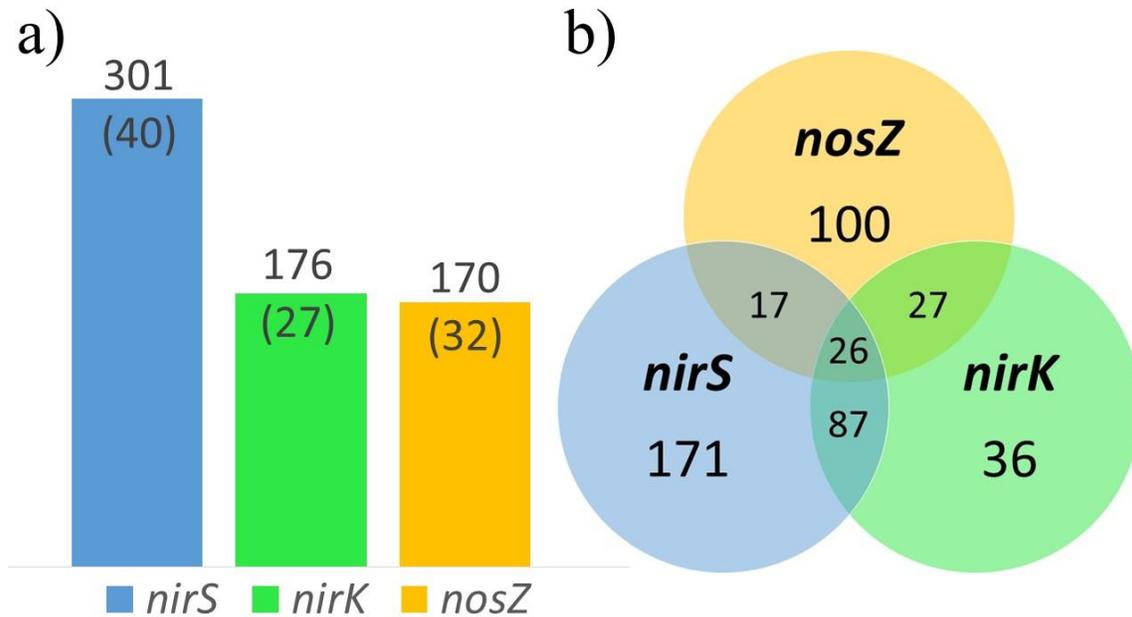
**Tabla 3-** Número de representantes seleccionados para la extracción de ADN (en paréntesis el número total de aislados representantes), en las muestras superficiales y profundas en las dos fases climáticas y en los dos medios de cultivo.

<b>Fase climática</b>	<b>Medio Marino</b>		<b>Medio Braker</b>	
	<b>Superficial</b>	<b>Profundo</b>	<b>Superficial</b>	<b>Profundo</b>
La Niña	43 (81)	16 (38)	24 (41)	20 (52)
El Niño	32 (77)	23 (45)	31 (38)	24 (56)

### **Distribución de bacterias aisladas con genes desnitrificantes *nirS*, *nirK* y *nosZ***

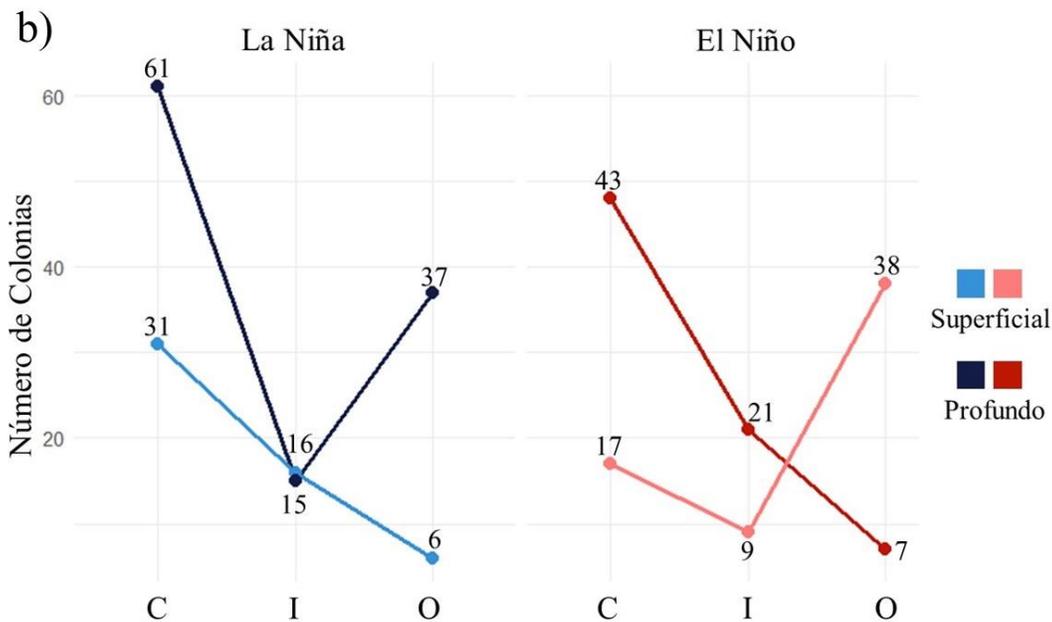
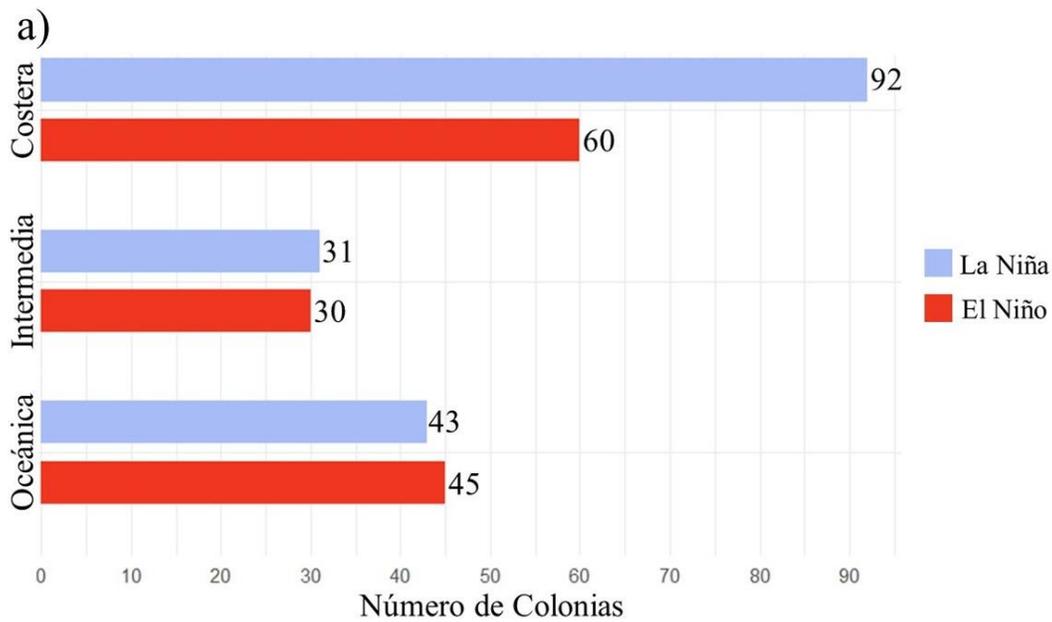
Una vez extraído el ADN a los 213 representantes, se descartaron las muestras con concentración baja y/o de mala calidad, quedando 121 muestras de ADN, las cuales se utilizaron para identificar las bacterias portadoras de genes desnitrificantes mediante PCR.

De las 121 muestras de ADN, 67 amplificaron genes desnitrificantes (representando a un total de 464 aislados). A partir de esos resultados se calculó el número de aislados portadores de genes desnitrificantes (Figura 8). Las figuras 9, 10 y 11, muestran la distribución espacial y temporal en la zona de estudio de los aislados bacterianos para cada uno de los genes desnitrificantes (*nirS*, *nirK* y *nosZ*, respectivamente).



**Figura 8.** a) Número de aislados bacterianos con genes desnitrificantes. El número encima de la barra refleja la abundancia registrada y entre paréntesis se indica el número de representantes para cada gen; b) Distribución de los aislados portadores de uno o varios genes desnitrificantes.

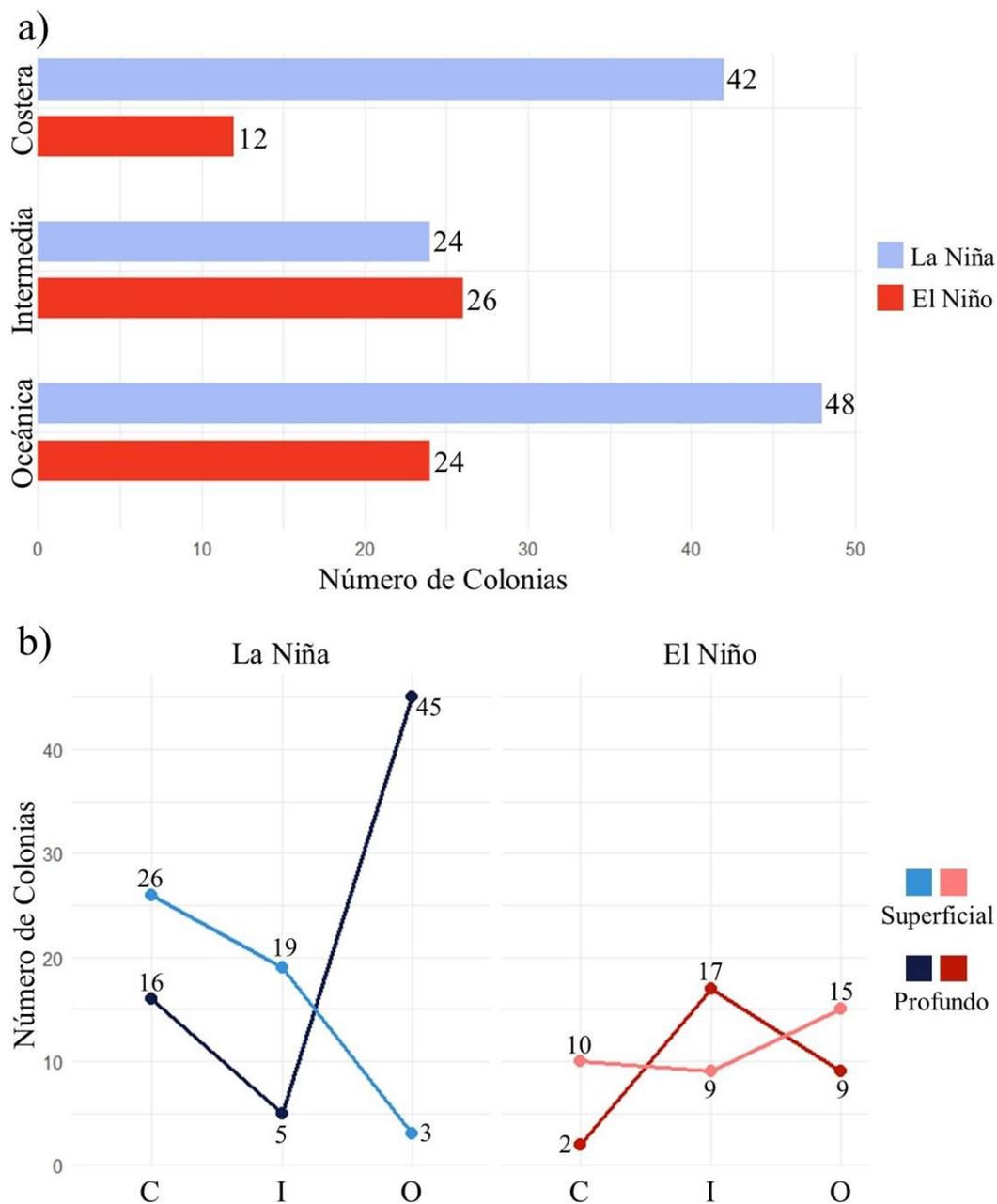
El número de aislados portadores del gen *nirS* (301) fue mayor en comparación con los otros genes desnitrificantes (176 para *nirK* y 170 para *nosZ*). Su abundancia fue mayor durante La Niña que durante El Niño (166 y 135 aislados, respectivamente) y en ambas fases el número de aislados con *nirS* fue menor en la estación intermedia (31 durante La Niña, 30 durante El Niño) y mayor en la estación costera (92 La Niña, 60 El Niño) (Figura 9a). Por otro lado, durante La Niña, el porcentaje de aislados con el gen *nirS* fue mayor en las muestras profundas en las estaciones costera y oceánica (66 y 86%, respectivamente), mientras que en la estación intermedia el porcentaje fue mayor en las superficiales (52%). Durante El Niño el porcentaje de los aislados portadores de este gen fue mayor en las muestras profundas en las estaciones costera e intermedia (72 y 70%, respectivamente) y en las muestras superficiales de la estación oceánica (84%) (Figura 9b).



**Figura 9.** a) Número de aislados portadores del gen *nirS* en cada estación durante La Niña y El Niño. b) Número de aislados con el gen *nirS* por estación (C: costera, I: intermedia, O: oceánica) y profundidad durante las dos fases climáticas.

En cuanto al gen *nirK*, en La Niña el número de aislados que lo portaron fue menor en la estación intermedia (24) en comparación con las estaciones costera (42) y oceánica (48), y fue en esa fase donde se encontró un mayor número de colonias portadoras de *nirK* (114). Durante El Niño disminuyó el número de aislados (62) y en la estación intermedia fue donde se encontró la mayor cantidad de aislados con *nirK* (26) (Figura 10a). En cuanto a las

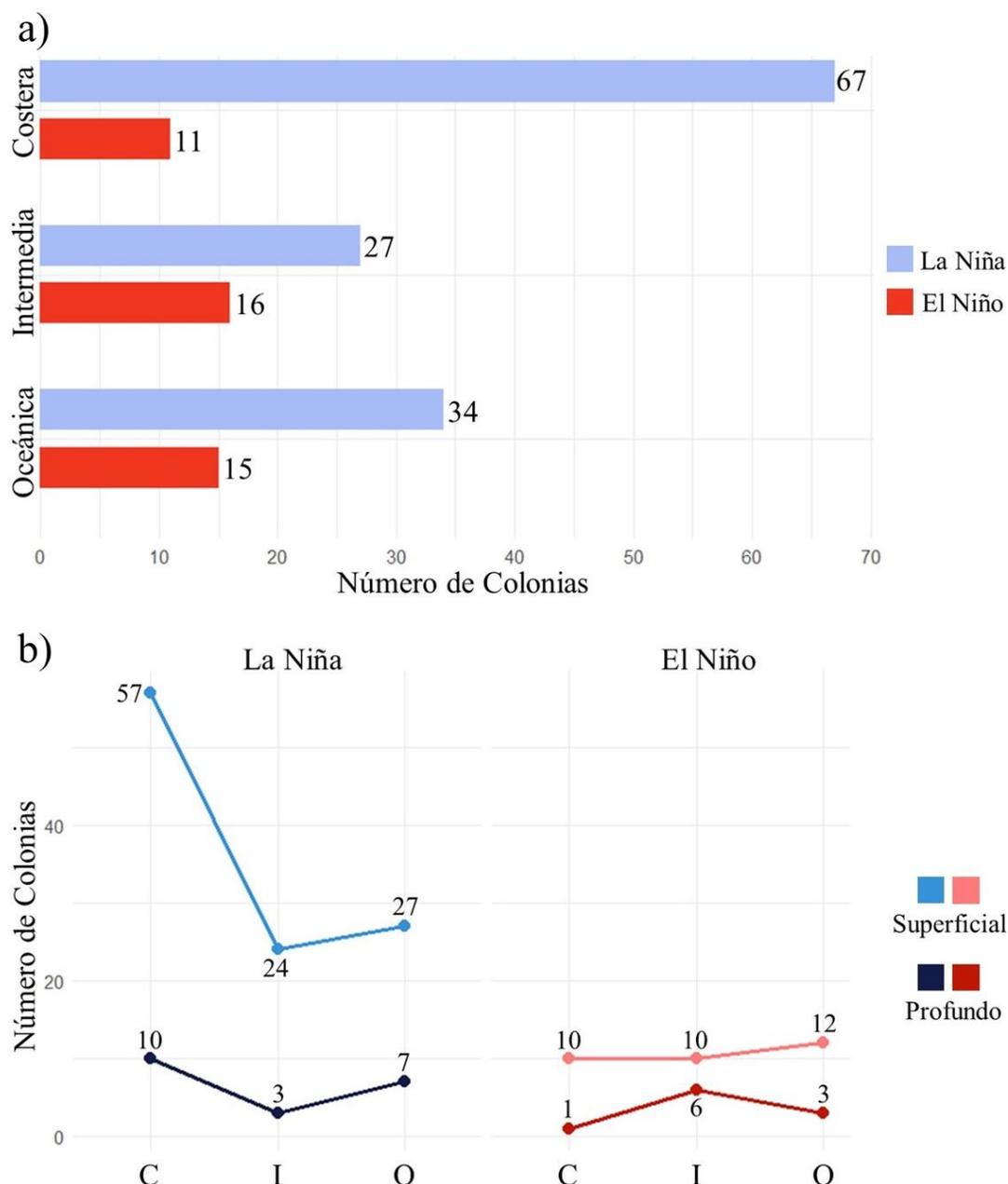
profundidades, las bacterias portadoras del gen *nirK* dominaron en las muestras superficiales en las estaciones costera e intermedia durante La Niña (72 y 79%) y en las estaciones costera y oceánica durante El Niño (83 y 62%) (Figura 10b).



**Figura 10.** a) Número de aislados portadores del gen *nirK* en cada estación durante La Niña y El Niño. b) Número de aislados con el gen *nirK* por estación (C: costera, I: intermedia, O: oceánica) y profundidad durante las dos fases climáticas.

Por último, el número de aislados portadores del gen *nosZ* durante La Niña fue mayor (128) y, al igual de lo que se observó en las colonias con *nirS*, se encontró el menor número de

aislados con este gen en la estación intermedia (27) y el mayor número en la estación costera (67). Durante El Niño se observó lo contrario, la estación con más aislados fue la intermedia (16), seguida de la oceánica (15) y por último la costera (11) (Figura 11a). Los aislados de bacterias que portaron el gen *nosZ* dominaron en las muestras superficiales en ambas fases climáticas y en todas las estaciones (Figura 11b).



**Figura 11.** a) Número de aislados portadores del gen *nosZ* en cada estación durante La Niña y El Niño. b) Número de aislados con el gen *nosZ* por estación (C: costera, I: intermedia, O: oceánica) y profundidad durante las dos fases climáticas.

## Diversidad alfa

En general, la riqueza (Chao1: promedio de 13.4 durante La Niña y de 17.1 durante El Niño) y la diversidad (Shannon: promedio de 1.57 durante La Niña y 1.88 durante El Niño) de bacterias desnitrificantes aisladas en este estudio fue baja, con un ligero incremento durante El Niño. Entre profundidades, estos índices fueron mayores en la superficie (Chao 1 de 17.9, Shannon de 1.86) que en la profundidad (Chao 1 de 12.5, Shannon de 1.6). El índice de Simpson sugiere que, en general, existió una alta dominancia de los aislados bacterianos desnitrificantes en las diferentes muestras, siendo mayor durante El Niño que durante La Niña (promedio de 0.7087 durante La Niña y de 0.7747 durante El Niño) (Tabla 4).

**Tabla 4.** Diversidad alfa a lo largo del transecto costa-océano en las distintas profundidades durante las dos fases climáticas.

Estaciones	Profundidad	Chao1		Shannon		Simpson	
		La Niña	El Niño	La Niña	El Niño	La Niña	El Niño
Costera	superficial	10.25	14.17	1.71	2.14	0.7139	0.8643
	profundo	11	8	1.67	0.88	0.7449	0.4829
Intermedia	superficial	18	12	1.39	2.07	0.6719	0.8389
	profundo	16	12.75	1.91	2.31	0.8304	0.8844
Oceánica	superficial	17	36.25	1.65	2.19	0.7191	0.8139
	profundo	8	19.5	1.14	1.69	0.5721	0.7639

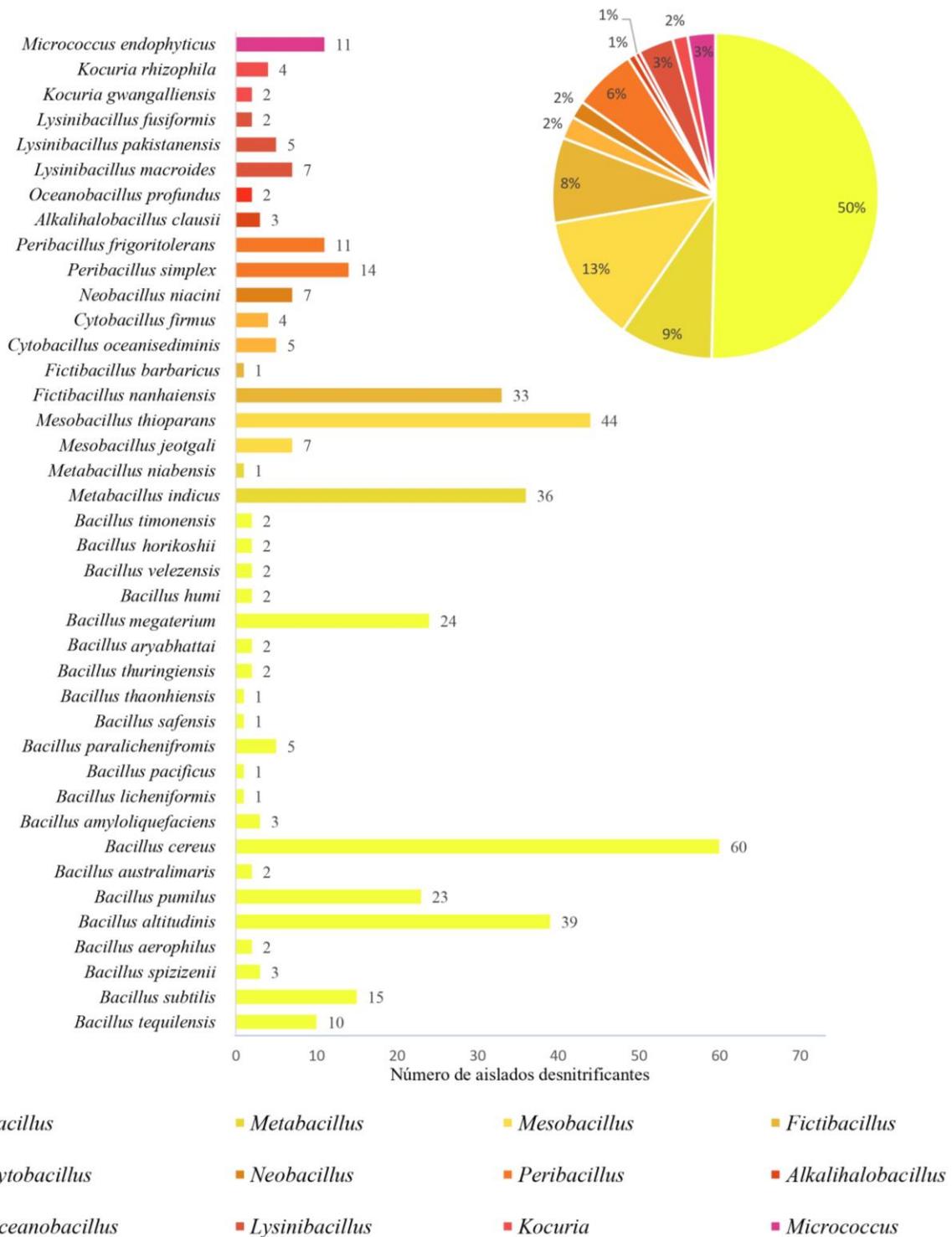
## Clasificación taxonómica de las bacterias portadoras de genes desnitrificantes

Se amplificó y se secuenció el gen ARNr 16S de los 67 representantes que presentaron algún gen desnitrificante. Una vez alineadas las secuencias obtenidas, se descartaron seis por mala calidad. Las 61 secuencias analizadas representaron a 401 aislados portadores de genes desnitrificantes.

De estos 61 representantes, 58 pertenecieron al filo Firmicutes y 3 a Actinobacteria. Se encontraron un total de 12 géneros bacterianos, de los cuales 10 pertenecieron al filo Firmicutes y se identificaron como: *Bacillus* con 34 representantes, siendo el género dominante con 202 aislados; *Mesobacillus* con cuatro representantes y 51 aislados; *Metabacillus* con seis representantes y 37 aislados; *Fictibacillus* con tres representantes y 34 aislados; *Peribacillus* con dos representantes y 25 aislados; *Lysinibacillus* con tres representantes y 14 aislados; *Cytobacillus* con dos representantes y nueve aislados;

*Neobacillus* con dos representantes y siete aislados; *Alkalihalobacillus* con un representante y tres aislados; y *Oceanobacillus* con un representante y dos aislados. Los dos géneros pertenecientes al filo Actinobacteria fueron *Micrococcus* con un representante y 11 aislados y *Kocuria* con dos representantes y seis aislados (Figura 12).

Por otro lado, se reconocieron 40 especies de bacterias desnitrificantes, 37 de ellas pertenecieron al filo Firmicutes, representando a un total de 384 aislados, mientras que 3 especies pertenecieron al filo Actinobacteria, representando a 17 aislados: *Micrococcus endophyticus* (11 aislados), *Kocuria rhizophila* (4) y *K. gwangalliensis* (2). Las cinco especies más abundantes pertenecieron a Firmicutes y fueron *Bacillus cereus* (60 aislados), *Mesobacillus thioparans* (44), *B. altitudinis* (39), *Metabacillus indicus* (36) y *Fictibacillus nanhaiensis* (33) (Figura 12).



**Figura 12.** Número de bacterias desnitrificantes aisladas por especie representadas en una gráfica de barras (el número al lado la barra muestra el número de aislados por especie). Porcentaje de bacterias desnitrificantes aisladas a nivel de género representado en un gráfico de pastel.

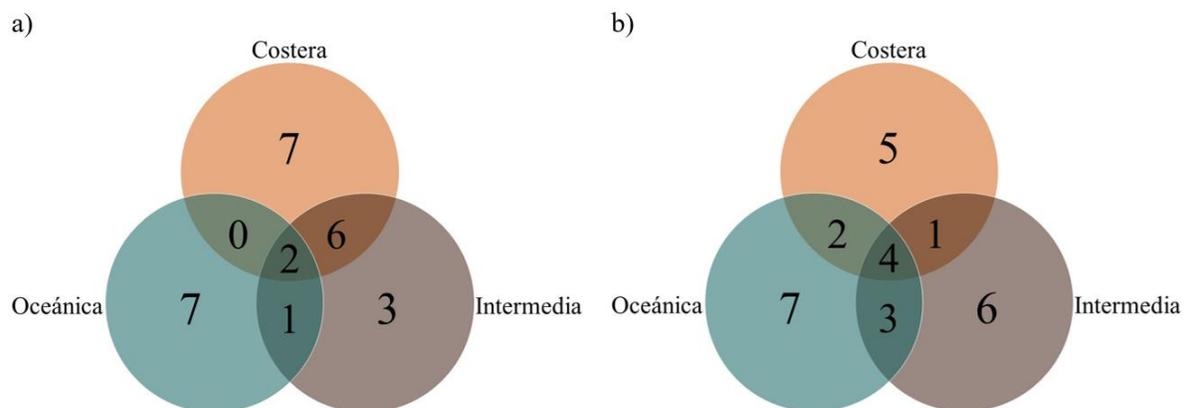
### Distribución de las especies de bacterias desnitrificantes aisladas

Durante La Niña se registraron 26 especies de bacterias desnitrificantes (con un total de 253 aislados) y solamente dos de ellas aparecieron en todas las estaciones (*Bacillus cereus* y *B. subtilis*). Tanto la estación costera como la oceánica presentaron siete especies únicas, mientras que la intermedia solamente tres (Figura 13; Anexo 5).

En cuanto a El Niño, se registraron 28 especies de bacterias desnitrificantes (con 158 aislados en total). *Bacillus altitudinis*, *B. tequilensis*, *B. megaterium* y *Metabacillus indicus* fueron identificadas en las tres estaciones. La estación oceánica fue la que presentó un mayor número de especies únicas (7), seguida de la intermedia (6) y por último la costera (5) (Figura 13b; Anexo 5)

En ambas fases se compartieron 14 especies, las cuales fueron *Bacillus subtilis*, *B. tequilensis*, *B. aerophilus*, *B. altitudinis*, *B. pumilus*, *B. cereus*, *B. megaterium*, *Metabacillus indicus*, *Peribacillus frigoritolerans*, *Mesobacillus jeotgali*, *Mesobacillus thioparans*, *Lysinibacillus pakistanensis*, *Alkalihalobacillus clausii* y *Micrococcus endophyticus* (Anexo 5 y 6).

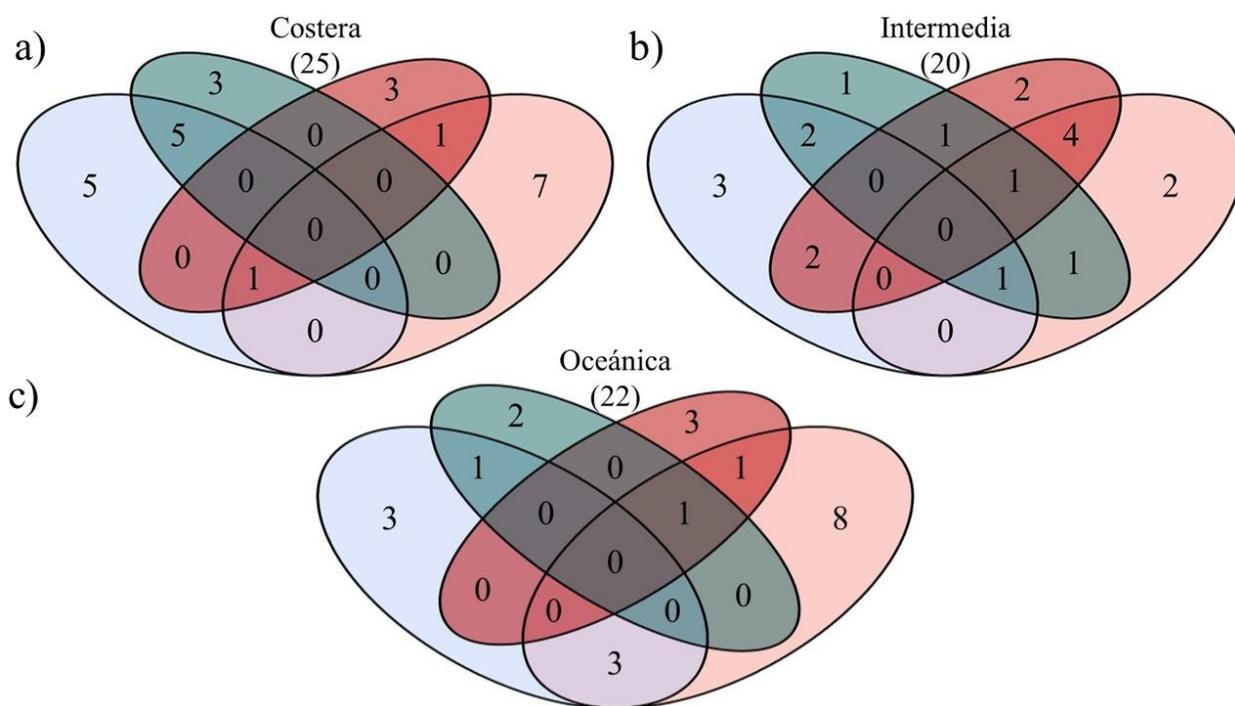
El número de especies desnitrificantes registrado a lo largo de transecto siguió un patrón inverso en cada fase climática. Durante La Niña, el número de especies disminuyó de la costa a la zona oceánica (con 15 especies en la estación costera, 12 en la intermedia y 10 en la oceánica). En cambio, durante El Niño, el número de especies aumentó de la estación costera a la oceánica (con 12 especies en la costa, 14 en la intermedia y 16 en la oceánica) (Anexo 5, Figura 13).



**Figura 13.** Distribución de las especies desnitrificantes en las tres estaciones durante: a) La Niña y b) El Niño.

La estación con un mayor número de especies de bacterias desnitrificantes aisladas fue la costera (con un total de 25), seguida de la oceánica (con 22) y, por último, la intermedia (con 20) (Figura 14). Por otro lado, fueron muy pocas las especies que se compartieron entre las dos fases climáticas en cada estación. Por ejemplo, en la estación intermedia se compartieron seis especies entre fases climáticas (*Bacillus subtilis*, *B. tequilensis*, *B. megaterium*, *Metabacillus indicus*, *Mesobacillus thioparans* y *Lysinibacillus pakistanensis*), en la oceánica cuatro especies (*B. subtilis*, *B. altitudinis*, *B. cereus* y *Metabacillus indicus*) y en la costera dos especies (*B. tequilensis* y *Peribacillus frigiditolerans*) (Figura 14; Anexo 5).

El mayor número de especies se encontró en la superficie de las estaciones costera y oceánica en ambas fases climáticas (durante La Niña en la estación costera se encontraron 5 especies y en la oceánica 3; durante El Niño se encontraron 7 y 8, respectivamente), mientras que en la estación intermedia no se observó un patrón de distribución claro entre profundidades (Figura 14; Anexo 5).



**Figura 14.** Distribución de las especies desnitrificantes para cada estación en las distintas profundidades y fases climáticas: La Niña representada en azul (■ superficial, ■ profundo) y El Niño en rojo (■ superficial, ■ profundo), a) estación costera, b) estación intermedia, c) estación oceánica y entre paréntesis en número total de especies presentes.

## Filogenia de las bacterias desnitrificantes aisladas

El árbol filogenético se construyó con 61 secuencias de 16S ARNr de representantes bacterianos que contuvieron genes desnitrificantes, correspondientes a 401 colonias y a 40 especies (Figura 15). El gen *nirS* fue el más abundante entre las especies identificadas, ya que estuvo presente en 24 de ellas, seguido del gen *nosZ*, que se encontró en 23 especies y, por último, el gen *nirK*, el cual amplificó en 20 especies.

*Bacillus timonensis*, *Cytobacillus firmus*, *Fictibacillus nanhaiensis*, *Mesobacillus jeotgali* y *Kocuria rizophila* fueron las especies que portaron los tres genes de interés, cada una en un solo representante. Cuatro especies presentaron los genes *nirS* y *nirK*, las cuales fueron *B. subtilis* (en uno de cinco representantes), *B. tequilensis* (en uno de tres representantes), *B. altitudinis* (en dos de cuatro representantes) y *Peribacillus frigoritolerans* (con un solo representante). Los genes *nirS* y *nosZ* amplificaron en las especies *B. pumilus* (en uno de dos representantes), *B. thuringiensis* y *C. oceanisediminis* (con un representante cada uno) y *Metabacillus indicus* (en dos de sus cuatro representantes). Las especies que amplificaron los genes *nirK* y *nosZ* fueron *B. subtilis* (en uno de cinco representantes), *B. thaonhiensis* (con un solo representante) y *F. nanhaiensis* (en uno de dos representantes).

Fueron 16 representantes pertenecientes a 14 especies los que amplificaron únicamente el gen *nirS*: *Bacillus velezensis*, *B. paralicheniformis*, *B. licheniformis*, *B. aryabhatai*, *Metabacillus niabensis* y *Peribacillus simplex* con un solo representante; *B. megaterium* y *Mesobacillus thioparans*, con dos representantes; y las especies que lo presentaron sólo en alguno de sus representantes: *B. tequilensis* (en uno de tres representantes), *B. altitudinis* (en uno de cuatro), *B. pumilus* (en uno de dos), *B. cereus* (en uno de tres), *Metabacillus indicus* (en dos de cinco) y *Mesobacillus jeotgali* (en uno de dos).

Los representantes que solamente amplificaron el gen *nirK* fueron 10, todos de diferentes especies, identificadas como *Bacillus spizizenii*, *B. humi*, *B. horikoshii*, *Fictibacillus barbaricus*, *Oceanobacillus profundus*, *Lysinibacillus fusiformis*, *Alkalihalobacillus clausii*, *Kocuria gwangalliensis* (todas con un solo representante), *Metabacillus indicus* (en uno de cinco representantes) y *Neobacillus niacini* (en uno de dos).

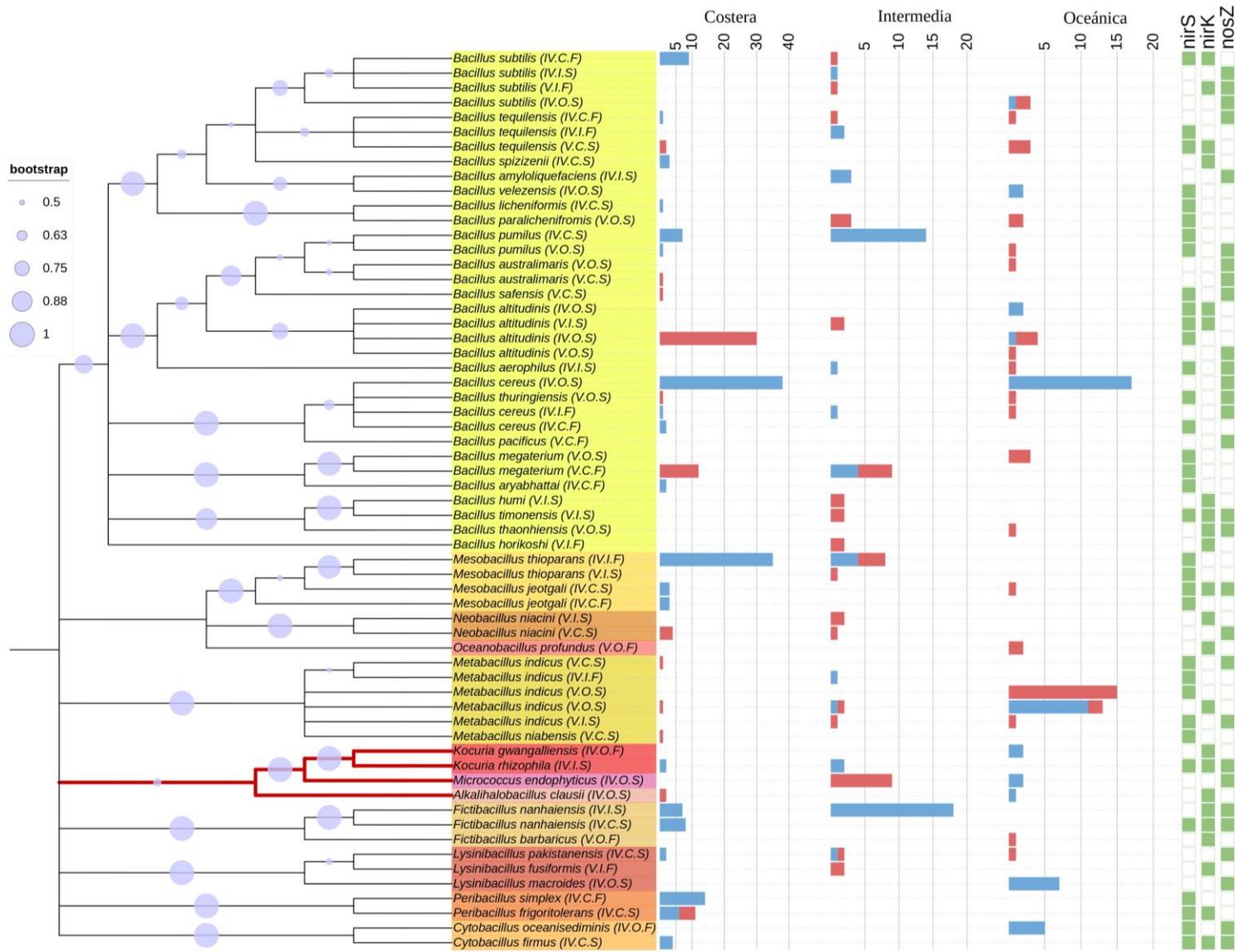
Por último, 14 representantes de 11 especies amplificaron solamente el gen *nosZ*. Las que tuvieron un solo representante se identificaron como *Bacillus pacificus*, *B. amyloliquefaciens*, *Lysinibacillus pakistanensis*, *L. macroides* y *Micrococcus endophyticus*. La única especie que presentó este gen en todos sus representantes fue *B. australimaris*, con dos representantes. Por último, las especies que portaron el gen *nosZ* en alguno de sus representantes fueron *B. subtilis* (en dos de cuatro representantes), *B. tequilensis* (en uno de tres), *B. altitudinis* (en uno de cuatro), *B. cereus* (en dos de tres) y *Neobacillus niacini* (en una de dos).

Doce especies desnitrificantes tuvieron más de un representante y, en su mayoría, tuvieron características morfológicas distintas a pesar de portar los mismos genes (Figura 15, Anexos 7 y 8). Por ejemplo, dos de los cuatro representantes de *Bacillus altitudinis* amplificaron los genes *nirK* y *nirS* (IV4S.7.mb y V7S.16.mm), pero su morfología difirió en la forma (irregular vs circular), el borde (lobulados vs lisos), el brillo (traslúcida vs opaca), el color (incoloro vs crema) y el aspecto (húmeda vs cerosa). En el caso de los representantes de *Bacillus cereus*, dos de tres portaron el gen *nosZ* (IV4S.4.mb y IV7F.7.mb) y presentaron formas (circular vs irregular), bordes (lisos vs lobulados) y estructuras (lisa vs rugosa) diferentes. En ambos representantes de *Bacillus australimaris* se registró el gen *nosZ* (V4S.1.mb y V8S.13.mb), uno con forma circular, bordes lobulados, brillo translúcido, color crema y aspecto ceroso, mientras que el otro representante tuvo una forma irregular, bordes ondulados, brillo opaco, color blanco y un aspecto seco; siendo una de las diferencias más evidentes que en el centro de uno de los representantes se observó un pigmento rosa (V4S.1.mb), que estuvo ausente en el otro representante (V8S.13.mb). Los dos representantes de *Bacillus megaterium* amplificaron el *nirS* (V4S.11.mb y V8F.9.mb), pero uno presentó una estructura filamentosa húmeda y blanca y el otro representante tuvo una estructura lisa cerosa y cremosa. Dos de los cinco representantes de *Metabacillus indicus* amplificaron el *nirK* (V4S.2.b y V4S.1.mm) y tuvieron diferencias en la elevación (convexa vs achatada), en los bordes (lisos vs ondulados) y en el color (amarillo vs naranja).

Por otro lado, durante La Niña se encontraron 12 especies exclusivas, representando a un total de 80 aislados, identificadas como *Bacillus amyloliquefaciens* (3 aislados), *B. aryabhattai* (2 aislados), *B. licheniformis* (1 aislado), *B. spizizenii* (3 aislados), *B. velezensis*

(2 aislados), *Cytobacillus firmus* (4 aislados), *C. oceanisediminis* (5 aislados), *Fictibacillus nanhaiensis* (33 aislados), *Kocuria gwangalliensis* (2 aislados), *K. rhizophila* (4 aislados), *Lysinibacillus macroides* (7 aislados) y *Peribacillus simplex* (14 aislados). Durante El Niño se registraron 14 especies exclusivas en un total de 32 aislados, que fueron identificadas como *Bacillus australimaris* (2 aislados), *B. horikoshii* (2 aislados), *B. humi* (2 aislados), *B. pacificus* (2 aislados), *B. paralicheniformis* (5 aislados), *B. safensis* (1 aislado), *B. thaonhiensis* (1 aislado), *B. thuringiensis* (2 aislados), *B. timonensis* (2 aislados), *Fictibacillus barbaricus* (1 aislado), *Lysinibacillus fusiformis* (2 aislados), *Metabacillus niabensis* (1 aislado), *Neobacillus niacini* (7 aislados) y *Oceanobacillus profundus* (2 aislados).

En cuanto a las distintas estaciones a lo largo del transecto, la mayor abundancia de desnitrificantes se encontró en la estación costera (210 aislados), donde dominaron aquellos pertenecientes a las especies *Bacillus cereus* (41 aislados), *Mesobacillus thioparans* (35 aislados) y *B. altitudinis* (30 aislados). En la estación oceánica se registraron 97 aislados desnitrificantes y las especies dominantes fueron *Bacillus cereus* (18 aislados) y *Metabacillus indicus* (29 aislados). Por último, en la estación intermedia se registró la menor abundancia de desnitrificantes (94 aislados), siendo *Bacillus pumilus* y *Fictibacillus nanhaiensis* las especies dominantes, con 14 y 18 aislados respectivamente.



**Figura 15.** Árbol filogenético a partir de secuencias de 16S ARNr de los 61 representantes desnitrificantes construido con el método neighbor-joining con un Bootstrap de 10,000 repeticiones. Los géneros se agrupan en distintos colores, las ramas en color negro indican las especies pertenecientes a la clase Bacilli y en color rojo indican a la clase Actinobacteria. Después del nombre de la especie, se indica en paréntesis la etiqueta de la muestra de la cual fue aislada (IV: La Niña, V: El Niño, C: estación costera, I: estación intermedia, O: estación oceánica, S: muestra superficial, F: muestra profunda). Las barras apiladas muestran la abundancia de cada especie por estación y por fase climática (■ La Niña, ■ El Niño). El sistema binario indica la presencia (■) o ausencia (□) de los distintos genes desnitrificantes.

En la base de datos del NCBI se encontraron 37 genomas de las 40 especies desnitrificantes identificadas, y solamente en 3 de ellas se encontró el registro del gen *nosZ* (*Mesobacillus jeotgali*, *Cytobacillus oceanisediminis* y *Neobacillus niacini*). A pesar de que en este estudio se detectó este gen en dichas especies, no fue el único que amplificaron: *Mesobacillus jeotgali* amplificó los tres genes de interés (*nirS*, *nirK* y *nosZ*), *Cytobacillus oceanisediminis* presentó los genes *nirS* y *nosZ* y *Neobacillus niacini* portó los genes *nirK* y *nosZ*. En los genomas de las demás especies desnitrificantes no se han registrado los genes *nirS*, *nirK* y/o *nosZ* encontrados en este estudio (Tabla 5).

**Tabla 5.** Consulta de la presencia de genes desnitrificantes en los genomas disponibles en el NCBI.

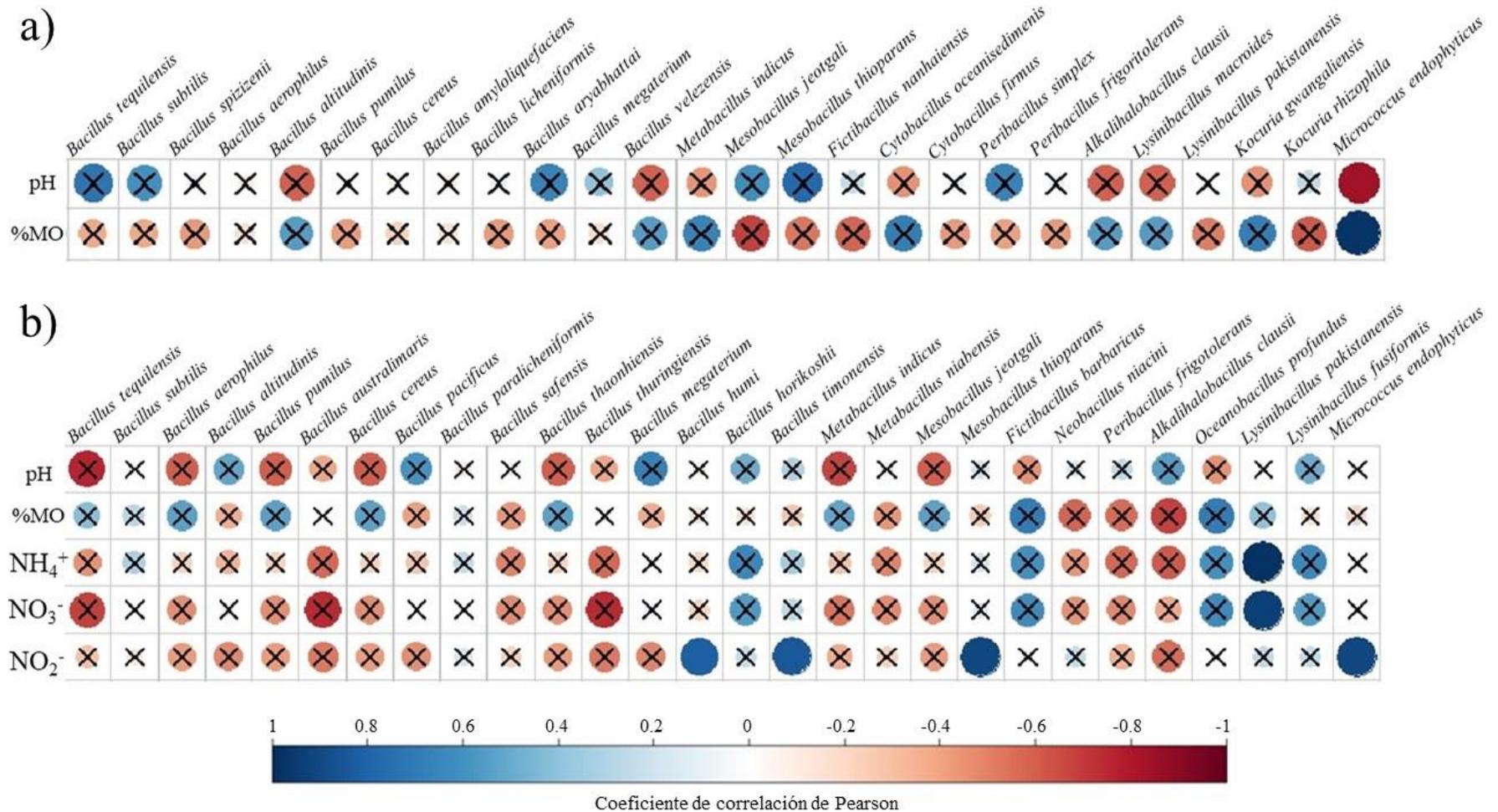
Especie	Genes desnitrificantes encontrados en este estudio			Genoma disponible	Genes presentes en el genoma	ID proteína
	<i>nirS</i>	<i>nirK</i>	<i>nosZ</i>			
<i>Bacillus tequilensis</i>	■	■	■	Sí	No	
<i>Bacillus subtilis</i>	■	■	■	Sí	No	
<i>Bacillus spizizenii</i>		■		Sí	No	
<i>Bacillus aerophilus</i>	■		■	Sí	No	
<i>Bacillus altitudinis</i>	■	■	■	Sí	No	
<i>Bacillus pumilus</i>	■		■	Sí	No	
<i>Bacillus australimaris</i>			■	Sí	No	
<i>Bacillus cereus</i>	■		■	Sí	No	
<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>			■	Sí	No	
<i>Bacillus licheniformis</i>	■			Sí	No	
<i>Bacillus pacificus</i>			■	Sí	No	
<i>Bacillus paralicheniformis</i>	■			Sí	No	
<i>Bacillus safensis</i>	■		■	Sí	No	
<i>Bacillus thaonhiensis</i>		■	■	No	-	
<i>Bacillus thuringiensis</i>	■		■	Sí	No	
<i>Bacillus aryabhatai</i>	■			Sí	No	
<i>Bacillus megaterium</i>	■			Sí	No	
<i>Bacillus humi</i>		■		Sí	No	
<i>Bacillus velezensis</i>	■			Sí	No	
<i>Bacillus horikoshii</i>		■		Sí	No	
<i>Bacillus timonensis</i>	■	■	■	Sí	No	
<i>Metabacillus indicus</i>	■	■	■	Sí	No	
<i>Metabacillus niabensis</i>	■			Sí	No	
<i>Mesobacillus jeotgali</i>	■	■	■	Sí	<i>nosZ</i>	WP_102264655.1
<i>Mesobacillus thioparans</i>	■			Sí	No	

<i>Fictibacillus nanhaiensis</i>	■	■	■	Sí	No	
<i>Fictibacillus barbaricus</i>		■		Sí	No	
<i>Cytobacillus oceanisediminis</i>	■		■	Sí	nosZ	WP_199749507.1
<i>Cytobacillus firmus</i>	■	■	■	Sí	No	
<i>Neobacillus niacini</i>		■	■	Sí	nosZ	WP_063254731.1
<i>Peribacillus simplex</i>	■			Sí	No	
<i>Peribacillus frigoritolerans</i>	■	■		Sí	No	
<i>Alkalihalobacillus clausii</i>		■		Sí	No	
<i>Oceanobacillus profundus</i>		■		Sí	No	
<i>Lysinibacillus macroides</i>			■	Sí	No	
<i>Lysinibacillus pakistanensis</i>			■	No	-	
<i>Lysinibacillus fusiformis</i>		■		Sí	No	
<i>Kocuria gwangalliensis</i>		■		No	-	
<i>Kocuria rhizophila</i>	■	■	■	Sí	No	
<i>Micrococcus endophyticus</i>			■	Sí	No	

### Correlación entre la abundancia de especies de bacterias desnitrificantes y las variables ambientales

De acuerdo con los coeficientes de correlación de Pearson entre la abundancia de las especies y determinados parámetros ambientales, durante La Niña *Micrococcus endophyticus* fue la única especie que se correlacionó positivamente con el porcentaje de materia orgánica y negativamente con el pH (Figura 16a).

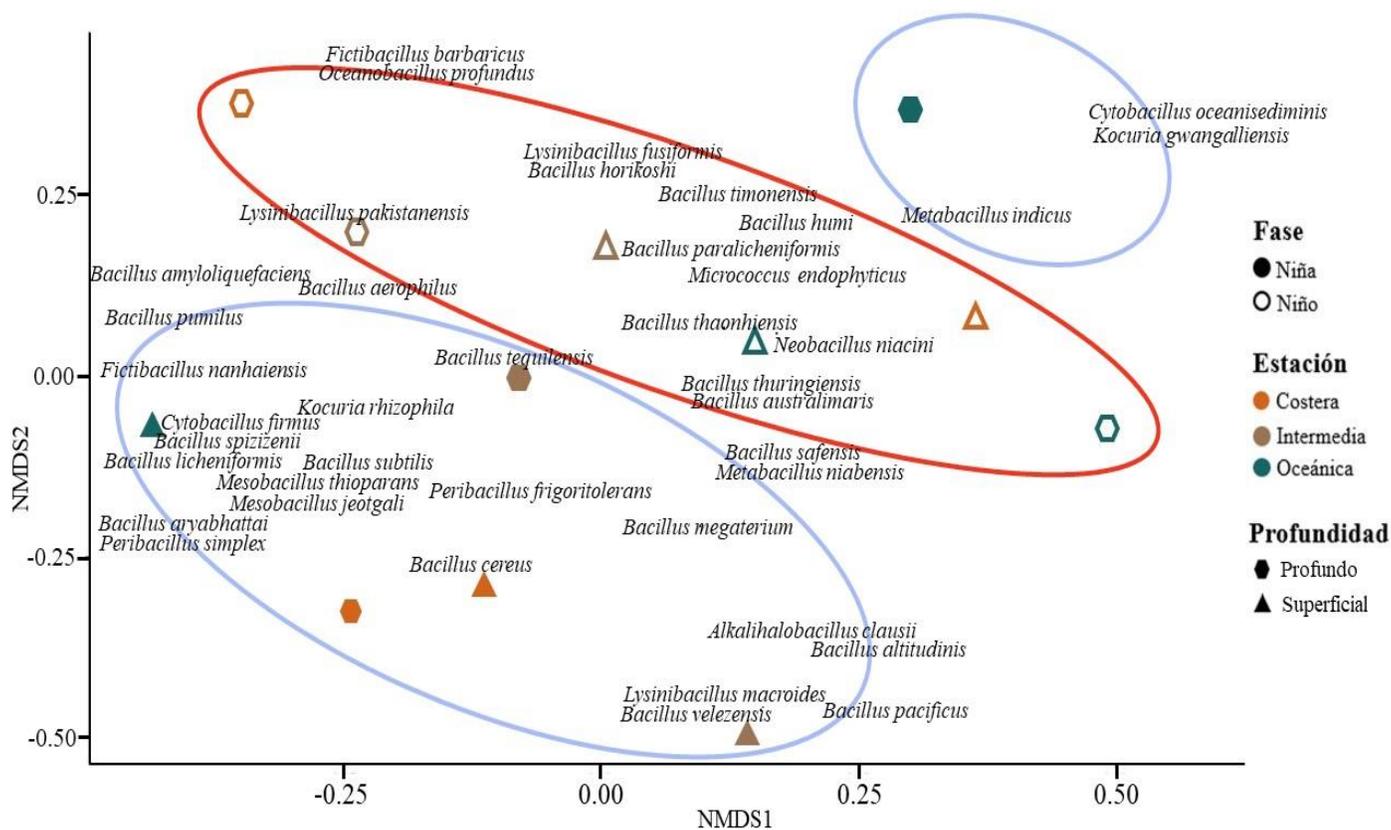
Por otro lado, se obtuvieron algunos valores significativos del coeficiente de correlación de Pearson entre las abundancias de las especies encontradas durante El Niño y la concentración de nutrientes. *Lysinibacillus pakistanensis* se correlacionó positivamente con el  $\text{NH}_4^+$  y el  $\text{NO}_3^-$ , mientras que *Bacillus humi*, *Bacillus timonensis*, *Mesobacillus thioparans* y *Micrococcus endophyticus* se correlacionaron positivamente con el  $\text{NO}_2^-$  (Figura 16b).



**Figura 16.** Correlación de Pearson entre la abundancia de las especies desnitrificantes y determinados parámetros ambientales durante a) La Niña y b) El Niño. El color de los círculos representa el valor de la correlación, el tamaño indica la significancia de los valores obtenidos y las celdas tachadas corresponden a los valores no significativos ( $p \geq 0.05$ ).

## Estructura de la comunidad bacteriana desnitrificante en la ZMO del Pacífico Mexicano

De acuerdo al NMDS, realizado a partir de la abundancia de aislados por especie, la comunidad de bacterias desnitrificantes se distribuyó en tres grupos principales: 1) especies pertenecientes a seis géneros distintos (*Bacillus*, *Lysinibacillus*, *Micrococcus*, *Neobacillus*, *Oceanobacillus* y *Fictibacillus*) predominaron en todas las muestras de sedimento colectadas durante El Niño, 2) especies pertenecientes a nueve géneros diferentes (*Bacillus*, *Fictibacillus*, *Kocuria*, *Cytobacillus*, *Mesobacillus*, *Metabacillus*, *Peribacillus*, *Alkalihalobacillus* y *Lysinibacillus*) dominaron en la mayoría de las muestras de sedimentos obtenidos durante La Niña y 3) un grupo donde predominaron *Cytobacillus oceanisediminis*, *Kocuria gwangalliensis* y *Metabacillus indicus* en las muestras profundas oceánicas durante La Niña (Figura 17).



**Figura 17.** Gráfica NMDS basada en el índice de disimilitud de Bray-Curtis de la distribución de las muestras en función de la abundancia de los aislados desnitrificantes obtenidos en cada especie a lo largo del transecto en las dos fases ENSO (nivel de estrés: 0.168).

## Ensayo de actividad en condiciones aerobias de los genes desnitrificantes

En la prueba de reducción de nitratos y nitritos, junto con la campana Durham, se comprobó la actividad en condiciones aerobias de los genes desnitrificantes encontrados en cinco representantes identificados: *Bacillus tequilensis* (*nirK* y *nirS*), *B. humi* (*nirK*), *B. timonensis* (*nirK*, *nirS* y *nosZ*), *B. thaonhiensis* (*nirK* y *nosZ*) y *Cytobacillus oceanisediminis* (*nirS* y *nosZ*). En el caso de *B. tequilensis*, los resultados de este ensayo reflejaron la producción de N gaseoso al presentar burbujas en la campana Durham, sin embargo, este representante no registró la presencia del gen *nosZ*, por lo que se podría suponer que se trata de producción de N<sub>2</sub>O mediado por genes *nor* (Tabla 6, Anexo 9).

**Tabla 6.** Aislados representantes cuya actividad de genes desnitrificantes identificados por PCR pudo ser comprobada mediante la prueba de reducción de NO<sub>3</sub><sup>-</sup> y NO<sub>2</sub><sup>-</sup>.

Especie	Representante	Morfología	Gen reportado en este estudio			Gen comprobado
			<i>nirK</i>	<i>nirS</i>	<i>nosZ</i>	
<i>Bacillus tequilensis</i>	V8S.6 (mm)	crema achatada	Sí	Sí	No	<i>nirK</i> , <i>nirS</i>
<i>Bacillus humi</i>	V7S.7 (mb)	blanca achatada	Sí	No	No	<i>nirK</i>
<i>Bacillus timonensis</i>	V7S.7 (mm)	crema achatada	Sí	Sí	Sí	<i>nirK</i> , <i>nirS</i> , <i>nosZ</i>
<i>Bacillus thaonhiensis</i>	V4S.21 (mm)	naranja achatada	Sí	No	Sí	<i>nirK</i> , <i>nosZ</i>
<i>Cytobacillus oceanisediminis</i>	IV4F.4 (mm)	crema convexa	No	Sí	Sí	<i>nirK</i> , <i>nosZ</i>

## Discusión

### **Características físico-químicas de los sedimentos de la ZMO del Pacífico Mexicano**

El área de estudio se localiza en la ZMO del ETNP, la cual representa el ~40% del área total de las ZMO globales, siendo la ZMO más extensa e intensa del océano global (Paulmier y Ruiz-Pino, 2009). Estas zonas se asocian con áreas de surgencia y, en esta región, la intensidad de este fenómeno oceanográfico se ve afectado por el patrón climático ENSO, intensificándose durante La Niña y disminuyendo durante El Niño. Así mismo, el límite superior de la ZMO se reduce durante La Niña y se profundiza durante El Niño (Yang *et al.*, 2017; Pajares *et al.*, 2023).

Los sedimentos a lo largo de este transecto se encontraron en plena ZMO, tanto en la estación costera de 32 m de profundidad, como en la estación oceánica de 700 m de profundidad (Pajares *et al.*, 2023), por tanto, es un ambiente óptimo para el desarrollo de la comunidad microbiana desnitrificante.

En general, el porcentaje de materia orgánica en estos sedimentos aumentó de la estación costera a la oceánica. Dicho comportamiento fue similar al que reportaron Liu *et al.* (2003) en esta misma ZMO y Hughes *et al.* (2009) en la ZMO del mar Arábigo nororiental. El hecho de que exista un menor porcentaje de materia orgánica en los sedimentos cercanos a la costa puede deberse a que en la costa existe una mayor disponibilidad de nutrientes y productividad biológica, por lo tanto, la materia orgánica queda disponible para una mayor diversidad de organismos y esto puede reducir la cantidad de materia orgánica que llega y se acumula en los sedimentos (Wakeham y Canuel, 2006; Arndt *et al.*, 2013; Kurian *et al.*, 2020). Por otro lado, es necesario considerar otros factores importantes que afectan el contenido de materia orgánica en los sedimentos como, por ejemplo, la granulometría (Premuzic *et al.*, 1982), la cual no se determinó en este estudio. Así mismo, la distribución de la materia orgánica podría explicar los valores de pH más bajos encontrados en la parte más oceánica del transecto, ya que la materia orgánica puede acidificar el entorno debido a la liberación de ácidos orgánicos durante su descomposición, lo que puede disminuir el pH (Jourabchi *et al.*, 2005; Zhu *et al.*, 2006).

En cuanto a los nutrientes, las menores concentraciones de  $\text{NO}_3^-$  encontradas en la superficie de los sedimentos con respecto a los sedimentos profundos pueden deberse a que la tasa de desnitrificación tiende a ser mayor en los sedimentos marinos superficiales en comparación con los sedimentos más profundos (Nishio *et al.*, 1982; Middelburg *et al.*, 1996; Neumann *et al.*, 2017). Esta misma situación podría respaldar las concentraciones elevadas de  $\text{NO}_2^-$  que se encontraron en las muestras superficiales de las estaciones costera e intermedia, ya que, a medida que los nitratos se reducen, se generan cantidades sustanciales de  $\text{NO}_2^-$  como parte del proceso, lo que aumentaría la presencia de éstos (Vanderborght y Billen, 1975; Middelburg *et al.*, 1996). Por otro lado, Henrichs y Farrington (1984) reportaron que la concentración de  $\text{NH}_4^+$  aumentó junto con la profundidad de los sedimentos de la ZMO de Perú, coincidiendo con los resultados obtenidos en este trabajo, donde las concentraciones de  $\text{NH}_4^+$  fueron mayores en las muestras profundas. Sin embargo, el comportamiento de las concentraciones del  $\text{NO}_3^-$  y  $\text{NO}_2^-$  en dicho estudio fue contrario al observado en este trabajo.

### **Distribución de genes desnitrificantes en los sedimentos de la ZMO del Pacífico Mexicano**

Hasta la fecha, se ha logrado aislar y analizar bacterias aerobias desnitrificantes en distintos sistemas marinos (Gao *et al.*, 2010; Zheng *et al.*, 2012; Huang *et al.*, 2017; Zhang *et al.*, 2020b), excepto en ZMO. De hecho, este trabajo representa el primer estudio sobre la caracterización filogenética y comprobación de la actividad potencial desnitrificante en condiciones aerobias de bacterias portadoras de los genes *nirS*, *nirK* y/o *nosZ* aisladas en sedimentos de la ZMO más extensa del océano global, la del ETNP.

El gen desnitrificante más abundante en las bacterias aisladas en condiciones aerobias en los sedimentos de la ZMO del Pacífico Mexicano fue el *nirS* (46.52%), lo cual está en consonancia con lo encontrado tanto en sedimentos como en la columna de agua en esta ZMO mediante técnicas independientes de cultivo (Liu *et al.*, 2003; Jayakumar *et al.*, 2009; Jayakumar *et al.*, 2013, Shi *et al.*, 2019). El gen menos abundante fue el *nosZ* (26.28%), en línea con lo encontrado en otros estudios, como los realizados por Yu *et al.* (2014) y Ming *et al.* (2021) con técnicas independientes de cultivo en una ZMO de una región subtropical al sureste de China y en un estuario al noreste de China, respectivamente. Por otro lado, los aislados que portaron simultáneamente los genes *nirK* y *nosZ* fueron más abundantes que

aquellos que compartieron *nirS* y *nosZ*. Sin embargo, se ha reportado que es mucho más frecuente que el gen *nosZ* se encuentre en los genomas de organismos con *nirS* que en aquellos con *nirK* (Jones *et al.*, 2008; Graf *et al.*, 2014). También el 18.75% del total de los representantes desnitrificantes presentaron una co-ocurrencia de los genes *nirS* y *nirK*. Si bien las enzimas catalizadas por cada uno de estos genes realizan la misma función en la vía de desnitrificación, no son homólogas y se pensaba que eran mutuamente excluyentes en los genomas de los organismos desnitrificantes (Zumft, 1997; Jones *et al.*, 2008). Sin embargo, este estudio no es el primero en encontrar ambos genes en un solo microorganismo (Graf *et al.*, 2014); incluso, se ha reportado la presencia de ambos genes en algunas cepas de bacterias desnitrificantes cultivables, como *Ochrobactrum* sp., *Paracoccus* sp., *Comamonas* sp., *Thauera* sp., *Pseudomonas* sp. y *Bacillus* sp. (Heylen *et al.*, 2006).

En el mar Árabe, a partir del uso de técnicas independientes de cultivo, se ha encontrado un patrón en la distribución de microorganismos portadores de genes *nirS* y *nirK* con la concentración de nutrientes, de manera que la concentración de  $\text{NO}_3^-$  se relaciona inversamente con la abundancia de dichos genes (Jayakumar *et al.*, 2009). Este patrón también se observó en la estación oceánica para ambos genes y en la estación costera solamente para el gen *nirK*. En estas estaciones, dichos genes dominaron en las muestras superficiales, las cuales tuvieron los valores más bajos de  $\text{NO}_3^-$ . En contraste, Pajares *et al.* (2019) encontraron una mayor abundancia del gen *nirS* (cuantificado mediante qPCR) en profundidades con concentraciones elevadas de  $\text{NO}_3^-$  en la columna de agua de una región de la ZMO en el Pacífico Mexicano más al sur a esta zona de estudio. Este patrón coincide con la abundancia del gen *nirS* observada en los sedimentos de las estaciones costera e intermedia.

Los resultados de Liu *et al.* (2003) en sedimentos de la ZMO del ETNP indican que muchas bacterias que poseen el gen *nirS* en esta comunidad desnitrificante son cultivables, ya que las secuencias obtenidas de este gen estaban relacionadas con desnitrificantes cultivables, a diferencia de las portadoras del gen *nirK*. Por lo tanto, considerando esta premisa y también reconociendo que el aislamiento en medios con agar no representa con precisión la cantidad real de bacterias en un entorno específico (Staley y Konopka, 1985; Harwani, 2013), es

relevante destacar que los resultados obtenidos en este trabajo podrían haber sido influenciados por la técnica de aislamiento empleada.

En términos generales, se observó una mayor abundancia de genes desnitrificantes durante La Niña que durante El Niño. Estos resultados pueden explicarse por la intensificación de las surgencias asociadas a La Niña, que impulsan aguas más profundas y ricas en nutrientes hacia la superficie, que fomentan una alta productividad. Eventualmente, la materia orgánica generada por el fitoplancton se hunde y se deposita en el fondo marino, contribuyendo así al enriquecimiento de los sedimentos con materia orgánica. Por lo tanto, la mayor abundancia de genes desnitrificantes durante La Niña puede deberse a una mayor disponibilidad de materia orgánica lábil derivada de las surgencias más intensas, creando condiciones propicias para el desarrollo de estos microorganismos heterótrofos (Ward *et al.*, 2008; Yang *et al.*, 2017; Duncan *et al.*, 2019; Pajares *et al.*, 2023).

### **Identificación de bacterias desnitrificantes aerobias**

En este estudio se identificaron dos filos bacterianos, Firmicutes y Actinobacteria, que han sido previamente registrados en las ZMO (Mulla *et al.*, 2018; Sun *et al.*, 2021) y, en particular, en la columna de agua de esta ZMO del Pacífico Mexicano (Pajares *et al.*, 2023). También se han registrado de manera abundante en sedimentos marinos permeables del noreste del Golfo de México (Mills *et al.*, 2008) y del Atlántico Sur (Hunter *et al.*, 2006), es decir, son linajes comunes en los ambientes marinos.

De los doce géneros identificados, el que predominó fue *Bacillus*, reconocido por su participación en procesos de desnitrificación aerobia (Yang *et al.*, 2011; Yang *et al.*, 2020b; Elkarrach *et al.*, 2021). Esta información es coherente con el hecho de que los cultivos se desarrollaron en condiciones aerobias, lo que favorece la proliferación de este tipo específico de bacterias desnitrificantes. Es importante tener en cuenta que, aunque *Bacillus* es conocido por su comportamiento aerobio, los desnitrificantes en general son microorganismos anaerobios facultativos, lo que significa que pueden adaptarse a entornos con y sin O<sub>2</sub> (Lam y Kuypers, 2011; Zehr y Kudela, 2011). Además, se ha informado que, a pesar de la limitación de O<sub>2</sub> en las ZMO, las comunidades bacterianas aerobias también pueden

prosperar en estos ambientes (Kalvelage *et al.*, 2015; Bhattacharya *et al.*, 2020; Sarkar *et al.*, 2023).

En cuanto a los otros géneros identificados en este estudio, únicamente cuatro de ellos han sido reconocidos como bacterias desnitrificantes: *Peribacillus* (Liang *et al.*, 2023), *Fictibacillus* (Cho *et al.*, 2022), *Oceanobacillus* (Hosseini *et al.*, 2018) y *Kocuria* (Chen *et al.*, 2018; Shi, *et al.*, 2019; Han *et al.*, 2020). Es relevante destacar que todos estos géneros exhiben capacidades de desnitrificación bajo condiciones aerobias (Hosseini *et al.*, 2018; Cho *et al.*, 2022; Liang *et al.*, 2023).

Por otro lado, Patel y Gupta (2020) mencionan que los géneros *Cytobacillus*, *Mesobacillus*, *Neobacillus*, *Metabacillus* y *Alkalihalobacillus* son microorganismos anaerobios facultativos que, aunque no plantean que se trate de bacterias meramente desnitrificantes, dicha característica es propia de éstos. Solamente *Cytobacillus*, *Metabacillus* y *Alkalihalobacillus* han sido aislados en sistemas marinos (Nielsen *et al.*, 1995; Yoon y Oh, 2005; Zhang *et al.*, 2010).

De las 40 especies bacterias desnitrificantes aerobias identificadas, 21 pertenecieron a *Bacillus*. Verbaendert *et al.* (2011) comprobó la actividad desnitrificante, en condiciones anóxicas, de *B. altitudinis*, *B. amyloliquefaciens*, *B. cereus*, *B. licheniformis*, *B. megaterium* y *B. thuringiensis*. También se ha registrado actividad desnitrificante en *B. subtilis* (Hussain *et al.*, 2011; Yang *et al.*, 2011), *B. pumilus* y *B. paralicheniformis* (Yang *et al.*, 2020b). Es importante destacar que, entre todas las especies mencionadas, ninguna ha sido aislada hasta donde se tiene conocimiento de ambientes marinos, mucho menos en sedimentos de ZMO, a excepción de *B. megaterium*. Esta última fue aislada de la columna de agua en la ZMO del mar Árabe, sin embargo, no demostró la capacidad de reducir  $\text{NO}_3^-$  (Mulla *et al.*, 2018).

*Bacillus* ha sido identificado como portador del gen *nirS* (Baskaran y Prabavathy, 2022) y del gen *nosZ* (Yu *et al.*, 2014). Estos hallazgos concuerdan con los resultados obtenidos en este estudio, donde, de las 20 especies pertenecientes a este género, el 70% amplificó el gen *nirS* y el 65% el gen *nosZ*, aunque también el 40% de las especies de *Bacillus* aisladas presentó el gen *nirK*.

Se ha reportado previamente a *Kocuria* como portador del gen *nirS* en muestras de suelo (Chen *et al.*, 2018; Han *et al.*, 2020) y sedimentos marinos (Shi *et al.*, 2019). En este estudio, de las dos especies pertenecientes a este género, solo *K. rhizophila* amplificó el gen *nirS*, junto con *nirK* y *nosZ*. En cambio, *K. gwangalliensis* portó exclusivamente el gen *nirK*.

Es relevante destacar que se ha sugerido que en los desnitrificantes la transferencia horizontal de genes es un fenómeno común (Etchebehere y Tiedje, 2005; Heylen *et al.*, 2006; Jang *et al.*, 2019; Qiao *et al.*, 2021). La capacidad de los desnitrificantes para intercambiar genes contribuye significativamente a su plasticidad genómica y a su adaptación a entornos cambiantes (Novichkov *et al.*, 2004), lo que podría justificar la diferencia que existe en los genes desnitrificantes que se encontraron en las bacterias de la misma especie identificadas en este estudio. Asimismo, es necesario realizar más estudios al respecto para obtener una comprensión más completa de los genes desnitrificantes presentes en cada una de las especies aisladas en los sedimentos de la ZMO del ETNP.

Por último, cabe resaltar que algunas especies, como *Bacillus subtilis*, *B. altitudinis*, *B. cereus*, *B. australimaris*, *B. megaterium*, *Mesobacillus thioparans* y *Metabacillus indicus*, contaron con más de un representante que, a pesar de portar los mismos genes, presentaron características morfológicas distintas. Por lo tanto, las características morfológicas no pueden considerarse como un factor importante para la identificación de los organismos.

### **Diversidad y distribución de las especies bacterianas desnitrificantes aerobias en los sedimentos de la ZMO del Pacífico Mexicano**

En general, la diversidad de bacterias desnitrificantes aerobias aisladas en los sedimentos de la ZMO del ETNP no mostró cambios significativos entre fases ENSO y fue menor a lo reportado en otros estudios realizados en sedimentos marinos (Mills *et al.*, 2008; Ming *et al.*, 2021). No obstante, esto podría justificarse por la metodología empleada en este estudio. A diferencia de las técnicas independientes de cultivo implementadas en estudios realizados en sedimentos de distintos ecosistemas como el estuario de Liaohe (Ming *et al.*, 2021), diversos humedales costeros en China (Gao *et al.*, 2016) o la bahía del Atlántico Sur (Hunter *et al.*, 2006), el aislamiento en agar puede sesgar la verdadera abundancia de bacterias en el entorno (Staley y Konopka, 1985; Harwani, 2013).

La diversidad de los desnitrificantes aislados en este trabajo tampoco mostró cambios relevantes a lo largo del transecto. Gao et al. (2016) indicaron que la distribución y composición de desnitrificantes en sedimentos de humedales costeros no mostraron variaciones temporales significativas, sino más bien una diferenciación latitudinal. Este patrón se asemeja a lo reportado por Liu et al. (2003), quienes encontraron mayor similitud entre las comunidades desnitrificantes de sedimentos en la ZMO del ETNP en estaciones geográficamente cercanas. Adicionalmente, Scala y Kerkhof (2000) evidenciaron que la comunidad desnitrificante en sedimentos marinos mostraba variabilidad tanto geográficas (desde centímetros hasta kilómetros) como temporales. Estos antecedentes sugieren la necesidad de seguir investigando sobre los patrones de distribución de la comunidad de bacterias desnitrificantes en sedimentos de la ZMO del ETNP.

Aunque la diversidad de las bacterias desnitrificantes aerobias no cambió significativamente entre las distintas fases del fenómeno ENSO, el NMDS reflejó que la estructura de esta comunidad fue única en cada una de las fases. Este resultado sugiere que si bien la riqueza y diversidad de las bacterias puede mantenerse relativamente constante, su distribución espacial puede ser sensible a las variaciones ambientales.

### **Actividad desnitrificante aerobia en los representantes bacterianos portadores de genes desnitrificantes**

En cinco especies desnitrificantes se pudo comprobar su potencial para llevar a cabo dicho proceso en condiciones aerobias, las cuales fueron *Bacillus tequilensis*, *B. humi*, *B. timonensis*, *B. thaonhiensis* y *Cytobacillus oceanisediminis*. Sin embargo, solamente existe registro de la actividad desnitrificante en dos de ellas, aunque no se especifica si los experimentos de desnitrificación se llevaron a cabo en condiciones aerobias o anaerobias (Verbaendert *et al.*, 2010; Moukhliissi *et al.*, 2014).

Moukhliissi et al. (2014) aislaron *Bacillus cereus* y *B. tequilensis* de un reactor desnitrificante anóxico para tratamiento de aguas residuales domésticas, y demostraron su actividad desnitrificante al comprobar su capacidad de reducir  $\text{NO}_3^-$  y  $\text{NO}_2^-$ . En este estudio también se registró la generación de productos gaseosos de *B. tequilensis*, lo que no concuerda con los genes desnitrificantes que portó (*nirK* y *nirS*), por lo que podríamos suponer que no

cuenta con una ruta de desnitrificación completa ya que no presenta el gen *nosZ*, produciendo  $N_2O$  por la actividad de genes *nor*. Debemos tomar en cuenta que la desnitrificación es un proceso modular, lo que significa que puede ocurrir en varias etapas y cada una puede ser llevada a cabo por uno o varios microorganismos diferentes, ya que hay muchos desnitrificantes que solo poseen vías parciales con algunos genes faltantes (Zumft, 1997).

Por otro lado, también se ha reportado la capacidad de *Bacillus humi* de reducir solamente  $NO_3^-$  a  $NO_2^-$  gracias a la actividad de sus genes *nar* (Verbaendert *et al.*, 2010). No obstante, en este estudio, *B. humi* registró la actividad del gen *nirK*, responsable de la reducción subsecuente de la realizada por los genes *nar*, la de  $NO_2^-$  a  $NO$ .

Finalmente, no se ha documentado actividad desnitrificante en *Bacillus timonensis*, *B. thaonhiensis* y *Cytobacillus oceanisediminis*. Sin embargo, entre las cinco especies que mostraron actividad desnitrificante, solo *C. oceanisediminis* presentó el gen *nosZ* (NCBI: WP\_102264655.1) en su genoma. Además del gen registrado en su genoma, y que sí amplificó en este estudio, esta especie también presentó el gen *nirK*, lo que sustenta la posibilidad de que lo haya adquirido por transferencia horizontal de otros desnitrificantes.

## Conclusiones

- Este estudio es pionero en aislar y demostrar la actividad de bacterias aerobias desnitrificantes en sedimentos de una ZMO, concretamente la del Pacífico Mexicano.
- Se aislaron 1034 bacterias de sedimentos de un transecto en la ZMO del Pacífico Mexicano, que se agruparon en 213 representantes, de los cuales 67 presentaron genes desnitrificantes *nirS*, *nirK* y *nosZ* (representando a 464 aislados).
- El gen desnitrificante más prevalente en las bacterias aisladas fue *nirS* (46.52%), seguido de *nirK* (27.20%) y *nosZ* (26.28%), que fue el menos abundante.
- El 33.84% de los aislados desnitrificantes portaron en su genoma más de un gen desnitrificante (3.7% *nosZ/nirS*, 5.8% *nosZ/nirK*, 18.74% *nirS/nirK*, 5.6% *nosZ/nirS/nirK*), a pesar de que los genes *nirS* y *nirK* se consideran mutuamente

excluyentes. Estos resultados apoyan la hipótesis de que estos genes desnitrificantes son propensos a transferirse de manera horizontal entre microorganismos.

- Se encontró una mayor abundancia de bacterias aerobias desnitrificantes durante el fenómeno de La Niña (62.3%) que durante El Niño (37.7%).
- En la estación costera se encontró el mayor porcentaje de bacterias aerobias desnitrificantes (45.3%), seguido por la estación oceánica (31.4%) y la estación intermedia (23.3%).
- Las muestras superficiales fueron ligeramente más abundantes en bacterias aerobias desnitrificantes (51.5%) en comparación con las muestras profundas (48.5%).
- Se identificaron 40 especies de bacterias aerobias desnitrificantes pertenecientes a 12 géneros, siendo *Bacillus* el predominante (50.4% de los aislados).
- Solo cinco especies identificadas mostraron correlaciones significativas con las variables ambientales. *Micrococcus endophyticus* presentó una correlación negativa con el pH y positiva con la MO y el  $\text{NO}_2^-$ . *Mesobacillus thioparans*, *Bacillus timonensis* y *B. humi* mostraron una correlación positiva con la concentración de  $\text{NO}_2^-$ , mientras que *Lysinibacillus pakistanensis* se correlacionó positivamente con las concentraciones de  $\text{NH}_4^+$  y  $\text{NO}_3^-$ .
- En condiciones aerobias se comprobó la reducción de  $\text{NO}_3^-$  y  $\text{NO}_2^-$  en *Bacillus tequilensis* y *Bacillus humi*, mientras que *B. timonensis*, *B. thaonhiensis* y *Cytobacillus oceanisediminis* presentaron una desnitrificación completa.
- A pesar del sesgo que genera el uso de métodos dependiente de cultivo, es necesario llevarlos a cabo para poder estudiar la fisiología y el metabolismo de los microorganismos, en particular, de las bacterias desnitrificantes.
- Es indispensable llevar a cabo análisis adicionales (más estudios mediante métodos dependientes de cultivo, caracterización de la comunidad desnitrificante en estos ambientes, diversidad de los genes desnitrificantes, etc.) para una mejor comprensión de la diversidad genética y la funcionalidad de los organismos que participan en el proceso de la desnitrificación en un ambiente tan único como la ZMO del ETNP.

## Referencias

- Amberkar, U., Khandeparker, R., D Menezes, L., Meena, R. M. (2021). Phylogenetic diversity of culturable marine bacteria from sediments underlying the oxygen minimum zone of the Arabian Sea and their role in nitrate reduction. *Marine Ecology*, 42(2), 1-12.
- Andersen, T. K., Jensen, M. H., Sørensen, J. (1984). Diurnal variation of nitrogen cycling in coastal, marine sediments: I. Denitrification. *Marine Biology*, 83, 171-176.
- Arndt, S., Jørgensen, B. B., LaRowe, D. E., Middelburg, J. J., Pancost, R. D., Regnier, P. (2013). Quantifying the degradation of organic matter in marine sediments: A review and synthesis. *Earth-Science Reviews*, 123, 53-86.
- Bandekar, M., Ramaiah, N., Meena, R. M. (2018). Diversity and abundance of denitrifying and anammox bacteria from the Arabian Sea oxygen minimum zone. *Deep Sea Research Part II: Topical Studies in Oceanography*, 156, 19-26.
- Baskaran, V., Prabavathy, V. R. (2022). Diverse key nitrogen cycling genes *nifH*, *nirS* and *nosZ* associated with Pichavaram mangrove rhizospheres as revealed by culture-dependent and culture-independent analyses. *Archives of Microbiology*, 204(1), 109.
- Bertagnolli, A. D., Stewart, F. J. (2018). Microbial niches in marine oxygen minimum zones. *Nature Reviews Microbiology*, 16(12), 723-729.
- Bhattacharya, S., Roy, C., Mandal, S., Sarkar, J., Rameez, M. J., Mondal, N., Mapder, T., Chatterjee, S., Pyne, P., Alam, M., Haldar, P. K., Roy, R., Fernandes, S., Peketi, A., Chakraborty, R., Mazumdar, A., Ghosh, W. (2020). Aerobic microbial communities in the sediments of a marine oxygen minimum zone. *FEMS Microbiology Letters*, 367(19), fnaa157.
- Blackburn, T. H., Henriksen, K. (1983). Nitrogen cycling in different types of sediments from Danish waters 1. *Limnology and Oceanography*, 28(3), 477-493.
- Bonin, P., Gilewicz, M., Denis, M., Bertrand, J. C. (1989). Salt requirements in the denitrifying bacterium *Pseudomonas nautica* 617. *Research in Microbiology*, 140(2), 159-169.
- Braker, G., Fesefeldt, A., Witzel, K.-P. (1998) Development of PCR primer systems for amplification of nitrite reductase genes (*nirK* and *nirS*) to detect denitrifying bacteria in environmental samples. *Applied and Environmental Microbiology*, 64, 3769-3775.
- Braker, G., Zhou, J., Wu, L., Devol, A. H., Tiedje, J. M. (2000). Nitrite reductase genes (*nirK* and *nirS*) as functional markers to investigate diversity of denitrifying bacteria in Pacific Northwest marine sediment communities. *Applied and Environmental Microbiology*, 66(5), 2096-2104.
- Breitburg, D., Levin, L. A., Oschlies, A., Grégoire, M., Chavez, F. P., Conley, D. J., Garçon, V., Gilbert, D., Gutiérrez, D., Isensee, K., Jacinto, G. S., Limburg, K. E., Montes, I., Naqvi, S. W. A., Pitcher, G. C., Rabalais, N. N., Roman, M. R., Rose, K. A., Seibel, B. A., ... Zhang, J. (2018). Declining oxygen in the global ocean and coastal waters. *Science*, 359(6371), eaam7240.
- Brin, L. D., Giblin, A. E., Rich, J. J. (2014). Environmental controls of anammox and denitrification in southern New England estuarine and shelf sediments. *Limnology and Oceanography*, 59(3), 851-86.
- Bulow, S. E., Rich, J. J., Naik, H. S., Pratihary, A. K., Ward, B. B. (2010). Denitrification exceeds anammox as a nitrogen loss pathway in the Arabian Sea oxygen minimum zone. *Deep Sea Research Part I: Oceanographic Research Papers*, 57(3), 384-393.
- Canfield, D. E., Kraft, B. (2022). The 'oxygen' in oxygen minimum zones. *Environmental Microbiology*, 24(11), 5332-5344.
- Capone, D. G., Bronk, D. A., Mulholland, M. R., Carpenter, E. J. (Eds.). (2008). *Nitrogen in the Marine Environment* (pp. 303-384). Elsevier.
- Carter, J. P., Hsaio, Y. H., Spiro, S., Richardson, D. J. (1995). Soil and sediment bacteria capable of aerobic nitrate respiration. *Applied and Environmental Microbiology*, 61(8), 2852-2858.
- Castro-González, M., Braker, G., Farías, L., Ulloa, O. (2005). Communities of *nirS*-type denitrifiers in the water column of the oxygen minimum zone in the eastern South Pacific. *Environmental Microbiology*, 7(9), 1298-1306.
- Chen, Z., Gao, X., Xia, T., Su, Y., Liu, J., Yu, L., Xu, S. (2018). Community Structure and Diversity of *nirS*-type Denitrifying Bacteria in Paddy Soils. *International Conference on Medicine, Biology, Materials and Manufacturing (ICMBMM 2018), Harbin, China*. 67.

- Chen, Z., Jiang, Y., Chang, Z., Wang, J., Song, X., Huang, Z., Chen, S., Li, J. (2020). Denitrification characteristics and pathways of a facultative anaerobic denitrifying strain, *Pseudomonas denitrificans* G1. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 129(6), 715-722.
- Chen, F., Xia, Q., Ju, L. K. (2003). Aerobic denitrification of *Pseudomonas aeruginosa* monitored by online NAD(P)H fluorescence. *Applied and Environmental Microbiology*, 69(11), 6715-6722.
- Cho, E. S., Hwang, C. Y., Jung, D. H., Cha, I. T., Seo, M. J. (2022). *Fictibacillus marinisediminis* sp. nov., a nitrate-reducing bacterium isolated from marine sediment in Hupo Basin, Republic of Korea. *Archives of Microbiology*, 204(8), 474.
- Ciccarelli, F. D., Doerks, T., Von Mering, C., Creevey, C. J., Snel, B., Bork, P. (2006). Toward automatic reconstruction of a highly resolved tree of life. *Science*, 311(5765), 1283-1287.
- Codispoti, L. A. (2007). An oceanic fixed nitrogen sink exceeding 400 Tg N a<sup>-1</sup> vs the concept of homeostasis in the fixed-nitrogen inventory. *Biogeosciences*, 4(2), 233-253
- Codispoti, L. A., Brandes, J. A., Christensen, J. P., Devol, A. H., Naqvi, S. W. A., Paerl, H. W., Yoshinari, T. (2001). The oceanic fixed nitrogen and nitrous oxide budgets: moving targets as we enter the anthropocene? *Scientia Marina*, 65(S2), 85-105.
- Cole, J. R., Wang, Q., Fish, J. A., Chai, B., McGarrell, D. M., Sun, Y., Brown, T. C., Porras-Alfaro, A., Kuske, C. R., Tiedje, J. M. (2014). Ribosomal Database Project: data and tools for high throughput rRNA analysis. *Nucleic Acids Research*, 42(D1), D633-D642.
- Dalsgaard, T., Stewart, F. J., Thamdrup, B., De Brabandere, L., Revsbech, N. P., Ulloa, O., Canfield, D. E., De Long, E. F. (2014). Oxygen at nanomolar levels reversibly suppresses process rates and gene expression in anammox and denitrification in the oxygen minimum zone off northern Chile. *MBio*, 5(6), e01966-14.
- Dalsgaard, T., Thamdrup, B., Farías, L., Revsbech, N. P. (2012). Anammox and denitrification in the oxygen minimum zone of the eastern South Pacific. *Limnology and Oceanography*, 57(5), 1331-1346.
- Dang, H., Wang, C., Li, J., Li, T., Tian, F., Jin, W., Ding, Y., Zhang, Z. (2009). Diversity and distribution of sediment nirS-encoding bacterial assemblages in response to environmental gradients in the eutrophied Jiaozhou Bay, China. *Microbial ecology*, 58, 161-169.
- De Sousa, T., & Bhosle, S. (2012). Microbial denitrification and its ecological implications in the marine system. *Microorganisms in Environmental Management: Microbes and Environment*, 683-700.
- DeVries, T., Deutsch, C., Rafter, P. A., Primeau, F. (2013). Marine denitrification rates determined from a global 3-D inverse model. *Biogeosciences*, 10(4), 2481-2496.
- Devol, A. H. (1978). Bacterial oxygen uptake kinetics as related to biological processes in oxygen deficient zones of the oceans. *Deep Sea Research*, 25(2), 137-146.
- Devol, A. H. (2015). Denitrification, anammox, and N<sub>2</sub> production in marine sediments. *Annual Review of Marine Science*, 7(1), 403-423.
- Divya, B., Annie, F., Shanta, N. (2017). Bacterial community profiling of the arabian sea oxygen minimum zone sediments using cultivation independent approach. *Examines Marine Biology and Oceanography*, 1(1), 22-28.
- Duncan, M. I., James, N. C., Bates, A. E., Goschen, W. S., Potts, W. M. (2019). Localised intermittent upwelling intensity has increased along South Africa's south coast due to El Niño–Southern Oscillation phase state. *African Journal of Marine Science*, 41(3), 325-330.
- Elkarrach, K., Merzouki, M., Atia, F., Laidi, O., Benlemlih, M. (2021). Aerobic denitrification using *Bacillus pumilus*, *Arthrobacter* sp., and *Streptomyces lusitanus*: Novel aerobic denitrifying bacteria. *Bioresource Technology Reports*, 14, 100663.
- Espinoza-Morriberón, D., Echevin, V., Colas, F., Tam, J., Gutierrez, D., Graco, M., Ledesma, J., Quispe-Ccalluari, C. (2019). Oxygen variability during ENSO in the tropical South Eastern Pacific. *Frontiers in Marine Science*, 5, 526.
- Ettwig, K. F., Butler, M. K., Le Paslier, D., Pelletier, E., Mangenot, S., Kuypers, M. M., Schreiber, F., Dutilh, B. E., Zedelius, J., de Beer, D., Gloerich, J., Wessels, H. J. C. T., van Alen, T., Luesken, F., Wu, M. L., van de Pas-Schoonen, K. T., Op den Camp, H. J., Janssen-Megens, E. M., Francoijs, K.-J., ... Strous, M. (2010). Nitrite-driven anaerobic methane oxidation by oxygenic bacteria. *Nature*, 464(7288), 543-548.
- Etchebehere, C., Tiedje, J. (2005). Presence of two different active *nirS* nitrite reductase genes in a denitrifying *Thauera* sp. from a high-nitrate-removal-rate reactor. *Applied and Environmental Microbiology*, 71(9), 5642-5645.
- Falkowski, P. G. (1997). Evolution of the nitrogen cycle and its influence on the biological sequestration of CO<sub>2</sub> in the ocean. *Nature*, 387(6630), 272-275.
- Gamble, T. N., Betlach, M. R., Tiedje, J. M. (1977). Numerically dominant denitrifying bacteria from world soils. *Applied and Environmental Microbiology*, 33(4), 926-939.

- Gao, H., Schreiber, F., Collins, G., Jensen, M. M., Kostka, J. E., Lavik, G., de Beer, D., Zhou, H., Kuypers, M. M. (2010). Aerobic denitrification in permeable Wadden Sea sediments. *The ISME Journal*, 4(3), 417-426.
- Gao, J., Hou, L., Zheng, Y., Liu, M., Yin, G., Li, X., Lin, X., Yu, C., Wang, R., Jiang, X., Sun, X. (2016). *nirS*-Encoding denitrifier community composition, distribution, and abundance along the coastal wetlands of China. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 100, 8573-8582.
- Garcia-Robledo, E., Padilla, C. C., Aldunate, M., Stewart, F. J., Ulloa, O., Paulmier, A., Gregori, G., Revsbech, N. P. (2017). Cryptic oxygen cycling in anoxic marine zones. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 114(31), 8319-8324.
- Graco, M. I., Purca, S., Dewitte, B., Castro, C. G., Morón, O., Ledesma, J., Flores, G., Gutiérrez, D. (2017). The OMZ and nutrient features as a signature of interannual and low-frequency variability in the Peruvian upwelling system. *Biogeosciences*, 14(20), 4601-4617.
- Graf, D. R., Jones, C. M., Hallin, S. (2014). Intergenomic comparisons highlight modularity of the denitrification pathway and underpin the importance of community structure for N<sub>2</sub>O emissions. *PLoS One*, 9(12), e114118.
- Griffis, T. J., Chen, Z., Baker, J. M., Wood, J. D., Millet, D. B., Lee, X., Venterea, R. T., Turner, P. A. (2017). Nitrous oxide emissions are enhanced in a warmer and wetter world. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 114(45), 12081-12085.
- Gruber, N. (2008). The Marine Nitrogen Cycle. *Nitrogen in the Marine Environment* (1–50). Elsevier
- Gruber, N., Sarmiento, J. L. (1997). Global patterns of marine nitrogen fixation and denitrification. *Global Biogeochemical Cycles*, 11(2), 235-266
- Hallin, S., Lindgren, P. E. (1999). PCR detection of genes encoding nitrite reductase in denitrifying bacteria. *Applied and Environmental Microbiology*, 65(4), 1652-1657.
- Han, X., Huang, C., Khan, S., Zhang, Y., Chen, Y., Guo, J. (2020). *nirS*-type denitrifying bacterial communities in relation to soil physicochemical conditions and soil depths of two montane riparian meadows in North China. *Environmental Science and Pollution Research*, 27, 28899-28911.
- Hansen, H. P., Koroleff, F. (1999). Determination of nutrients. *Methods of Seawater Analysis* (159–228). Wiley-VCH Verlag GmbH.
- Harwani, D. (2013). The great plate count anomaly and the unculturable bacteria. *Microbiology*, 2(9), 350-1.
- Helly, J. J., Levin, L. A. (2004). Global distribution of naturally occurring marine hypoxia on continental margins. *Deep Sea Research Part I: Oceanographic Research Papers*, 51(9), 1159-1168.
- Henrichs, S. M., Farrington, J. W. (1984). Peru upwelling region sediments near 15° S. 1. Remineralization and accumulation of organic matter 1. *Limnology and Oceanography*, 29(1), 1-19.
- Henry, S., Bru, D., Stres, B., Hallet, S., Philippot, L. (2006). Quantitative detection of the *nosZ* gene, encoding nitrous oxide reductase, and comparison of the abundances of 16S rRNA, *narG*, *nirK*, and *nosZ* genes in soils. *Applied and Environmental Microbiology*, 72(8), 5181-5189.
- Heylen, K., Gevers, D., Vanparys, B., Wittebolle, L., Geets, J., Boon, N., De Vos, P. (2006). The incidence of *nirS* and *nirK* and their genetic heterogeneity in cultivated denitrifiers. *Environmental Microbiology*, 8(11), 2012-202.
- Holding, A.J., Colle, J.G. (1971). Routine biochemical tests. En: Norris JR, Ribbons DW (eds.), *Methods in Microbiology* (6A). London: Academic Press. p. 1-32.
- Hosseini, M., Al-Rubaye, M. T. S., Fakhari, J., Babaha, F. (2018). Isolation and characterization of denitrifying halophilic bacteria from Bahr Al-Milh Salt Lake, Karbala, Iraq. *Journal of Applied Biology and Biotechnology*, 6(4), 32-36.
- Huang, G., Ou, L., Pan, F., Wang, Y., Fan, G., Liu, G., Wang, W. (2017). Isolation of a novel heterotrophic nitrification–aerobic denitrification bacterium *Serratia marcescens* CL1502 from deep-sea sediment. *Environmental Engineering Science*, 34(6), 453-459.
- Hughes, D. J., Lamont, P. A., Levin, L. A., Packer, M., Feeley, K., Gage, J. D. (2009). Macrofaunal communities and sediment structure across the Pakistan Margin oxygen minimum zone, north-east Arabian Sea. *Deep Sea Research Part II: Topical Studies in Oceanography*, 56(6-7), 434-448.
- Hulth, S., Aller, R. C., Canfield, D. E., Dalsgaard, T., Engström, P., Gilbert, F., Sundbäck, K., Thamdrup, B. (2005). Nitrogen removal in marine environments: recent findings and future research challenges. *Marine Chemistry*, 94(1-4), 125-145
- Hutchins, D. A., Capone, D. G. (2022). The marine nitrogen cycle: new developments and global change. *Nature Reviews Microbiology*, 20(7), 401-414.
- Hunter, E. M., Mills, H. J., Kostka, J. E. (2006). Microbial community diversity associated with carbon and nitrogen cycling in permeable shelf sediments. *Applied and Environmental Microbiology*, 72(9), 5689-5701.

- Hussain, S. A., Prasher, S. O., Chenier, M., Arya, G. (2011). Removal of nitrate-N by antibiotic exposed bacterial isolates from constructed wetlands. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 27, 2061-2069.
- Jackson, M. L. (1958). Organic matter determination for soils. *Soil chemical analysis*. Prentice-Hall.
- Jang, J., Sakai, Y., Senoo, K., Ishii, S. (2019). Potentially mobile denitrification genes identified in *Azospirillum* sp. strain TSH58. *Applied and Environmental Microbiology*, 85(2), e02474-18.
- Jayakumar, D. A., Francis, C. A., Naqvi, S. W. A., Ward, B. B. (2004). Diversity of nitrite reductase genes (*nirS*) in the denitrifying water column of the coastal Arabian Sea. *Aquatic Microbial Ecology*, 34(1), 69-78.
- Jayakumar, A., O'mullan, G. D., Naqvi, S. W. A., Ward, B. B. (2009). Denitrifying bacterial community composition changes associated with stages of denitrification in oxygen minimum zones. *Microbial Ecology*, 58, 350-362.
- Jayakumar, A., Naqvi, S. W. A., Ward, B. B. (2009). Distribution and relative quantification of key genes involved in fixed nitrogen loss from the Arabian Sea oxygen minimum zone. *Indian Ocean biogeochemical Processes and Ecological Variability*, 185, 187-203.
- Jayakumar, A., Peng, X., Ward, B. B. (2013). Community composition of bacteria involved in fixed nitrogen loss in the water column of two major oxygen minimum zones in the ocean. *Aquatic Microbial Ecology*, 70(3), 245-259.
- Ji, B., Yang, K., Zhu, L., Jiang, Y., Wang, H., Zhou, J., Zhang, H. (2015). Aerobic denitrification: a review of important advances of the last 30 years. *Biotechnology and Bioprocess Engineering*, 20, 643-651.
- Johnson, B., Goldblatt, C. (2015). The nitrogen budget of Earth. *Earth-Science Reviews*, 148, 150-173.
- Jones, C. M., Stres, B., Rosenquist, M., Hallin, S. (2008). Phylogenetic analysis of nitrite, nitric oxide, and nitrous oxide respiratory enzymes reveal a complex evolutionary history for denitrification. *Molecular Biology and Evolution*, 25(9), 1955-1966.
- Joo, H. S., Hirai, M., Shoda, M. (2005). Characteristics of ammonium removal by heterotrophic nitrification-aerobic denitrification by *Alcaligenes faecalis* No. 4. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 100(2), 184-191.
- Jourabchi, P., Van Cappellen, P., Regnier, P. (2005). Quantitative interpretation of pH distributions in aquatic sediments: A reaction-transport modeling approach. *American Journal of Science*, 305(9), 919-956.
- Kalvelage, T., Lavik, G., Jensen, M. M., Revsbech, N. P., Löscher, C., Schunck, H., Kuypers, M. M. (2015). Aerobic microbial respiration in oceanic oxygen minimum zones. *PLoS One*, 10(7), e0133526.
- Kamykowski, D., Zentara, S. J. (1990). Hypoxia in the world ocean as recorded in the historical data set. *Deep Sea Research Part A. Oceanographic Research Papers*, 37(12), 1861-1874.
- Kassambara A (2023). *\_rstatix: Pipe-Friendly Framework for Basic Statistical Tests\_*. R package version 0.7.2, <<https://CRAN.R-project.org/package=rstatix>>.
- Kim, M., Jeong, S. Y., Yoon, S. J., Cho, S. J., Kim, Y. H., Kim, M. J., Ryu, E. Y., Lee, S. J. (2008). Aerobic denitrification of *Pseudomonas putida* AD-21 at different C/N ratios. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 106(5), 498-502.
- Kim, J. K., Park, K. J., Cho, K. S., Nam, S. W., Park, T. J., Bajpai, R. (2005). Aerobic nitrification-denitrification by heterotrophic *Bacillus* strains. *Bioresource Technology*, 96(17), 1897-1906.
- Knowles, R. (1982). Denitrification. *Microbiological reviews*, 46(1), 43-70.
- Kurian, S., Kessarkar, P. M., Rao, V. P., Reshma, K., Sarkar, A., Pattan, J. N., Naqvi, S. W. A. (2020). Controls on organic matter distribution in oxygen minimum zone sediments from the continental slope off western India. *Journal of Marine Systems*, 207, 103118.
- Kuypers, M. M., Sliemers, A. O., Lavik, G., Schmid, M., Jørgensen, B. B., Kuenen, J. G., Damsté, J. S. S., Strous, M., Jetten, M. S. (2003). Anaerobic ammonium oxidation by anammox bacteria in the Black Sea. *Nature*, 422(6932), 608-611.
- Lam, P., Kuypers, M. M. M. (2011). Microbial nitrogen cycling processes in oxygen minimum zones. *Annual Review of Marine Science*, 3(1), 317-345.
- Lane, D. J., Pace, B., Olsen, G. J., Stahl, D. A., Sogin, M. L., Pace, N. R. (1985). Rapid determination of 16S ribosomal RNA sequences for phylogenetic analyses. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 82(20), 6955-6959.
- Levin, L. A. (2018). Manifestation, drivers, and emergence of open ocean deoxygenation. *Annual Review of Marine Science*, 10, 229-260.
- Liang, X., Gan, L., He, T., Chen, M., Zhang, M., Wu, Q. (2023). The coexisted nitrate and nitrite as a driving force for the aerobic denitrification of *Peribacillus* sp. EM-C3. *Environmental Technology & Innovation*, 32, 103299.

- Liu, X., Tiquia, S. M., Holguin, G., Wu, L., Nold, S. C., Devol, A. H., Luo, K., Palumbo, A. V., Tiedje, J. M., Zhou, J. (2003). Molecular diversity of denitrifying genes in continental margin sediments within the oxygen-deficient zone off the Pacific coast of Mexico. *Applied and Environmental Microbiology*, 69(6), 3549-3560.
- Marchant, H. K., Ahmerkamp, S., Lavik, G., Tegetmeyer, H. E., Graf, J., Klatt, J. M., Holtappels, M., Walpersdorf, E., Kuypers, M. M. (2017). Denitrifying community in coastal sediments performs aerobic and anaerobic respiration simultaneously. *The ISME Journal*, 11(8), 1799-1812.
- Michotey, V., Mejean, V., Bonin, P. (2000). Comparison of methods for quantification of cytochrome cd 1-denitrifying bacteria in environmental marine samples. *Applied and Environmental Microbiology*, 66(4), 1564-1571.
- Middelburg, J. J., Soetaert, K., Herman, P. M., Heip, C. H. (1996). Denitrification in marine sediments: A model study. *Global Biogeochemical Cycles*, 10(4), 661-673.
- Mills, H. J., Hunter, E., Humphrys, M., Kerkhof, L., McGuinness, L., Huettel, M., Kostka, J. E. (2008). Characterization of nitrifying, denitrifying, and overall bacterial communities in permeable marine sediments of the northeastern Gulf of Mexico. *Applied and Environmental Microbiology*, 74(14), 4440-4453.
- Ming, H., Fan, J., Chen, Q., Su, J., Song, J., Yuan, J., Shi, T., Li, B. (2021). Diversity and abundance of denitrifying bacteria in the sediment of a eutrophic estuary. *Geomicrobiology Journal*, 38(3), 199-209.
- Mosier, A. C., Francis, C. A. (2010). Denitrifier abundance and activity across the San Francisco Bay empera. *Environmental Microbiology Reports*, 2(5), 667-676.
- Moukhliissi, S., Aboussabiq F. E., Amine, J., Rihani, M., Assobhei, O. (2014). Heterotrophic denitrification by Gram-positive bacteria: *Bacillus cereus* and *Bacillus tequilensis*. *International Journal of Scientific and Research Publications*, 4(4).
- Moura, I., Moura, J. J. (2001). Structural aspects of denitrifying enzymes. *Current Opinion in Chemical Biology*, 5(2), 168-175.
- Mulla, A., Fernandes, G., Menezes, L., Meena, R. M., Naik, H., Gauns, M., Damare, S. (2018). Diversity of culturable nitrate-reducing bacteria from the Arabian Sea oxygen minimum zone. *Deep Sea Research Part II: Topical Studies in Oceanography*, 156, 27-33.
- Nakano, M., Inagaki, T., Okunishi, S., Tanaka, R., Maeda, H. (2010). Effect of salinity on denitrification under limited single carbon source by *Marinobacter* sp. Isolated from marine sediment. *Journal of Basic Microbiology*, 50(3), 285-289.
- Neumann, A., van Beusekom, J. E., Holtappels, M., Emeis, K. C. (2017). Nitrate consumption in sediments of the German Bight (North Sea). *Journal of Sea Research*, 127, 26-35.
- Nielsen, P., Fritze, D., Priest, F. G. (1995). Phenetic diversity of alkaliphilic *Bacillus* strains: proposal for nine new species. *Microbiology*, 141(7), 1745-1761.
- Nishio, T., Koike, I., Hattori, A. (1982). Denitrification, nitrate reduction, and oxygen consumption in coastal and estuarine sediments. *Applied and Environmental Microbiology*, 43(3), 648-653.
- Novichkov, P. S., Omelchenko, M. V., Gelfand, M. S., Mironov, A. A., Wolf, Y. I., Koonin, E. V. (2004). Genome-wide molecular clock and horizontal gene transfer in bacterial evolution. *Journal of Bacteriology*, 186(19), 6575-6585.
- Nowicki, B. L. (1994). The effect of temperatura, oxygen, salinity, and nutrient enrichment on estuarine denitrification rates measured with a modified nitrogen gas flux technique. *Estuarine, Coastal and Shelf Science*, 38(2), 137-156.
- Oksanen J., Simpson G., Blanchet F., Kindt R., Legendre P., Minchin P., O'Hara R., Solymos P., Stevens M., Szoecs E., Wagner H., Barbour M., Bedward M., Bolker B., Borcard D., Carvalho G., Chirico M., De Caceres M., Durand S., ... Weedon J (2022). *\_vegan: Community Ecology Package\_*. R package version 2.6-4, <<https://CRAN.R-project.org/package=vegan>>.
- Padilla, C. C., Bristow, L. A., Sarode, N., Garcia-Robledo, E., Gómez Ramírez, E., Benson, C. R., Bourbonnais, A., Altabet, M. A., Girguis, P. R., Thamdrup, B., Stewart, F. J. (2016). NC10 bacteria in marine oxygen minimum zones. *The ISME Journal*, 10(8), 2067-2071.
- Pajares, S., Merino-Ibarra, M., Farías, L. (2023). Prokaryotic community dynamics and nitrogen-cycling genes in an oxygen-deficient upwelling system during La Niña and El Niño conditions. *Environmental Microbiology*.
- Pajares, S., Ramos, R. (2019). Processes and microorganisms involved in the marine nitrogen cycle: knowledge and gaps. *Frontiers in Marine Science*, 6, 739.
- Pajares, S., Soto-Jiménez, M. F., Merino-Ibarra, M. (2019). Molecular and isotopic evidence of the distribution of nitrogen-cycling microbial communities in the oxygen minimum zone of the Tropical Mexican Pacific. *FEMS Microbiology Ecology*, 95(10), fiz143.

- Patel, S., Gupta, R. S. (2020). A phylogenomic and comparative genomic framework for resolving the polyphyly of the genus *Bacillus*: Proposal for six new genera of *Bacillus* species, *Peribacillus* gen. nov., *Cytobacillus* gen. nov., *Mesobacillus* gen. nov., *Neobacillus* gen. nov., *Metabacillus* gen. nov. and *Alkalihalobacillus* gen. nov. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 70(1), 406-438.
- Patureau, D., Godon, J. J., Dabert, P., Bouchez, T., Bernet, N., Delgenes, J. P., Moletta, R. (1998). *Microvirgula aerodenitrificans* gen. nov., sp. nov., a new gram-negative bacterium exhibiting co-respiration of oxygen and nitrogen oxides up to oxygen-saturated conditions. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 48(3), 775-782.
- Patureau, D., Zumstein, E., Delgenès, J. P., Moletta, R. (2000). Aerobic denitrifiers isolated from diverse natural and managed ecosystems. *Microbial Ecology*, 39, 145-152.
- Paulmier, A., Ruiz-Pino, D. (2009). Oxygen minimum zones (OMZs) in the modern ocean. *Progress in Oceanography*, 80(3-4), 113-128.
- Pfenning, K. S., McMahon, P. B. (1997). Effect of nitrate, organic carbon, and temperature on potential denitrification rates in nitrate-rich riverbed sediments. *Journal of Hydrology*, 187(3-4), 283-295.
- Philippot, L. (2002). Denitrifying genes in bacterial and archaeal genomes. *Biochimica et biophysica acta (BBA)-Gene Structure and Expression*, 1577(3), 355-376.
- Posadas, J., Velez, P., Pajares, S., Gasca-Pineda, J., Espinosa-Asuar, L. (2024). Fungal diversity in sediments of the eastern tropical Pacific oxygen minimum zone revealed by metabarcoding. *Plos One* 19(5), e0301605.
- Premuzic, E. T., Benkovitz, C. M., Gaffney, J. S., Walsh, J. J. (1982). The nature and distribution of organic matter in the surface sediments of world oceans and seas. *Organic Geochemistry*, 4(2), 63-77.
- Qiao, W., Wang, L., Luo, Y., Miao, J. (2021). Outer membrane vesicles mediated horizontal transfer of an aerobic denitrification gene between *Escherichia coli*. *Biodegradation*, 32(4), 435-448.
- R Core Team. (2020). R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. <https://www.R-project.org/>.
- Rao, A. M., McCarthy, M. J., Gardner, W. S., Jahnke, R. A. (2007). Respiration and denitrification in permeable continental shelf deposits on the South Atlantic Bight: Rates of carbon and nitrogen cycling from sediment column experiments. *Continental Shelf Research*, 27(13), 1801-1819.
- Revsbech, N. P., Thamdrup, B., Dalsgaard, T., Canfield, D. E. (2011). Construction of STOX oxygen sensors and their application for determination of O<sub>2</sub> concentrations in oxygen minimum zones. *Methods in enzymology. Academic Press*, 486, 325-341.
- Risgaard-Petersen, N., Langezaal, A. M., Ingvarsdén, S., Schmid, M. C., Jetten, M. S., Op den Camp, H. J., Derksen, J. W. M., Piña-Ochoa, E., Eriksson, S. P., Nielsen, L. P., Revsbech, N. P., Cedhagen, T., van der Zwaan, G. J. (2006). Evidence for complete denitrification in a benthic foraminifer. *Nature*, 443(7107), 93-96.
- Robertson, L. A., Kuenen, J. G. (1983). *Thiosphaera pantotropha* gen. nov. sp. nov., a facultatively anaerobic, facultatively autotrophic sulphur bacterium. *Journal of General Microbiology*, 129(9), 2847-2855.
- Robertson, L. A., Kuenen, J. G. (1984). Aerobic denitrification-old wine in new bottles? *Antonie van Leeuwenhoek*, 50, 525-544.
- Robertson, L. A., Dalsgaard, T., Revsbech, N. P., Kuenen, J. G. (1995). Confirmation of 'aerobic denitrification' in batch cultures, using gas chromatography and <sup>15</sup>N mass spectrometry. *FEMS Microbiology Ecology*, 18(2), 113-119.
- Sarkar, J., Mondal, M., Bhattacharya, S., Chatterjee, S., Mondal, N., Dutta, S., Ghosh, W. (2023). Extremely oligotrophic and complex organic compounds degrading microaerobic bacteria from Arabian Sea oxygen minimum zone sediments. *bioRxiv*, 2023-10.
- Scala, D. J., Kerkhof, L. J. (1999). Diversity of nitrous oxide reductase (*nosZ*) genes in continental shelf sediments. *Applied and Environmental Microbiology*, 65(4), 1681-1687.
- Scala, D. J., Kerkhof, L. J. (2000). Horizontal heterogeneity of denitrifying bacterial communities in marine sediments by terminal restriction fragment length polymorphism analysis. *Applied and Environmental Microbiology*, 66(5), 1980-1986.
- Seitzinger, S. P. (1988). Denitrification in freshwater and coastal marine ecosystems: ecological and geochemical significance. *Limnology and Oceanography*, 33(4), 702-724.
- Seitzinger, S., Harrison, J. A., Böhlke, J. K., Bouwman, A. F., Lowrance, R., Peterson, B., Tobias, C., Van Drecht, G. (2006). Denitrification across landscapes and waterscapes: a synthesis. *Ecological Applications*, 16(6), 2064-2090.
- Stein, L. Y., Klotz, M. G. (2016). The nitrogen cycle. *Current Biology*, 26(3), R94-R98.
- Shi, R., Xu, S., Qi, Z., Huang, H., Liang, Q. (2019). Seasonal patterns and environmental drivers of *nirS*- and *nirK*-encoding denitrifiers in sediments of Daya Bay, China. *Oceanologia*, 61(3), 308-320.

- Shoun, H., Kim, D. H., Uchiyama, H., Sugiyama, J. (1992). Denitrification by fungi. *FEMS Microbiology Letters*, 94(3), 277-281.
- Staley, J. T., y Konopka, A. (1985). Measurement of in situ activities of nonphotosynthetic microorganisms in aquatic and terrestrial habitats. *Annual Review of Microbiology*, 39(1), 321-346.
- Stramma, L., Johnson, G. C., Sprintall, J., Mohrholz, V. (2008). Expanding oxygen-minimum zones in the tropical oceans. *Science*, 320(5876), 655-658.
- Stramma, L., Schmidtko, S., Levin, L. A., Johnson, G. C. (2010). Ocean oxygen minima expansions and their biological impacts. *Deep Sea Research Part I: Oceanographic Research Papers*, 57(4), 587-595.
- Sun, Q., Song, J., Li, X., Yuan, H., Wang, Q. (2021). The bacterial diversity and community composition altered in the oxygen minimum zone of the Tropical Western Pacific Ocean. *Journal of Oceanology and Limnology*, 39(5), 1690-1704.
- Surzycki, S. (2000). Basic Techniques in Molecular Biology. Springer Berlin Heidelberg, 1-434.
- Tamura, K., Stecher, G., Kumar, S. (2021). MEGA11: molecular evolutionary genetics analysis version 11. *Molecular Biology and Evolution*, 38(7), 3022-3027.
- Tanimoto, T., Hatano, K. I., Kim, D. H., Uchiyama, H., Shoun, H. (1992). Co-denitrification by the denitrifying system of the fungus *Fusarium oxysporum*. *FEMS Microbiology Letters*, 93(2), 177-180.
- Thamdrup, B., Dalsgaard, T. (2008). Nitrogen Cycling in Sediments. *Microbial Ecology of the Oceans* (pp. 527–568). John Wiley & Sons, Inc.
- Tiano, L., Garcia-Robledo, E., Dalsgaard, T., Devol, A. H., Ward, B. B., Ulloa, O., Canfield, D. E., Revsbech, N. P. (2014). Oxygen distribution and aerobic respiration in the north and south eastern tropical Pacific oxygen minimum zones. *Deep Sea Research Part I: Oceanographic Research Papers*, 94, 173-183
- Vavrek, M. J. (2011). “fossil: palaeoecological and palaeogeographical analysis tools.” *Palaeontologia Electronica*, 14(1), 1T. R package version 0.4.0.
- Vanderborght, J. P., Billen, G. (1975). Vertical distribution of nitrate concentration in interstitial water of marine sediments with nitrification and denitrification. *Limnology and Oceanography*, 20(6), 953-961.
- Verbaendert, I., Boon, N., De Vos, P., Heylen, K. (2011). Denitrification is a common feature among members of the genus *Bacillus*. *Systematic and Applied Microbiology*, 34(5), 385-391.
- Voss, M., Bange, H. W., Dippner, J. W., Middelburg, J. J., Montoya, J. P., Ward, B. (2013). The marine nitrogen cycle: recent discoveries, uncertainties and the potential relevance of climate change. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, 368(1621), 20130121.
- Wakeham, S. G., Canuel, E. A. (2006). Degradation and preservation of organic matter in marine sediments. *Marine Organic Matter: Biomarkers, Isotopes and DNA*, 295-321.
- Walkley-Black, A. (1947). Organic carbon by the Walkley-Black oxidation procedure. *Soil Science*, 63, 251-264.
- Ward, B. B., Devol, A. H., Rich, J. J., Chang, B. X., Bulow, S. E., Naik, H., Pratihary, A., Jayakumar, A. (2009). Denitrification as the dominant nitrogen loss process in the Arabian Sea. *Nature*, 461(7260), 78-81.
- Ward, B. B., Tuit, C. B., Jayakumar, A., Rich, J. J., Moffett, J., Naqvi, S. W. A. (2008). Organic carbon, and not copper, controls denitrification in oxygen minimum zones of the ocean. *Deep Sea Research Part I: Oceanographic Research Papers*, 55(12), 1672-1683
- Wickham, H. 2016. ggplot2: Elegant Graphics for Data Analysis. Springer-Verlag New York.
- Wright, J. J., Konwar, K. M., Hallam, S. J. (2012). Microbial ecology of expanding oxygen minimum zones. *Nature Reviews Microbiology*, 10(6), 381-394
- Wyrski, K. (1962). The oxygen minima in relation to ocean circulation. *Deep Sea Research and Oceanographic Abstracts* (Vol. 9, No. 1-2, 11-23). Elsevier.
- Yang, S., Gruber, N., Long, M. C., Vogt, M. (2017). ENSO-driven variability of denitrification and suboxia in the Eastern Tropical Pacific Ocean. *Global Biogeochemical Cycles*, 31(10), 1470-1487.
- Yang, X. P., Wang, S. M., Zhang, D. W., Zhou, L. X. (2011). Isolation and nitrogen removal characteristics of an aerobic heterotrophic nitrifying–denitrifying bacterium, *Bacillus subtilis* A1. *Bioresource Technology*, 102(2), 854-862.
- Yang, J., Feng, L., Pi, S., Cui, D., Ma, F., Zhao, H. P., Li, A. (2020a). A critical review of aerobic denitrification: insights into the intracellular electron transfer. *Science of The Total Environment*, 731, 139080.
- Yang, T., Xin, Y., Zhang, L., Gu, Z., Li, Y., Ding, Z., Shi, G. (2020b). Characterization on the aerobic denitrification process of *Bacillus* strains. *Biomass and Bioenergy*, 140, 105677.
- Yoon, J. H., Oh, T. K. (2005). *Bacillus litoralis* sp. nov., isolated from a tidal flat of the Yellow Sea in Korea. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 55(5), 1945-1948.
- Yu, Z., Yang, J., Liu, L. (2014). Denitrifier community in the oxygen minimum zone of a subtropical deep reservoir. *PLoS One*, 9(3), e92055.

- Zehr, J. P., Kudela, R. M. (2011). Nitrogen cycle of the open ocean: from genes to ecosystems. *Annual Review of Marine Science*, 3, 197-225.
- Zhang, J., Wang, J., Fang, C., Song, F., Xin, Y., Qu, L., Ding, K. (2010). *Bacillus oceanisediminis* sp. nov., isolated from marine sediment. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 60(12), 2924-2929.
- Zhang, X., Ward, B. B., Sigman, D. M. (2020a). Global nitrogen cycle: critical enzymes, organisms, and processes for nitrogen budgets and dynamics. *Chemical Reviews*, 120(12), 5308-5351.
- Zhang, M., Li, A., Yao, Q., Wu, Q., Zhu, H. (2020b). Nitrogen removal characteristics of a versatile heterotrophic nitrifying-aerobic denitrifying bacterium, *Pseudomonas bauzanensis* DN13-1, isolated from deep-sea sediment. *Bioresource Technology*, 305, 122626.
- Zhang, H., Zhao, Z., Chen, S., Kang, P., Wang, Y., Feng, J., Jia, J., Yan, M., Wang, Y., Xu, L. (2018). *Paracoccus versutus* KS293 adaptation to aerobic and anaerobic denitrification: Insights from nitrogen removal, functional gene abundance, and proteomic profiling analysis. *Bioresource Technology*, 260, 321-328.
- Zheng, H. Y., Liu, Y., Gao, X. Y., Ai, G. M., Miao, L. L., Liu, Z. P. (2012). Characterization of a marine origin aerobic nitrifying–denitrifying bacterium. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 114(1), 33-37.
- Zhu, X., Burger, M., Doane, T. A., Horwath, W. R. (2013). Ammonia oxidation pathways and nitrifier denitrification are significant sources of N<sub>2</sub>O and NO under low oxygen availability. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 110(16), 6328-6333.
- Zhu, Q., Aller, R. C., Fan, Y. (2006). Two-dimensional pH distributions and dynamics in bioturbated marine sediments. *Geochimica et Cosmochimica Acta*, 70(19), 4933-4949.
- Zumft, W. G. (1997). Cell biology and molecular basis of denitrification. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 61(4), 533-616.

## **Anexo 1. Características de los medios de cultivo utilizados.**

### **Medio marino (fórmula para 1 L de medio):**

- 35 g de sales marinas (fuente de oligoelementos).
- 5 g de peptona de caseína (proporciona nitrógeno, vitaminas, minerales y aminoácidos esenciales para el crecimiento de las colonias bacterianas).
- 0.3 g de nitrato de potasio (sustrato para las bacterias cultivadas).
- 1.5 g de extracto de carne (fuente alterna de nitrógeno, fósforo y azufre orgánico).
- 1.5 g de extracto de levadura (fuente alterna de vitaminas y aminoácidos).
- 15 g de agar bacteriológico (agente solidificante).

\*Ajustar pH a 7-7.2

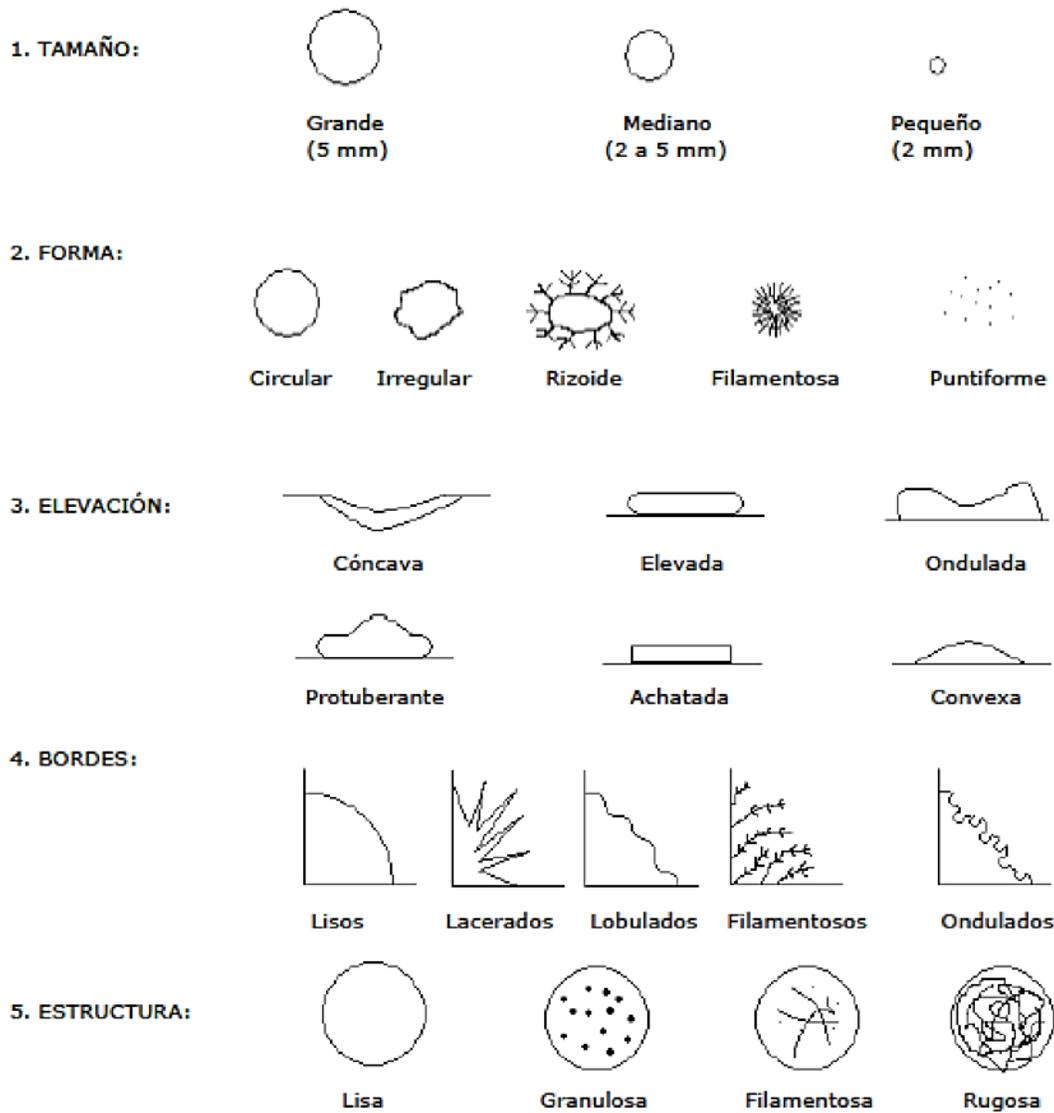
### **Medio Braker (fórmula para 1 L de medio):**

- 37.5 g de medio marino (fuente de oligoelementos, nitrógeno, vitaminas, minerales y aminoácidos esenciales para el crecimiento de las colonias bacterianas).
- 0.51 g de nitrato de potasio (sustrato para las bacterias cultivadas).
- 0.5 g de extracto de levadura (fuente alterna de vitaminas y aminoácidos).
- 15 g de agar bacteriológico (agente solidificante).

\*Ajustar pH a 7-7.2

## Anexo 2. Criterios utilizados para la caracterización morfológica de las colonias bacterianas.

### LOS OCHO CRITERIOS UTILIZADOS



**6. BRILLO:** transparente, translúcida, opaca.

**7. COLOR:** incolora, pigmentada.

**8. ASPECTO:** viscosa, húmeda, membranosa, gelatinosa, lechosa, etc.

### **Anexo 3. Prueba de reducción de nitratos y nitritos (modificado de *Holding y Colle, 1971*).**

Esta prueba es un método colorimétrico que se realiza para determinar la capacidad de un microorganismo para reducir los nitratos a nitritos, y para detectar aquellas bacterias que reducen  $\text{NO}_2^-$  a productos gaseosos ( $\text{N}_2$  y/o  $\text{N}_2\text{O}$ ), se utiliza una campana Durham. Para llevar a cabo esta prueba se utilizan los siguientes reactivos:

- Reactivo  $\beta$ : Formación de sales de diazonio en medios con nitritos.
- Reactivo  $\alpha$ : Formación de colorantes azoicos en medios con sales de diazonio.
- Zinc en polvo: Reduce los nitratos presentes en el medio a nitritos.

Los posibles resultados de esta prueba denotan lo siguiente:

- **Coloración roja después de añadir los reactivos  $\alpha$  y  $\beta$ :** indica que el  $\text{NO}_3^-$  han sido reducido a  $\text{NO}_2^-$ , por lo que hay presencia/actividad de los genes *napA* y/o *narG*, y los genes *nirK* y/o *nirS* están inactivos o ausentes.
- **Sin cambio de coloración después de añadir los reactivos  $\alpha$  y  $\beta$ :** no hay  $\text{NO}_2^-$  en el medio, lo que puede deberse a que no se formó  $\text{NO}_2^-$  (queda  $\text{NO}_3^-$ , los genes *napA* y/o *narG* están inactivos/ausentes) o se formó  $\text{NO}_2^-$  y se redujo (no hay  $\text{NO}_3^-$ , verificación exitosa de los genes *nirK* y/o *nirS*). Para discernir el resultado correcto se añade zinc (Zn).
- **Coloración roja después de añadir el Zn:** presencia de  $\text{NO}_3^-$ , por tanto los genes *napA* y/o *narG* se encuentran inactivos o ausentes, pero es posible que los genes desnitrificantes (*nirK*, *nirS*, *nosZ*) estén presentes y se comprueba mediante la presencia de gas en la campana Durham.
- **Sin cambio de coloración tras añadir el Zn:** ausencia de  $\text{NO}_3^-$ , por lo que se verifica de manera exitosa la actividad de los genes *napA* y/o *narG* y *nirK* y/o *nirS*.
- **Ausencia de burbuja en la campana Durham:** no se obtuvo ningún producto gaseoso ( $\text{N}_2\text{O}$  o  $\text{N}_2$ ), por lo que los genes desnitrificantes están inactivos o ausentes.
- **Presencia de burbuja en la campana Durham:** hay productos gaseosos, verificación exitosa de genes desnitrificantes.

## **Anexo 4.** Preparación de reactivos $\alpha$ y $\beta$ para la prueba de reducción de nitratos y nitritos.

### **Reactivo $\alpha$**

- Agregar 0.25 g de  $\alpha$ -naftilamina (forma colorante azoico -rojo- en contacto con una sal de diazonio) a 35 ml de ácido acético 5 N (interacciona con  $\alpha$ -naftilamina formando una solución adsorbente). Nota: Por 1 ml de ácido acético 5 N se agregan 5 mg de  $\alpha$ -naftilamina.
- Disolver por agitación en parrilla de calentamiento con agitación (~25 °C y 8 rpm).
- Aforar la solución a 50 ml con ácido acético 5 N.
- Verter la solución en frasco ámbar y refrigerar (4 °C).

**Nota:** Se mantendrá estable durante ~3 meses, antes de la presencia de virutas cafés.

**Precaución:** Este reactivo es cancerígeno por lo que se recomienda el uso de N, N-dimetil-1-naftilamina.

### **Reactivo $\beta$**

- Agregar 0.4 g de ácido sulfanílico (reacciona con ácido nitroso formando una sal de diazonio) a 35 ml de ácido acético 5 N (reacciona con nitritos formando ácido nitroso). Nota: Por 1 ml de ácido acético 5 N se agregan 8 g de ácido sulfanílico.
- Disolver por agitación con varilla de vidrio.
- Aforar la solución a 50 ml con ácido acético 5 N.
- Verter la solución en frasco ámbar y refrigerar (4 °C).

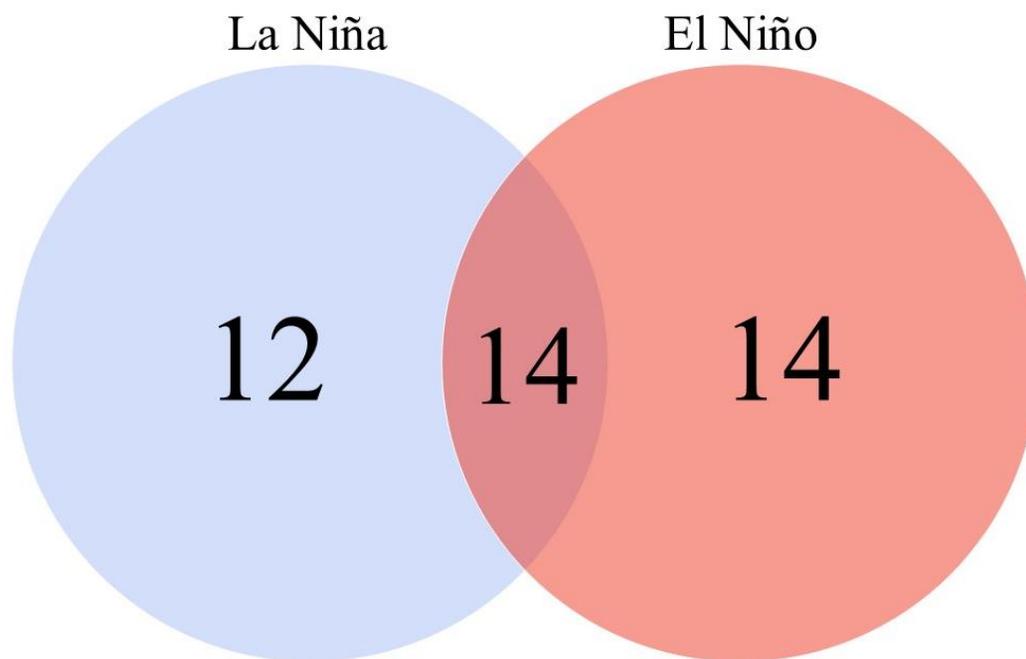
**Nota:** Se mantendrá estable durante ~3 meses

**Anexo 5.** Distribución de aislados bacterianos desnitrificantes aerobios en los sedimentos a lo largo del transecto durante las dos fases ENSO y en las dos profundidades.

Especies	Costera				Intermedia				Oceánica			
	Superficial		Profundo		Superficial		Profundo		Superficial		Profundo	
	La Niña	El Niño	La Niña	El Niño	La Niña	El Niño	La Niña	El Niño	La Niña	El Niño	La Niña	El Niño
<i>Bacillus tequilensis</i>	0	2	1	0	0	1	2	0	0	3	0	1
<i>Bacillus subtilis</i>	0	0	9	0	1	0	0	2	1	2	0	0
<i>Bacillus spizizenii</i>	3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>Bacillus aerophilus</i>	0	0	0	0	1	0	0	0	0	1	0	0
<i>Bacillus altitudinis</i>	0	0	0	30	0	2	0	0	3	4	0	0
<i>Bacillus pumilus</i>	7	0	1	0	14	0	0	0	0	1	0	0
<i>Bacillus australimaris</i>	0	1	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0
<i>Bacillus cereus</i>	38	0	3	0	0	0	1	0	17	1	0	0
<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	0	0	0	0	3	0	0	0	0	0	0	0
<i>Bacillus licheniformis</i>	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>Bacillus pacificus</i>	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>Bacillus paralicheniformis</i>	0	0	0	0	0	1	0	2	0	2	0	0
<i>Bacillus safensis</i>	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>Bacillus thaonhiensis</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0
<i>Bacillus thuringiensis</i>	0	1	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0
<i>Bacillus aryabhatai</i>	0	0	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>Bacillus megaterium</i>	0	0	0	12	0	0	4	5	0	3	0	0
<i>Bacillus humi</i>	0	0	0	0	0	2	0	0	0	0	0	0
<i>Bacillus velezensis</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	2	0	0	0
<i>Bacillus horikoshii</i>	0	0	0	0	0	0	0	2	0	0	0	0
<i>Bacillus timonensis</i>	0	0	0	0	0	1	0	1	0	0	0	0
<i>Metabacillus indicus</i>	0	2	0	0	1	2	1	0	0	18	11	1

<i>Metabacillus niabensis</i>	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>Mesobacillus jeotgali</i>	3	0	3	0	0	0	0	0	0	1	0	0
<i>Mesobacillus thioparans</i>	5	0	30	0	0	3	4	2	0	0	0	0
<i>Fictibacillus nanhaiensis</i>	8	0	7	0	17	0	1	0	0	0	0	0
<i>Fictibacillus barbaricus</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1
<i>Cytobacillus oceanisediminis</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	5	0
<i>Cytobacillus firmus</i>	4	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>Neobacillus niacini</i>	0	4	0	0	0	2	0	1	0	0	0	0
<i>Peribacillus simplex</i>	0	0	14	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>Peribacillus frigorigerans</i>	6	4	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>Alkalihalobacillus clausii</i>	0	1	0	1	0	0	0	0	1	0	0	0
<i>Oceanobacillus profundus</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2
<i>Lysinibacillus macroides</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	7	0	0	0
<i>Lysinibacillus pakistanensis</i>	2	0	0	0	1	0	0	1	0	0	0	1
<i>Lysinibacillus fusiformis</i>	0	0	0	0	0	0	0	2	0	0	0	0
<i>Kocuria gwangalliensis</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2	0
<i>Kocuria rhizophila</i>	2	0	0	0	1	0	1	0	0	0	0	0
<i>Micrococcus endophyticus</i>	0	0	0	0	0	7	0	2	1	0	1	0

**Anexo 6.** Distribución de las especies de bacterias desnitrificantes aerobias en las distintas fases ENSO.



## Anexo 7. Caracterización morfológica de bacterias aisladas con genes desnitrificantes.

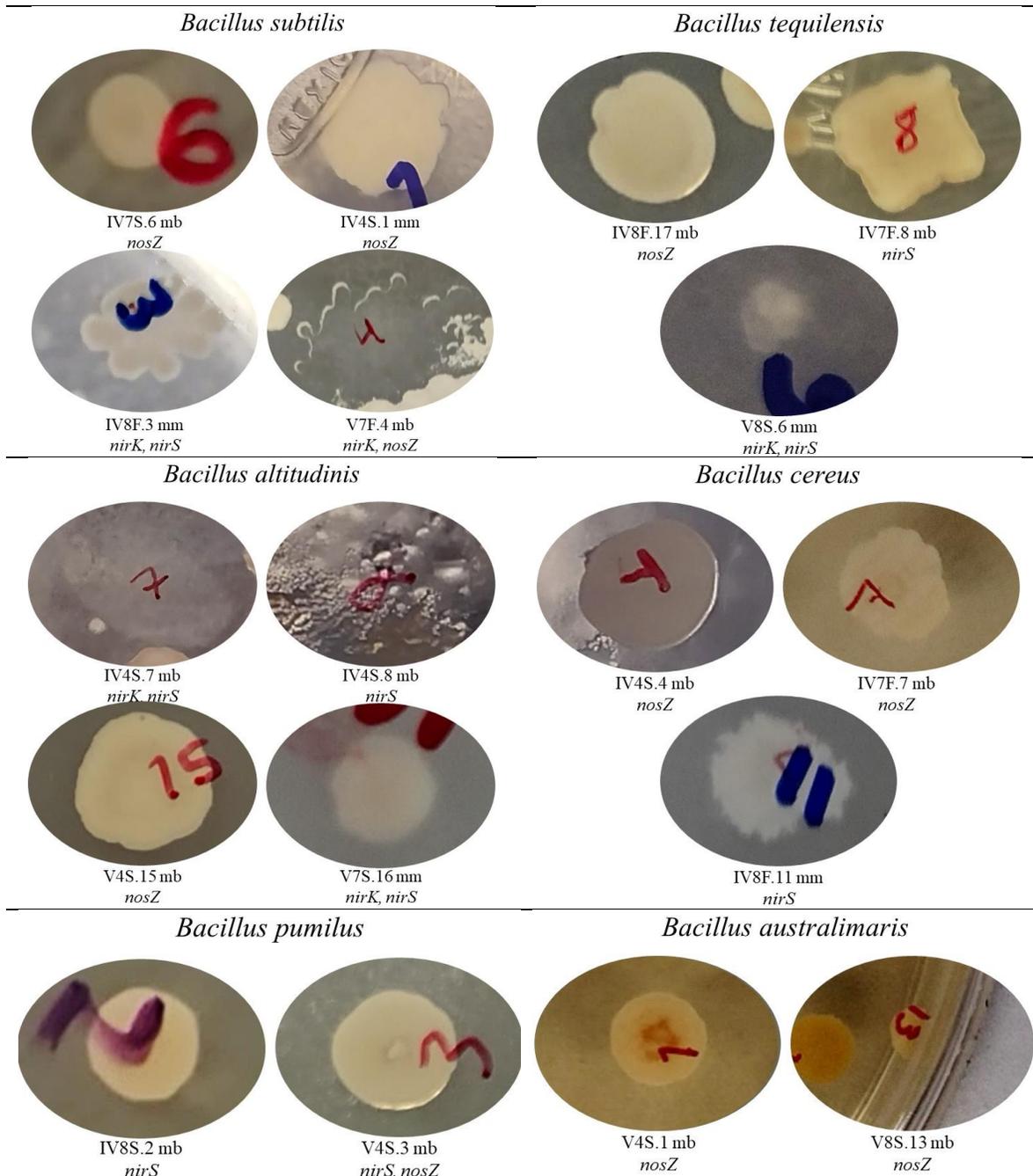
Especie	Representante	Medio	Características morfológicas							Número de colonias
			Color	Forma	Elevación	Bordes	Estructura	Brillo	Aspecto	
<i>Bacillus subtilis</i>	V7F.4	Braker	incolora	irregular	convexa	lobulados	lisa	transparente	gelatinosa	1
	IV7S.6	Braker	blanca	circular	elevada	lisos	lisa	opaca	húmeda	1
	IV8F.3	Marino	crema	irregular	achatada	lobulados	lisa	opaca	lechosa	9
<i>Bacillus tequilensis</i>	IV4S.1	Marino	crema	circular	achatada	ondulados	lisa	opaca	cerosa	1
	IV7F.8	Braker	crema	irregular	elevada	lisos	lisa	opaca	húmeda	2
	IV8F.17	Braker	crema	circular	convexa	lisos	lisa	opaca	húmeda	1
<i>Bacillus altitudinis</i>	V8S.6	Marino	blanco	irregular	achatada	ondulados	lisa	translúcida	seca	2
	IV4S.7	Braker	incolora	irregular	achatada	lobulados	lisa	translúcida	húmeda	2
	IV4S.8	Braker	incolora	circular	achatada	lisos	lisa	transparente	húmeda	1
<i>Bacillus cereus</i>	V4S.15	Braker	crema	irregular	achatada	lobulados	rugosa	opaca	cerosa	1
	V7S.16	Marino	crema	circular	achatada	lisos	lisa	opaca	cerosa	1
	IV4S.4	Braker	blanca	circular	achatada	lisos	lisa	opaca	húmeda	2
<i>Bacillus pumilus</i>	IV7F.7	Braker	blanca	irregular	achatada	lobulados	rugosa	opaca	húmeda	1
	IV8F.11	Marino	crema	circular	achatada	ondulados	filamentosa	opaca	seca	2
<i>Bacillus australimaris</i>	IV8S.2	Braker	blanca	circular	achatada	lisos	granulosa	opaca	húmeda	7
	V4S.3	Braker	blanca	circular	achatada	lisos	granulosa	opaca	cerosa	1
<i>Bacillus aerophilus</i>	V4S.1	Braker	crema	circular	achatada	lobulados	filamentosa	translúcida	cerosa	1
	V8S.13	Braker	blanca	irregular	achatada	ondulados	filamentosa	opaca	seca	1
<i>Bacillus licheniformis</i>	IV7S.9	Braker	blanca	irregular	achatada	lobulados	filamentosa	opaca	seca	1
	IV8S.6	Braker	blanca	irregular	protuberante	lobulados	granulosa	translúcida	húmeda	1

<i>Bacillus safensis</i>	V8S.9	Braker	crema	circular	achatada	ondulados	lisa	opaca	cerosa	1
<i>Bacillus humi</i>	V7S.7	Braker	blanca	circular	achatada	lisos	rugosa	translúcida	húmeda	2
<i>Bacillus spizizenii</i>	IV8S.5	Marino	blanco	irregular	achatada	ondulados	granulosa	translúcida	húmeda	3
<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	IV7S.3	Marino	blanco	irregular	achatada	lobulados	lisa	opaca	húmeda	3
<i>Bacillus velezensis</i>	IV4S.7	Marino	crema	circular	achatada	ondulados	lisa	opaca	cerosa	1
<i>Bacillus paralicheniformis</i>	V4S.7	Marino	naranja tenue	circular	achatada	lisos	lisa	translúcida	húmeda	2
<i>Bacillus timonensis</i>	V7S.7	Marino	crema	irregular	achatada	lobulados	lisa	opaca	húmeda	2
<i>Bacillus thaonhiensis</i>	V4S.21	Marino	naranja tenue	circular	achatada	lisos	lisa	opaca	húmeda	1
<i>Bacillus pacificus</i>	V8F.2	Marino	crema	circular	elevada	ondulados	lisa	opaca	cerosa	1
<i>Bacillus thuringiensis</i>	V4S.17	Marino	crema	circular	achatada	lobulados	lisa	opaca	húmeda	1
<i>Bacillus megaterium</i>	V4S.11	Braker	blanca	circular	achatada	lisos	filamentosa	opaca	húmeda	1
	V8F.9	Braker	crema	circular	achatada	lisos	lisa	opaca	cerosa	1
<i>Bacillus aryabhatai</i>	IV8F.14	Marino	crema	circular	achatada	lisos	lisa	opaca	seca	2
<i>Bacillus horikoshii</i>	V7F.2	Marino	naranja amarillento	circular	achatada	lisos	lisa	opaca	cerosa	2
<i>Cytobacillus firmus</i>	IV8S.1	Braker	rosa	circular	achatada	lisos	lisa	translúcida	húmeda	1
<i>Cytobacillus oceanisediminis</i>	IV4F.4	Marino	crema	circular	convexa	lisos	lisa	translúcida	húmeda	2
	V4S.2	Braker	amarillo	circular	convexa	lisos	lisa	opaca	cerosa	2
	V8S.1	Braker	naranja	circular	achatada	lisos	lisa	opaca	cerosa	1
<i>Metabacillus indicus</i>	V7S.6	Braker	naranja	circular	achatada	lisos	lisa	opaca	húmeda	1
	V4S.1	Marino	naranja amarillento	circular	achatada	ondulados	lisa	opaca	cerosa	13
<i>Metabacillus niabensis</i>	IV7F.1	Marino	naranja	circular	achatada	ondulados	filamentosa	opaca	cerosa	1
	V8S.17	Marino	crema	irregular	achatada	lobulados	lisa	opaca	seca	1
<i>Mesobacillus jeotgali</i>	IV8F.12	Marino	crema	puntiforme	achatada	lisos	granulosa	translúcida	seca	2
	IV8S.18	Marino	blanco	circular	achatada	lisos	lisa	translúcida	húmeda	3

<i>Mesobacillus thioparans</i>	IV7F.3	Marino	blanco	circular	achatada	lisos	lisa	translúcida	húmeda	4
	V7S.19	Marino	crema	circular	elevada	lobulados	lisa	translúcida	húmeda	1
<i>Neobacillus niacini</i>	V7S.1	Braker	crema	irregular	achatada	ondulados	rugosa	translúcida	húmeda	2
	V8S.16	Braker	blanca	circular	achatada	lisos	lisa	opaca	cerosa	1
<i>Fictibacillus nanhaiensis</i>	IV7S.4	Marino	naranja tenue	circular	achatada	lisos	lisa	opaca	húmeda	6
	IV8S.13	Marino	naranja pastel	circular	achatada	lisos	lisa	opaca	cerosa	3
<i>Fictibacillus barbaricus</i>	V4F. 9	Marino	crema	circular	achatada	lisos	lisa	opaca	húmeda	1
<i>Lysinibacillus macroides</i>	IV4S.1	Braker	blanca	circular	achatada	lisos	filamentosa	opaca	húmeda	7
<i>Lysinibacillus pakistanensis</i>	IV8S.10	Braker	blanca	irregular	achatada	ondulados	lisa	translúcida	húmeda	2
<i>Lysinibacillus fusiformis</i>	V7F.7	Marino	crema	irregular	achatada	ondulados	lisa	translúcida	cerosa	2
<i>Kocuria gwangalliensis</i>	IV4F.1	Braker	rosa	circular	convexa	lisos	lisa	opaca	húmeda	2
<i>Kocuria rhizophila</i>	IV7S.10	Braker	blanca	irregular	protuberante	lisos	rugosa	translúcida	cerosa	1
<i>Peribacillus simplex</i>	IV8F.8	Marino	crema	circular	elevada	lisos	lisa	opaca	húmeda	6
<i>Peribacillus frigoritolerans</i>	IV8S.21	Marino	crema	circular	achatada	lisos	lisa	opaca	cerosa	6
<i>Oceanobacillus profundis</i>	V4F. 8	Marino	crema	irregular	achatada	lobulados	lisa	opaca	lechosa	2
<i>Alkalihalobacillus clausii</i>	IV4S.14	Marino	crema	circular	achatada	ondulados	granulosa	translúcida	cerosa	1
<i>Micrococcus endophyticus</i>	IV4S.21	Marino	amarillo pastel	circular	convexa	lisos	lisa	opaca	húmeda	1
	V4F.5	Marino	crema	circular	achatada	lisos	rugosa	opaca	húmeda	50
<b>Sin identificar</b>	V4F.7	Marino	crema	circular	achatada	lobulados	lisa	translúcida	cerosa	1
	V7F.8	Marino	amarillo pastel	irregular	achatada	ondulados	lisa	translúcida	húmeda	6
	IV4S.5	Braker	blanca	circular	achatada	lisos	granulosa	opaca	húmeda	1
	V4S.10	Braker	blanca	irregular	achatada	lisos	filamentosa	opaca	membranosa	1
	V4S.14	Braker	crema	circular	achatada	lisos	lisa	translúcida	húmeda	4

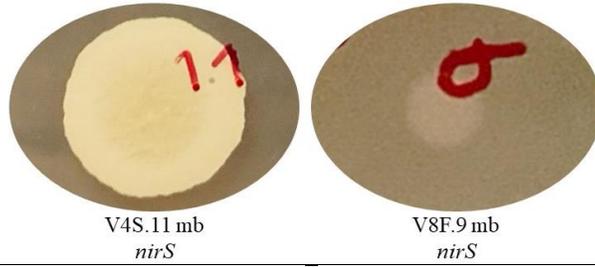
## Anexo 8. Representantes desnitrificantes aerobios pertenecientes a la misma especie

En las siguientes imágenes se observan las doce especies de bacterias desnitrificantes que tuvieron más de un representante. Se indica la muestra que pertenecieron (IV= La Niña, V= El Niño; S= superficial, F= Profundo; 4= estación oceánica, 7= estación intermedia, 8= estación costera; mb= medio Braker, mm= medio marino) y los genes que portaron.

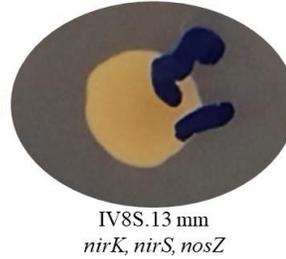
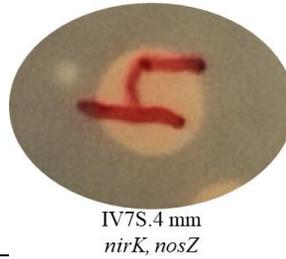
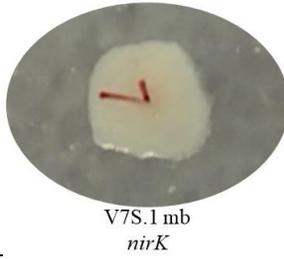


---

*Bacillus megaterium*

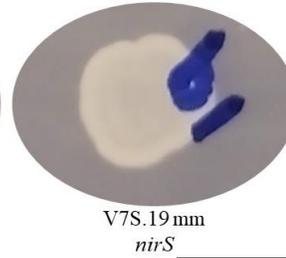
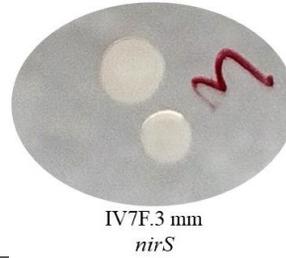
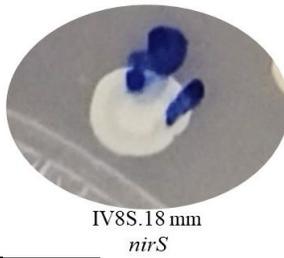


*Neobacillus niacini*



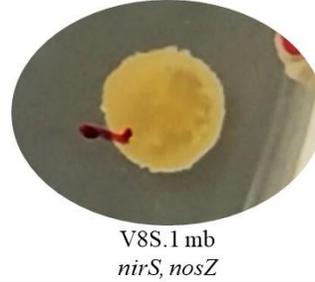
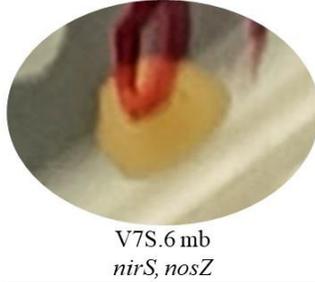
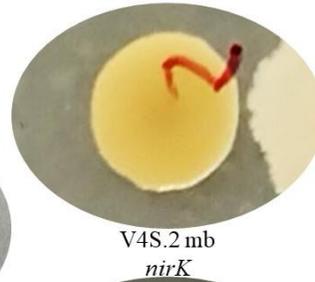
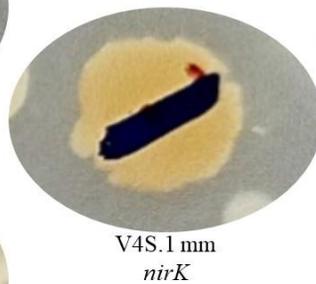
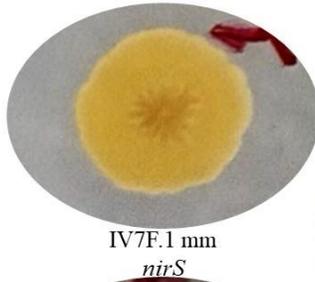
*Fictibacillus nanhaeiensis*

*Mesobacillus jeotgali*



*Mesobacillus thioparans*

*Metabacillus indicus*



## Anexo 9. Resultados del ensayo de actividad en condiciones aerobias de los genes desnitrificantes.

En verde se resaltan los representantes en los cuales se pudo comprobar la actividad de los genes desnitrificantes que portaron.

Especie	Representante	Medio	Resultados PCR			Pruebas de reducción de nitratos y nitritos					Interpretación de resultados
			<i>nirK</i>	<i>nirS</i>	<i>nosZ</i>	Prueba colorimétrica			Campana Durham		
						rojo después de $\alpha$ y $\beta$ (presencia de $\text{NO}_2^-$ en el medio)	rojo después de Zn (presencia de $\text{NO}_3^-$ en el medio)	incolore después de Zn (ausencia de $\text{NO}_3^-$ y $\text{NO}_2^-$ en el medio)	sin burbujas (ausencia de productos gaseosos)	con burbujas (presencia de productos gaseosos: $\text{N}_2$ o $\text{N}_2\text{O}$ )	
<i>Bacillus subtilis</i>	V7F.4	Braker	Sí	No	Sí	x				(-)	actividad de <i>napA</i> y/o <i>narG</i> ; <i>nirK</i> inactivo, actividad de <i>nosZ</i> no comprobable (falta de sustrato)
<i>Bacillus subtilis</i>	IV7S.6	Braker	No	No	Sí	x				(-)	actividad de <i>napA</i> y/o <i>narG</i> ; actividad de <i>nosZ</i> no comprobable (falta de sustrato)
<i>Bacillus subtilis</i>	IV8F.3	Marino	Sí	Sí	No	x				(-)	actividad de <i>napA</i> y/o <i>narG</i> ; <i>nirK</i> y <i>nirS</i> inactivos
<i>Bacillus subtilis</i>	IV4S.1	Marino	No	No	Sí	x				(-)	actividad de <i>napA</i> y/o <i>narG</i> ; actividad de <i>nosZ</i> no comprobable (falta de sustrato)
<i>Bacillus tequilensis</i>	IV7F.8	Braker	No	Sí	No	x				(-)	actividad de <i>napA</i> y/o <i>narG</i> ; <i>nirS</i> inactivo
<i>Bacillus tequilensis</i>	IV8F.17	Braker	No	No	Sí	x				(-)	actividad de <i>napA</i> y/o <i>narG</i> ; actividad de <i>nosZ</i> no comprobable (falta de sustrato)
<i>Bacillus tequilensis</i>	V8S.6	Marino	Sí	Sí	No			x		(+)	genes <i>napA</i> y/o <i>narG</i> , <i>nirK</i> y <i>nirS</i> activos
<i>Bacillus altitudinis</i>	IV4S.7	Braker	Sí	Sí	No	x				(-)	actividad de <i>napA</i> y/o <i>narG</i> ; <i>nirK</i> y <i>nirS</i> inactivos
<i>Bacillus altitudinis</i>	IV4S.8	Braker	No	Sí	No	x				(-)	actividad de <i>napA</i> y/o <i>narG</i> ; <i>nirS</i> inactivo

<i>Bacillus altitudinis</i>	V4S.15	Braker	No	No	Sí	x		(-)	actividad de <i>napA</i> y/o <i>narG</i> ; actividad de <i>nosZ</i> no comprobable (falta de sustrato)
<i>Bacillus altitudinis</i>	V7S.16	Marino	Sí	Sí	No		x	(-)	inactividad de genes desnitrificantes
<i>Bacillus cereus</i>	IV4S.4	Braker	No	No	Sí	x		(-)	actividad de <i>napA</i> y/o <i>narG</i> ; actividad de <i>nosZ</i> no comprobable (falta de sustrato)
<i>Bacillus cereus</i>	IV7F.7	Braker	No	No	Sí	x		(-)	actividad de <i>napA</i> y/o <i>narG</i> ; actividad de <i>nosZ</i> no comprobable (falta de sustrato)
<i>Bacillus cereus</i>	IV8F.11	Marino	No	Sí	No	x		(-)	actividad de <i>napA</i> y/o <i>narG</i> ; <i>nirS</i> inactivo
<i>Bacillus pumilus</i>	IV8S.2	Braker	No	Sí	No	x		(-)	actividad de <i>napA</i> y/o <i>narG</i> ; <i>nirS</i> inactivo
<i>Bacillus pumilus</i>	V4S.3	Braker	No	Sí	Sí		x	(-)	inactividad de genes desnitrificantes
<i>Bacillus australimaris</i>	V4S.1	Braker	No	No	Sí		x	(-)	inactividad de genes desnitrificantes
<i>Bacillus australimaris</i>	V8S.13	Braker	No	No	Sí	x		(-)	actividad de <i>napA</i> y/o <i>narG</i> ; actividad de <i>nosZ</i> no comprobable (falta de sustrato)
<i>Bacillus aerophilus</i>	IV7S.9	Braker	No	Sí	Sí	x		(-)	actividad de <i>napA</i> y/o <i>narG</i> ; <i>nirS</i> inactivo, actividad de <i>nosZ</i> no comprobable (falta de sustrato)
<i>Bacillus licheniformis</i>	IV8S.6	Braker	No	Sí	No			Sin crecimiento	
<i>Bacillus safensis</i>	V8S.9	Braker	No	Sí	Sí		x	(-)	inactividad de genes desnitrificantes
<i>Bacillus humi</i>	V7S.7	Braker	Sí	No	No			(-)	genes <i>napA</i> y/o <i>narG</i> , <i>nirK</i> activos
<i>Bacillus spizizenii</i>	IV8S.5	Marino	Sí	No	No	x		(+)	actividad de <i>napA</i> y/o <i>narG</i> ; <i>nirK</i> inactivo
<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	IV7S.3	Marino	No	No	Sí	x		(-)	actividad de <i>napA</i> y/o <i>narG</i> ; actividad de <i>nosZ</i> no comprobable (falta de sustrato)
<i>Bacillus velezensis</i>	IV4S.7	Marino	No	Sí	No	x		(-)	actividad de <i>napA</i> y/o <i>narG</i> ; <i>nirS</i> inactivo

<i>Bacillus paralicheniformis</i>	V4S.7	Marino	No	Sí	No	x		(-)	actividad de <i>napA</i> y/o <i>narG</i> ; <i>nirS</i> inactivo
<i>Bacillus timonensis</i>	V7S.7	Marino	Sí	Sí	Sí		x	(+)	genes <i>napA</i> y/o <i>narG</i> , <i>nosZ</i> , <i>nirK</i> y <i>nirS</i> activos
<i>Bacillus thaonhiensis</i>	V4S.21	Marino	Sí	No	Sí		x	(+)	genes <i>napA</i> y/o <i>narG</i> , <i>nosZ</i> y <i>nirK</i> activos
<i>Bacillus pacificus</i>	V8F.2	Marino	No	No	Sí	x		(-)	actividad de <i>napA</i> y/o <i>narG</i> ; actividad de <i>nosZ</i> no comprobable (falta de sustrato)
<i>Bacillus thuringiensis</i>	V4S.17	Marino	No	Sí	Sí	x		(-)	actividad de <i>napA</i> y/o <i>narG</i> ; <i>nirS</i> inactivo, <i>nosZ</i> probablemente inactivo (falta de sustrato)
<i>Bacillus megaterium</i>	V4S.11	Braker	No	Sí	No		x	(-)	inactividad de genes desnitrificantes
<i>Bacillus megaterium</i>	V8F.9	Braker	No	Sí	No	x		(-)	actividad de <i>napA</i> y/o <i>narG</i> ; <i>nirS</i> inactivo
<i>Bacillus aryabhatai</i>	IV8F.14	Marino	No	Sí	No		x	(-)	inactividad de genes desnitrificantes
<i>Bacillus horikoshii</i>	V7F.2	Marino	Sí	No	No		x	(-)	inactividad de genes desnitrificantes
<i>Cytobacillus firmus</i>	IV8S.1	Braker	Sí	Sí	Sí	x		(-)	actividad de <i>napA</i> y/o <i>narG</i> ; <i>nirK</i> y <i>nirS</i> inactivo, actividad de <i>nosZ</i> no comprobable (falta de sustrato)
<i>Cytobacillus oceanisediminis</i>	IV4F.4	Marino	No	Sí	Sí		x	(+)	genes <i>napA</i> y/o <i>narG</i> , <i>nosZ</i> y <i>nirS</i> activos
<i>Metabacillus indicus</i>	V4S.2	Braker	Sí	No	No			Sin crecimiento	
<i>Metabacillus indicus</i>	V8S.1	Braker	No	Sí	Sí			Sin crecimiento	
<i>Metabacillus indicus</i>	V7S.6	Braker	No	Sí	Sí	x		(-)	actividad de <i>napA</i> y/o <i>narG</i> ; <i>nirS</i> inactivo, actividad de <i>nosZ</i> no comprobable (falta de sustrato)
<i>Metabacillus indicus</i>	V4S.1	Marino	No	Sí	No		x	(-)	inactividad de genes desnitrificantes
<i>Metabacillus indicus</i>	IV7F.1	Marino	No	Sí	No		x	(-)	inactividad de genes desnitrificantes
<i>Metabacillus niabensis</i>	V8S.17	Marino	No	Sí	No	x		(-)	actividad de <i>napA</i> y/o <i>narG</i> ; <i>nirS</i> inactivo

<i>Mesobacillus jeotgali</i>	IV8F.12	Marino	No	Sí	No	x		(-)	actividad de <i>napA</i> y/o <i>narG</i> ; <i>nirS</i> inactivo
<i>Mesobacillus jeotgali</i>	IV8S.18	Marino	Sí	Sí	Sí	x		(-)	actividad de <i>napA</i> y/o <i>narG</i> ; <i>nirK</i> y <i>nirS</i> inactivos, <i>nosZ</i> posiblemente inactivo (falta de sustrato)
<i>Mesobacillus thioparans</i>	IV7F.3	Marino	No	Sí	No	x		(-)	actividad de <i>napA</i> y/o <i>narG</i> ; <i>nirS</i> inactivo
<i>Mesobacillus thioparans</i>	V7S.19	Marino	No	Sí	No	x		(-)	actividad de <i>napA</i> y/o <i>narG</i> ; <i>nirS</i> inactivo
<i>Neobacillus niacini</i>	V7S.1	Braker	Sí	No	No	x		(-)	actividad de <i>napA</i> y/o <i>narG</i> ; <i>nirK</i> inactivo
<i>Neobacillus niacini</i>	V8S.16	Braker	No	No	Sí			Sin crecimiento	
<i>Fictibacillus nanhaiensis</i>	IV7S.4	Marino	Sí	No	Sí	x		(-)	actividad de <i>napA</i> y/o <i>narG</i> ; <i>nirK</i> inactivo, <i>nosZ</i> posiblemente inactivo (falta de sustrato)
<i>Fictibacillus nanhaiensis</i>	IV8S.13	Marino	Sí	Sí	Sí	x		(-)	actividad de <i>napA</i> y/o <i>narG</i> ; <i>nirK</i> y <i>nirS</i> inactivos, <i>nosZ</i> posiblemente inactivo (falta de sustrato)
<i>Fictibacillus barbaricus</i>	V4F.9	Marino	Sí	No	No	x		(-)	actividad de <i>napA</i> y/o <i>narG</i> ; <i>nirK</i> inactivo
<i>Lysinibacillus macroides</i>	IV4S.1	Braker	No	No	Sí		x	(-)	inactividad de genes desnitrificantes
<i>Lysinibacillus pakistanensis</i>	IV8S.10	Braker	No	No	Sí	x		(-)	actividad de <i>napA</i> y/o <i>narG</i> ; actividad de <i>nosZ</i> no comprobable (falta de sustrato)
<i>Lysinibacillus fusiformis</i>	V7F.7	Marino	Sí	No	No	x		(-)	actividad de <i>napA</i> y/o <i>narG</i> ; <i>nirK</i> inactivo
<i>Kocuria gwangalliensis</i>	IV4F.1	Braker	Sí	No	No			Sin crecimiento	
<i>Kocuria rhizophila</i>	IV7S.10	Braker	Sí	Sí	Sí		x	(-)	inactividad de genes desnitrificantes
<i>Peribacillus simplex</i>	IV8F.8	Marino	No	Sí	No	x		(-)	actividad de <i>napA</i> y/o <i>narG</i> ; <i>nirS</i> inactivo
<i>Peribacillus frigoritolerans</i>	IV8S.21	Marino	Sí	Sí	No	x		(-)	actividad de <i>napA</i> y/o <i>narG</i> ; <i>nirK</i> y <i>nirS</i> inactivos
<i>Oceanobacillus profundis</i>	V4F.8	Marino	Sí	No	No	x		(-)	actividad de <i>napA</i> y/o <i>narG</i> ; <i>nirK</i> inactivo

<i>Alkalihalobacillus clausii</i>	IV4S.14	Marino	Sí	No	No	x		(-)	actividad de <i>napA</i> y/o <i>narG</i> ; <i>nirK</i> inactivo
<i>Micrococcus endophyticus</i>	IV4S.21	Marino	No	No	Sí		x	(-)	inactividad de genes desnitrificantes
<i>Sin identificar</i>	V4F.5	Marino	Sí	Sí	No	x		(-)	actividad de <i>napA</i> y/o <i>narG</i> ; <i>nirK</i> y <i>nirS</i> inactivos
<i>Sin identificar</i>	V4F.7	Marino	Sí	Sí	No		x	(-)	inactividad de genes desnitrificantes
<i>Sin identificar</i>	V7F.8	Marino	Sí	Sí	No	x		(-)	actividad de <i>napA</i> y/o <i>narG</i> ; <i>nirK</i> y <i>nirS</i> inactivos
<i>Sin identificar</i>	IV4S.5	Braker	No	Sí	Sí		x	(-)	inactividad de genes desnitrificantes
<i>Sin identificar</i>	V4S.10	Braker	No	Sí	Sí	x		(-)	actividad de <i>napA</i> y/o <i>narG</i> ; <i>nirS</i> inactivo, actividad de <i>nosZ</i> no comprobable (falta de sustrato)
<i>Sin identificar</i>	V4S.14	Braker	Sí	Sí	Sí	x		(-)	actividad de <i>napA</i> y/o <i>narG</i> ; <i>nirK</i> y <i>nirS</i> inactivo, actividad de <i>nosZ</i> no comprobable (falta de sustrato)