



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

Maestría y Doctorado en Ciencias Bioquímicas

DIVERSIDAD DE ARQUEAS Y BACTERIAS EN SEDIMENTOS PROFUNDOS DEL
GOLFO DE MÉXICO

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:
MAESTRO EN CIENCIAS

PRESENTA:
BIOL. ADRIÁN MARTÍNEZ SANTANA

DRA. KATY JUÁREZ LÓPEZ
[Instituto de Biotecnología, UNAM](#)

DR. FRANCISCO CERVANTES CARRILLO
[Unidad Académica Juriquilla, Instituto de Ingeniería, UNAM](#)
DR. LUIS SERVÍN GARCIDUEÑAS
[ENES Morelia, UNAM](#)

Cuernavaca, Morelos. Noviembre, 2020



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



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.

Jurado Asignado

Dr. Lorenzo Patrick Segovia Forcella

Presidente

Dr. Enrique Mérimo Pérez

Secretario

Dra. Gloria Soberón Chávez

Vocal

Dra. Eria Alaide Rebolgar Caudillo

Vocal

Dra. Luz de María Bretón Deval

Vocal

Agradecimientos

A mi directora de tesis la Dra. Katy Juárez López, por el apoyo y confianza desde el día en el que llegue al laboratorio. Por el darme la oportunidad de formar parte de un proyecto de tal magnitud, aportarme ideas, consejos y motivarme siempre a seguir adelante con el que hacer científico. De este proyecto aprendí una gran cantidad de temas, participe en varias actividades, conocí el Golfo de México y todo esto no lo hubiera conseguido sin su ayuda.

Al Dr. Francisco Cervantes Carrillo, miembro de mi comité tutorial por todas las ideas, consejos y aportaciones realizadas al proyecto y por facilitarme el análisis de la determinación de la concentración de metales en las muestras de mi trabajo lo cual apporto un gran valor al desarrollo de este proyecto.

Al Dr. Luis Servín Garcidueñas, miembro de mi comité tutorial por siempre estar disponible y apoyarme con varias observaciones y propuestas para este proyecto. Sobre todo, por la gran actitud que mantuvo conmigo a lo largo del desarrollo de este proyecto.

A los miembros de la Unidad Universitaria de Secuenciación Masiva y Bioinformática del Instituto de Biotecnología de la UNAM

A los doctores Paloma Lara Figueroa y José Fernando García Guevara investigadores posdoctorales en el laboratorio los cuales me enseñaron la forma de trabajar con este tipo de muestras, tuvieron la paciencia de sentarse a explicarme, recomendarme artículos, metodologías y darme varios consejos los cuales me ayudaron enormemente para realizar varias partes del proyecto.

A los miembros de la Unidad Universitaria de Secuenciación Masiva y Bioinformática del Instituto de Biotecnología en especial a la Dr. Leticia Vega Alvarado por su apoyo y resolución de dudas en todo el procesamiento bioinformático.

A los miembros de mi jurado, el Dr. Lorenzo Patrick Segovia Forcella, al Dr. Enrique Mérimo Pérez, a la Dra. Gloria Soberón Chávez, a la Dra. Eria Alaide Rebollar Caudillo, y a la Dra. Luz de María Bretón Deval, por todos sus comentarios, correcciones y observaciones que contribuyeron a mejorar mi trabajo escrito.

A mis compañeros y amigos del laboratorio, Dr. José Alberto Hernández, Dra. Paloma Lara, el M.C. Alan Brito, M.C. Fanny Flores, al Q.B. Manuel Huerta y al Ing Cesar Raúl Landa Aponte, por todas sus recomendaciones, apoyo y amistad durante todo este tiempo.

A todos los miembros del laboratorio 9 del Instituto de Biotecnología UNAM, por su apoyo y amistad compartida a lo largo de este proyecto.

A los técnicos del laboratorio 9, Corina Mondragón y Antonio Dorantes por su ayuda en el laboratorio

A los miembros del Consorcio de Investigación del Golfo de México por su apoyo y consejos en el desarrollo de los experimentos.

Al Consorcio de Investigación del Golfo de México (CIGOM). Fondo sectorial CONACyT-SENER-Hidrocarburos proyecto 201441.

Índice

Resumen	8
Introducción	9
Sedimentos marino	9
Golfo de México.....	10
Estudio de las comunidades microbianas de los sedimentos del fondo marino	13
Comparación de comunidades microbianas de sedimentos de diversos ambientes	14
Taxones representativos del sedimento marino	15
Metabolismos relevantes en el sedimento marino.....	16
Antecedentes	18
Suroeste del Golfo de México	18
Noroeste del Golfo de México	20
Objetivos	24
Objetivo general	24
Objetivos particulares	24
Metodología	24
Sitio de estudio y muestreo.....	24
Extracción y purificación de DNA de sedimento marino.....	27
Amplificación de regiones hipervariables del gen 16s ribosomal	27
Secuenciación masiva de amplicones.....	28
Procesamiento y análisis de las secuencias.....	28
Búsqueda de genes de interés metabólico.	29
Cuantificación de parámetros geoquímicos.....	30
Determinación de la concentración de metales	30
Cuantificación de aceptores de electrones anaerobios	31
Mediciones de Sulfato	32
Mediciones de Nitrato	32
Determinación de pH del sedimento marino	33
Resultados	33
Obtención de DNA de sedimentos marinos	33
Diversidad y riqueza de las muestras	36
Asignación taxonómica de la diversidad de arqueas	39

Estructura de la comunidad de arqueas.....	43
Asignación taxonómica de la diversidad de bacterias.	48
Estructura de la comunidad de Bacterias.....	56
Taxones diferencialmente abundantes	60
Determinación de variables geoquímicas.....	64
Participación en otros proyectos	67
Búsqueda de genes marcadores de metabolismos de interés	67
Discusión	76
Bacterias en el sedimento del GoM	76
Arqueas en el sedimento del GoM	79
Taxones y variables geoquímicas	81
La población conforme la profundidad.....	87
Conclusiones	89
Perspectivas	90
Obtención y análisis de metagenomas del sitio D18	91
Bibliografía y Referencias	94
Anexos	100
Anexo 1. Resultados del procesamiento de amplicones.....	100
Anexo 2. Curvas de rarefacción para cada núcleo	102
Anexo 3. Índices de diversidad alfa de cada muestra.....	105
Anexo 4. Órdenes de archaeas encontrados en las muestras.....	108
Anexo 5. Valores de media y mediana de las clases diferencialmente abundantes encontradas por ANCOM.	110
Anexo 6. Valores de la concentración de metales, sulfato, nitrato y pH. (se representan en mg/kg excepto pH y profundidad).....	113
Anexo 7. Resultado de las múltiples comparaciones por un ANOVA de 2 vías.	121
Anexo 8. Coeficiente de correlación de Spearman del análisis de regresión múltiple entre taxones y valores geoquímicos	123
Anexo 9. Programas y bases de datos utilizadas para el análisis bioinformático de las secuencias.....	125

Índice de Figuras

Figura 1. Distribución de las clases primarias de sedimento y puntos de muestreo en el GoM.11

Figura 2. Delimitación territorial del GoM y polígonos de explotación junto con otros países.... 12

Figura 3. Modelo general de la diversidad microbiana y posibles interacciones en los sedimentos marinos.....	17
Figura 4. Estaciones de muestreo de E. Godoy-Lozano et al., 2018.	19
Figura 5. Localización de los sitios de muestreo en el noroeste del GoM por Sánchez-Soto Jiménez et al., 2018.....	21
Figura 6. Sitios de muestreo sobre la plataforma continental del GoM. Tomado de Ramírez et al., 2020.....	22
Figura 7. Sitios de colecta de la campaña MET-02.....	25
Figura 8. Ejemplo de un núcleo de sedimento y el procesamiento de las muestras.	26
Figura 9. Esquema del procesamiento bioinformático utilizado para las secuencias de 16s ARN ribosomal.....	29
Figura 10 Gel de agarosa con amplicones de las regiones V3-V4 del gen 16s ribosomal.....	34
Figura 11. Índices de diversidad alfa de la comunidad de bacteria para los núcleos A1 y A3...36	
Figura 12. Índices de diversidad alfa de la comunidad de bacteria para los núcleos C11 y D18.	37
Figura 13. Índices de diversidad alfa de la comunidad de arquea para los núcleos A1 y A3.....	38
Figura 14. Índices de diversidad alfa de la comunidad de arquea para los núcleos C11 y D18.	39
Figura 15. Taxonomía y abundancia relativa de la diversidad de arqueas a nivel de Phylum. ...	40
Figura 16. Taxonomía y abundancia relativa de arqueas a nivel de clase.	42
Figura 17. Taxonomía y abundancia relativa de arqueas a nivel de clase.	42
Figura 18. Análisis multidimensional no métrico para los resultados de arquea.	44
Figura 19. NMDS para los resultados de arquea con la distancia de UniFrac.....	45
Figura 20. NMDS de las muestras del núcleo A1 con los resultados de arquea.....	46
Figura 21. PCoA de las muestras del núcleo A3 con los resultados de arquea.....	46
Figura 22. NMDS de las muestras del núcleo C11 con los resultados de arquea.	47
Figura 23. NMDS de las muestras del núcleo D18 con los resultados de arquea.	47
Figura 24. Abundancia relativa de los taxones de bacterias encontrados a nivel de Phylum. ...	49
Figura 25. Taxonomía y abundancia relativa a nivel de clase de los núcleos A1 y A3 de la zona de Perdido.....	50
Figura 26. Taxonomía y abundancia relativa a nivel de clase de los núcleos D18 y C11 de la zona de “Campeche knolls”.....	51
Figura 27. Heatmap de los tops 25 órdenes del núcleo A1.....	52
Figura 28. Heatmap de los tops 30 órdenes del núcleo A3.....	53
Figura 29. Heatmap de los tops 30 órdenes del núcleo C11.....	54
Figura 30. Heatmap de los tops 30 órdenes del núcleo D18.....	55
Figura 31. Análisis multidimensional no métrico para los resultados de bacterias.	56
Figura 32. Análisis multidimensional no métrico para los resultados de bacteria usando distancia de UniFrac.....	57
Figura 33. NMDS de las muestras del núcleo A1 con los resultados de bacteria.....	58
Figura 34. PcoA de las muestras del núcleo A3 con los resultados de bacteria.....	58
Figura 35. NMDS de las muestras del núcleo C11 con los resultados de bacteria.....	59
Figura 36. NMDS de las muestras del núcleo D18 con los resultados de bacteria.....	59
Figura 37. Análisis de coordenadas principales usando los 32 valores geoquímicos medidos..66	

Índice de tablas

Tabla 1. Datos de colecta sobre las cuatro muestras que fueron seleccionadas para el estudio. Se tomaron al momento de la colecta en la campaña MET-02.....	26
Tabla 2. Oligonucleótidos utilizados para la amplificación de regiones hipervariables del gen rDNA 16s.....	27
Tabla 3. Resultados de la extracción y purificación de DNA de las de la zona de Perdido.	33
Tabla 4. Resultados de la extracción y purificación de DNA de las de la zona de “Campeche knolls”.....	33
Tabla 5. Secciones definidas en la columna de sedimento basándose en la profundidad en cmbs de cada muestra	43
Tabla 6. Resultado de los PERMANOVA y Betadisper entre las secciones del sedimento.....	48
Tabla 7. Resultado de los PERMANOVA y Betadispers entre las secciones del sedimento.....	60
Tabla 8. Clases de arquea diferencialmente abundantes entre los núcleos.....	61
Tabla 9. Clases de arquea diferencialmente abundantes entre las categorías del sedimento para todas las muestras y para el núcleo C11.	61
Tabla 10. Clases de bacteria diferencialmente abundantes entre los núcleos.	62
Tabla 11. Clases de bacteria diferencialmente abundantes entre las categorías del sedimento para todas las muestras y para los núcleos C11 y D18.....	63
Tabla 12. Número de homólogos encontrados de cada gen en ambos metagenomas.....	68
Tabla 13. Taxonomía asociada a los genes homólogos encontrados de la vía de la metanogénesis/metanotrofia.....	69
Tabla 14. Taxonomía asociada a los genes homólogos encontrados de la vía de la sulfatoreducción y oxidación de sulfato.....	71
Tabla 15. Taxonomía asociada a los genes homólogos encontrados del metabolismo del nitrógeno.....	72
Tabla 16. Taxonomía asociada a los genes homólogos encontrados de marcadores degradación de hidrocarburos.	74
Tabla 17. Resultado del valor de P para cada correlación por el análisis de regresión lineal múltiple para los taxones de bacteria.	83
Tabla 18. Resultado del valor de P para cada correlación por el análisis de regresión lineal múltiple para los taxones de arquea.....	85

Resumen

El Golfo de México es reconocido por la importancia de sus recursos económicos, biológicos, minerales e industriales. Se ha investigado en numerosos aspectos, relacionados con la extracción, procesamiento y distribución de gas y petróleo, recientemente se han estudiado los microorganismos que habitan en el Golfo tanto en el agua como en el sedimento donde las condiciones ambientales se consideran extremas.

En el presente trabajo se investigó la diversidad de bacterias y arqueas en dos zonas previamente estudiadas del Golfo de México (La zona de Perdido y “Campeche knolls”), se analizó la diversidad vertical de las comunidades, la concentración de metales y algunos aceptores de electrones de 45 muestras de sedimento marino provenientes de cuatro sitios de muestreo. Los resultados obtenidos muestran una gran diversidad de bacterias en los sedimentos y una dominancia de la clase *Gammaproteobacteria* en la zona de Perdido mientras que la zona de “Campeche knolls” las poblaciones de *Deltaproteobacteria*, *Dehalococcoidia* y *Rokubacteria* fueron las más abundantes y las muestras presentaron una mayor diversidad. En cuanto a la población de arqueas esta fue muy parecida entre los cuatro sitios y la comunidad se vio altamente afectada por su distribución vertical en la columna de sedimento, donde los primeros 6 a 8 cm del sedimento fueron dominados casi en su totalidad por arqueas *Nitrosopumilaceae*. También se encontró que la concentración de metales en el sedimento es altamente dispersa y no existieron diferencias significativas entre los sitios o profundidad del sedimento, solo el sulfato fue el único compuesto que aumentó conforme la profundidad de cada muestra. Por último, se buscaron relaciones entre los compuestos y metales medidos y los taxones encontrados en el sedimento. Se observó una baja cantidad de correlaciones, sin embargo, los taxones encontrados son representativos de metabolismos de interés, biogeoquímico y biotecnológico resaltando la importancia del estudio de estas comunidades y su papel en el ecosistema.

Introducción

Sedimentos marino

El bioma marino cubre la mayor parte del planeta y los ecosistemas que están presentes van desde los estuarios costeros hasta las ventilas submarinas en las zonas más profundas del océano, observándose así una enorme variedad de hábitats en donde los microorganismos se desarrollan. Los sedimentos oceánicos representan 70% de la superficie terrestre, siendo el sustrato del ecosistema más grande de toda la tierra y aún más importante es que son considerados la reserva de carbono más grande del mundo (Dutkiewicz, Müller, O'Callaghan & Jónasson, 2015). La formación de los sedimentos marinos se da por la deposición de partículas de roca, suelo y materia orgánica que se van acumulando en el fondo marino. Estos se pueden clasificar de dos maneras, por el tamaño de las partículas gracias a la escala de Wentworth (de rocas a arcillas) y por su origen de formación en cuatro tipos: terrígeno (partículas provenientes de tierra arrastradas por ríos y otros procesos de erosión), biogénico (acumulación de restos de organismos.), hidrogénico (reacciones de precipitación de sales o metales) y cosmogénicos (partículas provenientes del espacio). La distribución y composición de

los sedimentos en los océanos apoya a la comprensión de los ciclos biogeoquímicos, formación de depósitos metálicos, comportamiento de corrientes y reconstrucción de ambientes pasados (Dutkiewicz, Müller, O'Callaghan & Jónasson, 2015).

Se considera a los sedimentos marinos como un hábitat microbiano masivo donde se pueden encontrar hasta 2.9×10^{29} células procariotas y alrededor del 0.18 al 3.6% de la biomasa viva total de la Tierra (Kallmeyer, et al., 2012 y; Petro et al., 2019). Esto conlleva a entender su importancia y participación en los ciclos biogeoquímicos, donde presentan roles esenciales dependiendo de sus metabolismos. En este hábitat, las bacterias y arqueas participan en procesos como la oxidación de la materia orgánica, la producción de metano, degradación de hidrocarburos, secuestro de carbono y oxidación anaerobia del amonio. (Kallmeyer, et al., 2012; Hinrichs et al., 2006; D'Hondt, 2004, Jørgensen et al., 2019 y In't Zandt et al., 2018). La mayoría de estos procesos ocurren en un ambiente con casi nulo oxígeno (fondo marino), por lo que los microorganismos utilizan diferentes aceptores de electrones para completar sus reacciones metabólicas acoplando algunos de estos procesos a la sulfato-reducción, nitrato y nitrito-reducción y en algunos casos reducción de óxidos metálicos. (In't Zandt et al., 2018). Debido a estos metabolismos la microbiota del fondo marino también ha sido estudiada con un interés biotecnológico y no solo para identificar su taxonomía, distribución y relación con ciclos biogeoquímicos.

Golfo de México

En el Golfo de México se ha sido estudiado numerosos aspectos relacionados principalmente a la extracción, procesamiento y distribución de gas y petróleo. Sin embargo, muy poco se sabe sobre los microorganismos que habitan el GoM tanto en el agua y el sedimento donde las condiciones ambientales como la temperatura, presión y concentración de oxígeno son extremas. Es en este ambiente donde habitan microorganismos que han evolucionado y generado interacciones de gran complejidad creando así importantes relaciones ecológicas entre ellos, el medio que los rodea y sus elementos. Actualmente estas relaciones biogeoquímicas son consideradas esenciales para el funcionamiento de la biosfera en el planeta (Cavicchioli et al., 2019).

De acuerdo con los tratados internacionales de Derecho de Mar, México junto con EE. UU y Cuba son responsables de preservar y estudiar los recursos naturales tanto en aguas como en el subsuelo del GoM. A lo largo de su historia México ha delimitado al GoM y su zona de explotación, esta se puede explotar hasta una distancia de 200 millas náuticas (mn) desde la línea base de mar territorial, aunque debido a la extensión de la plataforma continental del GoM se puede extender hasta un máximo de 350 mn. También el país cuenta con dos zonas de explotación más allá de las 200 mn ambas compartidas

con otros países, el Polígono Occidental (México – EE. UU) y el Polígono Oriental (México – EE. UU - Cuba) (Figura 2).

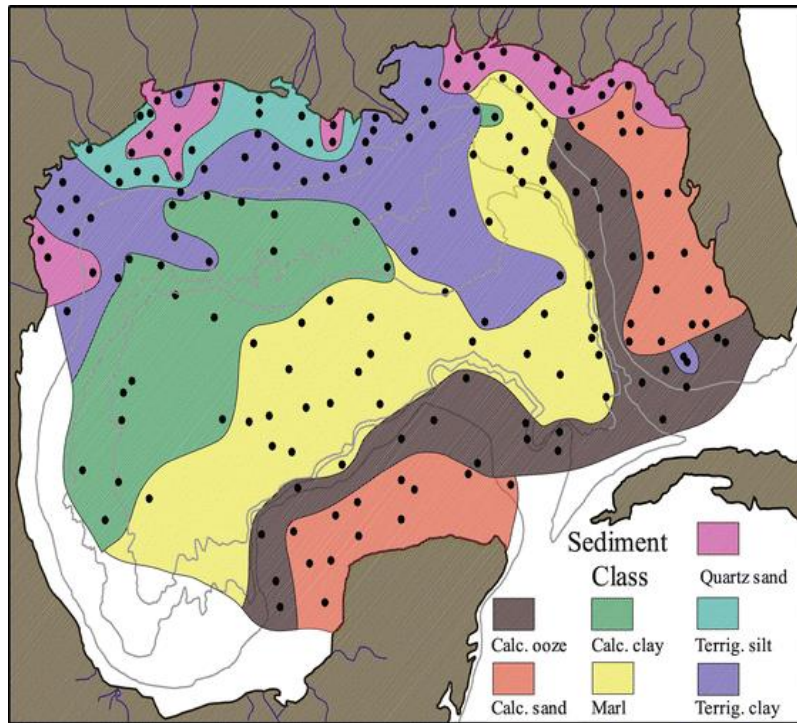


Figura 1. Distribución de las clases primarias de sedimento y puntos de muestreo en el GoM (puntos negros). Tomado de (Balsam & Beeson, 2003).

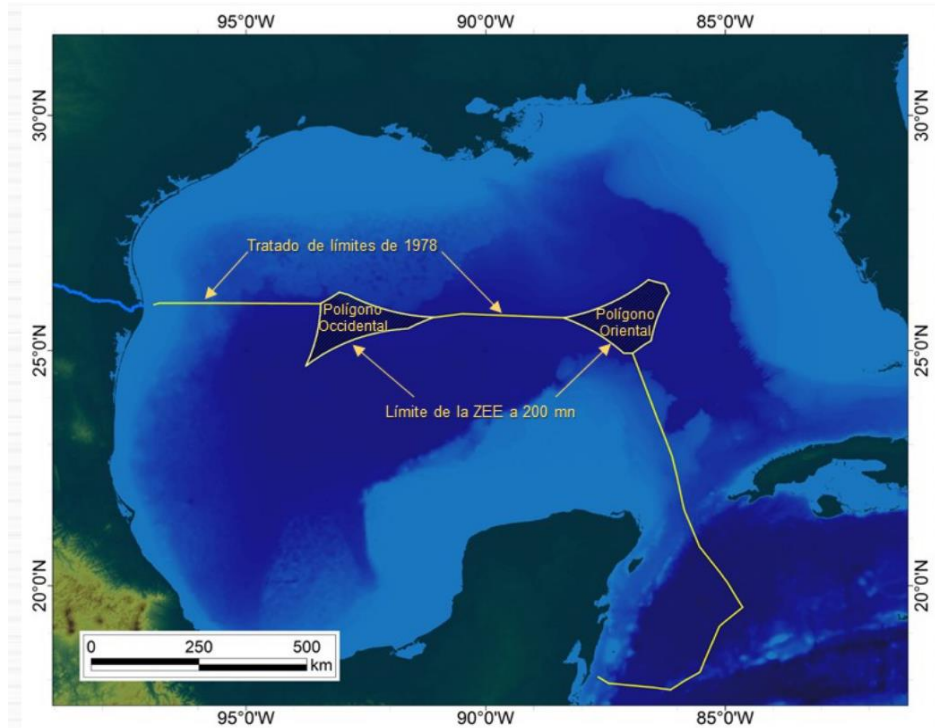


Figura 2. Delimitación territorial del GoM y polígonos de explotación junto con otros países.

Es dentro de esta gran demarcación (considerada por el gobierno del país como una Zona Económica Especial o ZEE) (Figura.2) donde se estima que se encuentran alrededor del 80% de las reservas de petróleo del país y donde la pesca, el comercio marítimo y la industria petrolera son de alta importancia para la economía del país.

Geográficamente el GoM se clasifica como una cuenca oceánica con una superficie de alrededor de 1.6 millones de km². Su formación comenzó desde hace unos 180 millones de años, esta cuenca se generó gracias al estiramiento de la corteza continental como proceso de expansión del fondo marino (Hine, Dunn & Locker, 2014). En su formación, el GoM ha sufrido varios eventos de evaporación e inundación intermitente generando zonas de depósitos salinos y metales, también ha tenido una deposición constante de sedimentos provenientes del continente por eventos de erosión y transporte por ríos. Estas condiciones han hecho que el GoM posea diversas clases y tipos de sedimento (Figura1). El GoM es reconocido por tener una concentración considerable de hidrocarburos principalmente provenientes de fuentes naturales de filtrado de gases e hidrocarburos y en segundo lugar por eventos de contaminación antropogénica (McDonald et al., 2015; Woods, García-Pineda & McDonald, 2016).

Las características geoquímicas del GoM, la cantidad de recursos naturales que alberga, la importancia socioeconómica para el país y la falta de información sobre los microorganismos del fondo marino hacen que el estudio de los sedimentos marinos sea

de alta importancia para poder determinar qué organismos habitan en esos ecosistemas, conocer su potencial metabólico y elucidar sus relaciones ecológicas entre ellos y con el ambiente.

Estudio de las comunidades microbianas de los sedimentos del fondo marino

El estudio de este tipo de ambientes presenta grandes dificultades debido a su naturaleza y características. Hasta hace algunos años, su estudio se realizaba tradicionalmente mediante el aislamiento de bacterias en cultivos de muestras ambientales y no fue hasta 1995 que se comenzaron a generar pruebas exhaustivas de la comunidad en sedimentos mediante el conteo de células, caracterizaciones de aislamientos bacterianos subsuperficiales, perfiles geoquímicos agua de poro (agua atrapada entre los sedimentos) y mediciones de tasas de procesos microbianos (Davis, 2017).

La dificultad de estas metodologías ha impulsado diferentes estrategias para estudiar a estos microorganismos de manera independiente de cultivos, dentro de estas nuevas metodologías la más utilizada es la metagenómica. Con la obtención del DNA ambiental de las muestras que se quiera estudiar se puede elegir entre dos procesos, la amplificación de genes marcadores mediante PCR (amplicones) para después secuenciar o la fragmentación de todo el DNA de la muestra para luego secuenciar todo ese material. (Morgan & Huttenhower, 2012).

La secuenciación de amplicones se ha empleado para identificar la composición de las comunidades de microorganismos y generalmente se usa el gen marcador 16s rRNA (que codifica para la subunidad menor del rRNA) el cual está presente en todos los organismos y en su secuencia posee regiones altamente conservadas, así como nueve regiones hipervariables (V1-V9); que en combinación permiten realizar una asignación taxonómica contra bases de datos que actualmente resulta muy confiable (Yarza et al., 2014).

En el caso de la secuenciación “shotgun” secuencian todo el DNA de la muestra incluyendo procariontes, eucariontes y virus. Al no depender de solo un gen marcador este método permite obtener más información, como qué genes posee la comunidad y también ofrece la posibilidad de ensamblar genomas completos de ciertos taxones o incluso especies.

La metagenómica ha aportado una gran cantidad de información a la ecología microbiana generando una comprensión de la ecofisiología de organismos que aún han sido cultivados (Narihiro & Kamagata, 2017). Actualmente se han reestructurado las relaciones filogenéticas de todos los organismos usando esta información que

previamente no se tenía, infiriendo una versión más expandida del árbol de la vida resaltando la importancia de los organismos que carecen de representantes aislados (Hug et al., 2016).

Comparación de comunidades microbianas de sedimentos de diversos ambientes

El mar presenta una diversa gama de hábitats cada uno con diferentes factores que hacen que la composición de la comunidad varíe de un ambiente a otro (Walsh et al., 2015, Hamdan et al., 2013), aunque en contraste se ha reportado que estas comunidades pueden ser relativamente consistentes en ambientes marinos similares aun separados por largas distancias (Vigneron et al., 2017, Godoy-Lozano et al., 2018).

Actualmente no solo es suficiente con secuenciar el DNA y realizar su asignación taxonómica, también es necesario obtener información sobre las propiedades del ambiente que tienen influencia para que ciertos microorganismos se desarrollen. Por ejemplo, las masas de agua con diferentes propiedades como la salinidad, temperatura y densidad presentan distintas comunidades (Hamdan et al., 2013). De igual manera, los ambientes sedimentarios pueden tener características diferentes y por lo tanto comunidades distintas (Walsh et al., 2015, Vigneron et al., 2017, Inagaki et al., 2006).

La profundidad, presencia y concentración de oxígeno, temperatura, concentración de aceptores de electrones (sulfatos, nitratos, y metales oxidados), el acceso a fuentes de energía y materia orgánica son factores que determinan qué población de microorganismos puede crecer y mantenerse activa en ese ambiente. Estas mismas condiciones han hecho que los microorganismos asociados estén especializados en lidiar contra estas limitaciones energéticas y metabólicas. Otra condición que produce variación en las comunidades asociadas al sedimento es su posición geográfica, por ejemplo, si estas se encuentran cerca de una fuente de metano o hidrocarburos (por una emanación natural o por contaminación) o dependen de la materia orgánica que cae de la columna de agua. Las ventilas submarinas o fuentes hidrotermales son centros naturales de gran circulación de hidrocarburos en el fondo marino. Estas emanaciones estimulan a la población de microorganismos capaces de utilizar el carbono producido en las profundidades marinas promoviendo el crecimiento de ciertos taxones (Vigneron et al., 2017, Joye, 2020).

La distribución de las comunidades sucede en gran medida debido a la posición geográfica en donde se encuentran (distribución horizontal), pero también es importante considerar la profundidad a la que se encuentran estas poblaciones. Proyectos como el de "Tara Ocean Foundation" han sido de los primeros estudios en tomar en cuenta esta distribución vertical en las comunidades de la columna de agua (Sunagawa et al., 2015).

En el fondo marino igual que en el suelo los sedimentos se acumulan unos sobre otros, en capas. Este proceso natural de deposición de los sedimentos va enterrando gradualmente el lecho marino y con el tiempo esto puede aislar a los microorganismos durante cientos o millones de años separando a las poblaciones y estratificando a las comunidades a lo largo de la columna de sedimento (Petro et al., 2019). Además, conforme aumenta la profundidad en la columna del sedimento, disminuye la disponibilidad y concentración de materia orgánica lo que genera mayores limitantes metabólicas y energéticas. Y sin embargo aún con estas limitantes se reconoce que estos hábitats extremos poseen una gran diversidad (Jørgensen & Marshall, 2016, Petro et al., 2019) e incluso se han reportado comunidades hasta 2.5 km bajo el subsuelo marino (Inagaki et al., 2015). Este aislamiento ha producido que los microorganismos que habitan estos sedimentos se hayan adaptado optimizando el consumo de energía a través del mantenimiento, reparación y lentas tasas de replicación (Jørgensen & Marshall, 2016).

Taxones representativos del sedimento marino

Actualmente se han podido caracterizar diversas poblaciones de microorganismos en el sedimento marino, tanto en sitios con y sin hidrocarburos. Se reconoce que existe un microbioma común en los primeros centímetros del fondo marino, este corresponde a los phyla *Proteobacteria*, *Chloroflexi*, *Planctomycetes* y *Bacteroidetes* en su mayoría (Carr et al., 2015, Parkes et al., 2014, Petro et al., 2019). En el caso de las arqueas los phyla dominantes corresponden a *Euryarchaeota*, *Crenarchaeota* y *Thaumarchaeota* (Carr et al., 2015, Vigneron et al., 2017, Petro et al., 2019).

Se ha observado que los primeros centímetros del sedimento, de 8 a 10 cm aproximadamente poseen una diversidad similar sin cambio aparente (Jørgensen & Marshall, 2016, Petro et al., 2019). Aún no se comprende del todo el proceso que mantiene este fenómeno, pero se sugiere que es gracias a un fenómeno conocido como bioturbación. A medida que los organismos del océano mueren, caen por la columna de agua y se van descomponiendo hasta llegar al fondo marino como finas partículas de materia orgánica y sedimentos arrastrados de los continentes, generando así una fuente de nutrientes (conocido como "marine snow") que se va depositando en el lecho marino. La bioturbación es un proceso que altera a los suelos y sedimentos provocado por la acción de los seres vivos. Actividades que produzcan el recambio del sedimento y por ende su mezcla son consideradas bioturbación, por ejemplo, la elaboración de madrigueras, enterramiento y defecación en sedimentos. Todo este proceso altera la deposición natural del sedimento en el fondo y se cree que es la razón por la que los primeros centímetros del sedimento marino poseen una comunidad de microorganismos

similar al regenerarse las fuentes de energía y carbono disponibles. (Petro et al., 2019 y Jørgensen & Marshall, 2016, Danovaro, Snelgrove & Tyler, 2014)

Cuando la zona de bioturbación termina y aumentan las limitaciones energéticas se da un cambio en la diversidad y taxonomía del sedimento. Es en esta zona donde los aceptores de electrones juegan un papel importante. Se ha observado que las concentraciones de Fe y Mn coinciden con la presencia de grupos de metanótrofos de arqueas ANME-2A y bacterias *Desulfomonadales* cuando estas aumentan donde hay emanaciones de metano (Tzu-Hsuan, et al., 2017). En la zona más activa de una emanación se ha reportado dominancia en la comunidad por *Bathymarchaeia*, *Atribacteria* y *Chloroflexi*, mientras que conforme aumenta la distancia a esta y la poblaciones cambian por arqueas metanotróficas anaeróbicas (ANME), *Desulfobacterales*, y *Beggiatoaceae* (Ruff et al., 2018). Esto se debe a que las concentraciones de metano, sulfato, amonio y sulfuro cambian promoviendo la población de organismos capaces de metabolizar a estos compuestos.

El que estas poblaciones dominen en estos sitios se debe a las interacciones entre los diferentes microorganismos, generando relaciones sintróficas entre sus metabolismos, como el proveer a los oxidadores de materia orgánica e hidrocarburos compuestos aceptores de electrones, donde los electrones se transfieren entre microorganismos aprovechándose por ambas partes para completar sus actividades metabólicas (Timmers et al., 2017, In't Zandt et al., 2018, Kuypers et al., 2018 y Jørgensen et al., 2019), , tal es el caso de las *Deltaproteobacterias* y las ANME (McGlynn, 2017) por ejemplo.

Aunque las áreas sin filtración representan la gran mayoría de todos los sedimentos marinos, siguen siendo relativamente poco investigadas en comparación con los sedimentos que tienen alguna filtración de hidrocarburos. En el GoM estas zonas sin presencia de hidrocarburos han presentado taxones correspondientes a *Gammaproteobacterias*, *Alphaproteobacterias*, *Planctomycetes* y *Thaumarchaeota* con un metabolismo involucrado en la degradación de varios glucanos, compuestos clorados y sulfonados (Vigneron et al., 2017) lo que revela que estos microorganismos viven de degradar materia orgánica detrítica y en descomposición que cae de la columna de agua (marine snow).

Metabolismos relevantes en el sedimento marino

Los metabolismos observados en el sedimento marino parecen haber sido favorecidos por las complicaciones energéticas presentes y la presencia de ambientes extremófilos. Esta situación ha causado que los microorganismos que son capaces de formen complejas redes de interacción dando paso a la reducción y oxidación de diversos

compuestos orgánicos e inorgánicos, generando diversos metabolitos y degradando diversas fuentes de carbono. Estas redes son de vital importancia para el mantenimiento de los diversos ciclos biogeoquímicos. Recientemente se ha descubierto que tanto el ciclado de carbono, el azufre y el nitrógeno están relacionados entre ellos (In't Zandt et al., 2018, Kuypers et al., 2018, Jørgensen et al., 2019). Esto sucede en su mayoría por tres procesos: la oxidación anaeróbica del metano (AOM) llevado a cabo por arqueas de los grupos ANME (Timmers et al., 2017), la oxidación anaerobia del amonio (Anammox) realizada por nuevos taxones pertenecientes a *Nitrosomonas* y *Planctomycetes* (In't Zandt et al., 2018), y la sulfato reducción en su mayoría llevada a cabo por *Deltaproteobacterias* y algunas arqueas *Thaumarchaeota* y *Euryarchaeota* (Jørgensen et al., 2019). Los dos primeros procesos requieren de aceptores de electrones y el sulfato es el aceptor más común de los metabolismos anaerobios, si los microorganismos oxidantes no son capaces de reducir el sulfato, generan relaciones sintróficas con los sulfatoredutores y en algunos casos con organismos nitrato reductores.

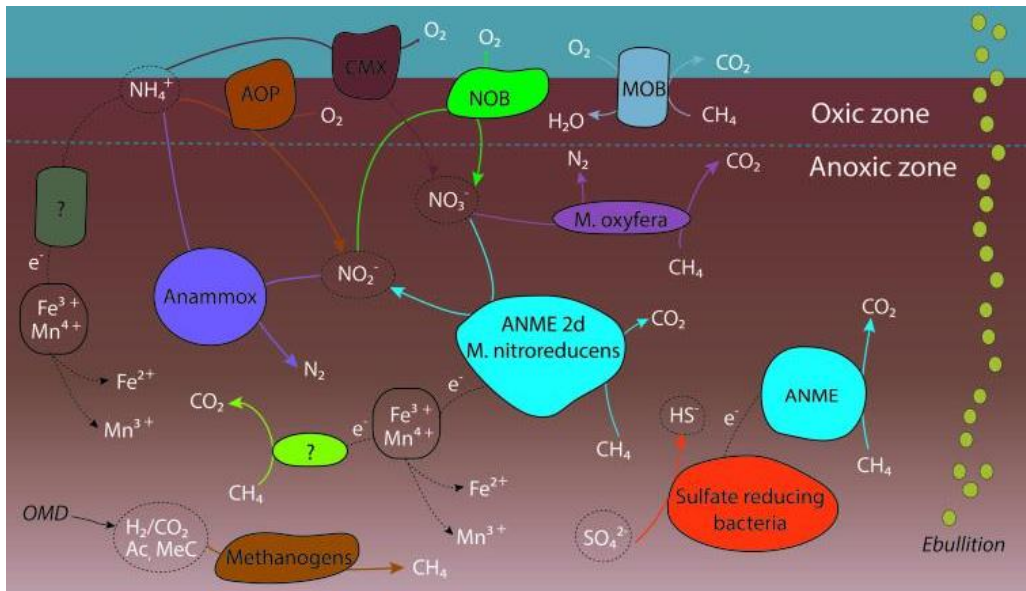


Figura 3. Modelo general de la diversidad microbiana y posibles interacciones en los sedimentos marinos. AOP: procariontes oxidantes de amonio, NOB: bacterias oxidantes de nitrito, MOB: bacterias oxidantes de metano, ANME: metanótrofo anaeróbico, CMX: bacterias commamox, OMD: degradación de materia orgánica. Tomado de In't Zandt et al., 2018

Para mantener estos metabolismos estables es necesario que también existan poblaciones que produzcan estos sustratos, arqueas metanogénicas y bacterias capaces de producir sulfato y nitrato, por lo que estos metabolismos y ciclos biogeoquímicos (ciclos del azufre, nitrógeno y carbono) también son de interés para entender la dinámica de la comunidad.

La cantidad de ventilas y sitios de filtrado de hidrocarburos que el GoM posee (McDonald et al., 2015), hacen inferir que existe un potencial metabólico para la degradación de hidrocarburos en el sedimento. En los sedimentos, las comunidades microbianas dependen en gran medida de alcano-monooxigenasas para degradar los compuestos alifáticos y aromáticos (Joye & Kostka, 2020), los compuestos más elaborados como los policíclicos se mantienen por más tiempo y se acumulan en el sedimento. Debido a que el ambiente posee muy poco oxígeno la degradación de hidrocarburos es en su mayoría anaerobia acoplando el metabolismo con el consumo de un aceptor de electrones como los que se han mencionado antes. Las *Deltaproteobacterias* son de particular interés porque pueden metabolizar anaeróbicamente una amplia variedad de alcanos alifáticos, así como hidrocarburos aromáticos mono y policíclicos (Davidova et al., 2018), y parecen abundar en sitios donde hay hidrocarburos complejos (Vigneron et al., 2018).

Antecedentes

Se ha generado una gran cantidad de información sobre los microorganismos del océano y sus sedimentos, en el GoM eventos como el derrame de petróleo de la plataforma Deepwater Horizon (DWH) en abril de 2010 impulsaron la investigación de esta tema y se ha podido identificar y caracterizar especies que habitan en el mar y el sedimento, así como genes, enzimas y vías metabólicas de interés, en especial sobre la degradación de hidrocarburos (Joye & Kostka, 2020). Sin embargo, la gran mayoría de estos estudios se han llevado a cabo en la zona noreste del GoM (perteneciente a EE. UU) dejando poca información sobre la zona noroeste y suroeste que pertenece a México y la mayoría de estos estudios se han enfocado en sitios donde hay filtrado de hidrocarburos y/o ventilas submarinas. Debido a la falta de información surgen varias preguntas sobre las comunidades de microorganismos en la zona de GoM que le pertenece a México.

Suroeste del Golfo de México

El primer reporte de la taxonomía asociada al sedimento de GoM en territorio mexicano y un antecedente directo de la diversidad de las comunidades del sur del GoM fue realizado por Godoy-Lozano et al., 2018. Donde en abril del 2017 se muestrearon 56 sitios distribuidos en un área de 142,593 km², con profundidades desde 183 a 3740 m en el sur del GoM (Figura4). También se midieron parámetros abióticos, concentraciones de hidrocarburos alifáticos y aromáticos, así como la concentración de 13 metales y materia orgánica en el sedimento. La comunidad asociada al sedimento fue dominada en su mayoría por taxones asociados a *Gammaproteobacteria*, *Deltaproteobacteria*, y

Alphaproteobacteria. Los sitios presentaron una gran cantidad de diferentes microorganismos asociados al sedimento.

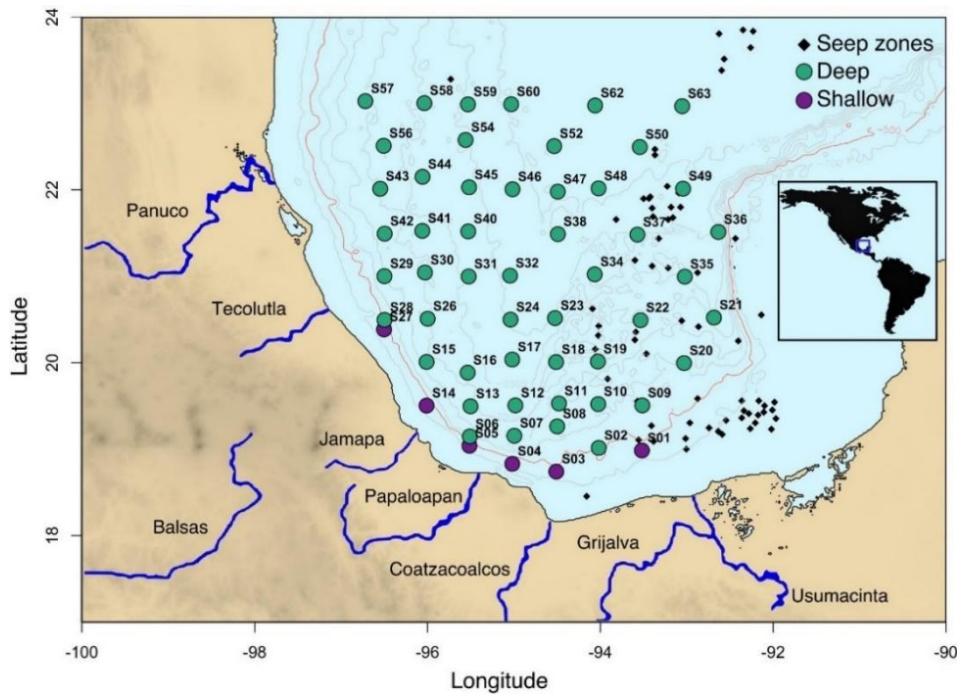


Figura 4. Estaciones de muestreo de E. Godoy-Lozano et al., 2018. Los sedimentos de profundidades inferiores a 500 m se muestran en color púrpura, los rombos negros representan emanaciones de hidrocarburos y la línea roja indica 500 m de profundidad. (Tomado de E. Godoy-Lozano et al., 2018).

La taxonomía asociada fue comparada contra otros sedimentos marinos recolectados de otros océanos del mundo Ártico Norte, Pacífico Sur, Atlántico Sur y Antártico Sur, así como muestras del derrame DWH. Se encontró que el GoM comparte con estos sitios 52 géneros de 1319, pertenecientes a *Deltaproteobacteria*, y *Gammaproteobacteria*. Se observó que las variables abióticas que tuvieron mayor impacto en la comunidad fueron la profundidad de la muestra y la concentración de hidrocarburos aromáticos. En las muestras poco profundas (<500 m) se encontró una mayor concentración de hidrocarburos aromáticos que en las muestras profundas. Además, las zonas costeras de la región suroeste del GoM tienen un efluente constante de contaminantes provenientes de los ríos Tonalá, Coatzacoalcos, Papaloapan, Grijalva y Usumacinta, los cuales se encuentran contaminados a causa del establecimiento de plantas petroquímicas (Gracia et al., 2005; Ponce-Vélez, 2005 y E. Godoy-Lozano et al., 2018). La contaminación proveniente de los ríos y la zona suroeste del GoM que posee una buena cantidad de ventilas submarinas ayudan a explicar el porqué de la variación de las muestras profundas a las no profundas y lo más importante de este trabajo fue el generar el primer reporte de la población de bacterias asociadas al sedimento del GoM

en territorio mexicano. También en este grupo de muestras se encontraron 14 géneros degradadores de hidrocarburos: *Prolixibacter*, *Microcoleus*, *Tropicimonas*, *Dethiosulfatibacter*, *Cellulosimicrobium*, *Ahrensia*, *Thermococcus*, *Roseobacter*, *Desulfuromusa*, *Oceanicola* y *Salinivibrio*. (E. Godoy-Lozano et al., 2018), resaltando el potencial degradador de hidrocarburos de las comunidades del sedimento marino.

Noroeste del Golfo de México

En el noroeste del GoM en la plataforma interior del talud continental existe una zona entre los límites de EE. UU con México conocida como el Cinturón Plegado de Perdido comúnmente conocida como Perdido. Se reconoce como una región con depósitos de petróleo y también se ha determinado como un sitio susceptible a perturbación ambiental por contaminación (Soto & Vázquez-Botello, 2013). Estas características hacen a la zona de Perdido un sitio de interés para el estudio de las comunidades asociadas al sedimento. Actualmente se han generado dos reportes sobre las comunidades en la zona norte del GoM, el trabajo de (Sánchez-Soto Jiménez et al., 2018). En este trabajo se muestrearon 11 sitios de la zona de Perdido, con un gradiente de profundidad de 20 a 3700 m (Figura5). Las muestras fueron recolectadas en abril de 2014, estas se separaron en 5 muestras poco profundas (menos de 600 m) y muestras profundas (de 2800 a 3700 m). Como variables fisicoquímicas se midió la concentración total de azufre, el potencial redox, materia orgánica total y el carbono orgánico total. También se estimó el tipo de sedimento midiendo la cantidad de arena, cal y arcilla.

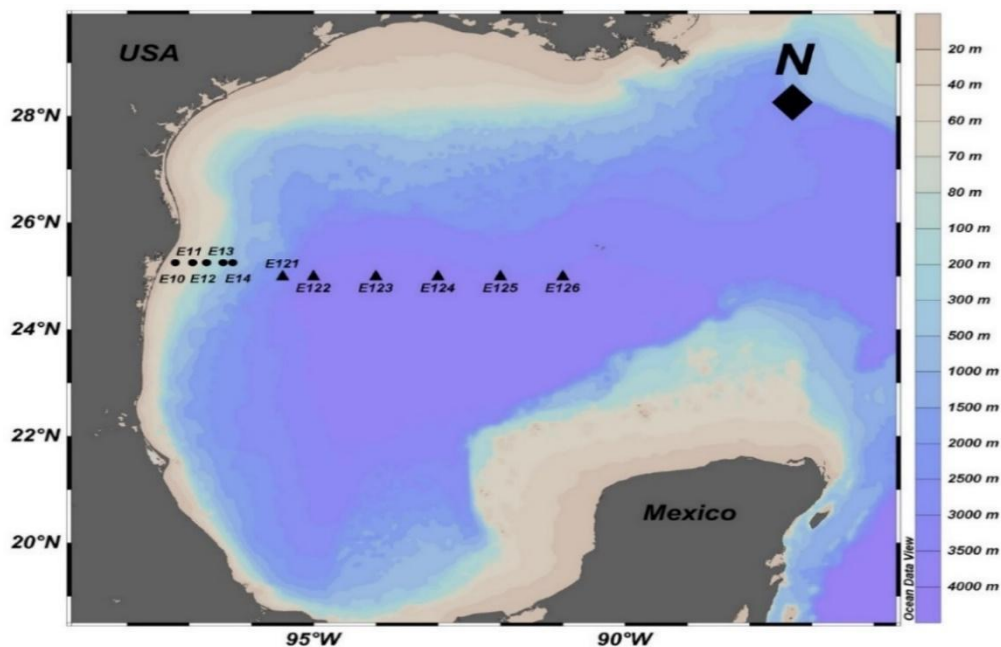


Figura 5. Localización de los sitios de muestreo en el noroeste del GoM por Sánchez-Soto Jiménez et al., 2018. Los círculos representan sitios poco profundos y los triángulos sitios profundos de la llanura abisal (Tomado de Sánchez-Soto Jiménez et al., 2018).

Los resultados de este trabajo indican que existe una gran diferencia en la diversidad entre las muestras poco profundas y las profundas. Los índices de diversidad en ambos grupos de muestras son altos, siendo las poco profundas las más diversas con valores de 9.6 para el índice de Shannon y 7.74 en las muestras profundas. La comunidad microbiana de estas muestras está representada por 25 phyla con una dominancia de las proteobacterias y las clases *Gammaproteobacteria*, *Alphaproteobacteria* y *Deltaproteobacteria* seguido de *Bacteroidetes*, *Acidobacterias*, *Chloroflexi*, *Nitrospirae*, *Planctomycetes*, *Gemmatimonadetes*. También se detectaron dos phylas de arquea, correspondientes a *Euryarchaeota* (clase *Thermoplasmata*) y *Crenarchaeota*. Interesantemente este trabajo es el primero en reportar en territorio marino perteneciente a México al recientemente descubierto phylum *Rokubacteria*, de bacterias desnitrificantes capaces de realizar la oxidación anaeróbica del metano (He et al., 2016). En las muestras poco profundas abundan los taxones de *Delta*, *Alpha* y *Gammaproteobacterias* a diferencia de las profundas donde la gran mayoría de la comunidad está dominada por *Gamma* y *Alphaproteobacterias* seguido de *Bacteroidetes* y *Nitrospirae* indicando que la diversidad es afectada por el aumento de la profundidad

Existe otro reporte de la taxonomía asociada al sedimento de la zona noroeste del GoM, llevado a cabo por Ramírez et al., 2020. Se recolectaron cuatro muestras de sedimento a lo largo de la plataforma continental en noviembre de 2012, y se midió la temperatura,

salinidad, oxígeno disuelto y la concentración de metales pesados (Al, Mg, Fe, Co, Ni, Cr y V). Dos muestras corresponden a la plataforma interior y dos al talud continental del GoM (Figura6). De igual manera que lo reportado por Sánchez-Soto Jiménez et al., 2018 en los sitios poco profundos (49 a 52 m) se encontraron más phyla, que en los profundos (511 a 2181 m). Más de la mitad de la población se estuvo dominada por el phylum *Proteobacteria* (en su mayoría las clases de *Gamma*, *Delta* y *Alphaproteobacteria*), seguido de *Bacteroidetes*, *Acidobacteria*. En las muestras profundas la abundancia de *Deltaproteobacterias* disminuyó aumentando la presencia de *Gamma* y *Alphaproteobacterias*, en la muestra B9 más del 80 % de la población se encontró dominada por *Shewanella* perteneciente a *Gammaproteobacteria*.

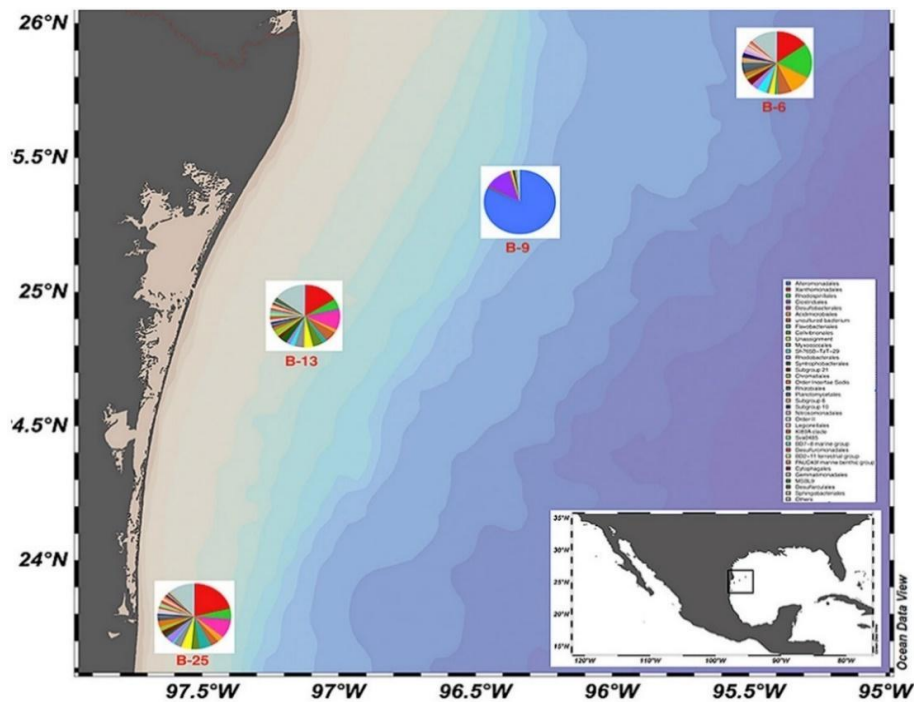


Figura 6. Sitios de muestreo sobre la plataforma continental del GoM B-13 y B-25 corresponden a sitios de la plataforma continental interior. B-6 y B-9 corresponden a sitios de pendiente continental. Tomado de Ramírez et al., 2020

Adicionalmente en este trabajo se buscó la presencia de bacterias con potencial degradador de hidrocarburos (de acuerdo con lo reportado en la literatura) encontrando 71 géneros con capacidad de degradación de hidrocarburos en estos sedimentos. La abundancia de estos géneros también se encuentra influenciada por las condiciones del sedimento, principalmente por la profundidad, lo que indica que existe un potencial degradador de hidrocarburos en una gran zona del GoM y que las poblaciones han estado en constante contacto con hidrocarburos (de forma natural o por contaminación)

de modo que siempre exista un grupo de organismos con capacidades degradadoras de hidrocarburos en el sedimento.

La diferencia entre estas poblaciones da una idea de que la dinámica en el sedimento está altamente influenciada por la distancia a la costa debido a los contaminantes y otras partículas a las que están expuestos los sedimentos y principalmente por la profundidad donde la materia orgánica y las limitaciones energéticas juegan un gran papel.

Las comunidades de microorganismos del GoM en territorio mexicano se conocían poco. Sin embargo, actualmente existen varios trabajos como los antes mencionados que han sido pioneros en tratar de identificar y entender a las comunidades del sedimento. Con estos trabajos se tiene un marco referencial de que poblaciones existen tanto en la zona noroeste y la suroeste del GoM y qué factores pueden estar influenciando a estas. Todos los trabajos anteriores reportan una gran diversidad en el sedimento y una dominancia del phylum *Proteobacteria* con diferencia entre la abundancia de las clases *Gamma*, *Delta* y *Alphaproteobacteria* dependiendo de la muestra. Las diferencias se dan principalmente por la profundidad, pero no se observan asociadas a la zona geográfica entre la zona de Perdido y la zona suroeste, lo que podría indicar las poblaciones de microorganismos en las comunidades del sedimento pueden ser un ubicuas mientras no exista perturbación por alguna fuente externa de contaminación o haya grandes diferencias en la profundidad.

Aun con este marco de referencia generado por dichos trabajos, existen incógnitas que no se han respondido sobre las comunidades asociadas al sedimento. La taxonomía de arqueas ha sido muy poco explorada, principalmente porque las metodologías usando amplicones por 16s RNA ribosomal poseen un sesgo hacia las poblaciones de bacterias (Brooks, et al., 2015). También hace falta información sobre las comunidades y su distribución vertical en el sedimento como la literatura ha aportado recientemente. Igualmente, algo que aún no se ha estudiado a fondo son los metabolismos de interés en GoM, ya que para esto es necesario utilizar más metodologías de la metagenómica, específicamente el análisis por “whole metagenomic shotgun” (WMS).

Objetivos

Objetivo general

Determinar la composición microbiana de arqueas y bacterias de sedimentos de dos zonas del Golfo de México, así como su relación con variables geoquímicas del sedimento marino.

Objetivos particulares

- Identificar y comparar a las comunidades de bacterias y arqueas en diferentes muestras estratificadas de sedimento marino del GoM mediante amplicones de 16s ribosomal.
- Determinar la concentración de algunos aceptores de electrones y metales en las muestras estratificadas de sedimento marino.
- Analizar si las variables geoquímicas tienen un papel en determinar la composición de las comunidades.
- Buscar genes de interés sobre metabolismos relacionados a sulfato, nitrógeno y metano y degradación de hidrocarburos en metagenomas del GoM.

Metodología

Sitio de estudio y muestreo

Gracias a los esfuerzos en el país para el estudio del GoM llevados a cabo por el Consorcio de Investigación del Golfo de México (CIGOM), se han realizado campañas de muestreo para estudiar las comunidades de microorganismos en la columna de agua y el sedimento. En la campaña metagenómica-02 (MET-02) realizada del 24 de mayo al 1 junio de 2017 se muestrearon dos zonas del GoM, la zona de Perdido y la zona Sureste del GoM ("Campeche knolls). De esta campaña el M.C. Emanuel Alvizo Tinoco colectó 12 núcleos de sedimento de las siguientes estaciones A1, A3, A4, B5, B7, N4, C11, C12, C14, D15, D16 y D18 (Figura.7), estaciones que se han estudiado previamente por el CIGOM (Raggi & García-Guevara et al., 2020).

Las muestras fueron obtenidas mediante un nucleador de caja, se usaron tubos de PVC de 30 cm de largo y 7.5 de diámetro. Los tubos fueron almacenados en el barco a -20°C y cuando las muestras llegaron al laboratorio se guardaron 5 días a 4°C.

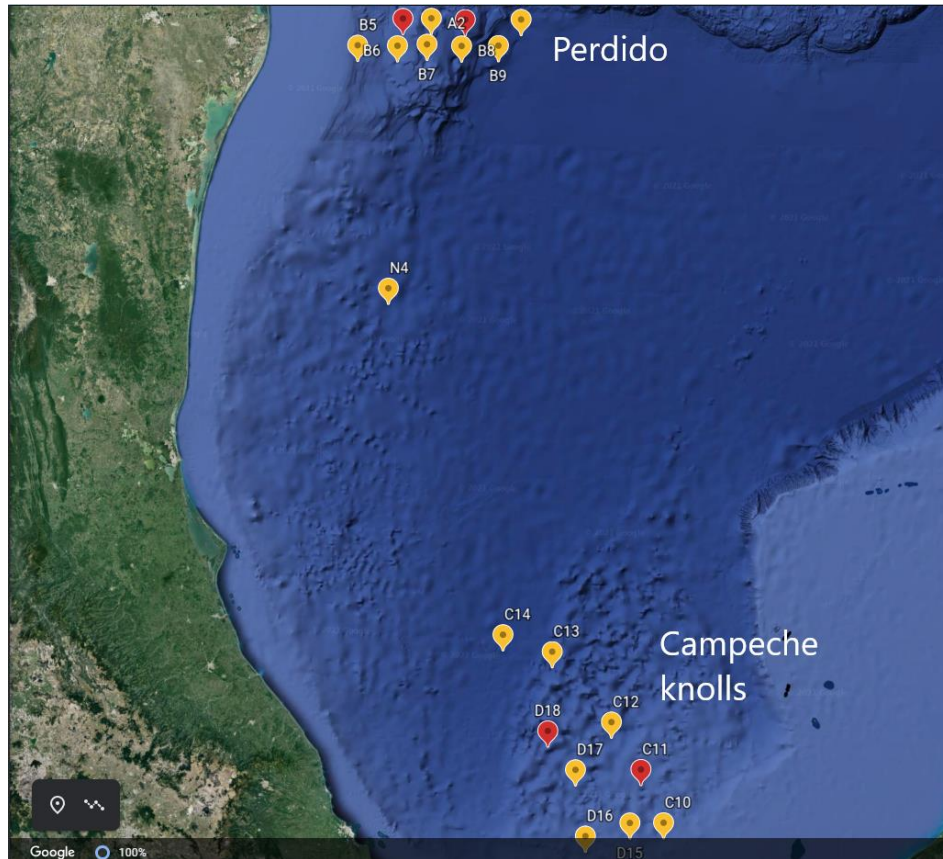


Figura 7. Sitios de colecta de la campaña MET-02. En rojo se marcaron los sitios estudiados en este trabajo.

Los núcleos de sedimento fueron seccionados en estratos cada 2 cm comenzando por la parte inferior, siendo los primeros estratos los más profundos. Los extremos inferiores y superiores de aproximadamente 1 cm fueron desechados en todos los núcleos (Figura 8). Finalmente, se obtuvieron un total de 45 muestras, estos estratos fueron almacenados a -70°C .

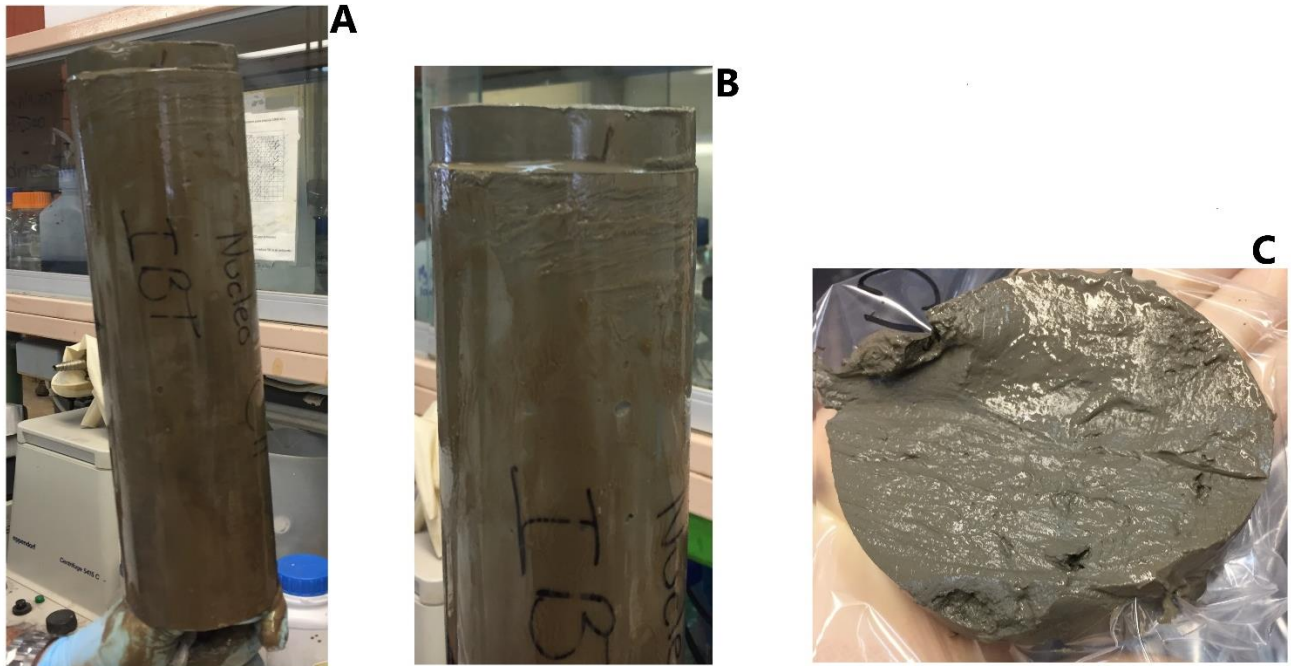


Figura 8. Ejemplo de un núcleo de sedimento y el procesamiento de las muestras. Núcleo completo A), sección de 2 cm B), estado final de las muestras de sedimento C).

De estos 12 núcleos colectados se seleccionaron cuatro para este trabajo, dos ubicados en la zona de Perdido (A1 y A3) y dos en la zona de “Campeche knolls” (D18 y C11), el criterio de selección se basó en que todas las muestras tuvieran más 600 m de profundidad, que fueran núcleos que tuvieron varias secciones o rebanadas y que el sedimento no tuviera mucha agua intersticial (Tabla 1).

Tabla 1. Datos de colecta sobre las cuatro muestras que fueron seleccionadas para el estudio. Se tomaron al momento de la colecta en la campaña MET-02.

Estación	MET-02-A3	MET-02-A3	MET-02-C11	MET-02-D18
Fecha (GMT)	2017-05-25	2017-02-25	2017-05-31	2017-05-31
Longitud	95°50.13'W	95°14.37'W	93°30.398'W	94°20.51'W
Latitud	25°53.7'N	25°53.32'N	19°37.38'N	19°55.91'N
Profundidad (m)	877	1926	857	1281
	10	9	14	12
Estado del sedimento	Acuoso poco estratificado	Arenoso poco estratificado	Estratificado	Estratificado
Agua intersticial	SI	NO	NO	NO
pH	7.45	7.6	7.67	7.87
Redox (mV)	246	261	270	253

De todas las muestras las de la zona de Perdido fueron las más acuosas y menos estratificadas, en cambio a las de “Campeche knolls” presentaron sedimentos mucho menos acuosos y núcleos con varias rebanadas.

Tomando en cuenta los pros y contras del estudio de las comunidades de microorganismos usando el marcador ribosomal 16s (Brooks, et al., 2015), se decidió utilizar dos pares de oligonucleótidos para amplificar diferentes regiones del 16s RNA ribosomal siendo un par específico para bacteria y el otro para arquea.

Los oligonucleótidos utilizados para las regiones V3-V4 del gen 16s están dirigidos para bacterias y fueron previamente utilizados en muestras de sedimento marino (E. Godoy-Lozano, et al., 2018). Para arquea las regiones V1-V2-V3 fueron amplificadas con oligonucleótidos previamente usados en sedimentos del GoM (Vigneron, et al., 2017). De esta manera se obtuvo tanto información de bacterias como de arqueas para cada muestra utilizada

Extracción y purificación de DNA de sedimento marino.

El DNA de las muestras seleccionadas fue extraído utilizando 0.5 a 0.7 g de sedimento. Se utilizó el *kit Power soil® DNA Isolation Kit - Mo Bio de QIAGEN*. Siguiendo el protocolo de este con ciertas modificaciones, una fue la centrifugación de la muestra a 10,000 G por 30 s antes de comenzar la lisis para poder retirar el agua del sedimento. La segunda modificación fue que el DNA se eluyó en agua Mili Q (50 µl) y no en la solución del kit. Por último, la muestra se cuantificó en *Nanodrop 2000C* de Thermo Fisher Scientific®

Amplificación de regiones hipervariables del gen 16s ribosomal

Usando el DNA que se obtuvo de los sedimentos se amplificaron las regiones hipervariables V3-V4 del gen rDNA 16S y las regiones V1-V2-V3 para la diversidad de arqueas. Los fragmentos fueron amplificados mediante PCR (Polymerase Chain Reaction).

Las reacciones de PCR se prepararon en un volumen final de 25 µl, utilizando µL 10 de la mezcla *Thermo Scientific Phusion Flash (Phusion Flash High-Fidelity PCR Master Mix)*, 1 µL de DNA, 1 µL por cada oligonucleótido *forward* y *reverse* ambos a una concentración de 10 µM (Tabla 2) y 12 µL de agua.

Tabla 2. Oligonucleótidos utilizados para la amplificación de regiones hipervariables del gen rDNA 16s.

Oligonucleótido	Blanco	Secuencia
<i>S-D-Bact-0341-b-S-17 (Forward)</i>	V3-V4	5'-CCT-ACG-GGN-GGC-WGC-AG-3'
<i>S-D-Bact-0785-a-A-21 (Reverse)</i>	V3-V4	5'-GAC-TAC-HVG-GGT-ATC-TAA-TCC-3'
<i>S-D-Arch-0008-b-S-18 (Forward)</i>	V1-V2-V3	5'-TCY-GGT-TGA-TCC-TGS-CGG-3'
<i>S-D-Arch-0519-a-A-19 (Reverse)</i>	V1-V2-V3	5'-GGT-DTT-ACC-GCG-GCK-GCT-G-3'

<i>Los oligonucleótidos fueron fusionados en su región 5' a los siguientes adaptadores "Illumina Overhang".</i>	
<i>Forward-Overhang</i>	5'-TCGTCGGCAGCGTCAGATGTGTATAAGAGACAG
<i>Reverse-Overhang</i>	5'-GTCTCGTGGGCTCGGAGATGTGTATAAGAGACAG

Para las regiones V3-V4 las condiciones de reacción fueron una desnaturalización inicial de 5 min a 95°C, seguido de 30 repeticiones de los ciclos de amplificación (30 seg a 95 °C, 30 seg a 59°C y un min a 72 °C) para terminar una extensión final a 72 °C por 5 min con un fragmento de alrededor de 485 pb. Para las reacciones de las regiones V1-V2-V3 las condiciones fueron las mismas exceptuando la temperatura de alineación que fue de 61 °C y el tamaño del fragmento de alrededor de 530 pb. Todos los productos de PCR fueron verificados por electroforesis en geles de agarosa al 1% teñidos con bromuro de etidio. Un marcador molecular fue utilizado para corroborar el tamaño de los amplicones (Thermo Scientific™ GeneRuler 100 pb DNA Ladder).

Secuenciación masiva de amplicones

Los fragmentos amplificados de 16s rRNA fueron secuenciados en las instalaciones de la Unidad Universitaria de Secuenciación Masiva de DNA en el Instituto de Biotecnología de la UNAM (UUSMB). Los amplicones fueron purificados por la unidad y procesados para generar las librerías necesarias para secuenciar por la plataforma Illumina MiSeq generando unas librerías de 2 x 300 pb.

Procesamiento y análisis de las secuencias

Inicialmente las secuencias fueron procesadas usando el programa *Fast Length Adjustment of Short reads* (FLASH) (Magoc & Salzberg, 2011) para fusionar las lecturas pareadas (*pair-end 2x300*) en una sola de mayor longitud. Las secuencias extendidas se introdujeron al programa *Quantitative Insights Into Microbial Ecology 2* (QIIME2) (Caporaso *et al.*, 2010) donde se realizó un filtrado de calidad en donde se decidió truncar las secuencias de los amplicones V3-V4 a un tamaño de 420 pb.

Para las secuencias de arquea (V1-V2-V3) la calidad de la secuenciación resultó muy baja (por debajo de 20 en el nivel de calidad Phred) por lo que se decidió trabajar con solo el fragmento "*forward*" de la secuenciación pareada ya que era el que mejor calidad poseía y se truncaron las secuencias a 280 pb de longitud.

Posteriormente se realizó un procesamiento de las secuencias resultantes y remoción de quimeras con el programa DADA2 (*Divisive Amplicon Denoising Algorithm*) (Callahan *et al.*, 2016) incorporado en QIIME2 para obtener las "amplicon sequence variants" o ASVs (tipo de OTU que considera la calidad del amplicon para su agrupación). Finalmente, las ASVs fueron asignadas taxonómicamente utilizando un clasificador bayesiano ingenuo entrenado con la base de datos de SILVA 132 (<https://www.arb->

silva.de) (Quast et al., 2012) y los respectivos pares de oligonucleótidos para V3-V4 y V1-V2-V3 (todo dentro del pipeline de QIIME2). Los archivos de salida de QIIME2 se importaron al programa R para realizar los análisis estadísticos y gráficas (Figura 9).

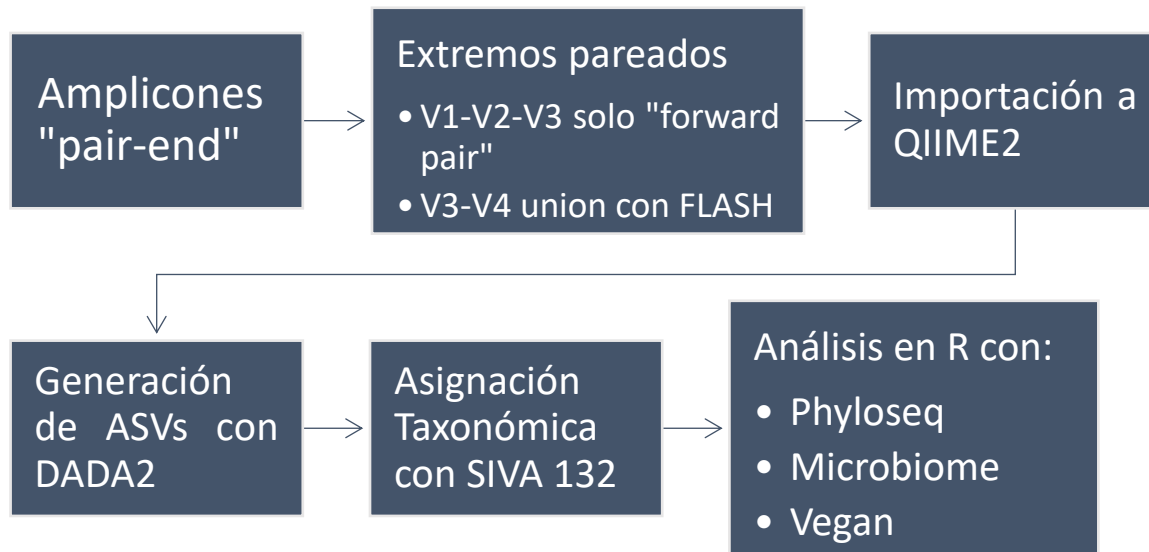


Figura 9. Esquema del procesamiento bioinformático utilizado para las secuencias de 16s ARN ribosomal.

En el primer análisis de las secuencias de las regiones V1-V2-V3 se observó un número de secuencias que no se asignaron a ningún nivel taxonómico 11.62% promedio para Perdido y 6.4% en "Campeche knolls", por lo que se decidió filtrar todas las secuencias que no perteneciera al dominio de arquea, y repetir el conteo de ASVs, el cálculo de índices de diversidad y la asignación taxonómica. Para las secuencias de la regiones V3-V4 se filtró todo lo que correspondiera al dominio de bacteria y de igual manera se realizaron los análisis consiguientes.

Búsqueda de genes de interés metabólico.

Para este objetivo se utilizaron las secuencias de dos metagenomas de sedimento, generados de una colecta realizada por el CIGOM en marzo 2016 a la zona de Perdido y "Campeche knolls" Los secuenciación fue realizada la UUSMB en el Instituto de Biotecnología de la UNAM, mediante la plataforma Illumina NextSeq 500 generando secuencias pareadas de 150 pb.

Se implementó el uso del programa GraftM v0.11.1 (Boyd et al., 2018) por el doctor José Fernando García Guevara. Con este programa se realizaron paquetes de genes de

marcadores y genes de interés metabólico para buscar en las lecturas en crudo de los metagenomas. Se buscaron todos los genes involucrados en la sulfato reducción desasimilatoria (*sat*, *aprA* y *dsrAB* (Meyer & Kuever, 2007), uno exclusivo de la oxidación del sulfato (*soxB*) (Jaffer et al., 2019), genes involucrados en la vía de la metanogénesis y metanotrofia (*mcrA*, *mer*, *fmd*, *ftr*, *mch*, *mtd* y *mtrA*) (Timmers et al., 2017), tres genes involucrados en el ciclo del nitrógeno (*narG* – nitrato reducción, *nifH* y *nifK* - fijación de nitrógeno y *nirK* para la reducción de nitrito) (Kuypers, Marchant & Kartal, 2018) y por último genes asociados a la degradación de hidrocarburos (*bssA*, *aliB* y *alkB*) (Acosta-González, Rosselló-Móra & Marqués, 2013, Kung, Meier, Mergelsberg & Boll, 2014 and Nie et al., 2014).

Los paquetes se construyeron manualmente usando el programa GraftM y usando las secuencias de la base de datos de Uniprot (<https://www.uniprot.org>) (“UniProt: a worldwide hub of protein knowledge”, 2018). Para ciertos genes marcadores se usaron secuencias previamente curadas en su asignación taxonómica: *dsrAB* (Müller et al., 2015), *mcrA* y *mer* (Boyd et al., 2018).

Los resultados de esta búsqueda y análisis se refinaron y utilizaron como parte de la información contenida en la publicación de Raggi & García-Guevara et al., 2020, manteniéndose en este trabajo como participación en otros proyectos.

Todos los programas, bases de datos y paqueterías utilizadas en el análisis de las secuencias y búsqueda de genes marcadores se enlistan en el Anexo 8, así como una breve descripción y sitio URL de descarga.

Cuantificación de parámetros geoquímicos

A las mismas muestras de sedimento a las que se les realizó la secuenciación de amplicones, también se les cuantificó la concentración de diferentes parámetros geoquímicos, como la concentración de metales, algunos aceptores de electrones y el valor de pH.

Determinación de la concentración de metales

Se realizó una extracción ácida en las muestras de sedimento, el producto de esta extracción fue enviado al Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica A.C. (IPICYT) donde se les realizó una determinación de los metales en la muestra usando Espectrofotometría de Emisión Óptica de Plasma Acoplado Inductivamente (ICP-OES) en el Laboratorio Nacional de Biotecnología Agrícola, Médica y Ambiental (LANBAMA).

La metodología para la extracción ácida fue la que el IPICYT recomendó para este tipo de muestras, la cual consistió en lo siguiente:

1. Se pesaron de 3.0 a 3.5 g de muestra húmeda (congeladas a -70°C) y se dejaron secar 2:30 horas a 80°C .
2. Se pesaron de 0.5 a 2 gr de muestra seca y se colocaron en un vaso de precipitado.
3. A las muestras se les agregó de 1 a 3 mL de ácido nítrico (HNO_3) y de 3 a 9 mL de ácido clorhídrico (HCl)
4. Los vasos de precipitado se dejaron en una parrilla caliente hasta semi sequedad, se retiraron de la parrilla y se dejaron enfriar.
5. Las paredes del vaso se lavaron con agua destilada y después se colocaron de 3 a 5 ml de HCl mientras se dejaba hervir a las muestras.
6. Se procedió a filtrar las muestras utilizando un papel filtro Whatman No.40.
7. Finalmente, las muestras se volvieron a hervir, dejaron enfriar y se aforaron a 10 mL con agua destilada anotando el Volumen de aforo.

Todas las muestras se almacenaron en tubos Falcon TM de 15 mL a 4°C .

Cuantificación de aceptores de electrones anaerobios

Para estas mediciones se utilizó el colorímetro DR900 de HACH® y sus respectivos kits (sulfato y nitrato) para cada compuesto de interés utilizando la metodología para cada kit. El equipo DR900 está diseñado para realizar mediciones en muestras de agua y al tratarse de muestras sólidas de sedimento marino se optó por el siguiente tratamiento para las muestras. Para cada muestra se pesó entre 1.0 y 1.5 g aproximadamente, estas se secaron en horno a 80°C durante 2:30 horas. Después se maceraron con mortero, se tamizaron con un tamiz número 20 (0.0331 pulgadas) y se pesaron para obtener el peso en seco. La muestra en seco se diluyó en una suspensión al 0.1 o 10% para cada muestra, con estas diluciones fue con las que se trabajó para medir los compuestos de interés.

Para corroborar que las muestras no poseían interferencia al momento de tomar la medición se usaron las soluciones estándar de HACH® para los reactivos a medir, con estos se realizó la metodología de adición de estándar reportada en la guía Water Analysis Guide ,2013 de HACH®.

En esta técnica a una muestra previamente medida se le retira cierto volumen, para después agregar el mismo volumen retirado, pero en este caso de la solución estándar y después se vuelve a medir esta muestra con el agregado. Al conocer la concentración

de la muestra medida y de la solución estándar se puede calcular la concentración teórica con la siguiente fórmula:

$$\text{Concentración teórica} = (C_u \times V_u) + (C_s \times V_s) \div V_u + V_s$$

Donde:

C_u = Concentración de la muestra problema

V_u = Volumen de la muestra problema

C_s = Concentración de la muestra con el agregado

V_s = Volumen de la muestra con el agregado

Usando el valor teórico se midió el porcentaje de recuperación dividiendo el valor de la muestra con el agregado sobre el valor teórico multiplicado por 100. Se usó el rango de aceptación reportado en la Water Analysis Guide ,2013 de HACH® y se aceptaron valores entre 90% y 110% para el porcentaje de recuperación.

Mediciones de Sulfato

El método utilizado fue el SulfaVer 4 Method (HACH® Method 10248), en este método los iones sulfato en la muestra reaccionan con el bario del kit de SulfaVer 4 y forman un precipitado de sulfato de bario. La turbidez formada es proporcional a la concentración de sulfato. La medida de longitud de onda usada fue 520 nm en colorímetros DR900.

Para estas mediciones se realizó el protocolo previamente mencionado, sin filtrar la muestra ya que para evitar los sólidos suspendidos se realizaron dos diluciones (1:100 y después 1:10) para disminuir la cantidad de sólidos en suspensión.

Se tomaron inicialmente 3 muestras al azar a las que se les aplicó el protocolo de adición de estándar para corroborar que no hubiera interferencia en las mediciones, una vez encontrado que no hubo interferencia después de las dos diluciones realizadas a la muestra se prosiguió con esta metodología para el resto de las muestras. Todas las mediciones fueron realizadas en un volumen de 10 mL y se llevaron a cabo por duplicado.

Mediciones de Nitrato

El método utilizado fue la reducción por cadmio (HACH® Method 8039), ya que el cadmio reduce el nitrato en la muestra a nitrito. El ion nitrito reacciona con el ácido sulfanílico del kit para formar una sal de diazonio intermedia. La sal se combina con ácido gentísico para formar una solución de color ámbar proporcional a la concentración de nitrato. La longitud de onda usada fue de 520 nm para colorímetros DR900

Esta medición presentó muchas complicaciones para poder eliminar la interferencia de la muestra, por lo que para estas mediciones fue necesario filtrar la suspensión al 10% por unos filtros de 0.22 μm y con el volumen resultante realizar las mediciones. Estas mediciones fueron realizadas en un volumen de 10 ml tomando de 3 a 4 ml de la muestra ya filtrada y aforando a 10 ml, todas las mediciones se realizaron por duplicado.

Determinación de pH del sedimento marino

Para este procedimiento se tomó el protocolo de la Norma Oficial Mexicana NOM-147-SEMARNAT/SSA1-2004 para la medición de pH en suelos. El cual constó de pesar 5 g de sedimento a los cuales se les agregó 10 ml de agua ultrapura. Después se agitó durante 30 minutos y se dejó 1 hr sin mover para permitir sedimentar los sólidos. Finalmente se utilizó un potenciómetro Oakton® PH 150 pHmeter previamente calibrado para medir el pH. Todas las mediciones se realizaron por duplicado.

Resultados

Obtención de DNA de sedimentos marinos

Entre los cuatro núcleos elegidos para este trabajo, se obtuvo un total de 45 muestras de sedimento. El sedimento tiene grandes cantidades de compuestos orgánicos e inorgánicos por lo que es considerado una matriz muy compleja de estudiar. Esto se reflejó en la pureza y las concentraciones extraídas de DNA, donde el rendimiento fue bajo, así como la pureza del DNA. (Tablas 3 y 4.). También se observó una tendencia en la que a mayor profundidad del estrato o rebanada menor cantidad de DNA se obtuvo.

Tabla 3. Resultados de la extracción y purificación de DNA de las de la zona de Perdido, se muestra la profundidad a la que corresponde cada rebanada del núcleo correspondiente.

Muestra	Profundidad	ng/ μL	A260/280	Muestra	Profundidad	ng/ μL	A260/280
A1-1	18-20 cm	4.6	1.53	A3-1	16-18 cm	3.2	1.66
A1-2	16-18 cm	6.4	1.72	A3-2	14-16 cm	5.1	1.48
A1-3	14-16 cm	4.4	1.83	A3-3	12-14 cm	3.8	1.64
A1-4	12-14 cm	4.0	1.79	A3-4	10-12 cm	3.7	1.39
A1-5	10-12 cm	6.0	1.93	A3-5	8-10 cm	3.8	1.71
A1-6	8-10 cm	12.3	1.20	A3-6	6-8 cm	5.5	1.62
A1-7	6-8 cm	8.5	1.50	A3-7	4-6 cm	4.1	1.9
A1-8	4-6 cm	9.4	1.48	A3-8	2-4 cm	5.6	1.79
A1-9	2-4 cm	7.7	1.60	A3-9	0-2 cm	7.5	1.68
A1-10	0-2 cm	12.0	1.63				

Tabla 4. Resultados de la extracción y purificación de DNA de las de la zona de "Campeche knolls", se muestra la profundidad a la que corresponde cada rebanada del núcleo correspondiente.

Muestra	Profundidad	ng/ μ L	A260/280	Muestra	Profundidad	ng/ μ L	A260/280
C11-1	26-28 cm	6.2	1.71	D18-1	22-24 cm	4.4	1.34
C11-2	24-26 cm	6.6	1.62	D18-2	20-22 cm	5.0	1.79
C11-3	22-24 cm	6.4	1.90	D18-3	18-20 cm	6.2	1.65
C11-4	20-22 cm	6.4	1.98	D18-4	16-18 cm	4.5	1.60
C11-5	18-20 cm	7.9	1.43	D18-5	14-16 cm	4.1	1.85
C11-6	16-18 cm	10.1	1.60	D18-6	12-14 cm	5.3	1.74
C11-7	14-16 cm	6.4	1.70	D18-7	10-12 cm	4.6	1.80
C11-8	12-14 cm	7.7	1.58	D18-8	8-10 cm	7.2	1.78
C11-9	10-12 cm	8.8	1.67	D18-9	6-8 cm	4.7	1.97
C11-10	8-10 cm	8.4	1.64	D18-10	4-6 cm	9.7	1.34
C11-11	6-8 cm	12.0	2.00	D18-11	2-4 cm	8.2	1.77
C11-12	4-6 cm	14.0	1.72	D18-12	0-2 cm	7.1	1.81
C11-13	2-4 cm	14.0	2.11				
C11-14	0-2 cm	15.4	1.64				

Aun con la dificultad de la extracción de DNA las regiones V3-V4 del gen 16S RNA ribosomal se lograron amplificar correctamente en todas las muestras (Figura 10.).

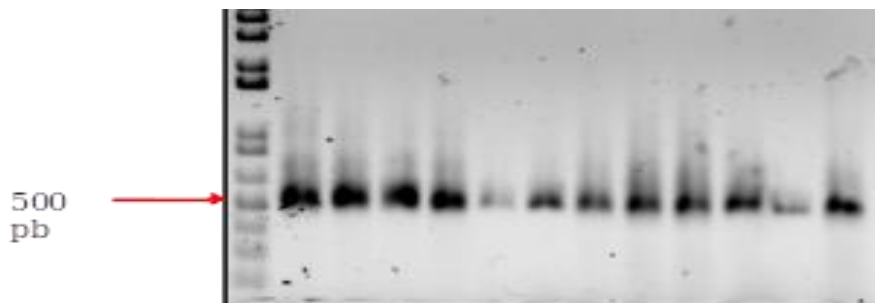


Figura 10 Gel de agarosa con amplicones de las regiones V3-V4 del gen 16s ribosomal. De izquierda a derecha muestras A1-1 hasta A1-20 hasta A1-2, últimas dos A3-18 y A3-16.

Se obtuvo un número considerable de secuencias finales, al menos 20,000 secuencias mínimo por muestra, basándose en lo que la literatura ha reportado sobre muestras similares de sedimentos del GoM (Sánchez-Soto Jiménez et al., 2018 y Godoy-Lozano et al., 2018 y Ramírez et al., 2020). Solo dos muestras tuvieron menos de 20,000 secuencias finales A1-BAC-2 y D18-BAC-10 (Anexo 1.1).

El número de ASVs de bacteria fue alto para todos los núcleos, más de 3500 en promedio, sólo las muestras A1-BAC-2 y A1-BAC-10 presentaron menos de 300 ASVs (Anexo 1.1). En cuanto las arqueas el número de ASVs encontrado fue mucho menor con un promedio de 520, un mínimo de 94 en A1-ARC-6 y una tendencia el aumento de las ASVs conforme la profundidad de la muestra (con un cambio drástico pasando los 6 a 8 cmbs) (Anexo 1.2).

En todas las muestras se obtuvo un rendimiento adecuado en las secuenciación e incluso con las pocas ASVs de arquea las curvas de rarefacción presentaron un aplanamiento de la curva (Anexo 2).

Diversidad y riqueza de las muestras

Los índices de diversidad alfa en la comunidad de bacterias fueron altos, por arriba de 6 para el índice de Shannon y casi uno para el índice de Simpson (Figuras 11 y 12) por lo que la comunidad no solo posee un gran número de diferentes ASVs si no en general no hay una se observó dominancia de alguna ASV en la población. En la mitad de las muestras del núcleo A1 los índices de diversidad fueron bajos en comparación con el resto de las muestras, por debajo de 5 para el índice de Shannon y una dominancia menor que todas las demás muestras. (Figura 11).

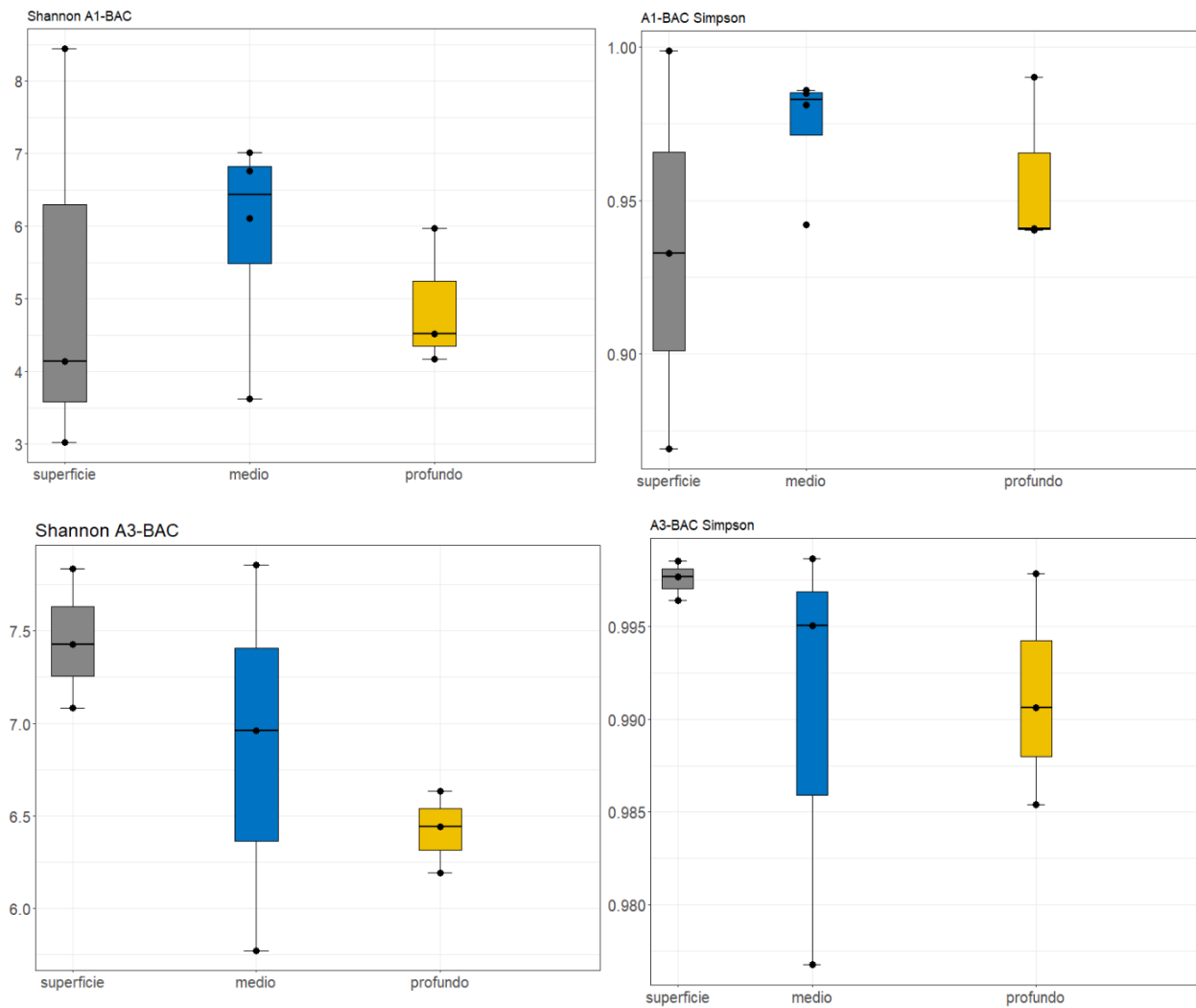


Figura 11. Índices de diversidad alfa de la comunidad de bacteria para los núcleos A1 y A3. Se muestran los índices de Shannon y Simpson

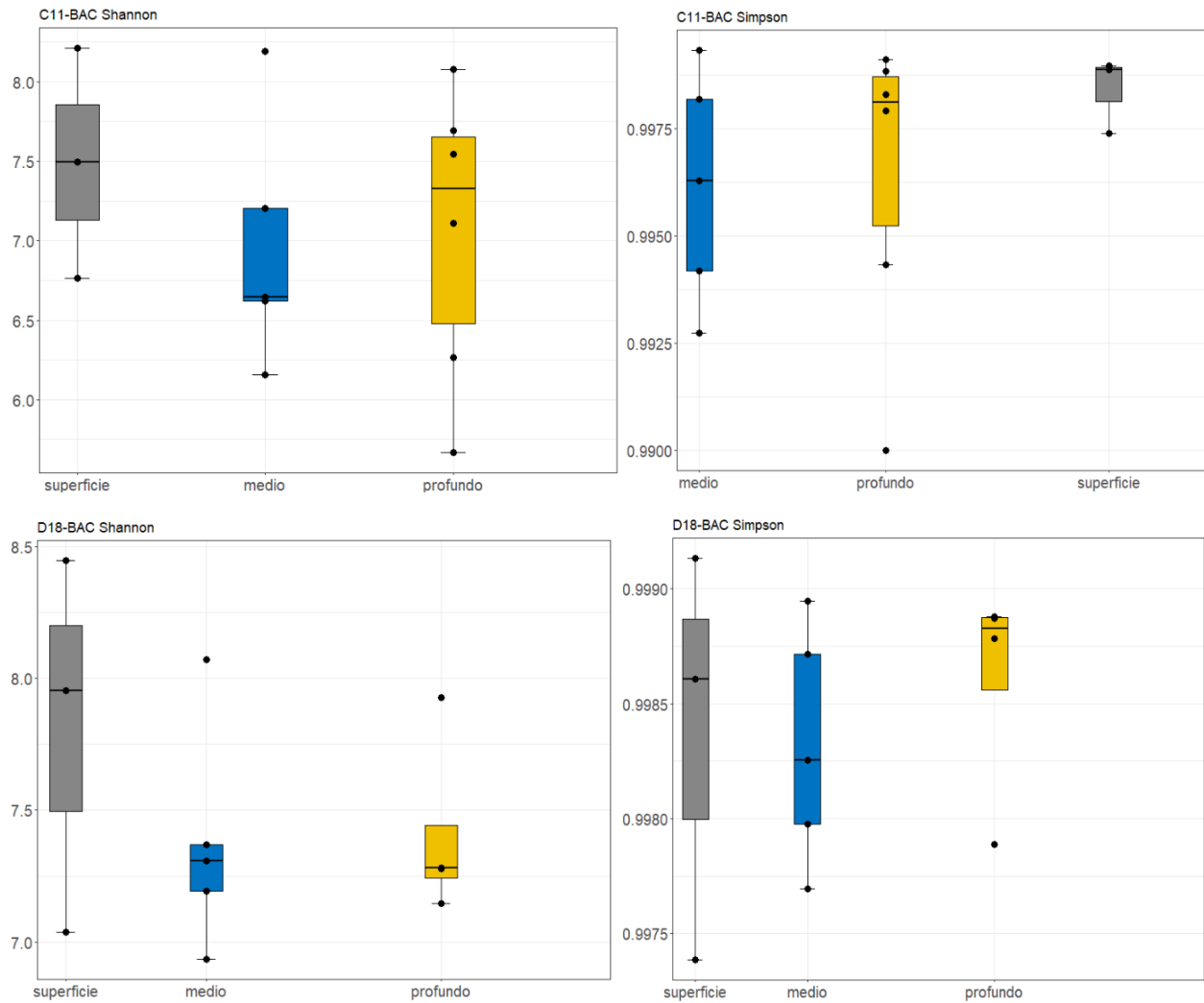


Figura 12. Índices de diversidad alfa de la comunidad de bacteria para los núcleos C11 y D18. Se muestran los índices de Shannon y Simpson

La comunidad de arqueas del sedimento, en contraste con la comunidad de bacterias presento índices de diversidad más bajos (por debajo de 5 para el índice de Shannon) en todas las muestras. En todos los núcleos se observó que conforme la profundidad de la muestra aumentó, también lo hicieron los índices de diversidad. (Figuras 13 y 14). En todos los núcleos se observó que el cambio más grande en los índices de diversidad sucedió alrededor de los 8 cmbs, en particular para el índice de Shannon

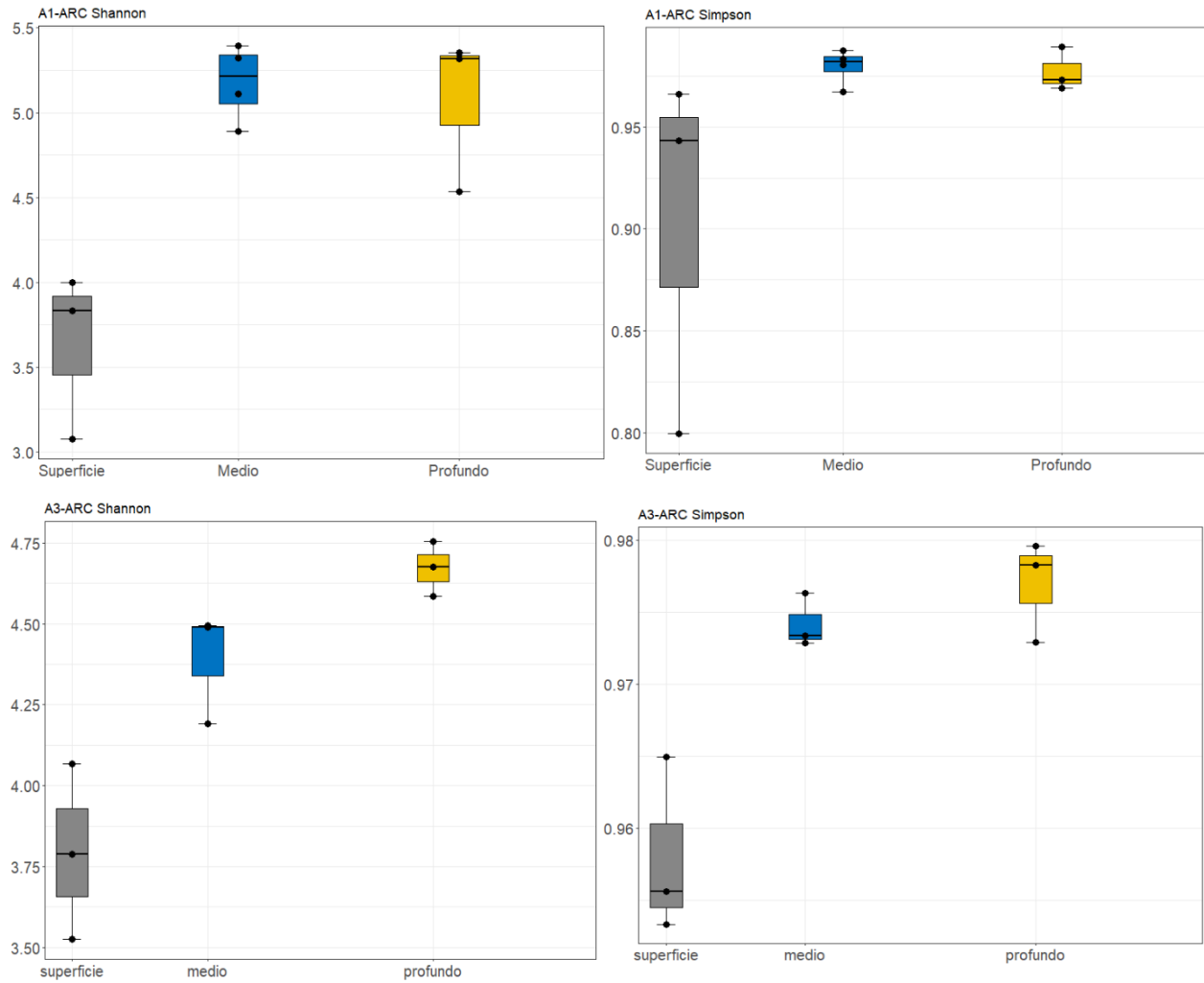


Figura 13. Índices de diversidad alfa de la comunidad de arquea para los núcleos A1 y A3. Se muestran los índices de Shannon y Simpson.

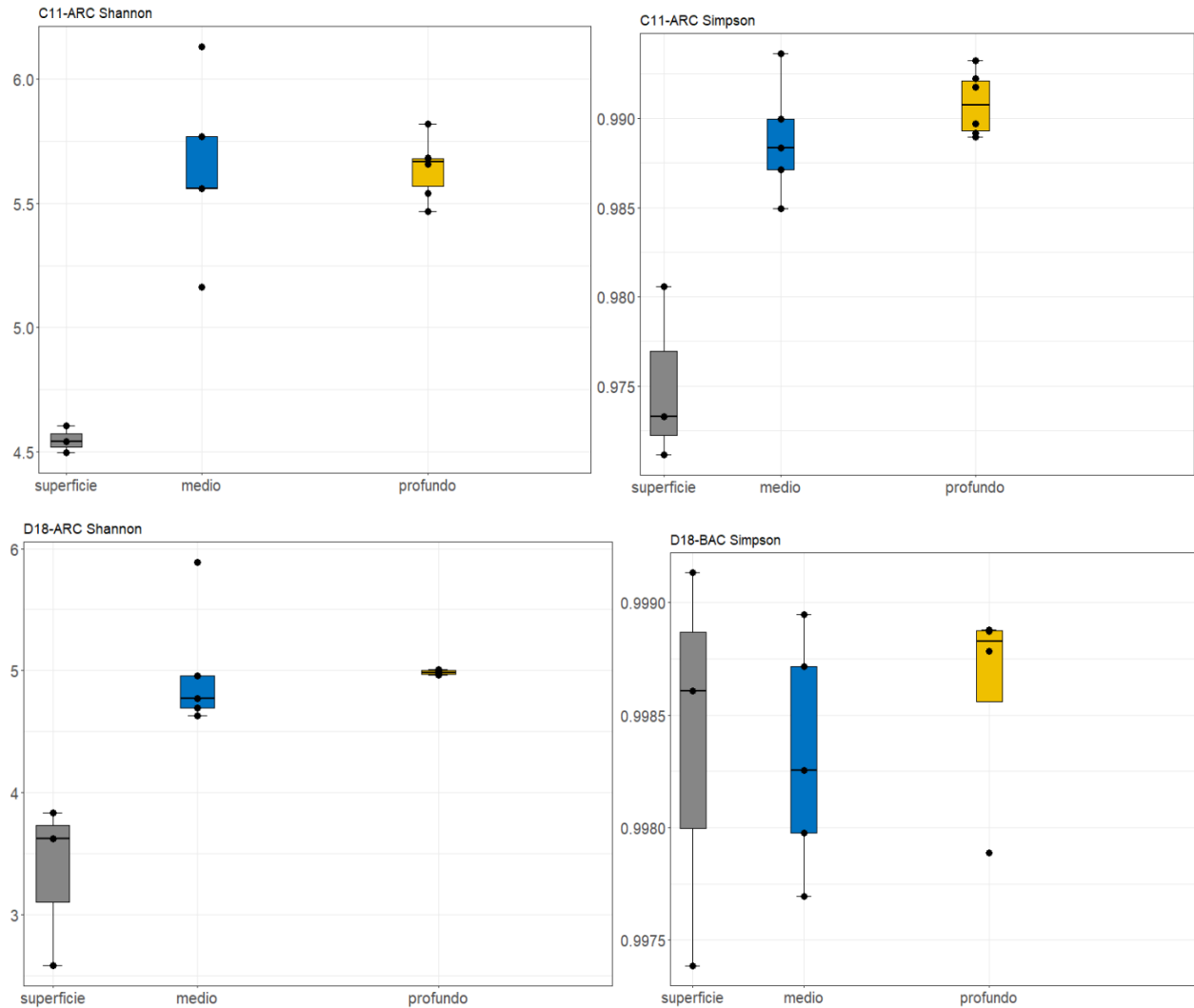


Figura 14. Índices de diversidad alfa de la comunidad de arquea para los núcleos C11 y D18. Se muestran los índices de Shannon y Simpson

Asignación taxonómica de la diversidad de arqueas

Entre todas las muestras se encontraron siete phyla de arqueas y en todos los núcleos en las primeras tres muestras pertenecientes al sedimento de la superficie (0 a 6 cmbs) el 90% de la abundancia relativa correspondió al phylum *Thaumarchaeota*. Mientras que el resto de los phyla aumentó su abundancia conforme la profundidad aumentó y la abundancia de *Thaumarchaeota* disminuyó (Figura 15).

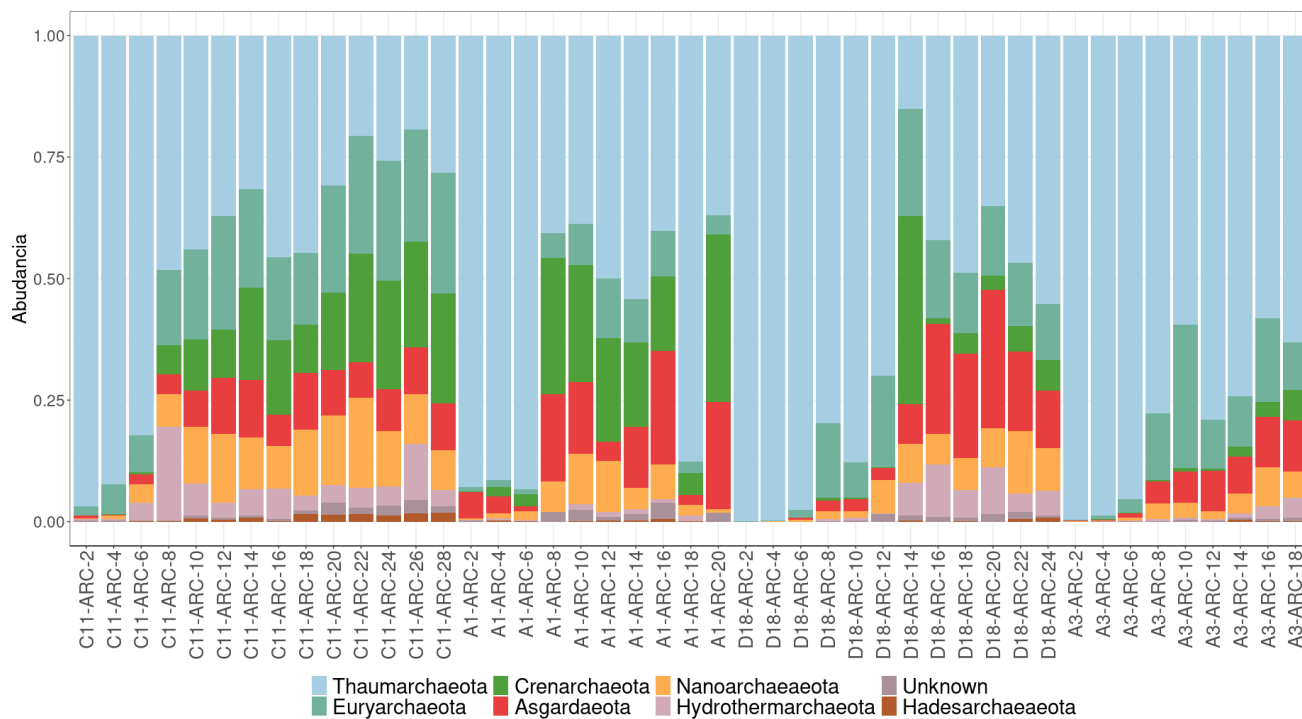


Figura 15. Taxonomía y abundancia relativa de la diversidad de arqueas a nivel de Phylum, Las muestras se encuentran ordenadas conforme la profundidad.

El segundo phylum más abundante de todos fue el de las *Crenarchaeota*, en las muestras del núcleo A1 en donde este se encontró a todos niveles (26.2% en promedio) excepto en las muestras del sedimento superficial (0 a 6 cmbs). En este núcleo, a diferencia de otros, las *Euryarchaeotas* no fueron abundantes, con un promedio 6.9% de abundancia relativa en las muestras que no fueron del sedimento superficial. También en A1 se observó que las *Nanoarchaeota* tuvieron una población más alta en la parte de media de la columna al resto de las muestras del núcleo y que y a los 16 18 cmbs donde la población de *Thaumarchaeota* volvió a aumentar considerablemente (Figura 15).

Las muestras del núcleo A3 fueron las que mantuvieron una mayor población de *Thaumarchaeota* después de los primeros 6 cmbs (casi 66.46% en promedio) y a diferencia de A1 las *Crenarchaeota* tuvieron una abundancia muy baja (menos de 1% en promedio) y se observó que el segundo phylum más abundante fue el de las *Euryarchaeota* (17.71 %), seguido de las *Asgardaeota* y *Nanoarchaeota*, estos dos en menor proporción que en A1 (Figura 15). Los núcleos de la zona de “Campeche knolls” fueron los que tuvieron mayor disminución de la población de *Thaumarchaeota* conforme la profundidad y un mayor aumento en la población del resto de los phylas. El núcleo C11 presentó una población similar de *Crenarchaeota* (23.47%), *Euryarchaeota* (20.36%), y *Nanoarchaeota* (16.84%), mientras que en las muestras de D18 se observó que las *Euryarchaeota* (18.36%) y *Asgardaeota* (21.51%) fueron más altas y solo de los

12 a 14 cmbs se encontró una alta población de *Crenarchaeota* (Figura 15). En las muestras de “Campeche knolls” la población de las *Hydrothermarchaeota* fue más alta y constante que en las muestras de la zona de Perdido.

En cuanto a las clases encontradas en el núcleo A1 solo cinco correspondieron a más del 90% de la comunidad en todas las muestras, estas clases tuvieron la misma distribución que el phylum al que corresponden (representan más del 95% de la abundancia del phylum al que pertenecen), *Nitrososphaeria*, para las *Thaumarchaeota*, *Bathyarchaeia* para las *Crenarchaeota*, *Lokiarcheia* en el caso de las *Asgardaeota*, *Nanohaloarcheia* para las *Nanoarchaeota* y *Thermoplasmata* para phylum *Euryarchaeota* (Figura 16). Las clases encontradas en el núcleo A3 al igual que en el núcleo A1 tuvieron prácticamente la misma abundancia que el phylum al que pertenecen, estas fueron *Nitrososphaeria*, *Thermoplasmata*, *Lokiarcheia*, *Nanohaloarcheia* y a diferencia del núcleo A1 se encontró a la clase conocida como Marine Benthic Group A (MBG-A) perteneciente a las *Thaumarchaeota* (Figura 16). A nivel de clase en las muestras de “Campeche knolls”, también se observó que la mayor parte de la población estuvo dominada por las mismas cinco clases *Nitrososphaeria*, *Thermoplasmata*, *Bathyarchaeia*, *Nanohaloarcheia* y *Lokiarcheia*). En el núcleo C11 pasando los primeros 6 cmbs, se observó un decremento en las *Nitrososphaeria* y un incremento en *Thermoplasmata* 16.9% en promedio para las muestras del estrato medio y 22.09% en las muestras profundas, *Bathyarchaeia* con 11.41 y ,21.69%, *Nanohaloarcheia* con 10.40 y 12.89% y *Lokiarcheia* con 8.54 y 8.61% (Figura 17). En las muestras del núcleo D18 el decremento alto de las *Nitrososphaeria* se dio pasando los 10 cmbs, donde se observó que una parte de las *Thaumarchaeota* correspondieron a las MBG-A (21.09% de los 10 a 12 cmbs) También este núcleo es el que más abundancia de *Lokiarcheia* presentó, pasando los 14 cmbs abundando en promedio un 20% con una tendencia de disminuir conforme aumentó la profundidad, las *Thermoplasmata* así como as *Nanohaloarcheia* se mantuvieron constantes a lo largo de la columna de sedimento 12.54% en promedio para *Thermoplasmata* pasando los 6 cmbs con un pico de abundancia de 21.63% en D18-ARC-14 y 8.14% en las *Nanohaloarcheia* pasando los 12 cmbs.(Figura15).

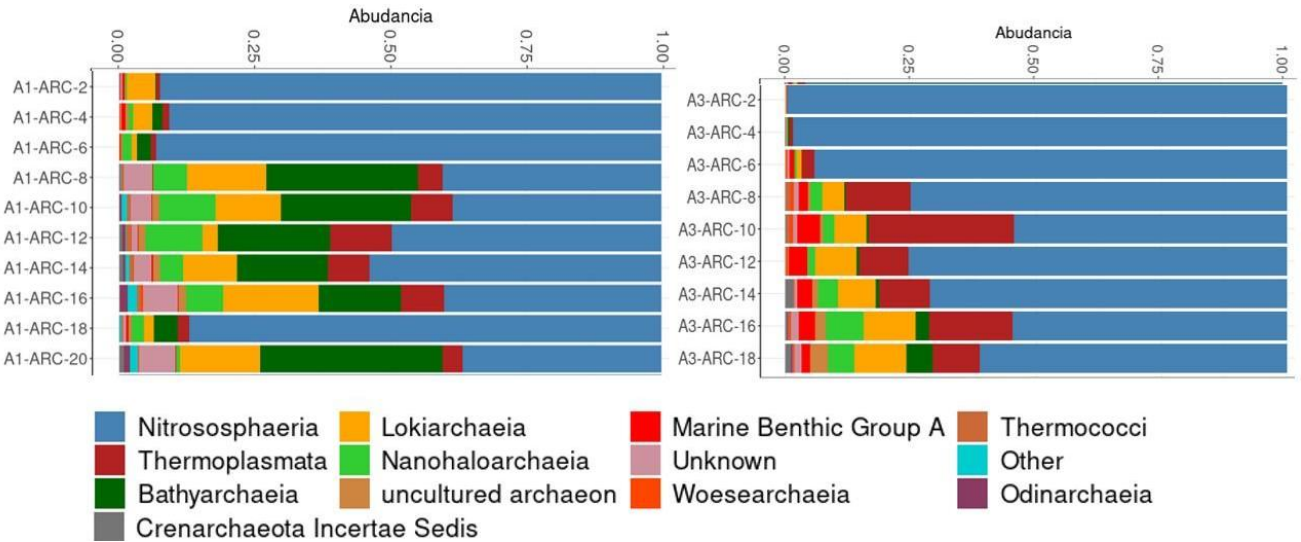


Figura 16. Taxonomía y abundancia relativa de arqueas a nivel de clase. Se muestran los núcleos A1 y A3 de la zona de Perdido. Las muestras se encuentran ordenadas conforme la profundidad de cada estrato. En la categoría de “other” se encuentran las clases con una abundancia menor 0.005).

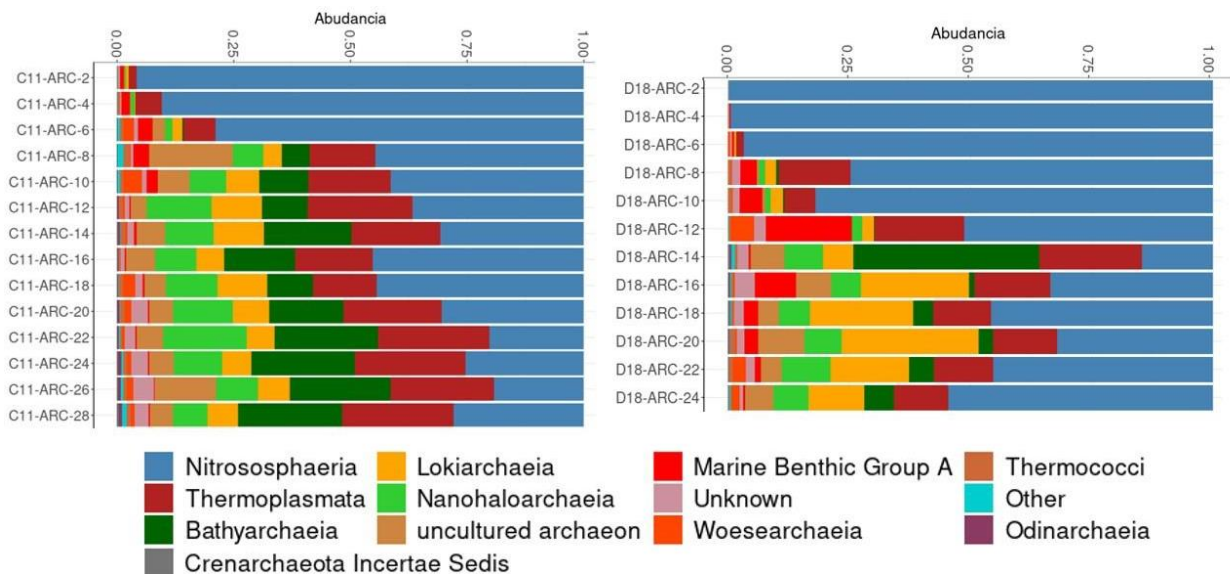


Figura 17. Taxonomía y abundancia relativa de arqueas a nivel de clase. Se muestran los núcleos C11 y D18 de la zona de “Campeche knolls”. Las muestras se encuentran ordenadas conforme la profundidad de cada estrato. En la categoría de “other” se encuentran las clases con una abundancia menor 0.005).

A nivel de orden la asignación taxonómica no fue tan precisa ya que la mayoría de las asignaciones correspondió a órdenes no identificados o muestras ambientales no cultivadas. (Anexo 4). En todas las muestras más del 90% de la clase *Nitrososphaeria* correspondió al orden de la *Nitrosopumilales* y estas a la familia de *Nitrosopumilaceae* la cual a su vez fue representada por el género *Candidatus Nitrosopumilus*. El resto de los

órdenes más abundantes correspondieron a las Marine Benthic Group D de *Thermoplasmata*, dos órdenes de *Nanohaloarchaeia* Deep Sea Euryarchaeotic Group (DSEG) y *Aenigmarchaeales* (Anexo 4).

La comunidad de arqueas en los sedimentos del GoM resultó ser muy similar entre los cuatro núcleos sin importar la zona a la que pertenecieron o la profundidad a la que se colectaron. Siempre se observó la dominancia de *Nitrosophaeria* en los primeros 6 a 8 cmbs y su disminución con cada estrato, así como las mismas cinco clases aumentando su poblaciones, aunque en diferentes proporciones para cada núcleo.

Estructura de la comunidad de arqueas

Para determinar la similitud entre las muestras de cada núcleo y estudiar la diversidad beta de los sedimentos se realizó un escalamiento multidimensional no métrico o NMDS (por sus siglas en inglés). Las distancias entre las 45 muestras se calcularon usando el índice de similitud de Bray-Curtis. Este índice cuantifica la diferencia entre la abundancia de las ASVs entre cada sitio.

Con lo observado en la taxonomía y riqueza de las muestras, se definieron tres categorías en el sedimento, correspondiendo a la profundidad de cada rebanada: sedimento de la superficie, sedimento medio y sedimento profundo (Tabla 5).

Tabla 5. Secciones definidas en la columna de sedimento basándose en la profundidad en cmbs de cada muestra

Profundidad/núcleo	A1	A3	C11	D18
0-2 cmbs	Superficie	Superficie	Superficie	Superficie
2-4 cmbs	Superficie	Superficie	Superficie	Superficie
4-6 cmbs	Superficie	Superficie	Superficie	Superficie
6-8 cmbs	Medio	Medio	Medio	Medio
8-10 cmbs	Medio	Medio	Medio	Medio
10-12 cmbs	Medio	Medio	Medio	Medio
12-14 cmbs	Medio	Profundo	Medio	Medio
14-16 cmbs	Profundo	Profundo	Medio	Medio
16-18 cmbs	Profundo	Profundo	Profundo	Profundo
18-20 cmbs	Profundo		Profundo	Profundo
20-22 cmbs			Profundo	Profundo
22-24 cmbs			Profundo	Profundo
24-26 cmbs			Profundo	
26-24 cmbs			Profundo	

Analizando a la población de arqueas se observó que las muestras se agruparon ligeramente conforme al núcleo al que pertenecen. Las muestras de los núcleos D18 y

A3 fueron las que más se agruparon a diferencia de las pertenecientes al núcleo C11 y A1 las cuales fueron las más dispersas (Figura 18) En todos los núcleos se observó que las muestras del sedimento de la superficie se agruparon o se posicionaron alejadas del resto de las muestras de la columna de sedimento.

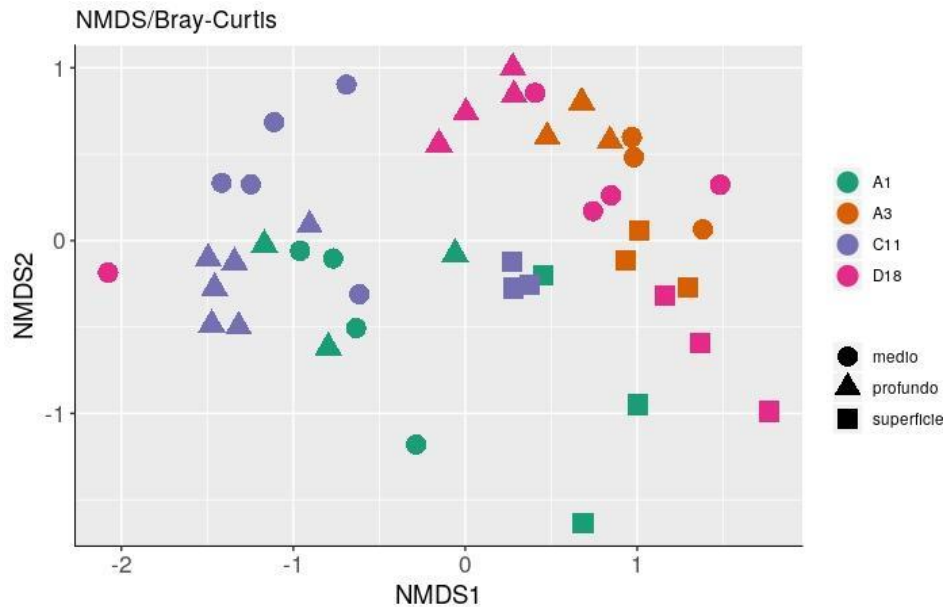


Figura 18. Análisis multidimensional no métrico para los resultados de arquea. Las muestras se colorearon correspondiendo al núcleo al que pertenecen.

Los núcleos D18 y A3 parecieron ser los de mayor similitud entre ellos y en el núcleo, solo una muestra D18-ARC-14 fue la más alejada de todas. En las muestras del núcleo C11, las muestras correspondientes a cada categoría de sedimento se agruparon, algo que se observó para todas las muestras del sedimento profundo para cada núcleo (Figura 18).

Para comparar si los núcleos presentaban una diferencia significativa en cuanto a su composición taxonómica se realizó un análisis multivariado permutacional de la varianza (PERMANOVA). El resultado arrojó que si existen diferencias significativas entre los cuatro núcleos ($p < 0.01$) en cuanto su composición de ASVs. Para validar este resultado y que lo observado no estuviera influenciado por la dispersión de las muestras o una varianza heterogénea, se calculó la homogeneidad de la varianza usando la prueba de dispersión beta (betadisper) de Marti Anderson (Anderson et al., 2006). Este arrojó un valor de $P < 0.05$, indicando que no existe homogeneidad en la varianza y la dispersión de los núcleos es significativamente diferente. Esta combinación de resultados indica que si bien existe una diferencia significativa entre los núcleos también poseen una variación alta entre sus muestras y el grupo (núcleo) no está bien definido.

Además, también se realizó otro NMDS, pero tomando en cuenta no solo la composición de ASVs de las muestras sino la filogenia de estas usando la distancia de unfrac “unweighted”. Con este análisis la mayoría de las muestras se agruparon y solo algunas muestras de la superficie de D18, A3 y C11 se posicionaron aparte del conjunto de muestras agrupadas (Figura 19).

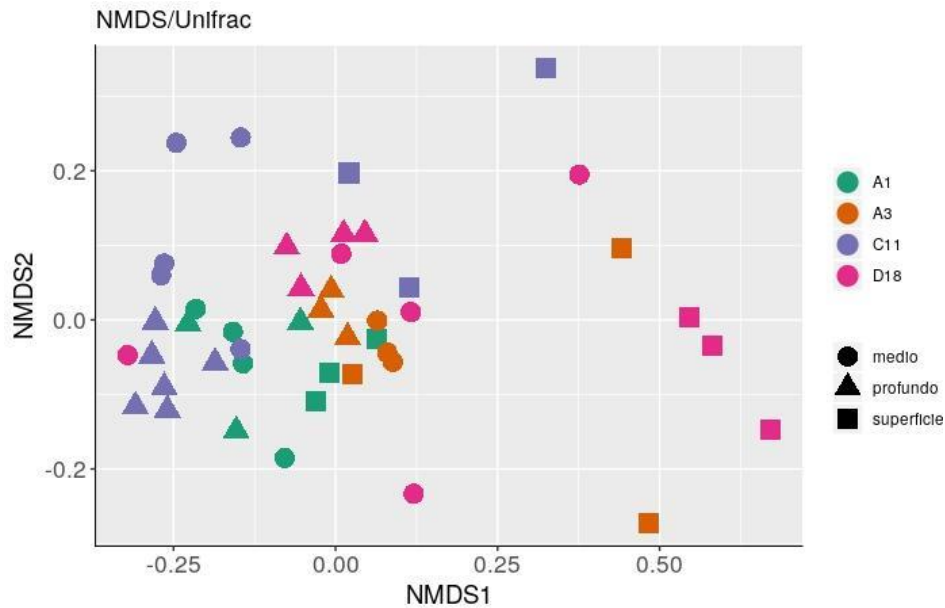


Figura 19. NMDS para los resultados de arquea con la distancia de UniFrac. Las muestras se colorearon correspondiendo al núcleo al que pertenecían y la forma de acuerdo con su profundidad.

Con esta distribución, las muestras del núcleo A1 se agruparon mucho más y en cambio las de los núcleos D18 y A3 presentaron una variación más alta. Con esta métrica de distancia, se puede observar que en la mayoría de las muestras existe un parentesco filogenético entre ellas, exceptuando algunas de la superficie.

Se logró analizar la estructura de la comunidad de arqueas en cada sitio realizando un NMDS con la métrica de Bray-Curtis para cada núcleo, excepto para el núcleo A3 que, por tener pocas muestras, la ordenación no se graficó de manera clara. Para este núcleo se realizó un PCoA (análisis de coordenadas principales) (Figuras 20 a 23).

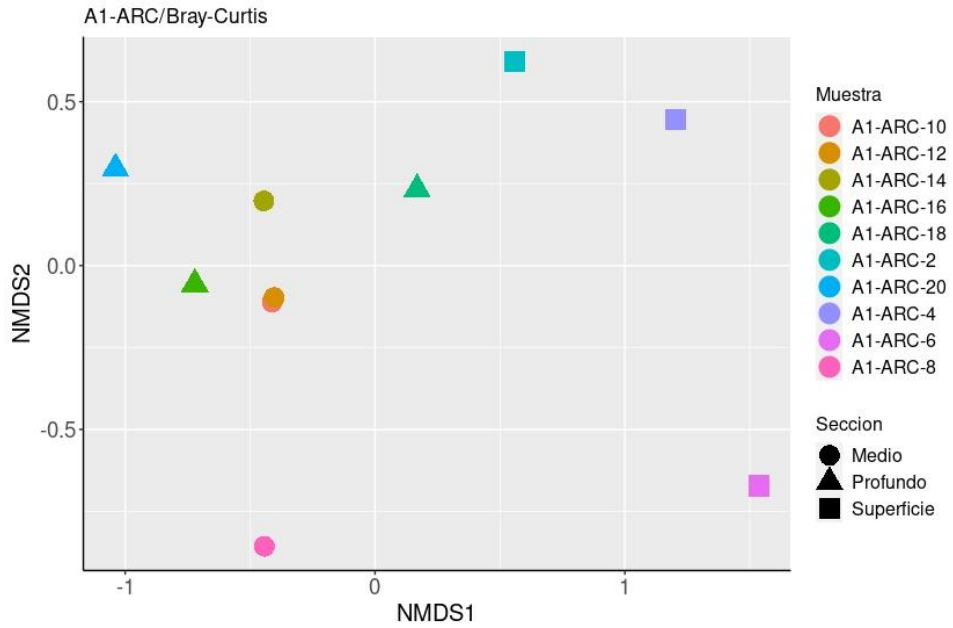


Figura 20. NMDS de las muestras del núcleo A1 con los resultados de arquea.

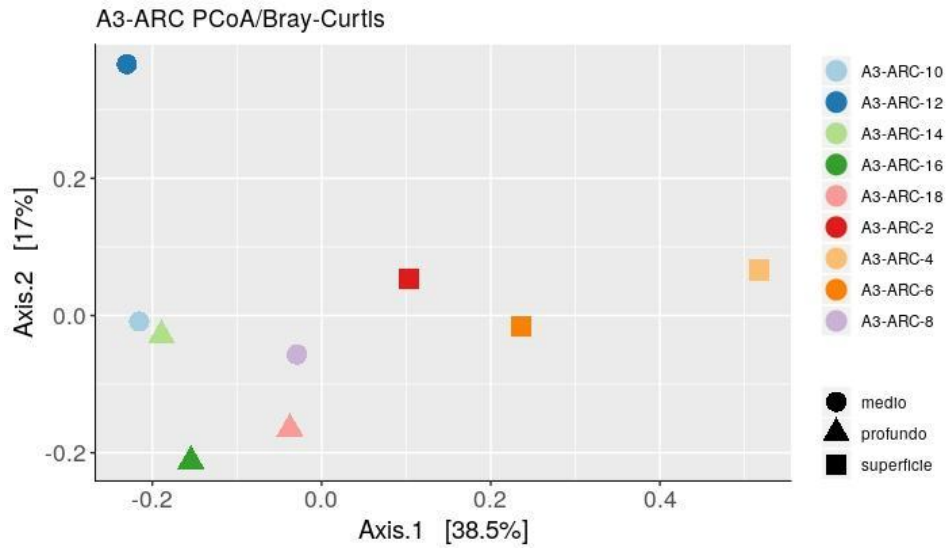


Figura 21. PCoA de las muestras del núcleo A3 con los resultados de arquea

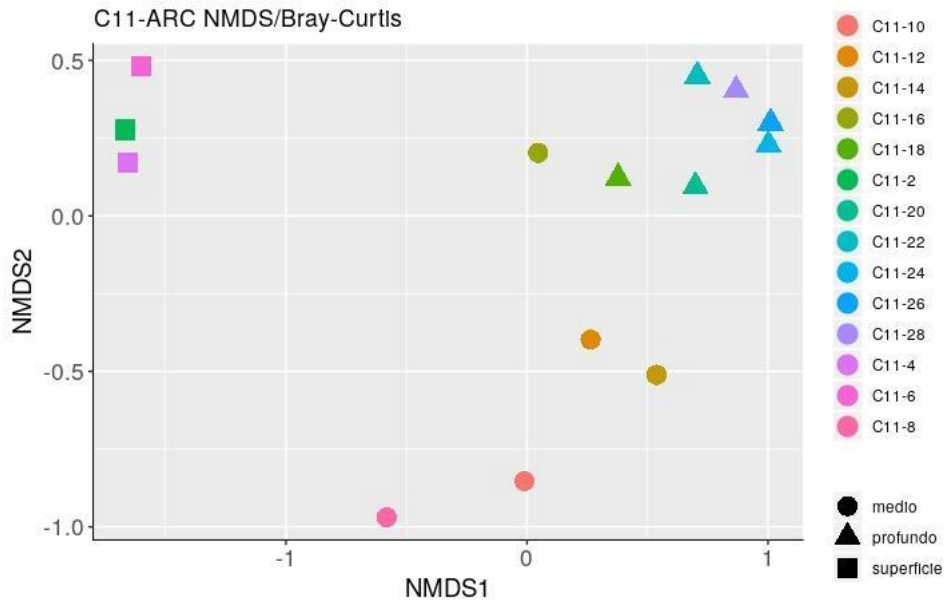


Figura 22. NMDS de las muestras del núcleo C11 con los resultados de arquea.

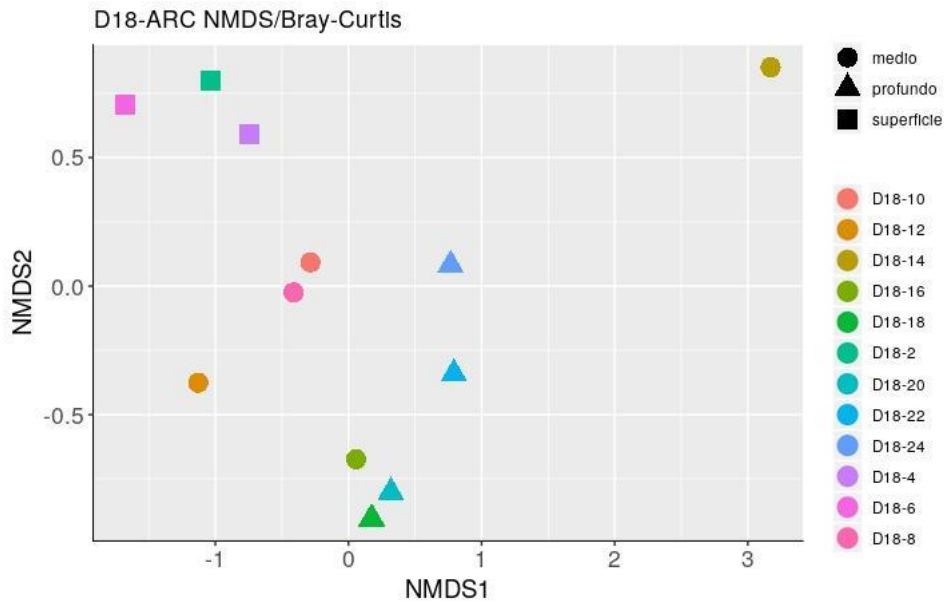


Figura 23. NMDS de las muestras del núcleo D18 con los resultados de arquea.

En estos NMDS realizados se observó que la comunidad de arqueas está estratificada conforme la profundidad del sedimento, siendo esto más claro en los núcleos A3, C11 y D18. La distribución de las muestras de la zona de Perdido fue en las que menos agrupación entre las diferentes categorías se observó. En el núcleo A1 se observó una

dispersión en la mayoría de las muestras (Figura 20), mientras que en A3 las muestra más profundas fueron las que más se agruparon (Figura 21). Los núcleos de la zona de “Campeche knolls fueron los que mayor separación entre las tres categorías tuvieron, en especial el núcleo C11 (Figura 22), mientras que en D18, solo la muestra D18-ARC-14 fue la más disímil del resto (Figura 23). Se observó en todos los núcleos, cómo las muestras correspondientes a los primeros 6 cmbs, se agrupan en un conjunto (núcleos C11 y D18) o se posicionan lejos del resto de las muestras (núcleos A1 y A3).

Se realizaron pruebas de PERMANOVAs a cada uno de los núcleos comparando las diferentes categorías del sedimento (Tabla 6), así como la medición de la homogeneidad de la varianza. Solo en el núcleo A1 la prueba no arrojó que existiera una diferencia significativa entre las tres categorías del sedimento y en todas las muestras la varianza fue homogénea (Tabla 6)

Tabla 6. Resultado de los PERMANOVA y Betadisper entre las secciones del sedimento (superficie, medio y profundo) para cada núcleo con los datos correspondientes de arquea (nds: no hay diferencia significativa, *: $p < 0.005$ **: $p < 0.001$)

Núcleo	PERMANOVA	Betadisper
A1-ARC	nds	nds
A3-ARC	*	nds
C11-ARC	**	nds
D18-ARC	**	nds

El resultado corrobora lo observado en los NMDS, donde en la mayoría de los núcleos se observan muestras agrupadas conforme la profundidad del sedimento y estos conjuntos tiene una diferencia estadísticamente significativa, excepto en el núcleo A1.

Asignación taxonómica de la diversidad de bacterias.

En total se lograron asignar 62 phylas, 55 para los núcleos A1 y A3 y 59 para los núcleos C11 y D18 respectivamente. En todas las muestras la mayor parte de la diversidad (más del 80% de la abundancia relativa) perteneció a los phyla *Proteobacteria*, *Chlorofelxi*, *Planctomycetes*, *Acidobacteria*, *Rokubacteria*, *Gemmatimonadetes*, *Patescibacteria* y *Actinobacteria* (Figura24). Se encontró que cuatro phyla principales correspondieron a casi dos terceras partes de toda la abundancia relativa en todas las muestras, *Proteobacteria*, *Chlorofelxi*, *Planctomycetes* y en algunas muestras *Acidobacteria* mientras que en otras *Rokubacteria* (Figura 24).

Proteobacteria fue el phylum más abundante en todas las muestras, siendo el núcleo A1 donde abundaron más (64.71% en promedio), y el núcleo D18 donde menos (27.65%).

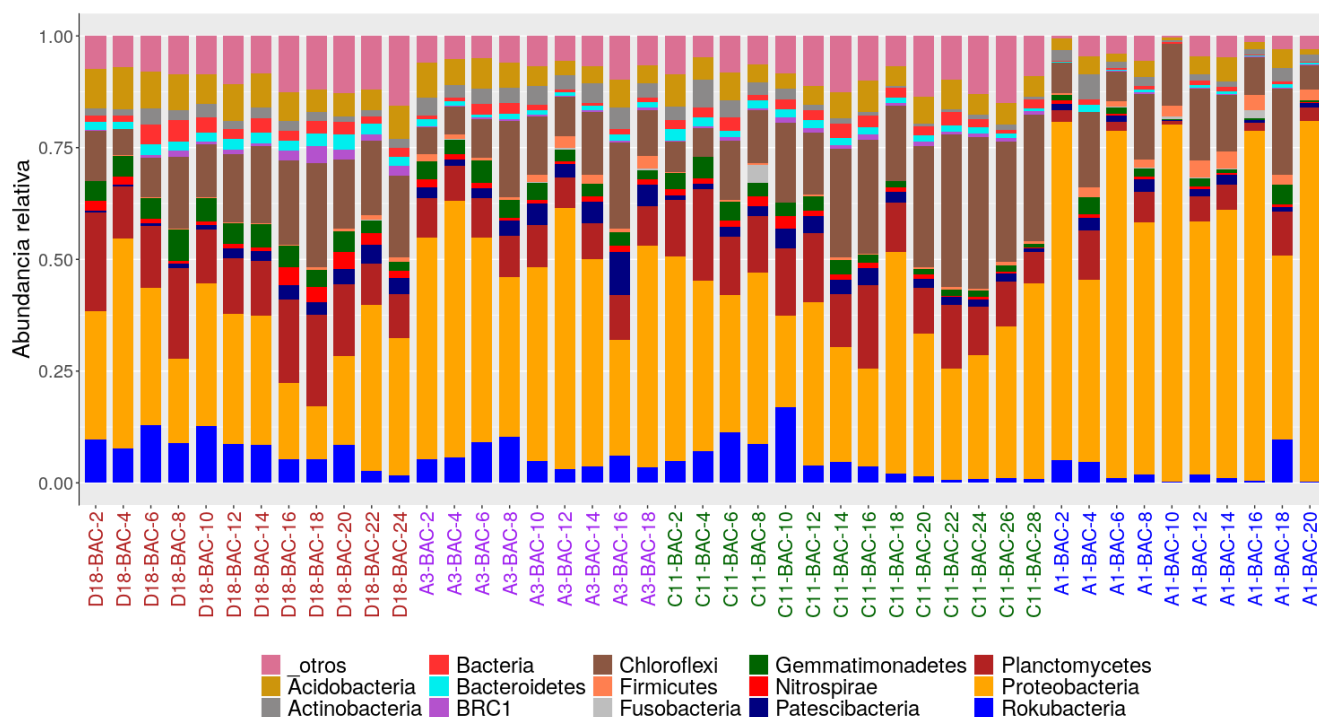


Figura 24. Abundancia relativa de los taxones de bacterias encontrados a nivel de Phylum. Las muestras se encuentran ordenadas conforme la profundidad de cada estrato. En la categoría de otros se encuentran los phyla con una abundancia menor 0.035 (color rosa).

La diversidad de bacterias a nivel de phylum, fue similar para todas las muestras, con ciertos cambios en algunos núcleos y a ciertas profundidades. Se observó que en los núcleos de la zona de “Campeche knolls” conforme la profundidad aumentó también lo hicieron las poblaciones de *Chloroflexi*, *Actinobacteria* y *Acidobacteria*. En el núcleo A3 la población a nivel de phylum se mantuvo similar en todas las profundidades con un ligero aumento de *Chloroflexi*, *Planctomycetes* y *Patescibacteria* en las muestras profundas (Figura 24). En el núcleo A1 fue donde menos población de *Chloroflexi*, *Planctomycetes* y *Rokubacteria* se observó y en cambio en todas la columna de sedimento *Proteobacteria* correspondió a más del 60% de la abundancia relativa.

A nivel de clase, en las muestras de la zona de Perdido las *Proteobacterias* más abundantes fueron las *Gammaproteobacteria* seguidos de *Deltaproteobacterias* y de las *Dehalococcoida* pertenecientes a *Chloroflexi*. (Figura 25). El núcleo A1 es el único en el que se observó que el 51.49% de su abundancia perteneció a *Gammaproteobacteria*, seguido de *Anaerolineae* (7.32 %), *Deltaproteobacteria* (6.21%), *Dehalococcoida* (4.81%), *Phycisphaerae* (3.14%), *Clostridia* (2.41%), *Alphaproteobacteria* (2.18),

Planctomycetia (1.98%) y *NC10* (1.79 %) en mucha menor proporción. (Figura 25). Aparte de ser la clase más dominante, su población se mantuvo constante a lo largo de la columna de sedimento, solo disminuyendo en ciertas muestras (A1-BAC-4, 8, 12, 14 y 18, Figura 25). El resto de las clases abundantes (*Anaerolineae* y *Deltaproteobacteria*) aumentaron su población en las muestras donde la abundancia de *Gammaproteobacterias* no fue tan alta.

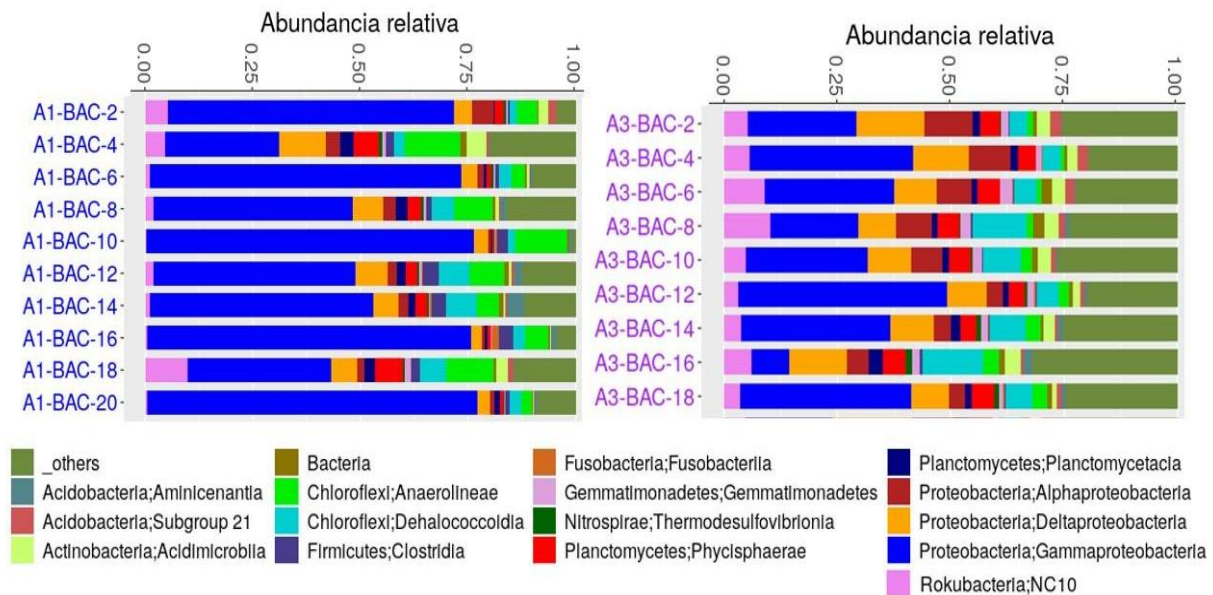


Figura 25. Taxonomía y abundancia relativa a nivel de clase de los núcleos A1 y A3 de la zona de Perdido. Las muestras se encuentran ordenadas conforme la profundidad de cada estrato. En la categoría de otros se encuentran las clases con una abundancia menor 0.035).

En el núcleo A3 se observó una diversidad más alta y más clases (139 clases) distribuidas en las muestras que en las muestras del núcleo A1. *Gammaproteobacteria* fue la clase más abundante seguida de *Deltaproteobacteria*, *Dehalococcoidia*, *Alphaproteobacteria*, *Phycisphaerae*, y NC10, las cuales juntas ocuparon más del 60% de la abundancia relativa en todas las muestras excepto en A3-BAC-16, siendo esta la muestra con la diversidad más alta (Figura 25). Las *Deltaproteobacteria* fueron más abundantes y disminuyeron ligeramente con la profundidad, lo mismo se observó para las *Alphaproteobacteria*, pero en menor proporción. Las *Dehalococcoidia* y *Phycisphaerae* mantuvieron una población constante en toda la columna (4.62 %y 5.1%) y solo en la *Anaerolineae* aumentaron conforme la profundidad de 1.1% en la superficie a 3.5% en los estratos profundos (Figura 25).

En la zona de “Campeche knolls” la abundancia de las *Proteobacterias* fue menor y se observó una mayor población de *Rokubacteria*, *Planctomycetes* y *Chloroflexi*. En ambos núcleos de la población de *Rokubacteria* disminuyó conforme la profundidad (de 11.5% a 5.27% aprox.), las *Chloroflexi* aumentaron con esta (8.7% en la superficie a 15.74 % en la parte media y 18.23% en las muestras profundas), y las *Planctomycetes*, así como las *Gemmatimonadetes* se mantienen constantes en la columna (Figura 24).

A nivel de clase las *Deltaproteobacteria* y *Dehalococcoidia* fueron más abundantes que las *Gammaproteobacteria* y se observó una población más grande de NC10 sobre todo en los estratos no profundos y en el núcleo D18 (Figura 26).

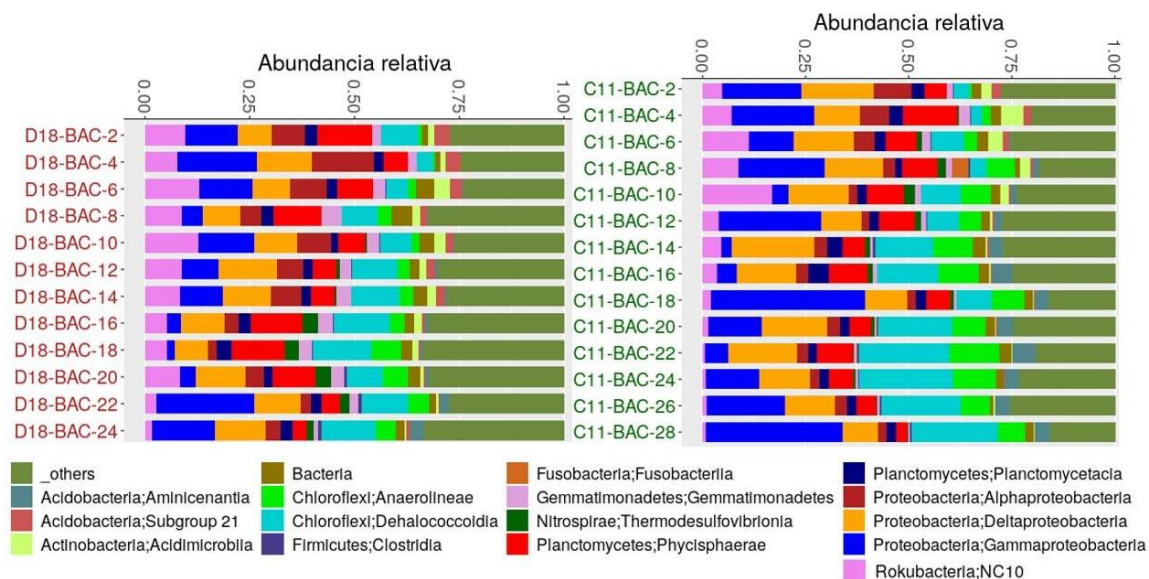


Figura 26. Taxonomía y abundancia relativa a nivel de clase de los núcleos D18 y C11 de la zona de “Campeche knolls”. Las muestras se encuentran ordenadas conforme la profundidad de cada estrato. En la categoría de otros se encuentran las clases con una abundancia menor 0.035.

En el núcleo C11 se asignó un total 179 clases, de las cuales ocho juntas abarcan más del 60% de la abundancia relativa en todas sus muestras: *Gammaproteobacteria*, *Deltaproteobacteria*, *Dehalococcoidia*, *Phycisphaerae*, *Anaerolineae*, NC10, *Alphaproteobacteria* y *Planctomycetia*. A partir de los 12 cmbs donde las NC10 disminuyeron su abundancia la población de *Dehalococcoidia* y *Anaerolineae* incrementó considerablemente 11.63% y 7.15% en las muestras del estrato medio para terminar con 22.08 % y 8 .1 en los estratos profundos (Figura 26). En las muestras pertenecientes al núcleo D18 se asignaron 148 clases y se observó poca dominancia por parte de algún taxón. La población de *Deltaproteobacterias* fue las más abundante y se mantuvo constante en la columna con un promedio de 10.51%, las *Alphaproteobacterias*, tuvieron una mayor abundancia en los primeros cmbs 10.38 % y después disminuyeron

considerablemente a un promedio de 3.6% (Figura 26). Las *Dehalococcoida* tuvieron una abundancia de 6.29% en la superficie y aumentaron conforme la profundidad a un promedio 11.9%., caso contrario a las NC10 bajaron de 10.5% de abundancia relativa hasta un promedio de 7.8% en los estratos profundos.

A nivel de orden el número de taxones aumentó considerablemente y solo en las muestras de la zona de Perdido se observó una dominancia de algunos de estos. En las muestras del núcleo A1, siete órdenes correspondieron a poco más del 50% de la abundancia relativa en todas las muestras. Los tres más abundantes pertenecen a las *Gammaproteobacteria* siendo *Alteromonadales*, *Pseudomonadales* y *Enterobacteriales*, el resto fueron los *Anaerolineales*, *Clostridiales*, *Physisphaerles* y S085, de *Dehalococcoidia* (Figura 27). Los órdenes de *Pseudomonadales* y *Enterobacteriales* tuvieron una población alta solo en las muestras A1-BAC-6, 8 y 20 (*Enterobacteriales* sólo en la última), mientras que *Alteromonadales* abundó en el resto de las muestras (Figura 27)

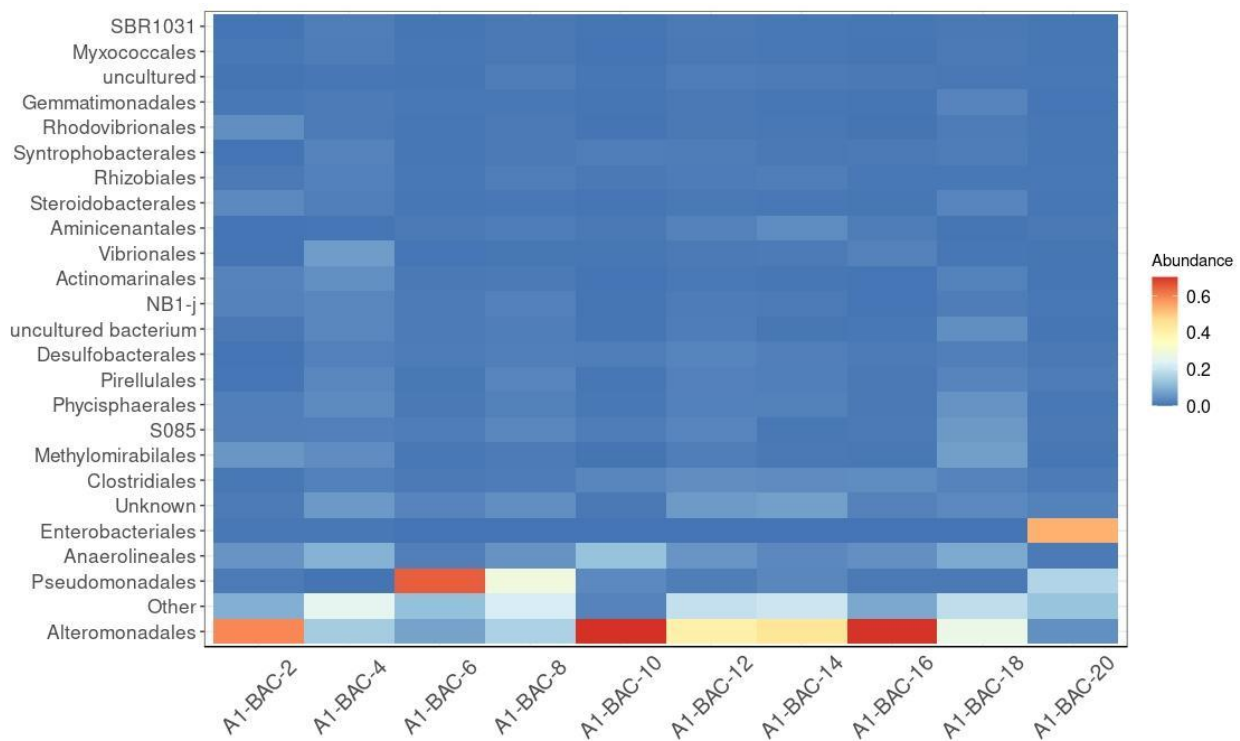


Figura 27. Heatmap de los tops 25 órdenes del núcleo A1, juntos correspondieron a más del 65% de la abundancia relativa en cada muestra, el resto se aglomeró en la categoría de “others”. La escala de colores se muestra en cuestión de la abundancia relativa de cada orden.

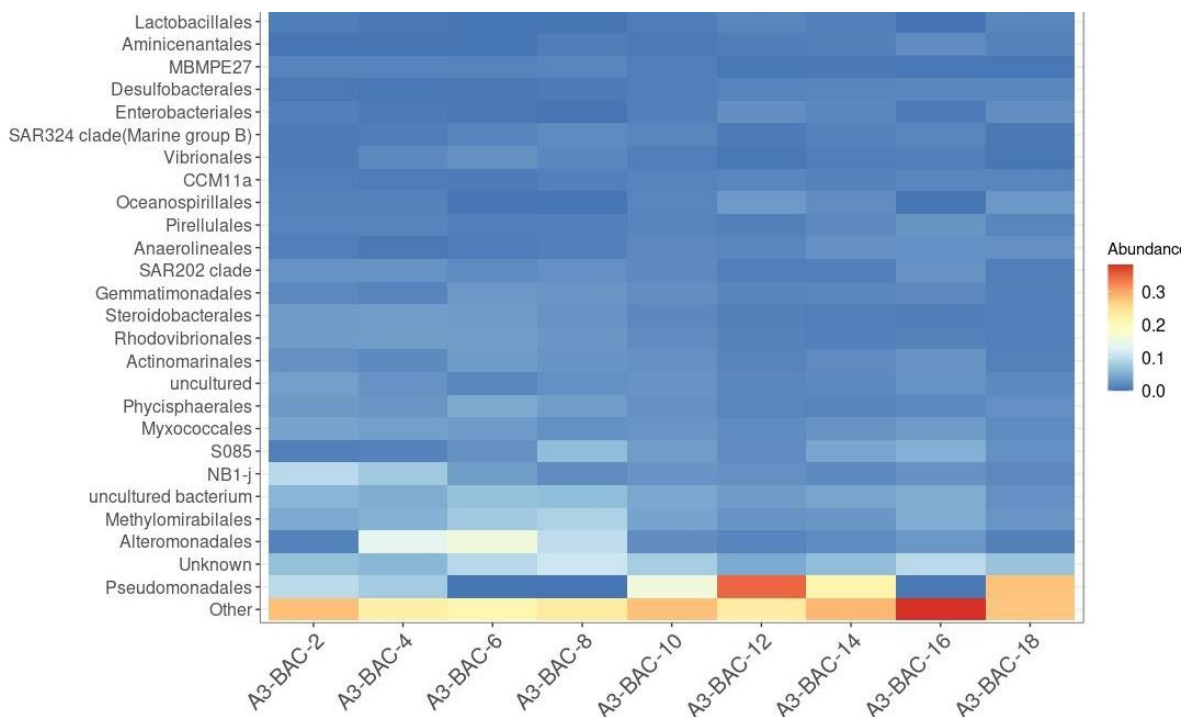


Figura 28. Heatmap de los tops 30 órdenes del núcleo A3, juntos correspondieron a más del 50% de la abundancia relativa en cada muestra, el resto se aglomeró en la categoría de “others”. La escala de colores se muestra en cuestión de la abundancia relativa de cada orden.

La distribución de las familias en este núcleo siguió el mismo patrón que la distribución de órdenes donde, la familia más abundante de *Alteromonadales* fue *Moritellaceae* abarcando más del 95% de todas las *Alteromonadales* excepto en la muestra más superficial donde la mitad correspondió a *Collwelliaceae*. Para las *Pseudomonadales* y *Enterobacterales* los representantes más abundantes (arriba del 90%) fueron *Pseudomonadaceae* y *Enterobacteraceae* respectivamente. En los órdenes del núcleo A3 se observó lo mismo que en A1 entre *Alteromonadales* y *Pseudomonadales*, en estas muestras no se encontró a él orden de las *Enterobacterales*, pero si una población más alta de las *Methyloirabiliales* de las NC10 en las muestras más superficiales (Figura 28). En ambos núcleos de la zona de Perdido los géneros correspondientes a los órdenes y familias más abundantes correspondió a *Moritella*, *Collwella*, *Pseudomonas* y *Klebsiella* para las *Alteromonadales*, *Pseudomonadales* y *Enterobacterales* y un género propuesto como wbA1-12 en las *Methyloirabiliales*.

La taxonomía a nivel de orden en la zona de “Campeche knolls” no presentó ordenes dominantes y los que fueron observados en la zona de Perdido tuvieron una abundancia baja (Figuras 29 y 30), en cambio la mayoría de los taxones pertenecientes a las clases de *Dehalococcoidia* y *Anaerolineae* no tuvieron una asignación más profunda. En las

muestras del núcleo C11 los órdenes con mayor abundancia fueron NB1-J (11% en la superficie y disminuyendo hasta 4.01 %), *Methylomirabiales* (en la superficie de 9.3% y pasando los 12 cmbs 3.4%) y *Phycisphaerales* (5.4% en promedio en todo el núcleo). En las muestras del estrato medio se observaron pocos órdenes abundantes, salvo en C11-BAC 8 y 10 los *Enterobacteriales* con 13.95% y 19.84 %. Las *Alteromonadales* comenzaron a tener un población más alta a partir de los 18 cmbs (26.03 %) y disminuyen hasta abundar de nuevo a los 24 cmbs 26.95% (Figura 29). En cuanto a las familias y géneros encontrados, la mayoría de los *Dehalococcoida* no se clasificaron para más de esa clase, y en cuanto a *Deltaproteobacterias* se llegó a identificar a la familia *Desulfobacteraceae*. Los géneros más abundantes son *Moritella* siendo la mayoría de los *Alteromonadales*, *Klebsiella* para las muestras donde hay *Enterobacteriales*, wb1-A12 *Metylomirabiales* y SEEP-SRB1 para la familia de *Desulfobacteraceae*.

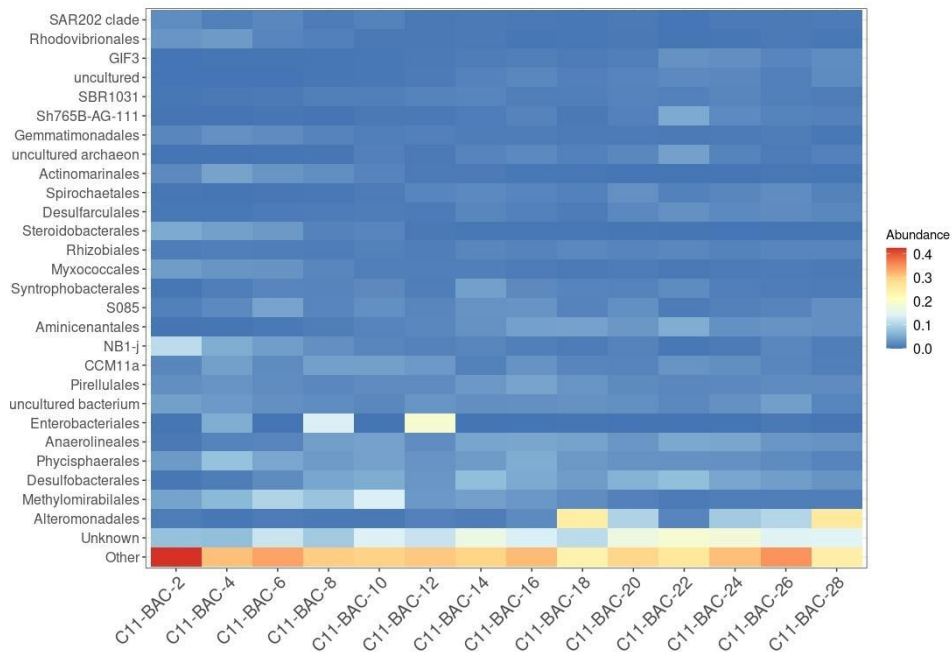


Figura 29. Heatmap de los tops 30 órdenes del núcleo C11, juntos correspondieron a más del 50% de la abundancia relativa en cada muestra, el resto se aglomeró en la categoría de “others”. La escala de colores se muestra en cuestión de la abundancia relativa de cada orden

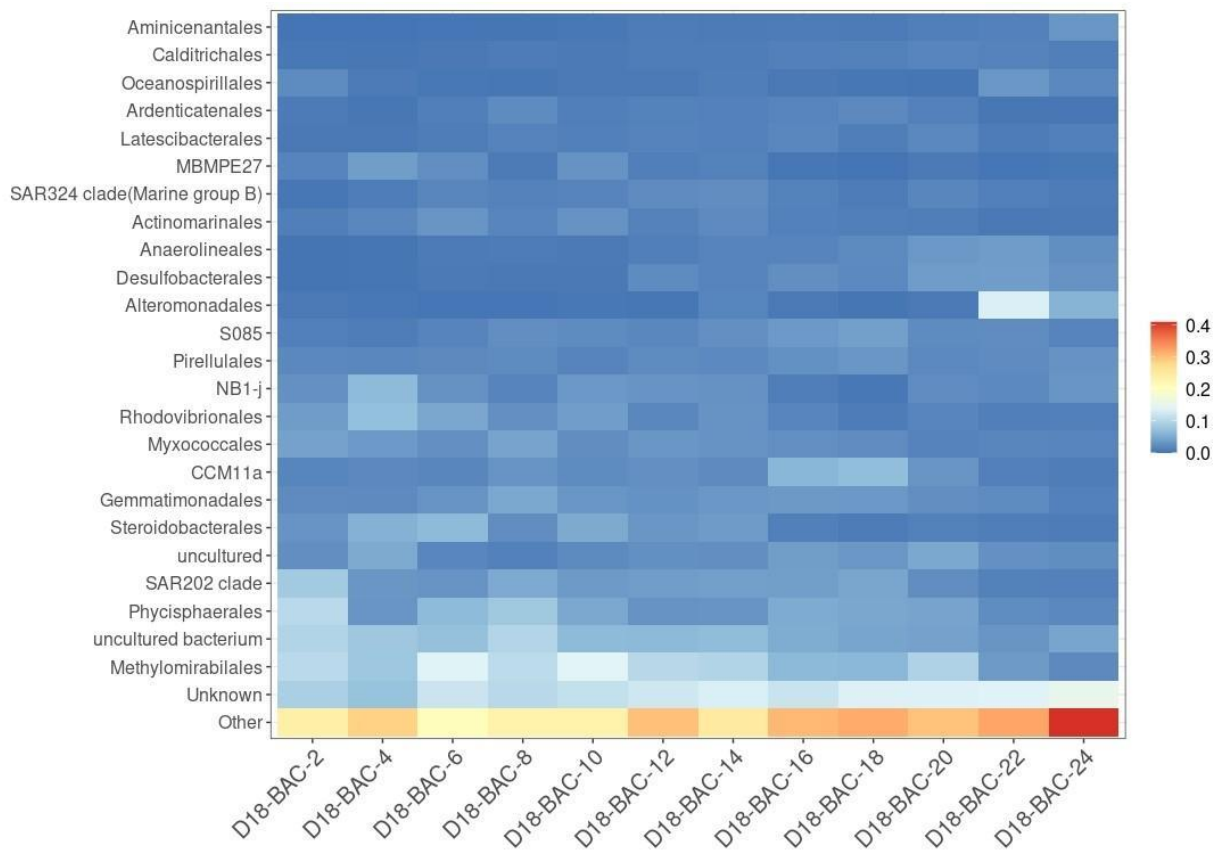


Figura 30. Heatmap de los tops 30 órdenes del núcleo D18, juntos correspondieron a más del 50% de la abundancia relativa en cada muestra, el resto se aglomeró en la categoría de “others”. La escala de colores se muestra en cuestión de la abundancia relativa de cada orden.

En el núcleo D18 se asignaron varios órdenes con poca abundancia entre ellos (Figura 30) e igual que en el núcleo C11 la mayoría de las *Dehalococcoidia* y *Anaerolineae* no se clasificaron para mayor profundidad, más que el clado SAR202 de *Dehalococcoidia*. El orden de las *Methyloirabiliales* fue el más abundante hasta los 14 cmbs (13.17%), seguido de las *Phycisphaerales* que se mantuvieron constantes a lo largo de la columna (8.6%) excepto en las últimas muestras (20-24 cmbs). Las *Alteromonadales* en D18 solo fueron abundantes en las últimas dos muestras (9.8%) (Figura 30).

En ambos núcleos la mayoría de las *Alteromonadales* correspondió al género *Moritella*, para las *Phycisphaerales* y *Methyloirabiliales* se asignaron los géneros propuestos de wbA1-12 y Urania-1B-19 respectivamente. También en C11 las *Enterobacterales* correspondieron en su mayoría a *Klebsiella* y la mayoría de las *Deltaproteobacterias* a el género conocido como SEEP-SRB1.

Estructura de la comunidad de Bacterias

Se realizó un NMDS usando la distancia de Bray-Curtis para determinar la similitud de las 45 muestras de acuerdo con su composición de ASVs. No se observó algún conjunto de muestra agrupadas aparte del resto, sino al contrario una alta dispersión en casi todos los núcleos, sin embargo, las muestras de los núcleos A3 y D18 presentaron una similitud mucho más alta que las de los núcleos C11 y A1 (Figura 31).

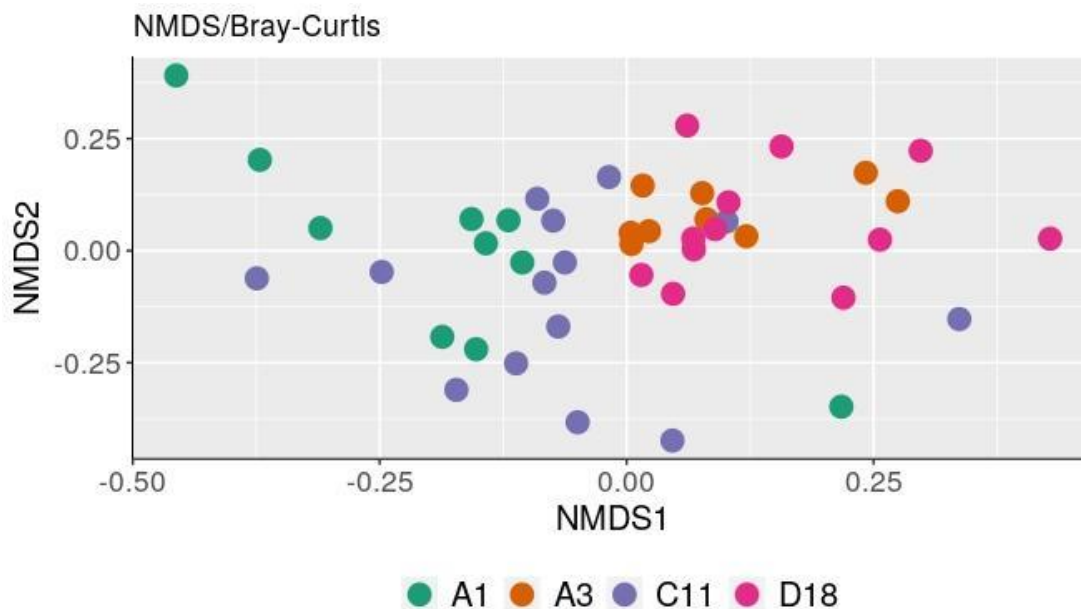


Figura 31. Análisis multidimensional no métrico para los resultados de bacterias. Las muestras se colorearon de acuerdo con el núcleo al que pertenecen.

También se realizó un PERMANOVA y se calculó la homogeneidad de la varianza (Betadisper) entre los núcleos para determinar si existen diferencia significativa entre estos. De este análisis se encontró que si existe una diferencia significativa ($p < 0.01$) entre los cuatro núcleos y que no hay una homogeneidad en la varianza y la variación entre las muestras es alta ($p < 0.05$).

Para analizar si entre las categorías del sedimento (Tabla 5) había una taxonomía significativamente diferente se realizó otro PERMANOVA entre Éstas. El resultado arrojó un valor de $p > 0.05$ demostrando que no hay diferencia significativa entre las categorías definidas y no se encontró diferencia significativa de la homogeneidad de la varianza no se encontró diferencia significativa dándole mayor confianza al resultado del PERMANOVA.

De igual manera se calculó un NMDS tomando en cuenta la distancia filogenética usando la distancia de UniFrac. Se observó que el núcleo A1 tuvo una mayor dispersión, el núcleo A3 mayor similitud entre sus muestras, seguido por el D18 y las muestras del núcleo C11 se encontraron menos disímiles a diferencia de la distancia por Bray-Curtis (Figura 32) infiriendo que, si existe variación en la distancia filogenética de las poblaciones de bacterias, pero son similares independientemente del núcleo al que pertenezcan.

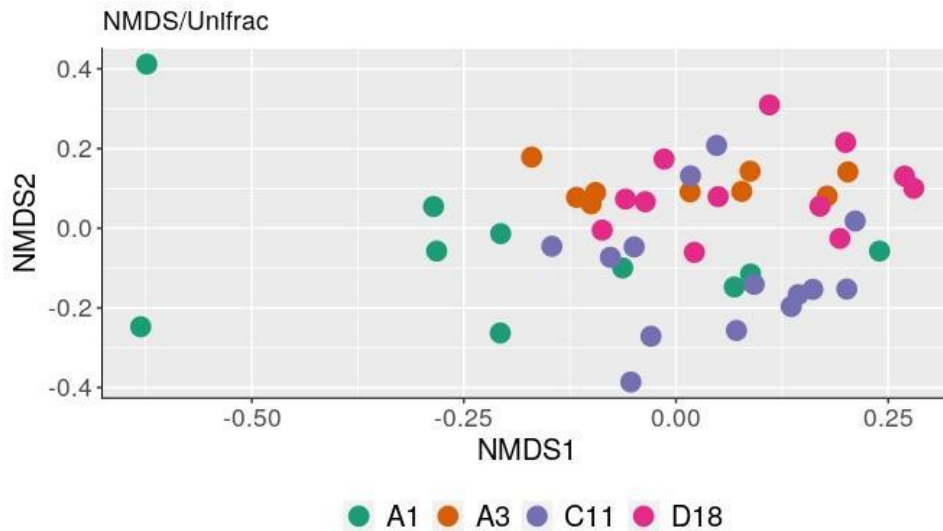


Figura 32. Análisis multidimensional no métrico para los resultados de bacteria usando distancia de UniFrac Las muestras se colorearon correspondiendo al núcleo al que pertenecen. Las dos muestras de A1 que se grafican en los extremos corresponden a A1-BAC-2 esquina superior izquierda y A1-BAC-10 esquina inferior izquierda.

Se analizó la distribución de las muestras de cada núcleo mediante un NMDS para los núcleos de A1, C11, D18 y un PCoA en A3 (Figuras 33 a 36). En el núcleo A1 la agrupación de las muestras es irregular y no correspondió conforme la profundidad muestras que corresponden a profundidades de 0 a 2 cmbs y de 8 a 10 cmbs se agruparon sin importar si son de la zona del medio, profundas o superficiales (Figuras 33). En el sitio de A3 la distribución de las muestras resultó en que las muestras superficiales fueron disímiles del resto y las muestras de los 8 a los 18 cmbs son altamente parecidas (Figura 34).

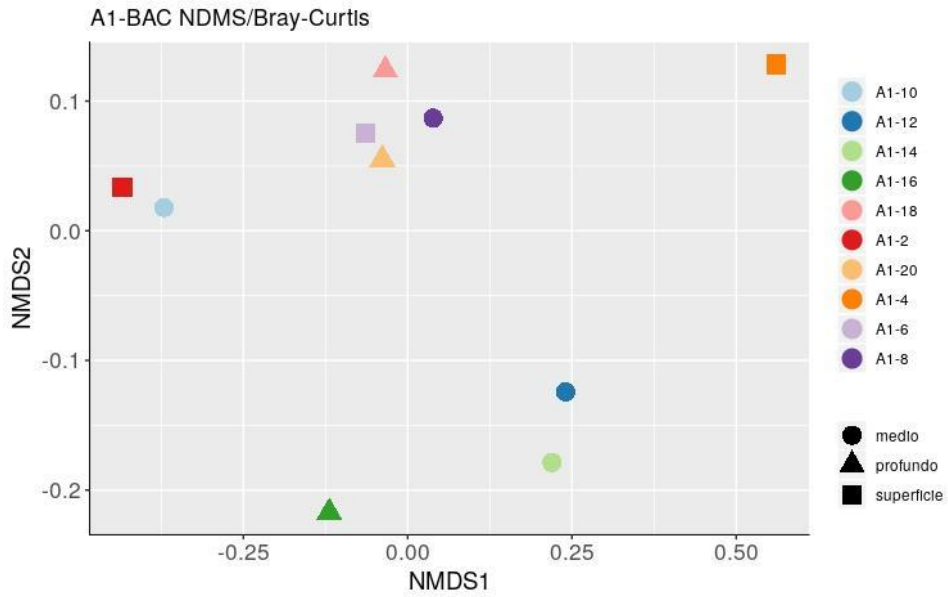


Figura 33. NMDS de las muestras del núcleo A1 con los resultados de bacteria

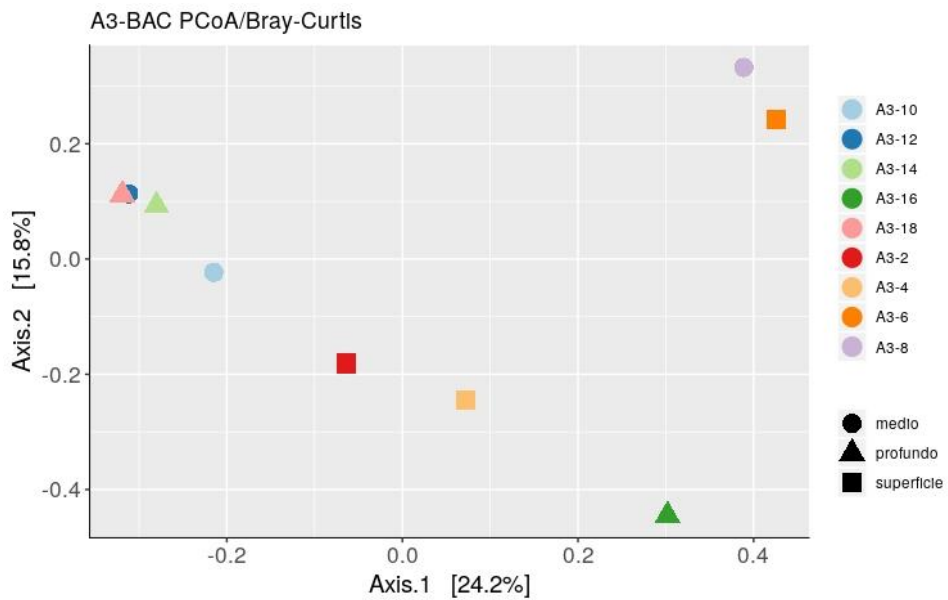


Figura 34. PcoA de las muestras del núcleo A3 con los resultados de bacteria

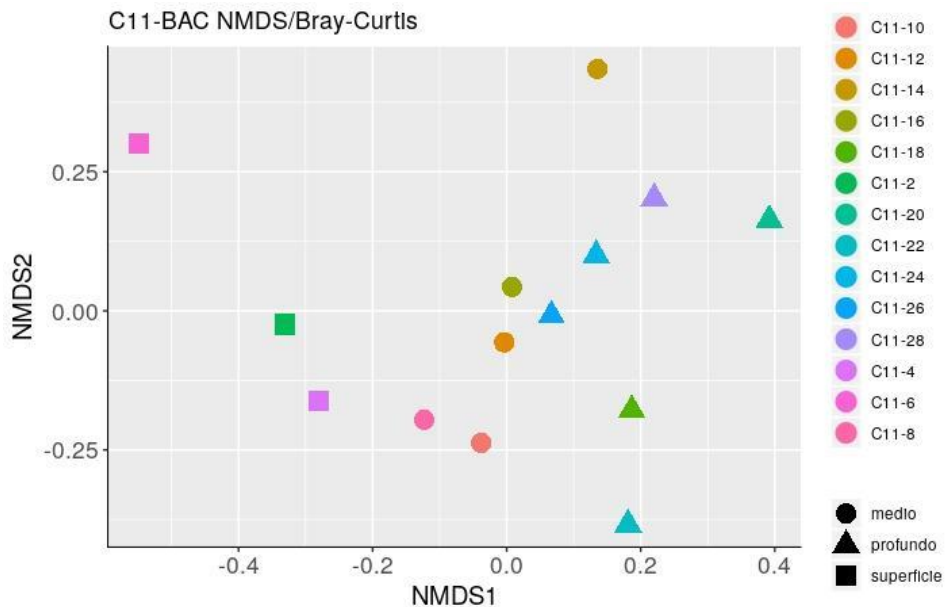


Figura 35. NMDS de las muestras del núcleo C11 con los resultados de bacteria.

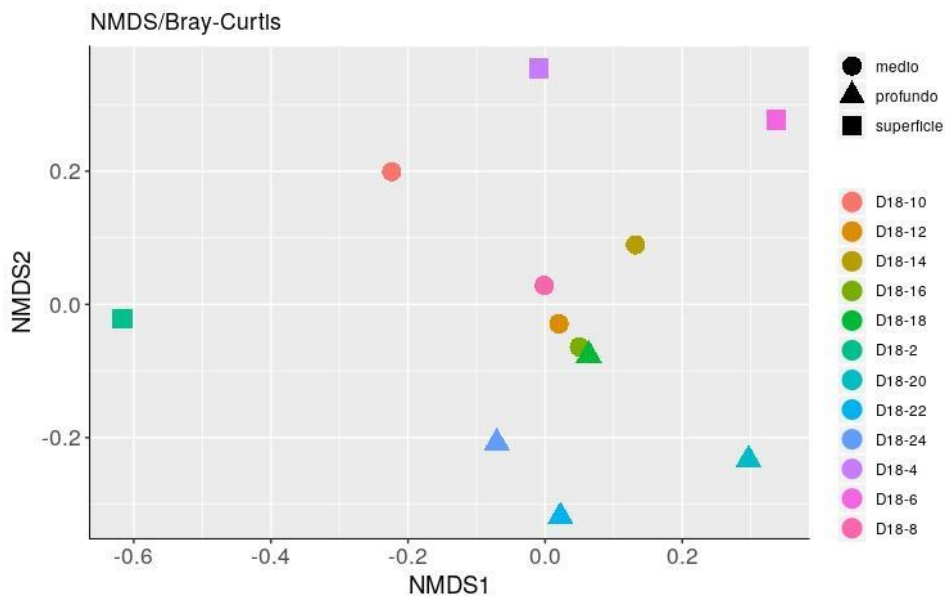


Figura 36. NMDS de las muestras del núcleo D18 con los resultados de bacteria.

En las muestras correspondientes a la zona de “Campeche knolls” la ordenación presentó ciertos grupos de acuerdo con la profundidad de las muestras, en particular en el núcleo C11 (Figura 35), en las muestras de D18 sucedió algo similar excepto con las muestras correspondientes a la superficie, en donde hubo gran variación (Figura 36).

Para corroborar estadísticamente si las diferencias que se observaron entre las secciones consideradas en los sedimentos son significativamente diferentes se realizó una prueba de PERMANOVA para cada núcleo comparando las tres secciones del sedimento (Tabla 5) y también se midió la homogeneidad de la varianza. En todos los núcleos la homogeneidad de la varianza se mantuvo y sólo en las muestras correspondientes a la zona de Perdido no se encontró diferencia significativa entre las categorías del sedimento (Tabla 7).

Tabla 7. Resultado de los PERMANOVA y Betadisper entre las secciones del sedimento para cada núcleo con los datos de Bacteria. (nds: no hay diferencia significativa, **: $p < 0.01$).

Núcleo	PERMANOVA	Betadisper
A1-BAC	nds	nds
A3-BAC	nds	nds
C11-BAC	**	nds
D18-BAC	**	nds

Taxones diferencialmente abundantes

Tanto para las secuencias de bacteria como las de arquea se decidió buscar cuales fueron clases diferencialmente abundantes entre cada núcleo y las categorías definidas en el sedimento. Para esto se utilizó el método estadístico de análisis de composición de microbiomas o ANCOM (Mandal et al., 2015) por sus siglas en inglés. Este método se basa en relaciones logarítmicas de composición para buscar diferencias en la media de la abundancia de los taxones para las categorías de interés. El valor de la abundancia media y mediana por categoría de las clases encontradas por el análisis de ANCOM se reporta en el anexo 5.

Entre los cuatro núcleos se encontraron pocas clases diferencialmente de arquea, solo seis de las abundantes. Estas fueron las clases de *Bathyarchaeia*, *Methanomicrobia*, *Nitrosphaeria*, *Odinarcheia*, *Thermoplasmata* y el grupo de las MBG-A. De estas clases solo las *Bathyarchaeia*, *Thermoplasmata* y *Nitrosphaeria* fueron de las más abundantes (Figuras 16 y 17), mientras que el resto de las clases presentó una baja abundancia en las muestras (Anexo 5.1). Por estos resultados se infiere que la mayoría de las diferencias entre la comunidad de arqueas de las muestras se da en los taxones que no son los fueron los más abundantes. Los núcleos D18 y C11 fueron muy similares, siendo solo las *Thermoplasmata* la única clase diferencialmente abundante entre ellos. También, se observó algo similar entre A3 y D18 con la clase de las *Odinarcheia*, la única diferencialmente abundante entre estos dos (Tabla 8).

Tabla 8. Clases de arquea diferencialmente abundantes entre los núcleos. Se muestra el resultado de la comparación múltiple de la abundancia entre los taxones y los núcleos (nds: no hay diferencia significativa, *: $p < 0.005$ **: $p < 0.001$, *** $p < 0.0001$).

Clases de arquea	A1 vs A3	A1 vs C11	A1 vs D18	A3 vs C11	A3 vs D18	C11 vs D18
<i>Bathyarchaeia</i>	**	nds	nds	***	nds	nds
<i>Marine_Benthic_Group_A</i>	**	nds	nds	ns	nds	nds
<i>Methanomicrobia</i>	nds	**	*	ns	nds	nds
<i>Nitrososphaeria</i>	nds	nds	nds	**	nds	nds
<i>Odinarchaeia</i>	*	nds	Nds	**	**	nds
<i>Thermoplasmata</i>	nds	***	*	nds	nds	*

El mismo análisis de ANCOM se realizó para buscar clase de arquea que fueran diferencialmente abundantes entre las secciones del sedimento. Se realizó el análisis usando todas las muestras y su categoría de la profundidad del sedimento y también para cada núcleo en particular. Solo en el núcleo C11 se observó que las *Bathyarchaeia* fueron diferencialmente abundantes entre el sedimento de la superficie y el resto de las categorías, mientras que en el resto de los núcleos no se encontró diferencia en ninguna clase (Tabla 9). En cambio, cuando se analizaron todas las muestras juntas se observó que siete clases fueron las diferencialmente abundantes, así como dos taxones no clasificados (Tabla 9) Como se observó en la asignación taxonómica la mayoría de las diferencias se dieron entre las muestras de los primeros 0 a 6 cmbs contra el resto de la columna de sedimento (Figuras 16 y 17). Interesantemente se encontraron clases como *Discoba* la cual solo se encontró en las muestras de la superficie y *Verstraetearchaeia* la cual solo se encontró en las muestras profundas (Anexo 5.2). Estos resultados muestran que aparte de lo observado en los taxones abundantes (*Bathyarchaeia*, *Nitrososphaeria* y *Thermoplasmata*), las diferencias en la comunidad de arqueas conforme la profundidad también se encuentran en taxones muy poco abundantes y una parte de la taxonomía aun no clasificada.

Tabla 9. Clases de arquea diferencialmente abundantes entre las categorías del sedimento para todas las muestras y para el núcleo C11. Se muestra el resultado de la comparación múltiple de la abundancia entre las clases y las secciones del sedimento. (nds: no hay diferencia significativa, *: $p < 0.005$ **: $p < 0.001$, $p < 0.0001$)

Clases de arquea	Sup vs Med	Sup vs Prof	Med vs Prof
<i>Bathyarchaeia</i>	**	***	nds
<i>Discoba</i>	***	***	nds
<i>Nanohaloarchaeia</i>	***	***	nds
<i>Nitrososphaeria</i>	***	***	nds
<i>Odinarchaeia</i>	**	**	nds
<i>Thermoplasmata</i>	***	***	nds

<i>Verstraetearchaeia</i>	nds	***	***
<i>Unclassified</i>	***	***	nds
<i>uncultured_archaeon</i>	*	***	nds
Núcleo C11	Sup vs Med	Sup vs Prof	Med vs Prof
<i>Bathyarchaeia</i>	**	***	nds

En la comunidad de bacterias del sedimento se encontraron más taxones diferencialmente abundantes entre los núcleos, siendo un total de 25 clases (Tabla 10). De estas clases la gran mayoría correspondió a taxones poca abundancia en las muestras (Figuras 25 y 26) o a ciertas clases de *Planctomycetes*, *Acidobacteria*, *Chloroflexi*, *Atribacteria* y *Actinobacteria* con una taxonomía no muy bien definida. Se encontró que las *Acidobacteriia* y *Gemmatimonadetes* fueron significativamente diferentes en todos los núcleos. Mientras que, las *Fusobacteriia*, *Oxyphotobacteria* y *Chloroflexi*; *TK17* fueron las que menos diferencia de abundancia entre los núcleos presentaron. Conforme al o lo observado en la asignación taxonómica de la comunidad de bacterias las *Gammaproteobacteria* fueron diferencialmente abundantes entre los núcleos excepto entre las muestras de la zona de Campeche knolls (C11 y D18). Estos dos núcleos también fueron los que menos clases diferencialmente abundantes tuvieron, así como D18 y A3, estos últimos siendo los sitios más profundos (Tabla 10). Los resultados indican que en general las mayoría de las diferencias, salvo las *Gammaproteobacterias* se encuentran en las clases que no son las más abundantes del sedimento marino sino al contrario en los grupos con poca abundancia o presencia en la comunidad.

Tabla 10. Clases de bacteria diferencialmente abundantes entre los núcleos. Se muestra el resultado de la comparación múltiple de la abundancia entre los taxones y los núcleos (nds: no hay diferencia significativa, *: $p < 0.005$ **: $p < 0.001$, $p < 0.0001$).

Clases de bacteria	A1 vs A3	A1 vs C11	A1 vs D18	A3 vs C11	A3 vs D18	C11-D18
<i>Acidobacteriia</i>	***	**	***	**	**	***
<i>Actinobacteria</i>	*	ns	*	***	***	ns
<i>Bacilli</i>	*	ns	ns	***	***	ns
<i>Bacteroidia</i>	***	***	***	ns	***	**
<i>Planctomycetes; BD7-11</i>	***	***	***	ns	*	*
<i>Calditrichia</i>	***	***	***	ns	*	*
<i>Clostridia</i>	***	***	***	ns	ns	ns
<i>Elusimicrobia</i>	***	ns	**	***	***	ns
<i>Fimbriimonadia</i>	**	ns	*	**	ns	*

<i>Fusobacteriia</i>	ns	ns	ns	ns	*	ns
<i>Gammaproteobacteria</i>	**	***	***	*	***	ns
<i>Gemmatimonadetes</i>	***	*	***	*	**	***
<i>Hydrogenedentia</i>	***	*	***	ns	**	***
<i>Atribacteria; JS1</i>	*	ns	*	*	ns	*
<i>Lentisphaeria</i>	ns	***	***	***	***	ns
<i>Moduliflexia</i>	*	***	ns	***	ns	**
<i>Mollicutes</i>	*	*	*	ns	ns	ns
<i>Omnitrophia</i>	*	ns	**	ns	ns	ns
<i>Oxyphotobacteria</i>	ns	ns	ns	ns	***	ns
<i>Rhodothermia</i>	**	ns	*	**	ns	**
<i>Planctomycetes; SPG12-343-353-B69</i>	ns	**	*	**	ns	ns
<i>Acidobacteria; Subgroup_15</i>	***	ns	***	***	ns	***
<i>Acidobacteria; Subgroup_6</i>	***	ns	***	***	ns	***
<i>Chloroflexi; TK17</i>	ns	ns	ns	ns	ns	**
<i>Planctomycetes; vadinHA49</i>	**	*	ns	ns	ns	ns
<i>Actinobacteria; WCHB1-81</i>	***	*	**	ns	ns	ns

De igual manera que como se realizó en las muestras de arquea, también se buscó a las clases de bacteria diferencialmente abundantes entre las categorías del sedimento. Se observó que diez clases fueron diferencialmente abundantes. Similar a lo encontrado en la comunidad de arqueas solo los núcleos de D18 y C11 fueron en los que se encontró clases diferencialmente abundantes. (Tabla 11). Las clases que se encontraron correspondieron a grupos con poca abundancia en la comunidad (Anexo 5.4) y a taxones aun no definidos, tal como los resultados del ANCOM entre los núcleos. Se observó que la mayoría de las diferencias se dieron entre el sedimento superficial y el profundo y que las menores diferencias fueron entre el sedimento medio y el profundo (Tabla 11). En la comunidad de bacterias no se aprecia una gran diferencia conforme la profundidad y las comunidades del sedimento, ciertos grupos aumentan y disminuyen, pero no de manera significativa. El análisis con ANCOM demuestra que estas diferencias se dan solo en taxones con poca abundancia, así como en las muestras que desde su colecta fueron las más estratificadas y que las muestra correspondientes a los primeros 6 cmbs son las más diferentes al resto de la columna de sedimento.

Tabla 11. Clases de bacteria diferencialmente abundantes entre las categorías del sedimento para todas las muestras y para los núcleos C11 y D18. Se muestra el resultado de la

comparación múltiple de la abundancia entre las clases y las secciones del sedimento. (nds: no hay diferencia significativa, *: $p < 0.005$ **: $p < 0.001$, $p < 0.0001$)

Clases de Bacteria	Sup vs Med	Sup vs Prof	Med vs Prof
<i>Aminicenantia</i>	**	***	ns
<i>Armatimonadetes; DG-56</i>	*	*	ns
<i>Entotheonellia</i>	ns	**	*
<i>Chlamydiae; LD1-PA32</i>	**	***	*
<i>Moduliflexia</i>	*	***	ns
<i>Nitrospira</i>	***	***	ns
<i>Planctomycetes; SPG12-343-353-B69</i>	*	*	ns
<i>Spirochaetia</i>	*	***	ns
<i>Acidobacteria; Subgroup_21</i>	***	***	*
<i>Chloroflexi; TK17</i>	ns	**	ns
Núcleo C11	Sup vs Med	Sup vs Prof	Med vs Prof
<i>Acidimicrobii</i>	*	***	*
<i>Gematimonadetes; AKAU4049</i>	ns	***	***
<i>Aminicenantia</i>	*	***	ns
<i>Entotheonellia</i>	**	***	*
<i>Rhodothermia</i>	ns	***	*
<i>Acidobacteria; Subgroup_21</i>	***	***	**
<i>Chloroflexi; TK17</i>	*	ns	*
Núcleo D18	Sup vs Med	Sup vs Prof	Med vs Prof
<i>Modulifelixia</i>	ns	*	**

Determinación de variables geoquímicas.

A las muestras de sedimento usadas para el análisis de su comunidad de microorganismos, se les aplicó una extracción ácida para después estimar la concentración total de metales mediante ICP-OES. Mediante esta metodología se logró determinar la concentración de 27 metales, boro y fósforo. Aparte de la medición de metales a las muestras también se les midió la concentración de sulfato nitrato y nitrito, conocidos aceptores de electrones. De todas estas variables geoquímicas el nitrito no se logró cuantificar debido a que la interferencia de algún componente de la muestra no se pudo remover por ningún método realizado. También, la plata fue el único metal que no se encontró mediante la cuantificación por ICP. Todos los valores se reportan en el anexo 5.

Los compuestos y metales más abundantes en todas las muestras fueron el sulfato, sodio, potasio y calcio con más de 1000 ppm en todas las muestras seguido del manganeso (Anexos 5.2 a 5.8) y boro este último sólo en muestras del núcleo A1 (Anexo 5.9). En contraste, metales como el berilio, cadmio, estroncio, selenio y antimonio, fueron los menos abundantes en todas las muestras (Anexo 5). El berilio solo se encontró en la muestra A1-20 a muy bajas concentraciones (menos de 0.01 mg/kg) y el cadmio solo en las muestra C11-10 y C11-28 también a bajas concentraciones (menos de 0.5 mg/kg) (Anexo 6.11).

El sulfato aparte de ser el compuesto con mayor concentración y se observó que aumentó su concentración conforme la profundidad en todos los núcleos (Anexo 5.2). Metales con altas concentraciones como el sodio, aluminio, hierro y calcio tuvieron una distribución similar en las muestras con una tendencia a disminuir conforme el aumento la profundidad en los núcleos C11 y D18 (Anexos 6.3, 6.4, 6.6 y 6.7)

Para explorar la distribución de las muestras conforme la concentración de los compuestos se realizó un análisis de coordenadas principales usando los valores de la cantidad de metales, sulfato, nitrato, pH y la profundidad de cada muestra, esta distribución resultó altamente dispersa. Las variables que más influyeron en la distribución de las muestras fueron el sulfato, y la profundidad. (Figura 37)

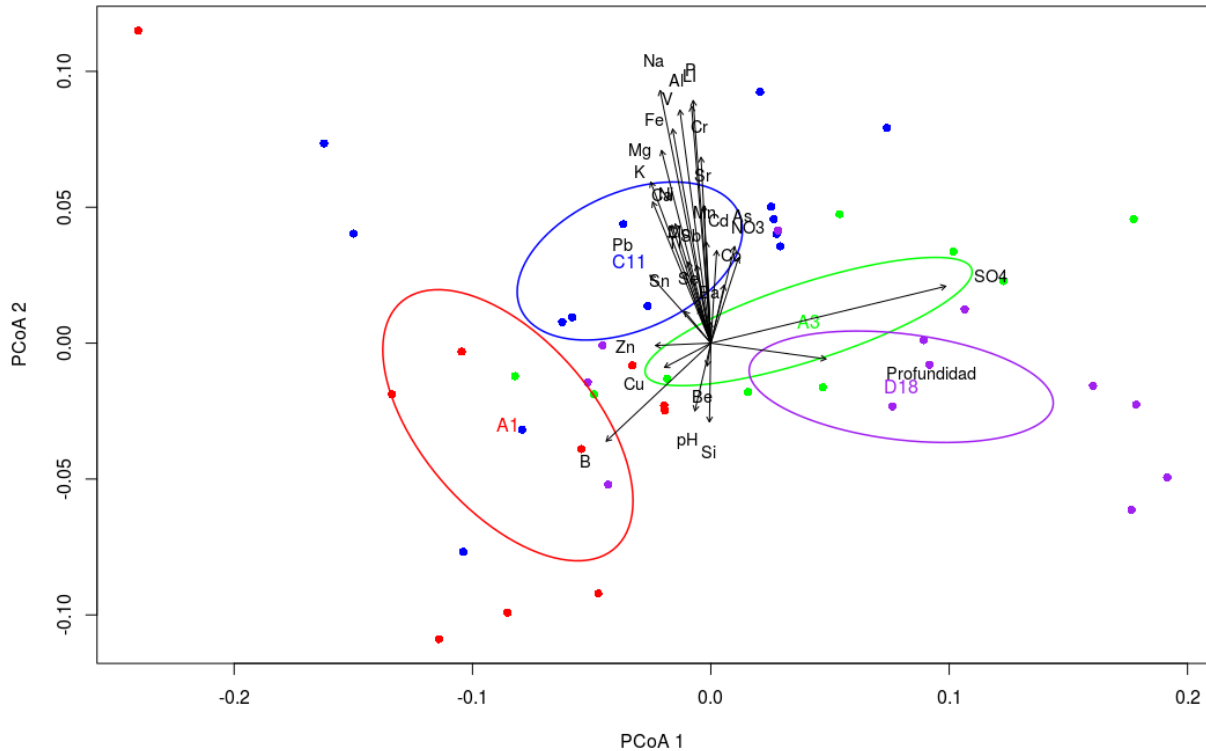


Figura 37. Análisis de coordenadas principales usando los 32 valores geoquímicos medidos. Las muestras se colocaron de acuerdo con el núcleo al que pertenecen y se representan los vectores.

Se observaron diversas características para cada núcleo. El que más dispersión presentó fue el núcleo A1, así como altas concentraciones de boro, cobre y zinc, estos dos últimos solo de los 8 a 19 cmbs (Muestra A1-10, Anexo). Las muestras de los núcleos D18 y A3 fueron las que mayor similitud tuvieron entre ellas y estos fueron los núcleos más parecidos por su concentración de sulfato y profundidad. Las muestras del núcleo C11 son las que reportaron una mayor concentración en la mayoría de los metales medidos (Figura 32).

El valor de pH de todas las muestras de sedimento fue básico (entre 7.5 hasta 8.6) y éste aumentó conforme la profundidad. En cambio, se observó que los núcleos menos profundos A1 Y C11 (877 m y 857 m respectivamente) el pH fue mayor que en D18, que en promedio fue el menos básico y A3 el cual tiene el valor de pH más constante a lo largo de la columna. (Anexo 5.10).

Los compuestos medidos parecen ser relativamente constantes a lo largo de la profundidad. Se realizó un ANOVA de dos vías comparando la concentración media de cada compuesto medido entre las tres categorías de sedimento (superficie, medio y profundo) (Tabla 5) para observar diferencias significativas en la columna de sedimento (Anexo 6). El resultado demostró que solo las concentraciones de sulfato cambian significativamente entre el sedimento de la superficie y el profundo, esto para todos los

núcleos. También hay diferencia en el sulfato en el núcleo C11 entre la superficie y el sedimento medio y en núcleo A3 entre el sedimento medio y profundo. En el núcleo A1 las concentraciones de sulfato fueron significativamente diferentes entre las tres categorías del sedimento. En este núcleo las concentraciones de sodio y potasio también presentaron diferencia significativa entre el sedimento de la superficie y el sedimento medio. Participación en otros proyectos

Para el estudio de las comunidades en el GOM se han realizado varias campañas de muestreo y monitoreo por el CIGOM. En la campaña realizada en marzo 2016, denominada malla fina 1 (MMF1) se definieron estaciones de muestreo en la zona de Perdido y “Campeche knolls”, mismas que se volvieron a muestrear en la campaña MET-02, (de donde se sacaron las muestras para este proyecto) de este muestreo se generaron algunos metagenomas” shotgun” de sedimento: A4 de la zona de perdido y D18 de “Campeche knolls”.

Participación en otros proyectos

Para el estudio de las comunidades en el GOM se han realizado varias campañas de muestreo y monitoreo por el CIGOM. En la campaña realizada en marzo 2016, denominada malla fina 1 (MMF1) se definieron estaciones de muestreo en la zona de Perdido y “Campeche knolls”, mismas que se volvieron a muestrear en la campaña MET-02 (de donde se sacaron las muestras para este proyecto), de este muestreo se generaron algunos metagenomas” shotgun” de sedimento: A4 de la zona de perdido y D18 de “Campeche knolls”. Fue con las secuencias de estos metagenomas con los que se decidió trabajar.

Búsqueda de genes marcadores de metabolismos de interés

Para estudiar no solo la taxonomía de las comunidades asociadas al sedimento, si no también metabolismos de interés biogeoquímico se usaron las secuencias de los metagenomas “shotgun” de sedimento para buscar la abundancia y taxonomía de genes de estas vías metabólicas. Se comenzó buscando genes marcadores de metabolismos que se sabe interactúan en poblaciones del sedimento marino (In’t Zandt et al., 2018, Jaffer et al., 2019, Meyer & Kuever, 2007 Kuypers, Marchant & Kartal, 2018, Acosta-González, Rosselló-Móra & Marqués, 2013, Kung, Meier, Mergelsberg & Boll, 2014 and Nie et al., 2014). Estos fueron: la metanogénesis y/o metanotrofia, sulfato-reducción, sulfato oxidación, fijación de nitrógeno, reducción de nitrato y nitrito, desnitrificación y algunos genes asociados a la degradación de hidrocarburos.

Se usó el programa GraftM (Boyd et al., 2018) para buscar secuencias homólogas de genes que participan en las vías metabólicas antes mencionadas. La búsqueda comenzó solo utilizando genes marcadores de las vías metabólicas, ya que se sabe que estos tienen una taxonomía definida y su presencia es clave para determinar si el metabolismo está presente, después se buscaron el resto de los genes que participan en las vías metabólicas.

Después de la búsqueda se encontró una diferencia en el número de homólogos encontrados entre los metagenomas, principalmente entre las vías de la metanogénesis, sulfatoreducción y degradación de hidrocarburos (Tabla 12).

Tabla 12. Número de homólogos encontrados de cada gen en ambos metagenomas Los genes considerados como marcadores de las vías metabólicas se encuentran resaltados.

Gen	Vía metabólica	A4	D18
<u>mcrA</u>	Metanogénesis/Metanotrofia	0	36
<u>mer</u>	Metanogénesis/Metanotrofia	11	907
<i>mtd</i>	Metanogénesis	49	9867
<i>Mch</i>	Metanogénesis	1135	1512
<i>Ftr</i>	Metanogénesis	1245	1620
<i>Fmd</i>	Metanogénesis	1751	1837
<i>mtrA</i>	Metanogénesis	128	1501
<i>Sat</i>	Sulfato reducción	15340	16922
<i>aprA</i>	Sulfato reducción	1645	20213
<u>dsrAB</u>	Sulfato reducción	260	20380
<u>soxB</u>	Sulfato oxidación	1950	1926
<u>narG</u>	Nitrato reducción	907	12174
<u>nifH</u>	Fijación de nitrógeno	345	1153
<u>nifK</u>	Fijación de nitrógeno	0	82
<u>nirK</u>	Reducción de nitrito	9513	3192
<u>nrfA</u>	Amonificación	952	427
<u>aliB</u>	Degradación de hidrocarburos anaerobia	6928	6281
<u>bssA</u>	Degradación de hidrocarburos anaerobia	4	1596
<u>alkB</u>	Degradación de hidrocarburos aerobia	1817	270

Los genes de la metanogénesis y metanotrofia y *nifK* fueron de los que menos homólogos se encontraron. Aun así, se observaron diferencias entre el sedimento de A4 y D18 para estos metabolismos, siendo D18 el que más genes de la metanogénesis presentó, aunque no una gran abundancia en los marcadores (Tabla 10. *mcrA* y *mer*). En los genes del metabolismo de sulfato fue donde más diferencias entre el número de homólogos se observó. En los genes *sat* y *soxB* el número de homólogos encontrados

fue similar, aumentando en el gen *aprA* y finalmente obteniendo un gran contraste para el gen marcador *dsrAB*. (Tabla 12). En cuanto a los marcadores del metabolismo de nitrógeno, las diferencias se dieron en los genes de la nitrato-reducción y fijación de nitrógeno, siendo D18 el que mayor homólogos presentó de estos. En cambio, en los procesos de fijación de nitrógeno y amonificación la muestra A4 fue en la que se encontraron más homólogos.

Para los genes marcadores de la degradación de hidrocarburos se encontraron grandes diferencias excepto en un gen marcador en donde el número de homólogos encontrados es muy similar (Tabla 12). El contraste más grande de este tipo de genes fue con el marcador *bssA* donde en D18 se observó una gran cantidad de homólogos encontrados a diferencia de A4, en cambio en A4 para el gen marcador *alkB* se encontraron muchos más homólogos que en D18.

Aparte de solo el número de secuencias parecidas a los genes de interés también se obtuvo la taxonomía asociada a los homólogos encontrados (Tablas 13, 14 ,15 y 16).

La taxonomía asociada a los genes de la metanogénesis y metanotrofia resultó en su mayoría relacionada con el phylum *Euryarchaeota* y clases metanogénicas como se esperaba. Fue solo en los genes que no son considerados marcadores de esta vía (*mtd*, *mcr*, *ptr* y *fmd*) y en A4 donde la mayoría de los taxones asociados fueron bacterias *Planctomycetes* y *Proteobacteria* y *Clostridiales*. (Tabla 13), siendo esta una de las grandes diferencias entre A4 y D18 aparte del número de homólogos encontrados de estas vías.

Tabla 13. Taxonomía asociada a los genes homólogos encontrados de la vía de la metanogénesis/metanotrofia.

Gen	Taxonomía asociada a A4	Taxonomía asociada a D18
<i>mcrA</i>		100% Euryarchaeota <ul style="list-style-type: none"> ● 33 % Methanobacteria ● 22 %Methanomicrobia ● 4% Methanococcales ● 4% Methaotrhoneales ● 37 % Sin clasificar
<i>mer</i>	99% Euryarchaeota 20% <ul style="list-style-type: none"> ● 20% Archeoglobaceae ● 16% Halobacteria ● 10%Methanomicrobia ● 2%Methanococcales 1%Sin dominio	68% Euryarchaeota <ul style="list-style-type: none"> ● 27% Archeoglobaceae ● 11% Halobacteria ● 9% Methanomicrobia 14% Arqueas sin clasificar 18% Sin dominio
<i>mtd</i>	94%Bacteria <ul style="list-style-type: none"> ● 6%Proteobacteria ● 94% Sin clasificar 6% Arquea	51 % Arquea <ul style="list-style-type: none"> ● 20% Euryarchaeota ● 14% Crenarchaeota ● 66% Sin clasificar

	<ul style="list-style-type: none"> ● 33% Euryarchaeota ● 67% No clasificadas 	49 % Bacteria
<i>mch</i>	<p>99% Bacteria</p> <ul style="list-style-type: none"> ● 33% Planctomycetes ● 16% Proteobacteria <ul style="list-style-type: none"> ○ 38% Alphaproteobacteria ○ 36% Gammaproteobacteria ○ 9% Betaproteobacteria ○ 16 % No clasificados ● 49% No clasificadas <p>1% Arquea</p>	<p>80% Arquea</p> <ul style="list-style-type: none"> ● 10 % Euryarchaeota ● 90% no clasificadas <p>20 % Bacteria</p> <ul style="list-style-type: none"> ● 36% Proteobacteria <ul style="list-style-type: none"> ○ 30% Alphaproteobacteria ○ 27% Gammaproteobacteria ○ 11% Deltaproteobacteria ○ 4% Betaproteobacteria ● 18% Planctomycetes ● 7 % Clostridiales ● 41% no clasificadas
<i>ftt</i>	<p>96% Bacteria</p> <ul style="list-style-type: none"> ● 52% Planctomycetes ● 18% Proteobacteria <ul style="list-style-type: none"> ○ 85% Gammaproteobacteria ○ 10% Alphaproteobacteria ○ 5% Sin clasificar ● 20% Sin clasificar 	<p>71% Arquea</p> <ul style="list-style-type: none"> ● 10% Euryarchaeota <ul style="list-style-type: none"> ○ 13 Methanomicrobia ○ 6% Methanobacteriales ○ 3 Archeoglobales ○ 2 Methanotruncarchaeales <p>22% Bacteria</p> <ul style="list-style-type: none"> ● 49% Proteobacteria ● 24% Planctomycetes ● 1% Clostridiales ● 26% no clasificado <p>7 % Sin dominio</p>
<i>fmd</i>	<p>71% Bacteria</p> <ul style="list-style-type: none"> ● 42% Proteobacteria <ul style="list-style-type: none"> ○ 62% Alphaproteobacteria ○ 12% Gammaproteobacteria ○ 7% Deltaproteobacteria ○ 19% Sin clasificar ● 24% Planctomycetes ● 34% Sin clasificar <p>21% Arquea</p> <ul style="list-style-type: none"> ● 69% Euryarchaeota ● 18% Thermoprotei ● 13% Sin clasificar <p>8% Sin dominio</p>	<p>49 % Arquea</p> <ul style="list-style-type: none"> ● 29 % Euryarchaeota <ul style="list-style-type: none"> ○ 24% Methanomicrobia ○ 8% Methanococcales ● 5% Thermoprotei <p>41% Bacteria</p> <ul style="list-style-type: none"> ● 45% Proteobacteria <ul style="list-style-type: none"> ○ 23% Gammaproteobacteria ○ 20% Alphaproteobacteria ○ 17% Deltaproteobacteria ● 20% Planctomycetes ● 35% no clasificadas <p>10% Sin dominio</p>
<i>mtrA</i>	<p>99% Euryarchaeota</p> <ul style="list-style-type: none"> ● 55% Methanomicrobia ● 21% Methanobacteriales ● 24% Sin clasificar <p>1% Sin dominio</p>	<p>91% Euryarchaeota</p> <ul style="list-style-type: none"> ● 37% Methanomicrobia ● 30% Methanobacteriales ● 5% Methanococcales <p>9% Arqueas sin clasificar</p>

Los resultados del metabolismo del sulfato no solo fueron contrastantes en cuanto al número de homólogos encontrados en los metagenomas sino también en la taxonomía

asociada a estos. En ambas muestras más del 95% de las secuencias corresponden a *Proteobacterias* de las cuales la diferencia principal es que en D18 existe una abundancia de *Deltaproteobacterias* y muy pocas *Alphaproteobacterias*, caso contrario a lo que sucede en A4. Esto se observó en todos los genes incluso en los que tuvieron un número de homólogos similar y es en el gen marcador *dsrAB* donde se observó el mayor contraste (Tabla 14). En cuanto al marcador de oxidación de sulfato, la abundancia de *Alphaproteobacterias* en A4 indica que el metabolismo dominante en ese sedimento es la oxidación del sulfato y en D18 la sulfatoreducción. Lo mayoría de las secuencias que se clasificaron como *Chloroflexi* no tuvieron una mayor clasificación

Tabla 14. Taxonomía asociada a los genes homólogos encontrados de la vía de la sulfatoreducción y oxidación de sulfato.

Gen	Taxonomía asociada a A4	Taxonomía asociada a D18
<i>Sat</i>	95% Bacteria <ul style="list-style-type: none"> ● 29% Proteobacteria <ul style="list-style-type: none"> ○ 36% Alphaproteobacteria ○ 11% Gammaproteobacteria ○ 6% Deltaproteobacteria ○ 2% Betaproteobacteria ○ 1% Otros. ○ 44% No clasificadas ● 22% Chloroflexi ● 6% Planctomycetes ● 4 % Firmicutes ● 39% Otros 5% Arquea <ul style="list-style-type: none"> ● 28% Euryarchaeota <ul style="list-style-type: none"> ○ 71% Archeoglobales ○ 29% No clasificadas ● 2% Crenarchaeota ● 2% Otros %68% No clasificadas	91% Bacteria <ul style="list-style-type: none"> ● 28% Proteobacteria <ul style="list-style-type: none"> ○ 63% Deltaproteobacteria ○ 23% Gammaproteobacteria ○ 3% Alphaproteobacteria ○ 2% Otros ○ 9% No clasificadas ● 16% Chloroflexi ● 5% Firmicutes ● 4% Planctomycetes ● 15% Otros ● 32% No clasificadas 7% Arquea <ul style="list-style-type: none"> ● 40% Euryarchaeota <ul style="list-style-type: none"> ○ 38% Thermoplasmata ○ 20% Archaeoglobales ○ 42% No clasificadas ● 10% Thaumarchaeota ● 4% Crenarchaeota ● 46% No asignadas 2% Sin dominio
<i>aprA</i>	95% Bacteria <ul style="list-style-type: none"> ● 75% Proteobacteria <ul style="list-style-type: none"> ○ 26% Alphaproteobacteria ○ 3% Gammaproteobacteria ○ 4% Otros ○ 67% No clasificadas ● 14% Chloroflexi ● 2% Otros ● 9% No clasificadas 1% Arquea <ul style="list-style-type: none"> 90% Euryarchaeota 10% No clasificadas 	98% Bacteria <ul style="list-style-type: none"> ● 47% Proteobacteria <ul style="list-style-type: none"> ○ 75% Deltaproteobacteria ○ 9% Gammaproteobacteria ○ 2% Alphaproteobacteria ○ 2% Otros ○ 12% Sin clasificar ● 11% Nitrospirae ● 3% Chloroflexi ● 2% Clostridia ● 6% Otros ● 31% Sin clasificar

	4 % Sin dominio	2% Sin dominio
<u>dsrA</u> <u>B</u>	97% Proteobacteria <ul style="list-style-type: none"> ● 90% Gammaproteobacteria ● 7% Alphaproteobacteria ● 1% Betaproteobacteria ● 2% Sin clasificar 3% Bacteria sin clasificar	85% Proteobacteria <ul style="list-style-type: none"> ● 55% Deltaproteobacteria ● 7% Gammaproteobacteria ● 2% Alphaproteobacteria ● 36% Sin clasificar 11% Nitrospirae 1% Chlorobi 3% Bacteria sin clasificar
<u>soxB</u>	94% Proteobacteria <ul style="list-style-type: none"> 57% Alphaproteobacteria 17% Gammaproteobacteria 2% Otros 24% No clasificadas 1% Rokubacteria 5% Bacterias sin clasificar	93% Proteobacteria <ul style="list-style-type: none"> ● 63% Gammaproteobacteria ● 16% Alphaproteobacteria ● 4% Epsilonbacteria ● 3% Betaproteobacteria ● 14% Sin clasificar 2% Otros 5% Bacteria sin Clasificar

En cuanto a la reducción de nitrato aun cuando el contraste fue en el número de homólogos encontrados (Tabla 15) la taxonomía es muy similar entre A4 y D18, la diferencia principal es lo mismo que en la sulfatoreducción (mayor población de *Deltaproteobacterias* en D18 y pocas *Alphaproteobacterias*) (*narG* – Tabla 13). Respecto a la taxonomía asociada a los genes de la fijación de nitrógeno esta fue muy parecida entre A4 y D18, tanto para arqueas como bacterias por lo que este metabolismo parece ser llevado a cabo por taxones similares en dos zonas del GoM con diferencia en el tamaño de su población (Tabla 15).

Tabla 15. Taxonomía asociada a los genes homólogos encontrados del metabolismo del nitrógeno.

Gen	Taxonomía asociada a A4	Taxonomía asociada a D18
<u>narG</u>	85% Bacteria <ul style="list-style-type: none"> ● 18% Proteobacteria <ul style="list-style-type: none"> ○ 27% Alphaproteobacteria ○ 21% Gammaproteobacteria ○ 11% Deltaproteobacteria ○ 10% Betaproteobacteria ○ 30% Sin clasificar ● 17% Ignivibacteria ● 11% Actinobacteria ● 8% Firmicutes ● 3% Bacteroidetes ● 43% Sin clasificar 7% Arquea <ul style="list-style-type: none"> ● 69% Thermoprotei ● 31% Euryarchaeota 9% Sin dominio	92% Bacteria <ul style="list-style-type: none"> ● 29% Proteobacteria <ul style="list-style-type: none"> ○ 40% Gammaproteobacteria ○ 24% Deltaproteobacteria ○ 11% Alphaproteobacteria ○ 3% Otros ○ 21% No clasificados ● 10% Ignavibacteria ● 8% Firmicutes ● 7% Actinobacteria ● 4% Bacteroidetes ● 43% No clasificados 3% Arquea <ul style="list-style-type: none"> ● 85% Thermoprotei ● 15% Euryarchaeota 5% Sin dominio
<u>nifH</u>	41% Bacteria	40% Bacteria

	<ul style="list-style-type: none"> ● 74% Firmicutes ● 1% Betaproteobacteria ● 25% Sin clasificar 16% Arquea <ul style="list-style-type: none"> ● 98% Euryarchaeota ● 2% Sin clasificar 43% Sin dominio	<ul style="list-style-type: none"> ● 52% Firmicutes ● 2% Deltaproteobacteria ● 46% Sin clasificar 22% Arquea <ul style="list-style-type: none"> ● 95% Euryarchaeota ● 5% Methanocellales 38% Sin dominio
<u>nifK</u>		87% Bacteria <ul style="list-style-type: none"> ● 42% Deltaproteobacteria ● 65% Firmicutes ● 4% Nitrospirae ● 3% Actinobacteria ● 45% Sin clasificar 9% Archaea <ul style="list-style-type: none"> ● 100% Methanosarcinales 4% Sin dominio
<u>nrfA</u>	14% Proteobacteria <ul style="list-style-type: none"> ● 42% Deltaproteobacteria ● 25% Gammaproteobacteria ● 9% Oligoflexia ● 5% Alphaproteobacteria 14% Planctomycetes 5% Verrucomicrobia 4% Actinobacteria 3% Chloroflexi 11% Otros 49% Bacterias sin clasificar	192% Bacteria <ul style="list-style-type: none"> ● 20% Planctomycetes ● 15% Proteobacteria <ul style="list-style-type: none"> ○ 71% Deltaproteobacteria ○ 10% Gammaproteobacteria ○ 5% Campylobacterales ○ 14% Sin clasificar ● 11% Chloroflexi ● 7% Bacteroidetes ● 4% Lentisphaerae ● 4% Otros ● 39% Sin clasificar 1% Archaea 7% Sin dominio
<u>nirK</u>	19% Cu-resistant 17% Multi-Cu-oxidase-clade-5 13% Experimental characterized 8% nirK group 3 7% nirK group 1 5% multicopper clade 6 12% Otros 5% Archaea (multi-copper oxidase) 12% Sin clasificar	27% Cu-resistant 14% Multi-Cu-oxidase-clade-6 13% Multi-Cu-oxidase-clade-5 13% % Multi-Cu-oxidase-clade-1 4% Nir-like group-3 13% Otros 4% Archaea (multi-copper oxidase) 16% Sin clasificar

Con el gen marcador de amonificación fue donde más *Deltaproteobacterias* se encontraron en A4, aunque no tanto porcentaje como en D18. Con este marcador la taxonomía entre ambas muestras es similar siendo las *Proteobacteria* y *Planctomycetes* los taxones más representativos de este gen en ambas muestras. El sedimento de D18

aun sin presentar tantos homólogos encontrados fue el único de los dos en donde se encontró *Chloroflexi* y *Arquea*.

La taxonomía de los genes de la reducción de nitrito aún no se encuentra bien definida. Esto debido una gran homología entre las secuencias del paquete generado, por lo que los homólogos que se encontraron corresponden dieron a superfamilias de la proteína o grupos caracterizados experimentalmente (Tabla 15). Aun así, se observaron diferencias entre los dos sedimentos, donde en D18 la mayoría de los grupos corresponde diferentes clados de oxidasas “Multi-Cu” y en A4 solo al clado 5. También en A4 se encontraron más homólogos asociados a grupos nirk a diferencia de los grupos nirk-like en D18.

En los genes marcadores de degradación de hidrocarburos se observaron grandes diferencias en dos de los tres genes buscados. El gen de la acyl-CoA deshidrogenasa (*aliB*) de degradación de ciclohexanos, aun cuando en ambos metagenomas se encontraron números similares de homólogos su taxonomía es un poco diferente. Todas las secuencias correspondieron a *Proteobacterias* repartidas en tres órdenes, en donde en A4 se observó más *Alphaproteobacterias* que en D18 en donde son las menos (Tabla 16). El contraste entre los metagenomas se observó en los genes *bssA* (bencilsuccinato sintasa) y *alkB* (Alcano 1-monooxigenasa) no solo en el número de homólogos, también en la taxonomía asociada. En cuanto al *bssA*, este gen marcador posee una gran cantidad de secuencias homologas y variaciones, por lo cual se encuentra distribuido en varios grupos anaerobios degradadores de hidrocarburos, En D18 la mayoría de las secuencias correspondieron a *Proteobacterias* mientras que en A4 solo dos de las cuatros secuencias correspondieron a *Proteobacterias*.

Tabla 16. Taxonomía asociada a los genes homólogos encontrados de marcadores degradación de hidrocarburos.

Gen	Taxonomía asociada a A4	Taxonomía asociada a D18
aliB	100% Proteobacteria <ul style="list-style-type: none"> ● 22% Alphaproteobacteria ● 19% Betaproteobacteria ● 17% Gammaproteobacteria ● 42% Sin clasificar 	100% Proteobacteria <ul style="list-style-type: none"> ● 26% Betaproteobacteria ● 16% Gammaproteobacteria ● 14% Alphaproteobacteria ● 44% Sin clasificar
<u>bssA</u>	50% Proteobacteria 50% Bacterias sin clasificar	77% Proteobacteria 3% Desulfosporinus 21% Bacterias sin clasificar
<u>alkB</u>	87% Proteobacteria <ul style="list-style-type: none"> ● 37% Deltaproteobacteria ● 33% Gammaproteobacteria ● 5% Alphaproteobacteria ● 1% Betaproteobacteria ● 24% Sin clasificar 	80% Proteobacteria <ul style="list-style-type: none"> ● 64% Gammaproteobacteria ● 6% Alphaproteobacteria ● 1% Betaproteobacteria ● 11% Sin clasificar 3% Bacteroidetes

	2% Actinobacteria 11% Bacterias sin clasificar	2% Actinobacteria 15% Bacterias sin clasificar
--	---	---

En el gen marcador de la degradación de hidrocarburos aerobia *alkB* fue el único gen en donde se encontró una mayor cantidad de *Deltaproteobacterias* en A4 que en D18 donde la mayoría de las secuencias se clasificaron como *Gammaproteobacterias*.

Los resultados de los genes degradadores de hidrocarburos junto con los genes de reducción de aceptores de electrones orgánicos indican que es posible que una diferencia entre los metagenomas sea una metabolismo anaerobio dominante en D18 a diferencia de A4 donde la degradación de hidrocarburos puede estar llevada a cabo en gran parte por organismos aerobios.

Estos resultados, si bien son parte de los objetivos planteados para este trabajo el análisis de estos se agregó como parte de una publicación (Raggi et al., 2020). En donde estos datos se trabajaron y procesaron de manera más profunda en conjunto con más muestras de sedimento y columna de agua.

ORIGINAL RESEARCH ARTICLE

Front. Microbiol., 11 August 2020 | <https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.01825>



Metagenomic Profiling and Microbial Metabolic Potential of Perdido Fold Belt (NW) and Campeche Knolls (SE) in the Gulf of Mexico

Luciana Raggi^{1,2†}, Fernando García-Guevara^{1†}, E. Ernestina Godoy-Lozano^{1,3}, Adrian Martínez-Santana¹, Alejandra Escobar-Zepeda¹, Rosa María Gutierrez-Rios¹, Antonio Loza¹, Enrique Merino¹, Alejandro Sanchez-Flores¹, Alexei Licea-Navarro⁴, Liliana Pardo-Lopez¹, Lorenzo Segovia^{1*} and Katy Juarez^{1*}

¹Instituto de Biotecnología, Universidad Nacional Autónoma de México, Cuernavaca, Mexico

²CONACYT-Laboratorio de Biotecnología Acuicola, Instituto de Investigaciones Agropecuarias y Forestales, Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo, Morelia, Mexico

³Centro de Investigación Sobre Enfermedades Infecciosas, Departamento de Bioinformática en Enfermedades Infecciosas, Instituto Nacional de Salud Pública, Cuernavaca, Mexico

⁴Laboratorio de Inmunología Molecular y Biotoxinas, Departamento de Innovación Biomedica, CICESE, Ensenada, Mexico

Discusión

Se encontró una enorme diversidad de bacterias que habitan en el fondo marino y haciendo uso de amplicones dirigidos específicamente al gen 16s de arquea se identificó una diversidad, que no había sido antes reportada en los sedimentos del GoM. Esta diversidad de arqueas se observó fuertemente afectada (en la taxonomía y en los índices de diversidad) por la profundidad a la que se encontrara el sedimento (cmbs) siendo dominada en los primeros 6 cm por casi solo un taxón, las arqueas *Nitrosopumilales*, las cuales disminuyeron en su abundancia conforme la profundidad del estrato aumenta, y las poblaciones de *Bathyarcheia*, *Lokiarcheia*, *Thermoplasmata* y *Nanoarchea* aumentaron en el sedimento profundo. En cuanto a las poblaciones de bacterias, los índices de diversidad y número de ASVs no se vieron tan afectados por la profundidad del estrato, como lo observado en las arqueas. Los phyla dominantes en todas las muestras fueron *Proteobacteria*, *Chloroflexi*, *Planctomycetes* y *Acidobacteria*, todos estos antes reportados como dominantes en los sedimentos en varios trabajos (Barcenos, 2018, Vigneron et al., 2017, Joye, 2020, E. Godoy-Lozano et al., 2018, Sánchez-Soto Jiménez et al., 2018, Ramírez et al., 2020)

La mayoría de los sedimentos del GoM no se observaron muy diferentes en cuanto a su composición geoquímica, aunque se observó gran variabilidad y dispersión entre la concentración de algunos metales. En general, la concentración de los metales en el núcleo A1 fue en donde se observó mayor dispersión. También este núcleo fue el que más boro presentó, así como cobre y zinc, en particular en la muestra A1-10. Las muestras pertenecientes al núcleo C11 se caracterizaron por tener ligeramente una mayor concentración de metales y nitrato que el resto. Las muestras de D18 y A3, aun siendo de diferentes zonas del GoM, fueron similares, muy probablemente por ser muestras profundas (más de 1000 m) y tener alta concentración de sulfato.

Bacterias en el sedimento del GoM

Entre todas las muestras se clasificaron 51 phyla, 109 clases, 209 órdenes, 222 familias y 201 géneros y entre los cuatro núcleos se comparten 41 phyla, 82 clases, 136 órdenes, 111 familias y 55 géneros lo que indica que existe un “core genome” similar a niveles taxonómicos no tan profundos y la diversidad comienza a cambiar pasando el nivel de clase aproximadamente.

El alto número de ASVs e índices de diversidad alfa indican que la comunidad de bacterias es altamente diversa (Anexos 3.2 y 3.2), con un gran número de diferentes bacterias y poca dominancia por parte de alguna en la mayoría de las muestras. Sin embargo, esta diversidad se encontró en su mayoría representada por los phyla de *Proteobacteria*, *Chloroflexi*, *Planctomycetes*, *Acidobacteria* y *Rokubacteria*. Con estos cinco phyla se representó casi el 80% de la abundancia relativa en todas las muestras

(Figura 24) y no se observó algún cambio o disminución considerable en la abundancia de estos phyla con respecto a la profundidad. Esta taxonomía es reconocida como característica del sedimento marino (Godoy-Lozano et al., 2018, Vigneron et al., 2017, Sánchez-Soto Jiménez et al., 2018), con la diferencia del resto de la literatura que el phylum *Rokubacteria* antes conocido como NC10 ha sido reportado una sola vez en muestras del GoM, al menos en territorio mexicano (Sánchez-Soto Jiménez et al., 2018), debido a que su clasificación aún no se aceptaba y por lo observado en las muestras este taxón debería de formar parte de la taxonomía característica de sedimentos marinos del GoM.

Las diferencias entre los núcleos se comenzaron a encontrar a nivel de clase, sobre todo en la proporción de los taxones encontrados, más que en la diferencia de grupos taxonómicos. Las *Gammaproteobacterias* fueron la clase más abundante en los núcleos de Perdido, en cambio, en la zona de “Campeche knolls” se encontraron *Dehalococcoida*, *Deltaproteobacteria*, *Phycisphaerae* y NC10 como clases abundantes en vez de solo *Gammaproteobacteria* (más del 50%). Generalmente se ha reportado a *Gammaproteobacteria* como la clase más abundante en sedimentos del GoM (Sánchez-Soto Jiménez et al., 2018, Godoy-Lozano et al. 2018, Overholt et al., 2019) y en muestras profundas (debajo de los 1000 m), su población es aún mayor por lo que parece que las muestras de “Campeche knolls” en este trabajo presentan alguna característica diferente a lo reportado comúnmente. Las poblaciones de *Deltaproteobacteria* en el fondo marino son reconocidas por abundar en zonas donde existe una buena concentración de hidrocarburos y sulfato (Vigneron et al., 2017, Davidova et al., 2018). Interesantemente, en la zona de “Campeche knolls” se han reportado sitios donde hay filtrado de hidrocarburos (McDonald et al., 2015, Godoy-Lozano et al., 2018) por lo que se puede observar un aumento en la población de *Deltaproteobacterias* y *Dehalococcoida* puede ser por que se trate de degradadores de hidrocarburos (Xiao, Jiang, Chen & Xu, 2020). En C11 y D18 puede estar relacionado con estos sitios de filtrado. En cuanto a las poblaciones de *Gammaproteobacterias* en este ambiente son reconocidas por mantener procesos como la oxidación del azufre (B. Jørgensen et al., 2019, Lenk et al., 2010), y fijación de carbono, principalmente por la asimilación de acetato y de materia orgánica proveniente de la columna de agua (“marine snow”) (Dyksma, Lenk, Sawicka, & Mußmann, 2018, Dyksma et al., 2016). La diferencia en la taxonomía también puede involucrar un cambio en los metabolismos y procesos asociados al sedimento de cada sitio y este cambio se pudo observar a nivel de clase con la diferencia en las abundancias de los grupos taxonómicos encontrados de bacteria.

La comunidad encontrada en el núcleo A1 fue la que presentó características más irregulares en comparación con los otros núcleos. La abundancia de las *Gammaproteobacterias* fue la más alta (casi un 75% en unas muestras) (Figura 25). Esta clase fue representada en su totalidad por los órdenes de *Alteromonadales* y en las muestra donde este no abundó, se encontró *Pseudomonadales* o *Enterobacteriales* (Figura 27). El 90% de la abundancia de estos órdenes correspondió a un solo género

Moritella, *Pseudomonas* y *Klebsiella*, respectivamente. De todas las muestras de este trabajo, solo en algunas correspondientes al núcleo A1 se observó que la población de un género fuera muy alta correspondiendo al 70% de la abundancia relativa en ciertas de las muestras (A1-BAC-2,10, 12, 14, 16) y mínimo un 20% en el resto. Tampoco se observó algún patrón definido entre la competencia de *Moritella* y *Pseudomonas* o *Klebsiella*. En el sedimento superficial la abundancia de la *Alteromonadales* se reparte entre *Moritella* y *Colwellia*, y conforme se incrementó la profundidad, *Pseudomonas* tuvo una población alta hasta el estrato de los 8 a 10 cmbs donde, disminuyó y *Moritella* aumentó su población hasta los 20 cmbs. En cuanto a los valores geoquímicos es justo en ese estrato donde la cantidad de Ca, Cu y Zn aumentan drásticamente, y a los 20 cmbs donde el B disminuye considerablemente por lo que es probable que las abundancias de estos tres géneros puedan estar relacionadas con la concentración de estos metales. De estos tres géneros *Moritella* es conocida por ser una bacteria completamente adaptada a ambientes psicrófilos y piezófilos (Urakawa, 2014), tal como lo es el fondo del GoM con altas presiones y temperaturas de 0 a 4°C, por lo que es probable que le sea mucho más fácil crecer a este género que a *Pseudomonas* y *Klebsiella* (Romanenko, Tanaka, Svetashev & Mikhailov, 2015, Sharma, Balkwill, Frenkel & Vairavamurthy, 2000). Las *Pseudomonas* poseen una amplia versatilidad metabólica y son capaces de usar nitrato y nitrito como aceptores de electrones (Arai, 2011, Scala & Kerkhof, 1998) por lo que su aumento poblacional puede estar relacionado con estos compuestos y a su versatilidad metabólica, así como las *Klebsiella* y su variada capacidad fermentativa (Zhou et al., 2015).

que tiene una amplia versatilidad metabólica para contender con varias variables ambientales, pero no están adaptadas a un ambiente específico como *Moritella*.

El núcleo A3 presentó una diversidad medianamente constante a lo largo de todas sus muestras con pocas variaciones entre las clases dominantes. Se observó la misma relación de *Moritella* y *Pseudomonas*, ya que es en la superficie donde *Moritella* tuvo una población alta (15% aprox.) de los 2 a los 8 cmbs, mientras que la población de *Pseudomonas* fue la más abundante (25% aprox.) a partir de los 8 hasta el fondo (excepto en el estrato 14-16). En este núcleo se observó una población más grande de la familia de *Methylomirabilaceae* (representante del phylum *Rokubacteria*) coocurriendo con *Moritella* a diferencia de A1 donde su población fue mínima. Por lo que es posible agrupar a los 0 a los 8 cmbs como muestras similares con baja población de *Pseudomonas* y mayor población de NB1-J (*Deltaproteobacteria*), *Moritella* y *Methylomirabilaceae*. Mientras que el resto de la columna se mantuvo similar (8 a 18 cmbs) con *Pseudomonas* como un género muy abundante y dominante.

En las muestras de “Campeche knolls” las características comunes fueron, una alta diversidad en todas las muestras, baja abundancia de *Gammaproteobacterias* y una abundancia alta de las clases de *Dehalococcoidia* y *Deltaproteobacterias*. No se observó algún género dominante en la comunidad como en la zona de Perdido. Tanto en el núcleo

C11 y D18 la población de las *Dehalococcoidia* aumento conforme la profundidad de cada muestra y en C11 llegó a representar casi el 20% de la población desde los 18 hasta los 28 cmbs. En estos núcleos se encontró una mayor población de NC10, y en ambos su población disminuyó conforme la profundidad (como lo observado en A3, pero más gradual), y en cambio la clase de las *Anaerolineae* aumentó.

Los géneros dominantes de Perdido en estas muestras (C11 y D18) no tuvieron una alta población y *Pseudomonas* fue prácticamente inexistente (entre el 1.5% o menos de abundancia relativa), aun así, se pudo percibir que mantuvieron la misma relación. En C11 la población de *Moritella* creció un poco en las muestras profundas, a partir de los 16 cmbs su abundancia incremento de menos del 1% en a un promedio de 15% entre los 16 a 24 cmbs, mientras que *Klebsiella* solo abundó en las muestras C11-4, 8 y 12 justo donde *Moritella* no abundo.

El núcleo D18 es interesante debido a varias razones, pues es el que más muestras diversas tuvo, en donde menos *Moritella* se encontró (solo en las dos muestras finales con 5% aprox.)- El género más abundante (11% aprox.) fue el taxón wb1-A12 de las *Methylomirabilaceae* que también disminuyó conforme su profundidad, y no coocurió con *Moritella* como en C11. En este núcleo el segundo género más abundante fue el Urania-1B-19 de las *Phycisphaeraceae*. De este sitio de colecta se tiene la taxonomía de un año antes, así como un metagenomas que se analizó en este trabajo. La comunidad de bacterias se caracterizó por tener una alta abundancia de *Deltaproteobacterias* y *Anaerolineae* (Raggi et al., 2020) y por lo visto en el análisis del metagenoma, la población tuvo un alto potencial metabólico asociado a la reducción de sulfato, degradación anaeróbica de hidrocarburos, nitrato-reducción y un poco del metabolismo del ciclado de carbono (metanogénesis y la vía de Wood-Ljudenhal) correspondiendo a la taxonomía encontrada. Sin embargo, aproximadamente un año después (Marzo 2016 a Mayo 2017) la taxonomía no es la misma. En estas muestras los primeros cmbs también tuvieron una alta cantidad de *Deltaproteobacterias*, pero mayor población de *Dehalococcoidia* y algo que no se observó antes, mas *Alphaproteobacterias*, las cuales no se observaron en el sitio D18 un año antes (Raggi et al., 2020). Debido a la sucesión ecológica, al consumirse o cambiar la materia orgánica y fuentes de energía del sedimento, la comunidad se ve afectada, por lo que organismos degradadores de materia orgánica (*Dehalococcoidia*) y productores de sulfato (*Alphaproteobacterias*), aumentan su población como se observó en estas muestras.

Arqueas en el sedimento del GoM

Actualmente existen 27 phyla propuestos en la taxonomía de arqueas (Baker et al., 2020), entre todas las muestras analizadas en este trabajo solo se encontraron siete en todos los núcleos. La diversidad de arqueas encontrada fue muy baja en comparación

con la de bacterias y no solo es menos diversa si no que no se tiene una clasificación con mayor profundidad. Aparte de los siete phyla encontrados se logró clasificar 14 clases, y 31 órdenes. A nivel de orden la mitad de las ASVs no se clasificó más que como algún tipo de arquea no clasificada o no cultivable perteneciente a una clase, a niveles más profundos sólo muy pocas ASVs tuvieron una buena clasificación. Esto era de esperarse debido al estado actual de la taxonomía de arqueas (Baker et al., 2020, Hug et al., 2016)., la falta de información de este dominio en las bases de datos de 16s y que en este trabajo se utilizó solo el fragmento “forward” para las secuencias de arquea teniendo una longitud menor para contrastar contra la base de datos.

Aun con todas estas características los resultados de la asignación taxonómica fueron los suficientes para apreciar cambios interesantes en la comunidad de arqueas. En todo los núcleos la diversidad aumentó conforme la profundidad del sedimento, este pasa de ser dominado por *Thaumarchaeota*, de la clase *Nitrososphaeria* a repartirse la abundancia entre *Lokiarchaeia*, *Nanohaloarchaeia*, *Bathyarchaeia* y *Thermoplasmata*. Interesantemente, en todos los núcleos se observó que el mismo cambio drástico en la taxonomía sucedió entre los 6 a 8 cmbs sin importar a qué zona perteneciera el núcleo.

En la zona de Perdido fue donde más *Nitrososphaeria* se encontró, en particular en las muestras de A3 donde la disminución en la población de *Thaumarchaeota* conforme la profundidad fue la menor de todos los núcleos. También en estas muestras se observó que las *Bathyarchaeia* una de las clases abundantes después de los 6 cmbs en otras muestras tuvo una abundancia muy baja en A3, y solo las *Thermoplasmata*, *Lokiarchaeia* y *Nanohaloarchaeia* se observan aumentar su población, pero poco en comparación a los de más núcleos. En cambio, en el núcleo A1 pasando los 6 cmbs la población de *Nitrososphaeria* correspondió a menos del 50% y las *Bathyarchaeia* fueron la segunda clase más abundante, mientras que las *Thermoplasmata* no pasaron del 10% de la abundancia relativa. En este núcleo, al igual que en la comunidad de bacterias entre los 16 a 18 cmbs, la diversidad cambió drásticamente, donde las *Nitrososphaeria* regresaron a dominar la población y la diversidad disminuyó mucho, contrario a lo que se ve en bacterias donde la diversidad aumentó drásticamente (Figura 16).

Las muestras de la zona de “Campeche knolls”, al igual que en la taxonomía de bacterias se observaron más estratificadas en comparación a las de Perdido, con mayor abundancia de los taxones que incrementan, cuando las *Thaumarchaeota* disminuyen, y también una población más grande del phylum *Hydrothermarchaeota* en ambos núcleos. En el núcleo C11 las poblaciones de *Thermoplasmata*, *Bathyarchaeia* y *Nanohaloarchaeia* fueron más altas que en los demás núcleos y su aumento se dio de manera escalonada conforme a la profundidad, así como a la disminución de *Nitrososphaeria*. También en este núcleo fue donde más *Hydrothermoarchaeota* se encontró y se mantuvo constante a lo largo de la columna de sedimento, pero solo abunda después de los 6 cmbs. En las muestras de D18 la distribución de la comunidad fue irregular en comparación a los demás núcleos. Si se da una disminución de la población de *Nitrososphaeria* y un aumento de las *Thermoplasmata* y arqueas MBG-A

(Marine Benthic Group A) después de los 6 cmbs, pero en mucha menor proporción que en los demás núcleos. En este núcleo, de los 10 a los 12 cmbs, se observó un incremento drástico en la población *Bathyarchaeia* (36% de la abundancia relativa) y sólo en esta muestra la población de esta arqueas pasa del 4 %. Después de este cambio las *Lokiarchaeia* tuvieron una alta abundancia (mayor que los demás núcleos) y no las *Thermoplasmata* mientras que la población de *Nitrosophaeria* aumento poco a poco conforme la profundidad a diferencia de lo observado en otras muestras.

En todos los núcleos alrededor de la mitad de la familia de *Nitrosopumilaceae* se clasificó como *Candidatus Nitrosopumilus*, tanto la familia, como el género propuesto, corresponden a arqueas distribuidas globalmente en el sedimento marino que sobrevive gracias a su metabolismo quimiolitótrofo es capaz de oxidar amonio (Walker et al., 2010). La disminución en su población en diferentes puntos del GoM es peculiar puesto que estas arqueas tienen un metabolismo específico para sobrevivir en el sedimento marino. Es factible que algún compuesto aumente o disminuya pasando esta profundidad para que la población de estas arqueas se vea afectada y los otros taxones puedan aumentar su población. Un ejemplo puede ser el amonio, la principal fuente de energía de *Candidatus Nitrosopumilus*, el cual puede haberse consumido pasando los 8 cmbs. Otra razón para el aumento en las demás clases de arquea es el tipo de materia orgánica que hay en el sedimento profundo, esta materia degradada incompletamente es suficiente para que taxones con capacidades metabólicas diversas como las *Bathyarchaeia* y *Lokiarchaeia* (Zhou, Pan, Wang, Gu & Li, 2018, Seitz et al., 2019) puedan crecer a esas profundidades. Cabe resaltar que el encontrar grupos de *Lokiarchaeia* en el GoM en este trabajo corresponde a lo reportado antes como característico de la comunidad de arqueas en el GoM (Hoshino et al., 2020) y su aumento en el sedimento profundo de D18 también correlaciona con su capacidad de degradación de hidrocarburos (Seitz et al., 2019) y cercanía de la zona a sitios de filtrado de hidrocarburos (McDonald et al., 2015).

Taxones y variables geoquímicas

Se determinó una gran cantidad de valores sobre la concentración de metales y compuestos aparte de la profundidad y el pH de los sedimentos. La diversidad de bacterias en el sedimento es muy alta y con poca dominancia por parte de algún taxon (excepto en el núcleo A1), es difícil determinar qué taxón es el más importante o abundante para investigar su relación con las variables medidas. Sin embargo, después de analizar la taxonomía se determinó que los taxones relevantes debido a su abundancia observada, o metabolismo reportado en la literatura fueron: *Moritella*, *Pseudomonas*, *Klebsiella*, *Colwellia*, *Dehalococcoidia*, *Anaerolineae*, *Alphaproteobacteria*, el género representantes de las NC10 *Rokubacteria* nombrado wb1A-12 (por lo observado en la zona de “Campeche knolls”), el género *Woeseia* por estar en todas las muestras y también se eligió a las tres clases más abundantes *Gamma*, *Delta* y *Alphaproteobacteria*, por su abundancia y aparición en los

anteriores. Para la asignación taxonómica de arqueas, fue más sencillo elegir a los taxones basándose solo en la abundancia. Estas fueron las clases *Nitrosopumilaceae*, *Lokiarchaeia*, *Thermoplasmata*, *Nanohaloarchaeia*, *Bathyarchaeia* y MBG-A.

Con las variables geoquímicas y los taxones elegidos se buscó una correlación entre los valores medidos y la abundancia de los taxones elegidos usando una regresión lineal múltiple ajustada usando la correlación de Spearman (Tablas 8 y 9). Si bien no toda correlación lineal significa una interacción y en el ambiente se observan que las relaciones no son siempre lineales, este es un buen acercamiento para poder elucidar si existe alguna interacción entre los taxones y algún compuesto o condición medida.

En general se observaron pocas correlaciones en los taxones elegidos y muchas de estas con un coeficiente bajo o con una no aparente interacción entre el metal y el taxón. De los phyla encontrados *Proteobacteria* fue quien tuvo más correlaciones, estas con un coeficiente muy bajo (Anexo 7) excepto con el Sr, pero este metal no presentó un cambio aparente entre las muestras. *Planctomycetes* y *Acidobacteria* no presentaron alguna correlación, algo recíproco con lo observado en su población que se mantuvo constante a lo largo de la columna de sedimento (exceptuando al núcleo A1, que fue el más irregular). Las correlaciones que si hacen más sentido se observaron en *Rokubacteria* con dos correlaciones negativas, con la profundidad lo cual era de esperarse debido a lo observado en la taxonomía (Figura 24) y con el V metal, el cual en el núcleo C11 (segundo núcleo con mas *Rokubacteria*) se encontró en altas cantidades aumentando conforme la profundidad. También hubo otra correlación positiva con el Sb que en las muestras de “Campeche knolls” fue más abundante, así como la población de *Rokubacteria*, este metal también se encontró en altas cantidades en las muestras de A3 que fue el núcleo de Perdido con mayor abundancia de este phylum. Esta interacción con la profundidad se repitió con su género representante wb1A-12 así como correlaciones con el Sb y Li, metales que se encontraron en mayor concentración en las muestras de “Campeche knolls” (Anexo 5), donde hubo una mayor población de este taxón.

En las tres clases principales de *Proteobacteria*, solo el Sb con las *Gammaproteobacterias* y el P con las *Alphaproteobacterias* presentaron relación, ambos metales se observaron constantes y sin cambios grandes. Aun con esta correlación, no se observó una asociación entre la concentración de estos metales concentración y la abundancia de estas clases. Este poco número de correlaciones puede estar asociada a que la abundancia de estas clases se mantuvo constante y sin grandes cambios en las muestras (excepto en A1 y solo para las *Gammaproteobacterias*) por lo que aun si hubo cambios en la concentración de los metales y compuestos medidos, profundidad y pH estos taxones no se ven afectados por estas variables. Aunque se esperaba alguna relación entre las *Deltaproteobacterias* y el SO₄, Mn o Fe por su metabolismo anaerobio y su asociación con la sulfatoreducción.

En cuanto al grupo *Chloroflexi* y sus representantes más abundantes *Dehalococcoidia* y *Anaerolineae*, se esperaba alguna correlación con alguno de los metales pues estas bacterias se han encontrado extendidas y abundantes en el subsuelo marino, tienen una relación con diversos aceptores de electrones (Algora C., 2016) y en estas muestras su población aumento conforme la profundidad en cmbs. Sin embargo, no se encontró ninguna correlación con las variables medidas más que el Be y Chloroflexi, pero este metal solo se encontró en una muestra a muy bajas cantidades. La clase *Dehalococcoida* se reconoce por su potencial degradador de órgano clorados y compuestos halogenados (Wasmund et al., 2013), compuestos que podrían explicar el por qué su aumento poblacional conforme la profundidad y no las variable medidas.

Los géneros de *Moritella*, *Pseudomonas* y *Klebsiella* se esperaba que tuvieran alguna interacción con algún metal como el Cu, Zn y B por lo que se observó en la asignación taxonómica (Figura 25) y la relación entre *Moritella* y los otros dos géneros, pero no encontró ninguna que pareciera interactuar con estos géneros.

Tabla 17. Resultado del valor de *P* para cada correlación por el análisis de regresión lineal múltiple para los taxones de bacteria. Se resaltan los valores significativamente diferentes ($p < 0.05$) en negritas y los valores subrayados representan una correlación negativa. Los valores del coeficiente de Spearman se reportan en el anexo 7.

	Proteobacteria	Rokubacteria	Planctomycetes	Chloroflexi	Acidobacteria	γ - proteobacteria	δ - proteobacteria	α - proteobacteria
Prof.	0.962	<u>0</u>	0.156	0.99	0.926	0.551	0.568	0.847
Na	0.044	0.974	0.904	0.541	0.344	0.142	0.874	0.701
Al	0.168	0.731	0.305	0.786	0.945	0.274	0.509	0.618
K	0.779	0.379	0.858	0.535	0.89	0.67	0.758	0.922
Fe	0.455	0.311	0.6	0.259	0.684	0.545	0.206	0.304
Ca	0.638	0.597	0.193	0.658	0.893	0.704	0.422	0.754
Mn	0.458	0.179	0.457	0.986	0.505	0.779	0.718	0.054
B	0.012	0.078	0.916	0.203	0.512	0.059	0.471	0.669
Mg	0.33	0.136	0.576	0.248	0.835	0.585	0.507	0.733
P	0.248	0.298	0.963	0.427	0.245	0.696	0.105	0.028
Sr	0.014	0.614	0.422	0.691	0.627	0.026	0.879	0.499
Ba	0.631	0.561	0.776	0.713	0.798	0.267	0.425	0.54
Cu	0.1	0.97	0.796	0.985	0.63	0.074	0.126	0.145
Zn	0.108	0.974	0.718	0.823	0.614	0.065	0.124	0.13
Si	0.922	0.834	0.848	0.444	0.762	0.922	0.465	0.112
V	0.476	0.006	0.133	0.839	0.557	0.604	0.962	0.668
Li	0.705	0.063	0.422	0.888	0.581	0.717	0.455	0.147
Ni	0.383	0.232	0.561	0.381	0.883	0.467	0.805	0.806
Cr	0.111	0.17	0.261	0.932	0.79	0.372	0.964	0.663
Pb	0.415	0.237	0.866	0.347	0.691	0.146	0.877	0.83
As	0.093	0.428	0.848	0.637	0.415	0.202	0.142	0.052

Mo	0.189	0.278	0.938	0.695	0.265	0.458	0.941	0.58
Co	0.918	0.849	0.718	0.697	0.444	0.398	0.427	0.064
Tl	0.684	0.454	0.706	0.409	0.853	0.966	0.514	0.82
Sb	0.328	0.005	0.211	0.693	0.809	0.722	0.565	0.321
Se	0.281	0.848	0.773	0.284	0.623	0.799	0.171	0.716
Sn	0.613	0.419	0.513	0.392	0.816	0.811	0.898	0.13
Cd	0.919	0.612	0.39	0.392	0.193	0.105	0.197	0.135
Be	0.389	0.803	0.536	0.043	0.467	0.58	0.612	0.813
SO4	0.178	0.478	0.92	0.672	0.633	0.229	0.384	0.956
NO3	0.953	0.323	0.716	0.955	0.751	0.808	0.742	0.37
pH	0.119	0.543	0.485	0.614	0.933	0.149	0.444	0.286
	Dehalococcoidia	Anaerolineae	Moritella	Pseudomonas	Klebsiella	Colwellia	wb1A12	Woeseia
Prof.	0.245	0.566	0.054	0.637	0.528	0.005	0.003	0.001
Na	0.076	0.55	0.043	0.723	0.255	0.153	0.732	0.169
Al	0.462	0.54	0.076	0.364	0.892	0.852	0.765	0.18
K	0.51	0.357	0.426	0.658	0.637	0.677	0.426	0.273
Fe	0.163	0.234	0.26	0.585	0.342	0.366	0.475	0.697
Ca	0.926	0.121	0.985	0.1	0.13	0.895	0.499	0.573
Mn	0.533	0.294	0.462	0.506	0.222	0.595	0.084	0.044
B	0.217	0.365	0.708	0.879	0.324	0.147	0.042	0.068
Mg	0.214	0.242	0.237	0.32	0.288	0.588	0.181	0.249
P	0.545	0.359	0.28	0.082	0.274	0.596	0.175	0.079
Sr	0.648	0.7	0.583	0.577	0.128	0.866	0.21	0.509
Ba	0.317	0.628	0.213	0.364	0.353	0.128	0.223	0.097
Cu	0.298	0.717	0.576	0.675	0.101	0.192	0.955	0.855
Zn	0.207	0.929	0.483	0.544	0.072	0.096	0.948	0.653
Si	0.209	0.768	0.441	0.897	0.579	0.74	0.529	0.797
V	0.485	0.659	0.245	0.896	0.509	0.377	0.064	0.08
Li	0.525	0.25	0.72	0.543	0.567	0.579	0.043	0.017
Ni	0.437	0.146	0.73	0.696	0.899	0.467	0.289	0.29
Cr	0.932	0.384	0.672	0.805	0.834	0.745	0.047	0.142
Pb	0.2	0.516	0.295	0.277	0.155	0.011	0.308	0.31
As	0.381	0.592	0.748	0.663	0.532	0.395	0.097	0.065
Mo	0.885	0.085	0.155	0.948	0.787	0.182	0.205	0.119
Co	0.515	0.424	0.396	0.36	0.327	0.122	0.393	0.22
Tl	0.778	0.099	0.947	0.514	0.898	0.214	0.627	0.285
Sb	0.738	0.571	0.581	0.966	0.415	0.567	0.002	0.002
Se	0.681	0.245	0.934	0.58	0.731	0.236	0.731	0.817
Sn	0.674	0.642	0.894	0.685	0.338	0.825	0.313	0.383
Cd	0.786	0.704	0.838	0.808	0.629	0.384	0.446	0.622
Be	0.17	0.049	0.063	0.899	0.165	0.384	0.818	0.234
SO4	0.495	0.313	0.264	0.661	0.17	0.455	0.644	0.455

NO3	0.623	0.223	0.443	0.423	0.146	0.719	0.555	0.941
pH	0.85	0.764	0.413	0.804	0.366	0.256	0.961	0.682

Debido a el drástico cambio en la abundancia de *Nitrosopumilaceae* en todos los núcleos se esperaba encontrar una correlación entre alguna variable medida y esta familia, pero extrañamente no se encontró ninguna variable por lo que es probable que falte información de estas variables o medir alguna otra. El phylum *Hydrothermarchaeota* también reconocido como Marine Benthic Group – E (MBG-E) es reconocido por su diversidad metabólica, degradación anaeróbica de aromáticos, la oxidación de compuestos C1, la utilización de compuestos metálicos, uso de la vía Wood-Ljungdahl y también por su capacidad de oxidar compuestos como el azufre, arsénico e hidrógeno (Dombrowski, Seitz, Teske & Baker, 2017, Zhou et al., 2020). Por lo que el encontrar una correlación entre este taxón y el As puede que se deba a su capacidad de metabolizar, este metal se encontró en mayor concentración las muestras de “Campeche knolls” en donde este phylum fue más abundante (Figura 16) y en menor concentración en las muestras de Perdido. También en el núcleo D18 en donde se observó una mayor población de *Hydrothermarchaeota* aumentando conforme la profundidad, el As fue más alto que en los demás muestras y de igual manera aumentó conforme la profundidad (Anexo 5). Igual que con los taxones de bacteria, se encontraron correlaciones a las cuales no se observó una clara interacción, como lo visto en las *Thermoplasmata* y *Bathyarchaeia* taxones que se reconocen como ubicuos en los sedimentos marinos (Compte-Port et al., 2017) y con un metabolismo diverso que les da esta capacidad de habitar gran parte del sedimento marino (Zhou, Pan, Wang, Gu & Li, 2018). Estos taxones fueron los siguientes en abundancia después de *Nitrosopumilaceae* y de los metales en los que se observó correlación (Tabla 19) solo el Cr es más abundante en el núcleo C11, donde la población de *Bathyarchaeia* es alta, el níquel y el sodio fueron constantes en su concentración entre todas las muestras (Anexo 5). En cambio, el molibdeno, presentó valores con alta dispersión, pero en general bajas concentraciones salvo unas muestras en las cuales no se observó una abundancia de *Bathyarchaeia*. En cuanto a las *Nanohaloarchaeia* su única correlación fue con el berilio e igual que con las Chloroflexi este metal solo apareció en una muestra a bajas concentraciones por lo que no se le atribuyó interacción alguna.

Tabla 18. Resultado del valor de P para cada correlación por el análisis de regresión lineal múltiple para los taxones de arquea. Se resaltan los valores significativamente diferentes ($p < 0.05$) en negritas y los valores subrayados representan una correlación negativa. Los valores del coeficiente de Spearman se reportan en el anexo 7.

	Hydrothermarchaeota	Thermoplasmata	MBG-A	Lokiarchaeia	Bathyarchaeia	Nanohaloarchaeia	Nitrosopumilaceae
Prof.	0.137	0.295	0.749	0.526	0.09	0.447	0.171
Na	0.801	0.798	0.142	0.745	<u>0.026</u>	0.385	0.49

Al	0.147	0.63	0.206	0.58	0.939	0.292	0.681
K	0.726	0.546	0.277	0.191	0.107	0.934	0.551
Fe	0.393	0.914	0.351	0.101	0.609	0.299	0.902
Ca	0.842	0.528	0.143	0.38	0.71	0.879	0.735
Mn	<u>0.009</u>	0.314	0.301	0.998	0.549	0.642	0.69
B	0.878	0.92	0.773	0.575	0.815	0.725	0.426
Mg	0.591	0.48	0.216	<u>0.049</u>	0.498	0.467	0.692
P	0.145	0.382	0.647	<u>0.025</u>	0.198	0.861	0.352
Sr	0.41	0.998	0.12	0.395	0.123	0.4	0.391
Ba	0.255	0.454	0.264	0.298	0.599	0.592	0.971
Cu	0.24	0.341	<u>0.041</u>	0.91	0.206	0.468	0.904
Zn	0.176	0.57	<u>0.031</u>	0.965	0.238	0.43	0.937
Si	0.45	0.225	0.683	0.151	0.437	0.773	0.386
V	0.162	0.826	0.426	<u>0.017</u>	0.635	0.844	0.688
Li	0.657	0.405	0.671	0.687	0.189	0.674	0.488
Ni	0.604	<u>0.038</u>	0.481	0.108	0.25	0.617	0.127
Cr	0.06	0.684	0.142	0.581	<u>0.01</u>	0.869	0.128
Pb	0.207	0.278	0.247	0.891	0.624	0.823	0.833
As	<u>0.046</u>	0.818	0.253	0.076	0.333	0.706	0.6
Mo	0.686	0.319	<u>0.019</u>	0.111	<u>0.014</u>	0.875	0.225
Co	0.311	0.778	0.347	0.508	0.852	0.722	0.94
Tl	0.244	0.373	0.058	0.979	0.079	0.535	0.698
Sb	0.392	0.657	0.364	<u>0.022</u>	0.058	0.11	0.169
Se	0.49	0.649	0.157	0.74	0.263	0.41	0.631
Sn	0.504	0.405	0.444	0.085	0.145	0.483	0.856
Cd	0.627	0.548	0.26	0.763	0.145	0.462	0.417
Be	0.421	0.521	0.287	0.894	0.276	<u>0.043</u>	0.895
SO4	0.341	0.955	0.164	0.794	0.331	0.103	0.755
NO3	0.617	0.3	<u>0.049</u>	0.132	0.144	0.853	0.557
pH	0.23	0.574	0.272	0.125	0.093	0.331	0.935

Los microorganismos del fondo marino se han desarrollado por mucho tiempo en ese ambiente y han tenido que contender con las limitaciones energéticas y metabólicas, así como la concentración de varios metales a lo largo de su historia evolutiva. Muchos de estos taxones han sufrido adaptaciones a ambientes extremófilos, halófilos y con una falta de fuentes de carbono, sobrellevando estas condiciones y reciclando la energía posible (Jørgensen et al., 2019, Petro et al., 2019, Inagaki et al., 2015). El bajo número de correlaciones y su bajo coeficiente nos dice que la concentración de estos metales puede no ser suficiente para determinar a las poblaciones que se desarrollan en el sedimento o para limitar el crecimiento de los microorganismos encontrados. Las pocas

correlaciones observadas permiten inferir que hay que determinar más variables en el sedimento o analizarlas de manera diferente. Otras variables como la materia orgánica, los hidrocarburos y el estado de oxidación de los metales pueden tener una correlación más clara con estos taxones. Algunos ejemplos son la relación entre las poblaciones de *Dehalococcoida* y el tipo de materia orgánica que puede degradar (Wasmund et al., 2013, Saiyari et al., 2018), *Deltaproteobacterias* y Alphaproteobacterias y su papel en la degradación de hidrocarburos y sulfato reducción (Joye, 2019, Jørgensen et al., 2019, Petro et al., 2019, Inagaki et al., 2015), *Moritella* con su metabolismo capaz de degradar hidrocarburos aromáticos policíclicos (Dong et al., 2014), y un compuesto muy importante en este ambiente, el amonio por la capacidad de las arqueas *Nitrosopumilales* de oxidarlo (Zhao, Dahle, Ramírez & Jørgensen, 2020) así como la vía anammox de ciertas *Planctomycetes* (Oren, 2015), por mencionar algunos ejemplos.

La población conforme la profundidad

El sedimento superficial que tiene contacto con la columna es enterando conforme el proceso natural de sedimentación ocurre, aislando de manera espacio temporal a las comunidades de microorganismos que habitan ese sedimento y afectando la disponibilidad de cualquier fuente de carbono y energía disponible (materia orgánica, hidrocarburos y aceptores de electrones). Esta afectación es contrarrestada en medida por la bioturbación en los sedimentos la cual puede incorporar compuestos y materia orgánica en el sedimento para que sean utilizados por las comunidades. En los cuatro núcleos de este trabajo se observó que aproximadamente pasando los 6 cmbs la taxonomía de arqueas sufre un cambio radical y en cuanto a las bacterias, las primeras tres muestras si bien no se agrupan como en la comunidad de arqueas, se observaron diferentes del resto de la columna de sedimento a la que pertenecen (Figuras 32 a 36) En especial en los núcleos C11 y D18, los cuales desde su colecta se observaron más estratificados y con menos agua intersticial lo que ayudó a mantener los estratos y el escalonamiento observado en las poblaciones de bacteria. Esto se reflejó tanto en la taxonomía de la comunidad, como en las clases diferencialmente abundantes.

Los taxones de arqueas que aumenta pasando los primeros 6 cmbs apoyan la idea de que existe una bioturbación constante y más intensa en los primeros 6 a 8 cmbs. Las *Bathyarchaeia*, *Lokiarchaeia* y *Thermoplasmata* son taxones de arquea que tiene un metabolismo lento, con bajas tasas de duplicación y enfocado al mantenimiento del metabolismo y al reciclado de compuestos (Lipp et al., 2008, McClain, Allen, Tittensor & Rex, 2012, Yu et al., 2018). Esto es necesario en ambientes donde las condiciones energéticas no son muy favorables y no hay una fuente constante de carbono, justo como sucede en sedimento profundo ya que la bioturbación es menos intensa y no hay ciclado de materia tan accesible para los microorganismos (Petro et al., 2019, Jochum et al., 2017, Chen et al., 2017).

Salvo en el núcleo A1 la diversidad de bacterias a lo largo de la columna es muy alta y mientras sí se observaron cambios a ciertos taxones específicos (*NC10*, *Dehalococcoidia*, *Anaerolineae*, por mencionar algunos). En general los taxones se mantienen relativamente constantes con ciertos géneros u otro taxones abundando a cierta profundidad, pero sin una población muy dominante. El núcleo más profundo A3 fue el que tuvo menos variaciones tanto en la diversidad de arquea, bacteria y en la concentración de metales y compuestos medidos, algo que correlaciona con lo reportado en la literatura donde se ha observado que la profundidad del sedimento afecta al proceso de bioturbación.

Bacterias de una misma familia u orden pueden tener metabolismos diferentes dependiendo de donde se han desarrollado sus linajes. En el sedimento marino existen dos estrategias para contener con el estrés generado de este ambiente extremófilo, el tener un metabolismo que permite sobrevivir a ambientes dinámicos y variables con diferentes fuentes de energía y carbono, o el desarrollar estrategias para contener con el estrés a largo plazo. La primera estrategia se ve favorecida por las bacterias y la segunda por las arqueas (Molari *et al.* 2012, Valentine *et al.* 2017). En las arqueas se reconocen phyla y clases capaces de contener con el estrés a largo plazo, lo que podría explicar la alta dominancia y poca diversidad de arqueas encontrada en el sedimento, en cambio diferentes bacterias de diversos taxones poseen diversos metabolismos secundarios y pueden crecer en el sedimento, pero pocas veces pueden dominar la comunidad, por lo que se mantiene una diversidad alta y constante a lo largo de la columna con ligeros cambios entre la zona de alta bioturbación al sedimento profundo.

La estratificación vertical de las comunidades en el sedimento se ha reportado en algunos trabajos (Petro *et al.*, 2019, Chen *et al.*, 2017, Lipp *et al.*, 2008 y Giovannelli *et al.*, 2013), pero muy pocos del GoM (Vigneron *et al.*, 2017, Vigneron *et al.*, 2018). En estos se han encontrado diferentes profundidades (cmbs) a las que se da un cambio en las comunidades encontradas o el número de arqueas y bacterias cambia considerablemente. Es muy interesante que, en el trabajo de Petro *et al.*, 2019, se reporta una profundidad similar donde la taxonomía cambia a la encontrada en este trabajo de 7 cmbs. Lo peculiar de esto es que estos sedimentos pertenecen a la bahía de Aarhus en Dinamarca. Este es un cuerpo de agua poco profundo (50 m máximo) y su comunidad de microorganismos es diferente. En los primeros 6 cmbs la población correspondió en su mayoría a *Proteobacteria* y *Bacteroidetes* y después de los 7 cmbs disminuyen aumentando las *Euryarchaeota*, *Lokiarchaeota*, *Chloroflexi* y *Atribacteria*. En esos sedimentos se observó que, así como la zona de alta bioturbación termina, la población de sulfato reductores y degradadores de materia orgánica aumentaron, así como los procesos que estos llevan a cabo. Las muestras de este trabajo y las de Petro *et al.*, 2019 provienen de sitios diferentes y aun así en ambos sitios se reportó un conjunto de taxones comunes asociados a la biosfera marina profunda y la profundidad en el sedimento donde se da un cambio en la comunidad es muy parecida. Es probable que en los sedimentos estudiados en este trabajo suceda algo similar a lo observado con la

bioturbación y la sulfatoreducción en la bahía de Aarhus, no específicamente con la sulfatoreducción, si no con alguno de los múltiples otros procesos y metabolismo que ocurren en la biosfera del sedimento profundo (In' Zandt et al., 2019) que son llevados a cabo por las comunidades de microorganismos. (Figura 3). Estos resultados no solo concuerdan con lo reportado en la literatura del GoM, donde se reconoce una alta población *Asgardaeota* (Hoshino et al., 2020). Aumento de las *Gammaproteobacteria* en la zona de Perdido, en particular en las zona profundas (Sánchez-Soto Jiménez et al., 2018). La dominancia por *Thaumarchaeota* en sedimentos más aeróbicos o en este caso con una alta bioturbación y mejor acceso al oxígeno que el resto de la columna de sedimento (B. Jørgensen et al., 2016, Hoshino et al., 2020). Estos resultados también aportan evidencia de cómo la estratificación de las comunidades es afectada por variables geoquímicas (principalmente la profundidad) y factores ambientales con los que las comunidades de microorganismos interactúan constantemente.

Conclusiones

La comunidad de microorganismos encontradas en el sedimento correspondió a un conjunto de taxones reconocidos como característicos del sedimento marino (*Proteobacteria*, *Chloroflexi*, *Planctomycetes*, *Acidobacteria*, *Thaumarchaeota*, *Euryarcheota* y el recientemente descubierto *Rokubacteria*).

La diferencia entre los taxones dominantes entre la zona de Perdido (*Gammaproteobacteria*) y “Campeche knolls” (*Dehalococcoidia* y *Deltaproteobacteria*), así como los diferentes índices de diversidad son indicadores de que existe una diferencia entre los metabolismos asociados al sedimento de cada zona.

La relación observada entre las poblaciones del género *Moritella* con *Pseudomonas* y *Klebsiella* puede tratarse de una competencia en la abundancia de los taxones entre *Moritella* contra las *Pseudomonas* en la zona de Perdido y contra *Klebsiella* en ambos sitios.

Los valores de pH y concentración de sulfato aumentaron conforme la profundidad en todas las columnas de sedimento analizadas mientras que el resto de los compuestos y metales medidos no presentaron una diferencia significativa a lo largo de la columna de sedimento.

El bajo número de correlaciones entre las variables geoquímicas y los taxones, así como su bajo coeficiente infiere que sólo la concentración de estos metales no es una variable suficiente para determinar o diferenciar a las poblaciones que se desarrollan en el sedimento y que la profundidad sigue siendo una variable compleja que involucra varios factores y por eso tiene un gran efecto en la comunidad de microorganismos del sedimento.

El proceso natural de bioturbación actúa de manera más intensa en los primeros 6 a 8 cmbs y mantiene a estos sedimentos con mayor acceso a materia orgánica y fuentes de energía. Este proceso parece ser suficiente para que la distribución de arqueas sea la misma en esa zona y la comunidad de bacterias sea diferente al resto de la columna de sedimento.

En ambos sitios la población de arqueas y bacterias tienen el potencial metabólico para mantener constante el proceso de fijación y consumo de carbono mediante la vía reductora de la acetil-coenzima A (WLP) y acetogénesis y en algunos casos metanogénesis y metanotrofia, reforzando la evidencia del sumidero de carbono del sedimento marino.

En cuanto a la capacidad metabólica de los taxones observados en la zona de “Campeche knolls” las altas poblaciones Deltaproteobacterias así como la abundancia de las bacterias NC10 permiten inferir que existe un potencial sulfatoreductor, desnitrificador y metanótrofo, mientras que en la zona de Perdido el potencial metabólico está relacionado con procesos de oxidación de compuestos inorgánicos (quimiolitótrofo) capaces de utilizar compuestos reducidos inorgánicos como fuentes de energía (azufre, nitrito y nitrato, y metales reducidos) y de consumo de aromáticos policíclicos (PAH).

Perspectivas

- Analizar la correlación de las variables geoquímicas y los taxones utilizando una metodología más avanzada sin depender de relaciones lineales como el análisis de datos y/o machine learning.
- Medir la concentración de otras variables geoquímicas como la cantidad y tipo de materia orgánica, hidrocarburos otros iones y el estado de oxidación de los metales que se sabe son aceptores de electrones del metabolismo anaerobio (Fe, Mn y Cr)
- Evaluar la capacidad de degradación de hidrocarburos de microorganismos del sedimento
- Aislar a los microorganismos más abundantes en las muestras de sedimento (*Moritella*, *Rokubacteria*, *Dehalococcoidia*, *Deltaproteobacteria*, *Nitrosopumilales*, *Pseudomonas* y *Klebsiella*) para estudiar su metabolismo.

- Identificar a las poblaciones sulfatoreductoras y oxidadores de sulfuro mediante la secuenciación de genes marcadores de este metabolismo (*dsrAB*, *soxB*) o mediante la generación de metagenomas de algunas muestras de sedimento.
- Cuantificar la generación o consumo de metano en las poblaciones de sedimento utilizando cultivos anaerobios y carbono marcado radioactivamente.

Obtención y análisis de metagenomas del sitio D18

Como parte de las perspectivas y gracias a los datos obtenidos del sitio D18, así como los de la publicación por Raggi-et al., 2020, se decidió estudiar a detalle este sitio con las muestras colectadas de la campaña MET-02 y las estudiadas en este trabajo.

Se utilizaron tres muestras del núcleo de sedimento D18, correspondientes a la muestra más superficial del sedimento (D18 - 0 a 2 cmbs), la muestra más profunda (D18 – 22a 24 cmbs) y una a la mitad de la columna de sedimento (D18 – 12 a 14 cmbs). De esta manera fue posible seguir el análisis de la comunidad y su distribución vertical al coensamblar las tres muestras generadas. El acceso a todo el DNA permitió corroborar el cambio en la taxonomía entre bacterias y sobre todo en arqueas y la profundidad en cmbs (Figura 38 y 39), aparte de que es posible obtener información del metabolismo y diversos genes asociados las comunidades del sedimento.

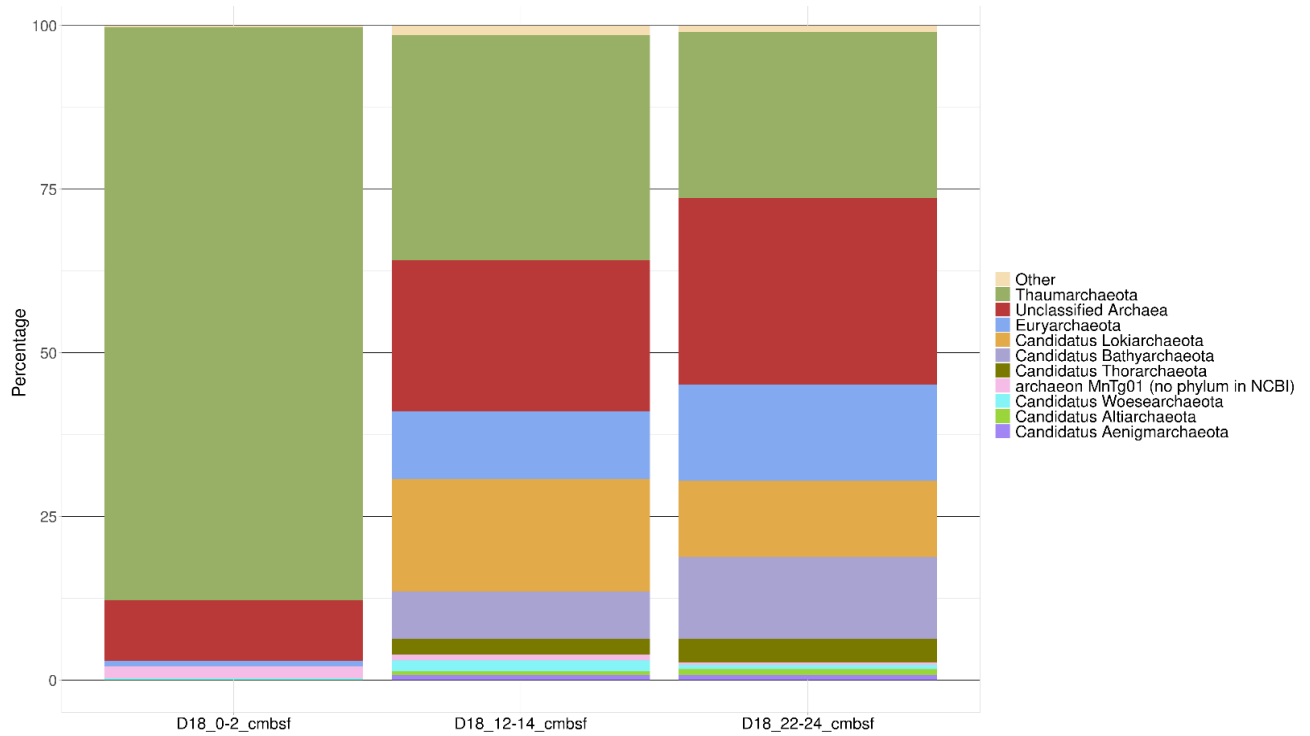


Figura 38. Abundancia relativa de los principales phyla de arquea encontrados en los metagenomas de D18.

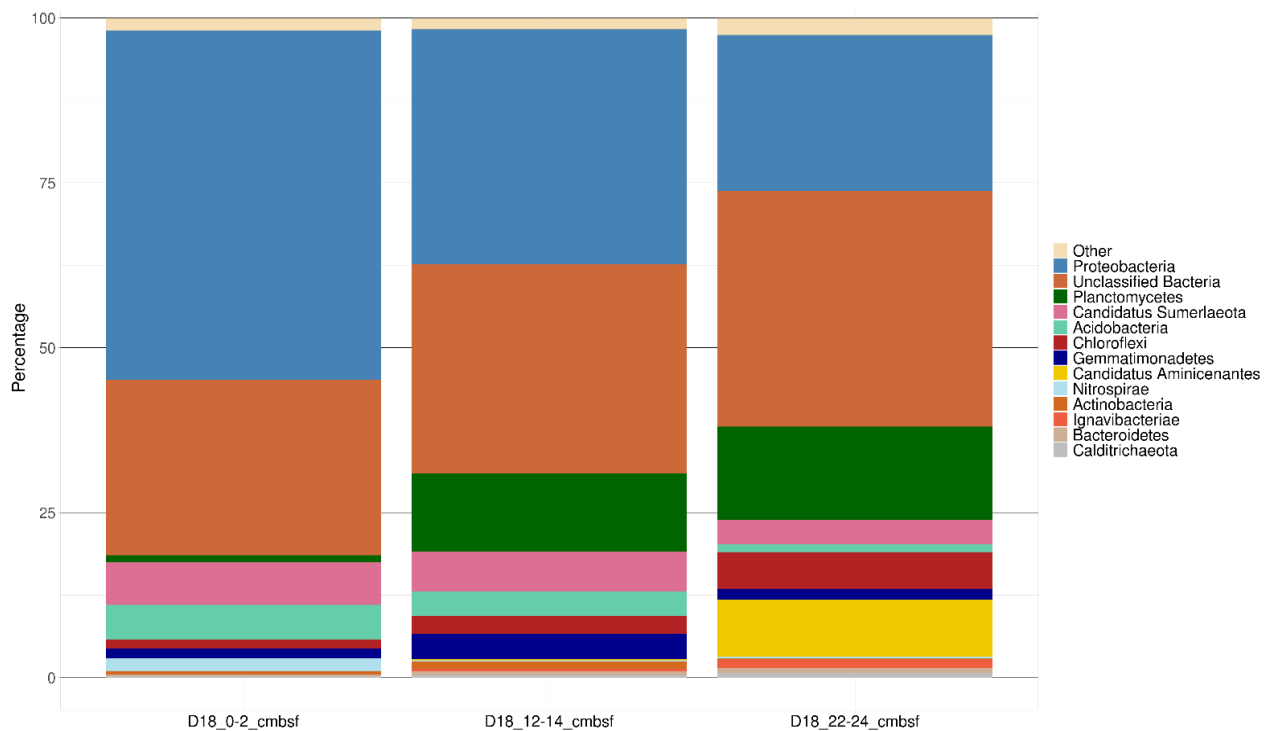


Figura 39. Abundancia relativa de las principales phyla bacterianas encontradas en los metagenomas de D18.

Al obtener una gran cantidad de información con los metagenomas y los datos obtenidos de este trabajo se decidió en integrar toda la información para comenzar a trabajar en una publicación y así refinar los análisis, el estudio y cumplir las perspectivas de este trabajo.

Bibliografía y Referencias

1. Cavicchioli, R., Ripple, W., Timmis, K., Azam, F., Bakken, L., & Baylis, M. et al. (2019). Scientists' warning to humanity: microorganisms and climate change. *Nature Reviews Microbiology*, 17(9), 569-586. doi: 10.1038/s41579-019-0222-5
2. Hine, A., Dunn, S., & Locker, S. (2014). Geologic Beginnings of the Gulf of Mexico with Emphasis on the Formation of the De Soto Canyon - Deep-C Consortium. Retrieved 1 January 2020, from <https://deep-c.org/news-and-multimedia/in-the-news/geologic-beginnings-of-the-gulf-of-mexico-with-emphasis-on-the-formation-of-the-de-soto-canyon>
3. MacDonald, I., Garcia-Pineda, O., Beet, A., Daneshgar Asl, S., Feng, L., & Graetinger, G. et al. (2015). Natural and unnatural oil slicks in the Gulf of Mexico. *Journal of Geophysical Research: Oceans*, 120(12), 8364-8380. doi: 10.1002/2015jc011062
4. Daneshgar Asl, S., Amos, J., Woods, P., Garcia-Pineda, O., & MacDonald, I. (2016). Chronic, Anthropogenic Hydrocarbon Discharges in the Gulf of Mexico. *Deep Sea Research Part II: Topical Studies in Oceanography*, 129, 187-195. doi: 10.1016/j.dsr2.2014.12.006
5. Godoy-Lozano, E., Escobar-Zepeda, A., Raggi, L., Merino, E., Gutierrez-Rios, R., & Juarez, K. et al. (2018). Bacterial Diversity and the Geochemical Landscape in the Southwestern Gulf of Mexico. *Frontiers in Microbiology*, 9. doi: 10.3389/fmicb.2018.0252813
6. Dutkiewicz, A., Müller, R., O'Callaghan, S., & Jónasson, H. (2015). Census of seafloor sediments in the world's ocean. *Geology*, 43(9), 795-798. doi: 10.1130/g36883.
7. Davis, R. (2017). Sediments of the Gulf of Mexico. *Habitats and Biota of The Gulf of Mexico: Before the Deepwater Horizon Oil Spill*, 165-215. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-3447-8_3 Caporaso JG, Kuczynski J, Stombaugh J, Bittinger K, Bushman FD, Costello EK, Fierer N, Pena AG, Goodrich JK, Gordon JI, Huttley GA, Kelley ST, Knights D, Koenig JE, Ley RE, Lozupone CA, McDonald D, Muegge BD, Pirrung M, Reeder J, Sevinsky JR, Turnbaugh PJ, Walters WA, Widmann J, Yatsunenkov T, Zaneveld J, Knight R. (2010). QIIME allows analysis of high-throughput community sequence data. *Nature methods*, 7(5), 335.
8. Magoc, T., & Salzberg, S. (2011). FLASH: fast length adjustment of short reads to improve genome assemblies. *Bioinformatics*, 27(21), 2957-2963. doi: 10.1093/bioinformatics/btr507
9. Abdel-Shafy, H., & Mansour, M. (2018). Microbial Degradation of Hydrocarbons in the Environment: An Overview. *Microbial Action on Hydrocarbons*, 353-386. https://doi.org/10.1007/978-981-13-1840-5_15
10. Nie, Y., Chi, C., Fang, H., Liang, J., Lu, S., & Lai, G. et al. (2014). Diverse alkane hydroxylase genes in microorganisms and environments. *Scientific Reports*, 4(1). <https://doi.org/10.1038/srep04968>
11. Danovaro, R., Snelgrove, P., & Tyler, P. (2014). Challenging the paradigms of deep-sea ecology. *Trends in Ecology & Evolution*, 29(8), 465-475. doi: 10.1016/j.tree.2014.06.002
12. Callahan, B., McMurdie, P., Rosen, M., Han, A., Johnson, A., & Holmes, S. (2016). DADA2: High-resolution sample inference from Illumina amplicon data. *Nature Methods*, 13(7), 581-583. doi: 10.1038/nmeth.3869
13. Callahan, B., McMurdie, P., & Holmes, S. (2017). Exact sequence variants should replace operational taxonomic units in marker-gene data analysis. *The ISME Journal*, 11(12), 2639-2643. doi: 10.1038/ismej.2017.119
14. Hug, L., Baker, B., Anantharaman, K., Brown, C., Probst, A., & Castelle, C. et al. (2016). A new view of the tree of life. *Nature Microbiology*, 1(5). <https://doi.org/10.1038/nmicrobiol.2016.48>
15. Balsam, W., & Beeson, J. (2003). Sea-floor sediment distribution in the Gulf of Mexico. *Deep Sea Research Part I: Oceanographic Research Papers*, 50(12), 1421-1444. <https://doi.org/10.1016/j.dsr.2003.06.001>
16. Wooley, J.C., Godzik, A., y Friedberg, I. (2010) A Primer on Metagenomics. *PLoS Comput Biol* 6(2): e1000667. doi: 10.1371/journal.pcbi.1000667

17. Zhou, S., Li, L., Perseke, M., Huang, Y., Wei, J., & Qin, Q. (2015). Isolation and characterization of a *Klebsiella pneumoniae* strain from mangrove sediment for efficient biosynthesis of 1,3-propanediol. *Science Bulletin*, *60*(5), 511-521. doi: 10.1007/s11434-015-0742-y
18. Kallmeyer, J., Pockalny, R., Adhikari, R., Smith, D., & D'Hondt, S. (2012). Global distribution of microbial abundance and biomass in subseafloor sediment. *Proceedings of The National Academy of Sciences*, *109*(40), 16213-16216. doi: 10.1073/pnas.1203849109
19. Vigneron, A., Alsop, E., Cruaud, P., Philibert, G., King, B., & Baksmaty, L. et al. (2019). Contrasting Pathways for Anaerobic Methane Oxidation in Gulf of Mexico Cold Seep Sediments. *Msystems*, *4*(1). <https://doi.org/10.1128/msystems.00091-18>
20. Petro, C., Zäncker, B., Starnawski, P., Jochum, L., Ferdelman, T., & Jørgensen, B. et al. (2019). Marine Deep Biosphere Microbial Communities Assemble in Near-Surface Sediments in Aarhus Bay. *Frontiers In Microbiology*, *10*. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.00758>
21. Hinrichs, K., Hayes, J., Bach, W., Spivack, A., Hmelo, L., & Holm, N. et al. (2006). Biological formation of ethane and propane in the deep marine subsurface. *Proceedings of The National Academy of Sciences*, *103*(40), 14684-14689. <https://doi.org/10.1073/pnas.0606535103>
22. D'Hondt, S. (2004). Distributions of Microbial Activities in Deep Subseafloor Sediments. *Science*, *306*(5705), 2216-2221. <https://doi.org/10.1126/science.1101155>
23. Sunagawa, S., Coelho, L., Chaffron, S., Kultima, J., Labadie, K., & Salazar, G. et al. (2015). Structure and function of the global ocean microbiome. *Science*, *348*(6237), 1261359-1261359. <https://doi.org/10.1126/science.1261359>
24. Joye, S. (2020). The Geology and Biogeochemistry of Hydrocarbon Seeps. *Annual Review of Earth and Planetary Sciences*, *48*(1). <https://doi.org/10.1146/annurev-earth-063016-020052>
25. Jørgensen, B., Andrén, T., & Marshall, I. (2020). Sub-seafloor biogeochemical processes and microbial life in the Baltic Sea. *Environmental Microbiology*. <https://doi.org/10.1111/1462-2920.14920>
26. Abdel-Shafy, H., & Mansour, M. (2018). Microbial Degradation of Hydrocarbons in the Environment: An Overview. *Microbial Action on Hydrocarbons*, 353-386. https://doi.org/10.1007/978-981-13-1840-5_15
27. Jørgensen, B., Findlay, A., & Pellerin, A. (2019). The Biogeochemical Sulfur Cycle of Marine Sediments. *Frontiers In Microbiology*, *10*. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.00849>
28. in 't Zandt, M., de Jong, A., Slomp, C., & Jetten, M. (2018). The hunt for the most wanted chemolithoautotrophic spookmicrobes. *FEMS Microbiology Ecology*, *94*(6). <https://doi.org/10.1093/femsec/fiy064>
29. Teske, A. (2013). Marine Deep Sediment Microbial Communities. *The Prokaryotes*, 123-138. https://doi.org/10.1007/978-3-642-30123-0_42
30. D'Hondt, S., Spivack, A., Pockalny, R., Ferdelman, T., Fischer, J., & Kallmeyer, J. et al. (2009). Subseafloor sedimentary life in the South Pacific Gyre. *Proceedings of The National Academy of Sciences*, *106*(28), 11651-11656. <https://doi.org/10.1073/pnas.0811793106>
31. Inagaki, F., Hinrichs, K., Kubo, Y., Bowles, M., Heuer, V., & Hong, W. et al. (2015). Exploring deep microbial life in coal-bearing sediment down to 2.5 km below the ocean floor. *Science*, *349*(6246), 420-424
32. Vigneron, A., Alsop, E., Cruaud, P., Philibert, G., King, B., & Baksmaty, L. et al. (2017). Comparative metagenomics of hydrocarbon and methane seeps of the Gulf of Mexico. *Scientific Reports*, *7*(1). <https://doi.org/10.1038/s41598-017-16375-5>
33. Sánchez-Soto Jiménez, M., Cerqueda-García, D., Montero-Muñoz, J., Aguirre-Macedo, M., & García-Maldonado, J. (2018). Assessment of the bacterial community structure in shallow and deep sediments of the Perdido Fold Belt region in the Gulf of Mexico. *PeerJ*, *6*, e5583. doi: 10.7717/peerj.5583
34. Walsh, E., Kirkpatrick, J., Rutherford, S., Smith, D., Sogin, M., & D'Hondt, S. (2015). Bacterial diversity and community composition from seafloor to subsurface. *The ISME*

- Journal*, 10(4), 979-989.
<https://doi.org/10.1038/ismej.2015.175>
35. Inagaki, F., Nunoura, T., Nakagawa, S., Teske, A., Lever, M., & Lauer, A. et al. (2006). Biogeographical distribution and diversity of microbes in methane hydrate-bearing deep marine sediments on the Pacific Ocean Margin. *Proceedings of The National Academy of Sciences*, 103(8), 2815-2820.
<https://doi.org/10.1073/pnas.0511033103>
 36. Jørgensen, B., & Marshall, I. (2016). Slow Microbial Life in the Seabed. *Annual Review of Marine Science*, 8(1), 311-332.
<https://doi.org/10.1146/annurev-marine-010814-015535>
 37. Carr, S., Orcutt, B., Mandernack, K., & Spear, J. (2015). Abundant Atribacteria in deep marine sediment from the Adélie Basin, Antarctica. *Frontiers In Microbiology*, 6.
<https://doi.org/10.3389/fmicb.2015.00872>
 38. Parkes, R., Cragg, B., Roussel, E., Webster, G., Weightman, A., & Sass, H. (2014). A review of prokaryotic populations and processes in sub-seafloor sediments, including biosphere: geosphere interactions. *Marine Geology*, 352, 409-425.
<https://doi.org/10.1016/j.margeo.2014.02.009>
 39. Ruff, S., Felden, J., Gruber-Vodicka, H., Marcon, Y., Knittel, K., Ramette, A., & Boetius, A. (2018). In situ development of a methanotrophic microbiome in deep-sea sediments. *The ISME Journal*, 13(1), 197-213.
<https://doi.org/10.1038/s41396-018-0263-1>
 40. Kuypers, M., Marchant, H., & Kartal, B. (2018). The microbial nitrogen-cycling network. *Nature Reviews Microbiology*, 16(5), 263-276.
<https://doi.org/10.1038/nrmicro.2018.9>
 41. Timmers, P., Welte, C., Koehorst, J., Plugge, C., Jetten, M., & Stams, A. (2017). Reverse Methanogenesis and Respiration in Methanotrophic Archaea. *Archaea*, 2017, 1-22.
<https://doi.org/10.1155/2017/1654237>
 42. Joye, S., & Kostka, J. (2020). Microbial Genomics of the Global Ocean System: Report on an American Academy of Microbiology (Academy), The American Geophysical Union (AGU), and The Gulf of Mexico Research Initiative (GoMRI) Colloquium held on 9 and 10 April 2019.
<https://doi.org/10.1128/aamcol.apr.2019>
 43. Davidova, I., Marks, C., & Sufliya, J. (2018). Anaerobic Hydrocarbon-Degrading Deltaproteobacteria. *Taxonomy, Genomics and Ecophysiology of Hydrocarbon-Degrading Microbes*, 1-38. https://doi.org/10.1007/978-3-319-60053-6_12-1
 44. Soto LA, Vázquez-Botello A. 2013. Legal issues and scientific constraints in the environmental assessment of the Deepwater Horizon oil spill in Mexico Exclusive Economic Zone (EEZ) in the Gulf of Mexico. *International Journal of Geosciences* 4:39–45 DOI 10.4236/ijg.2013.45B007
 45. Sánchez-Soto Jiménez, M., Cerqueda-García, D., Montero-Muñoz, J., Aguirre-Macedo, M., & García-Maldonado, J. (2018). Assessment of the bacterial community structure in shallow and deep sediments of the Perdido Fold Belt region in the Gulf of Mexico. *PeerJ*, 6, e5583.
<https://doi.org/10.7717/peerj.5583>
 46. He, Z., Cai, C., Wang, J., Xu, X., Zheng, P., Jetten, M., & Hu, B. (2016). A novel denitrifying methanotroph of the NC10 phylum and its microcolony. *Scientific Reports*, 6(1).
<https://doi.org/10.1038/srep32241>
 47. Ramírez, D., Vega-Alvarado, L., Taboada, B., Estradas-Romero, A., Soto, L., & Juárez, K. (2020). Bacterial diversity in surface sediments from the continental shelf and slope of the North West Gulf of Mexico and the presence of hydrocarbon degrading bacteria. *Marine Pollution Bulletin*, 150, 110590.
<https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2019.110590>
 48. Boyd, J., Woodcroft, B., & Tyson, G. (2018). GraftM: a tool for scalable, phylogenetically informed classification of genes within metagenomes. *Nucleic Acids Research*, 46(10), e59-e59. <https://doi.org/10.1093/nar/gky174>
 49. UniProt: a worldwide hub of protein knowledge. (2018), 47(D1), D506-D515.
<https://doi.org/10.1093/nar/gky1049>
 50. Anderson, M., Ellingsen, K., & McArdle, B. (2006). Multivariate dispersion as a measure of beta diversity. *Ecology Letters*, 9(6), 683-693.
<https://doi.org/10.1111/j.1461-0248.2006.00926>

51. Lozupone, C., & Knight, R. (2005). UniFrac: A New Phylogenetic Method for Comparing Microbial Communities. *Applied and Environmental Microbiology*, 71(12), 8228-8235. <https://doi.org/10.1128/aem.71.12.8228-8235.2005>
52. Mandal, S., Van Treuren, W., White, R., Eggesbø, M., Knight, R., & Peddada, S. (2015). Analysis of composition of microbiomes: a novel method for studying microbial composition. *Microbial Ecology In Health & Disease*, 26(0). doi: 10.3402/mehd.v26.27663
53. Jaffer, Y. D., Purushothaman, C. S., Sanath, K. H., Irfan, A. B., Gireesh-Babu, P., Ganie, P.A., et al. (2019). A combined approach of 16S rRNA and a functional marker gene, soxB to reveal the diversity of sulphur-oxidising bacteria in thermal springs. *Arch. Microbiol.* 201, 951–967. doi: 10.1007/s00203-01901666-4.
54. Meyer, B., & Kuever, J. (2007). Phylogeny of the alpha and beta subunits of the dissimilatory adenosine-5'-phosphosulfate (APS) reductase from sulfate-reducing prokaryotes – origin and evolution of the dissimilatory sulfate-reduction pathway. *Microbiology*, 153(7), 2026-2044. doi: 10.1099/mic.0.2006/003152-0
55. Acosta-González, A., Rosselló-Móra, R., & Marqués, S. (2013). Diversity of Benzylsuccinate Synthase-Like (bssA) Genes in Hydrocarbon-Polluted Marine Sediments Suggests Substrate-Dependent Clustering. *Applied and Environmental Microbiology*, 79(12), 3667-3676. doi: 10.1128/aem.03934-12.
56. Kung, J., Meier, A., Mergelsberg, M., & Boll, M. (2014). Enzymes Involved in a Novel Anaerobic Cyclohexane Carboxylic Acid Degradation Pathway. *Journal of Bacteriology*, 196(20), 3667-3674. doi: 10.1128/jb.02071-14
57. Nie, Y., Chi, C., Fang, H., Liang, J., Lu, S., & Lai, G. et al. (2014). Diverse alkane hydroxylase genes in microorganisms and environments. *Scientific Reports*, 4(1). doi: 10.1038/srep04968
58. Raggi, L., García-Guevara, F., Godoy-Lozano, E., Martínez-Santana, A., Escobar-Zepeda, A., & Gutierrez-Rios, R. et al. (2020). Metagenomic Profiling and Microbial Metabolic Potential of Perdido Fold Belt (NW) and Campeche Knolls (SE) in the Gulf of Mexico. *Frontiers in Microbiology*, 11. doi.org/10.3389/fmicb.2020.01825
59. Baker, B., De Anda, V., Seitz, K., Dombrowski, N., Santoro, A., & Lloyd, K. (2020). Diversity, ecology, and evolution of Archaea. *Nature Microbiology*, 5(7), 887-900. doi: 10.1038/s41564-020-0715-z
60. Algora, C. (2016). *Distribution of Dehalococcoidia in marine sediments and strategies for their enrichment* (Doctoral Thesis). Technische Universität Berlin.
61. Saiyari, D., Chuang, H., Senoro, D., Lin, T., Whang, L., Chiu, Y., & Chen, Y. (2018). A review in the current developments of genus Dehalococcoides, its consortia and kinetics for bioremediation options of contaminated groundwater. *Sustainable Environment Research*, 28(4), 149-157. doi: 10.1016/j.serj.2018.01.006
62. Dong, C., Bai, X., Lai, Q., Xie, Y., Chen, X., & Shao, Z. (2014). Draft Genome Sequence of Marinomonas sp. Strain D104, a Polycyclic Aromatic Hydrocarbon-Degrading Bacterium from the Deep-Sea Sediment of the Arctic Ocean. *Genome Announcements*, 2(1). doi: 10.1128/genomea.01211-13
63. Scala, D., & Kerkhof, L. (1998). Nitrous oxide reductase (nosZ) gene-specific PCR primers for detection of denitrifiers and three nosZ genes from marine sediments. *FEMS Microbiology Letters*, 162(1), 61-68. doi: 10.1111/j.1574-6968.1998.tb12979.x
64. Urakawa, H. (2014). The Family Moritellaceae. *The Prokaryotes*, 477-489. doi: 10.1007/978-3-642-38922-1_227
65. Hug, L., Baker, B., Anantharaman, K. et al. A new view of the tree of life. *Nat Microbiol* 1, 16048 (2016). <https://doi.org/10.1038/nmicrobiol.2016.48>
66. Dombrowski, N., Seitz, K., Teske, A., & Baker, B. (2017). Genomic insights into potential interdependencies in microbial hydrocarbon and nutrient cycling in hydrothermal sediments. *Microbiome*, 5(1). doi: 10.1186/s40168-017-0322-2
67. Romanenko, L., Tanaka, N., Svetashev, V., & Mikhailov, V. (2015). *Pseudomonas glareae* sp.

- nov., a marine sediment-derived bacterium with antagonistic activity. *Archives of Microbiology*, 197(5), 693-699. doi: 10.1007/s00203-015-1103-6
68. Zhao, R., Dahle, H., Ramírez, G., & Jørgensen, S. (2020). Indigenous Ammonia-Oxidizing Archaea in Oxic Subseafloor Oceanic Crust. *Msystems*, 5(2). doi: 10.1128/msystems.00758-19
69. Sharma, P., Balkwill, D., Frenkel, A., & Vairavamurthy, M. (2000). A New *Klebsiella planticola* Strain (Cd-1) Grows Anaerobically at High Cadmium Concentrations and Precipitates Cadmium Sulfide. *Applied and Environmental Microbiology*, 66(7), 3083-3087. doi: 10.1128/aem.66.7.3083-3087.2000
70. Barcenos, C. (2018). *Caracterización de las comunidades microbianas presentes en los sedimentos de Perdido y Coatzacoalcos del Golfo de México mediante análisis metagenómicos* (Maestría). Centro de Investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada, Baja California.
71. Xiao, Z., Jiang, W., Chen, D., & Xu, Y. (2020). Bioremediation of typical chlorinated hydrocarbons by microbial reductive dechlorination and its key players: A review. *Ecotoxicology And Environmental Safety*, 202, 110925. doi: 10.1016/j.ecoenv.2020.110925
- 72.
73. Walker, C., de la Torre, J., Klotz, M., Urakawa, H., Pinel, N., & Arp, D. et al. (2010). Nitrosopumilus maritimus genome reveals unique mechanisms for nitrification and autotrophy in globally distributed marine crenarchaea. *Proceedings of The National Academy of Sciences*, 107(19), 8818-8823. doi: 10.1073/pnas.0913533107
74. Oren, A. (2015). Anammox revisited: thermodynamic considerations in early studies of the microbial nitrogen cycle: Graphical Abstract Figure. *FEMS Microbiology Letters*, 362(15), fnv114. doi: 10.1093/femsle/fnv114
75. Zhou, Z., Pan, J., Wang, F., Gu, J., & Li, M. (2018). Bathyarchaeota: globally distributed metabolic generalists in anoxic environments. *FEMS Microbiology Reviews*, 42(5), 639-655. doi: 10.1093/femsre/fuy023
76. Seitz, K.W., Dombrowski, N., Eme, L. et al. Asgard archaea capable of anaerobic hydrocarbon cycling. *Nat Commun* 10, 1822 (2019). doi: 10.1038/s41467-019-09364-x
77. Jochum, L. M., Chen, X., Lever, M. A., Loy, A., Jørgensen, B. B., Schramm, A., et al. (2017). Depth distribution and assembly of sulfate-reducing microbial communities in marine sediments of Aarhus Bay. *Appl. Environ. Microbiol.* 83: e1547-17. doi: 10.1128/AEM.01547-17
78. Lipp, J., Morono, Y., Inagaki, F. et al. Significant contribution of Archaea to extant biomass in marine subsurface sediments. *Nature* 454, 991–994 (2008). <https://doi.org/10.1038/nature07174>
79. McClain, C., Allen, A., Tittensor, D., & Rex, M. (2012). Energetics of life on the deep seafloor. *Proceedings of The National Academy of Sciences*, 109(38), 15366-15371. doi: 10.1073/pnas.1208976109
80. Yu, T., Wu, W., Liang, W., Lever, M., Hinrichs, K., & Wang, F. (2018). Growth of sedimentary Bathyarchaeota on lignin as an energy source. *Proceedings of The National Academy of Sciences*, 115(23), 6022-6027. doi: 10.1073/pnas.1718854115
- 81.
82. Molari, M., Giovannelli, D., D'Errico, G. & Manini, E. Factors influencing prokaryotic community structure composition in sub-surface coastal sediments. *Estuar. Coast. Shelf Sci.* 97, 141–148, doi:10.1371/journal.pone.0072996 (2012).
83. Hoshino, T., Doi, H., Uramoto, G., Wörmer, L., Adhikari, R., & Xiao, N. et al. (2020). Global diversity of microbial communities in marine sediment. *Proceedings of The National Academy of Sciences*, 201919139. doi: 10.1073/pnas.1919139117
84. Lenk, S., Arnds, J., Zerjatke, K., Musat, N., Amann, R., & Mußmann, M. (2010, December 06). Novel groups of Gammaproteobacteria catalyse sulfur oxidation and carbon fixation in a coastal, intertidal sediment. doi: 10.1111/j.1462-2920.2010.02380.x
85. Seitz, K.W., Dombrowski, N., Eme, L. et al. Asgard archaea capable of anaerobic

- hydrocarbon cycling. *Nat Commun* **10**, 1822 (2019). <https://doi.org/10.1038/s41467-019-09364-x>
86. Arai, H. (2011). Regulation and Function of Versatile Aerobic and Anaerobic Respiratory Metabolism in *Pseudomonas aeruginosa*. *Frontiers In Microbiology*, *2*. doi: 10.3389/fmicb.2011.00103
87. Hoshino, T., Doi, H., Uramoto, G.-I., Wörmer, L., Adhikari, R. R., Xiao, N., Morono, Y., D'Hondt, S., Hinrichs, K.-U., & Inagaki, F. (2020). Global diversity of microbial communities in marine sediment. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *117*(44), 27587–27597. <https://doi.org/10.1073/pnas.1919139117>
88. Seitz, K. W., Dombrowski, N., Eme, L., Spang, A., Lombard, J., Sieber, J. R., Teske, A. P., Ettema, T. J. G., & Baker, B. J. (2019). Asgard archaea capable of anaerobic hydrocarbon cycling. *Nature Communications*, *10*(1), 10. <https://doi.org/10.1038/s41467-019-09364-x>
- 89.
90. Hoshino, T., Doi, H., Uramoto, G.-I., Wörmer, L., Adhikari, R. R., Xiao, N., Morono, Y., D'Hondt, S., Hinrichs, K.-U., & Inagaki, F. (2020). Global diversity of microbial communities in marine sediment. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *117*(44), 27587–27597. <https://doi.org/10.1073/pnas.1919139117>

Anexos

Anexo 1. Resultados del procesamiento de amplicones.

Anexo 1.1 Numero de secuencias y ASVs encontradas para las secuencias bacterianas.

Muestra	Secuencias iniciales	Secuencias procesadas	Número de ASVs
Núcleo A1			
A1-BAC-2	34491	8364	160
A1-BAC-4	156100	71550	13088
A1-BAC-6	61148	31480	1075
A1-BAC-8	105861	53462	3287
A1-BAC-10	88767	20923	298
A1-BAC-12	130824	61795	7658
A1-BAC-14	153298	71290	7790
A1-BAC-16	70942	28167	1623
A1-BAC-18	102256	31602	2029
A1-BAC-20	93851	49261	1123
Núcleo A3			
A3-BAC-2	157906	81373	5689
A3-BAC-4	92031	44695	4404
A3-BAC-6	61788	28492	5528
A3-BAC-8	64112	28354	5552
A3-BAC-10	117748	63313	3814
A3-BAC-12	185565	96338	1742
A3-BAC-14	128943	68833	2247
A3-BAC-16	139999	58552	1675
A3-BAC-18	186949	70462	2148

Muestra	Secuencias iniciales	Secuencias procesadas	Número de ASVs
Núcleo C11			
C11-BAC-2	131421	75396	3825
C11-BAC-4	137366	57796	2827
C11-BAC-6	95001	44882	8244
C11-BAC-8	112795	42663	1712
C11-BAC-10	98964	29920	2486
C11-BAC-12	85483	48924	2840
C11-BAC-14	58564	28097	6239
C11-BAC-16	156387	56242	4493
C11-BAC-18	105030	26758	2124
C11-BAC-20	100148	48501	7442
C11-BAC-22	63522	18782	1207
C11-BAC-24	121350	59299	5962
C11-BAC-26	95879	50494	2701

C11-BAC-28	105887	47284	5607
Núcleo D18			
D18-BAC-2	147660	111952	12568
D18-BAC-4	30350	23006	2731
D18-BAC-6	59119	43677	6025
D18-BAC-8	115709	83598	2656
D18-BAC-10	25980	19364	2770
D18-BAC-12	140098	106474	4269
D18-BAC-14	139316	103245	8948
D18-BAC-16	147589	112477	2501
D18-BAC-18	130514	97757	2969
D18-BAC-20	94409	70732	7139
D18-BAC-22	67549	52129	3650
D18-BAC-24	133772	102721	2876

Anexo 1.2 Número de secuencias y ASVs encontradas para las secuencias arquea.

Muestra	Secuencias iniciales	Secuencias procesadas	Número de ASVs
Núcleo A1			
A1-ARC-2	84185	66837	270
A1-ARC-4	40310	25777	160
A1-ARC-6	25722	9721	94
A1-ARC-8	12714	12055	279
A1-ARC-10	133009	129535	827
A1-ARC-12	96255	87100	659
A1-ARC-14	64444	54329	553
A1-ARC-16	133951	109234	790
A1-ARC-18	153148	127742	473
A1-ARC-20	23999	23241	428
Núcleo A3			
A3-ARC-2	75541	74796	726
A3-ARC-4	92912	86788	237
A3-ARC-6	68906	62594	296
A3-ARC-8	81717	76249	454
A3-ARC-10	92346	68525	409
A3-ARC-12	82138	68525	227
A3-ARC-14	154920	145077	394
A3-ARC-16	76334	68219	436
A3-ARC-18	70462	67911	417

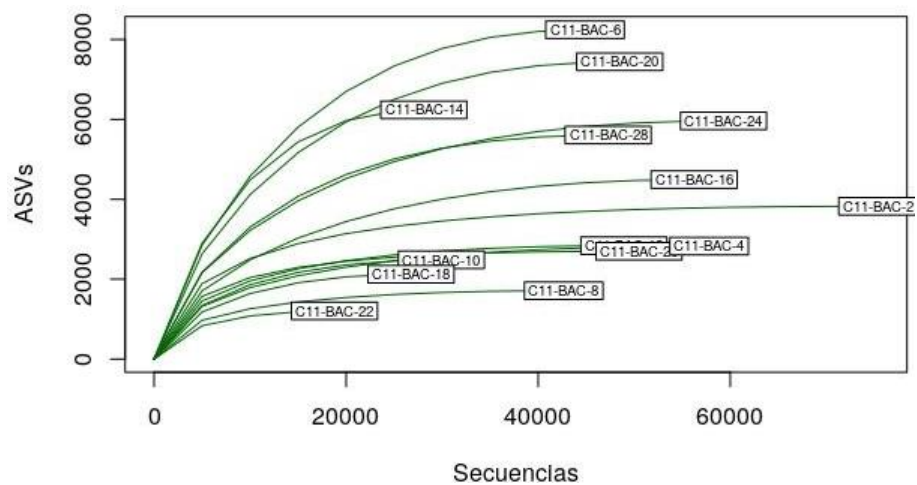
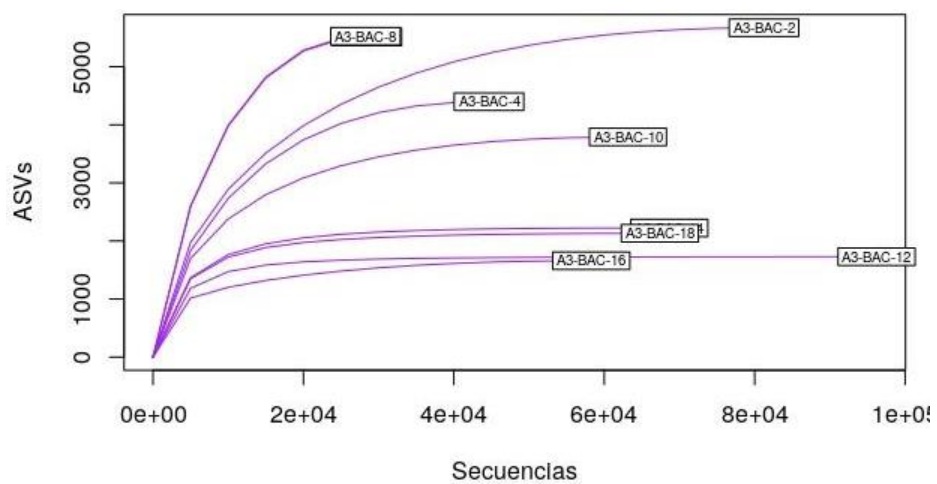
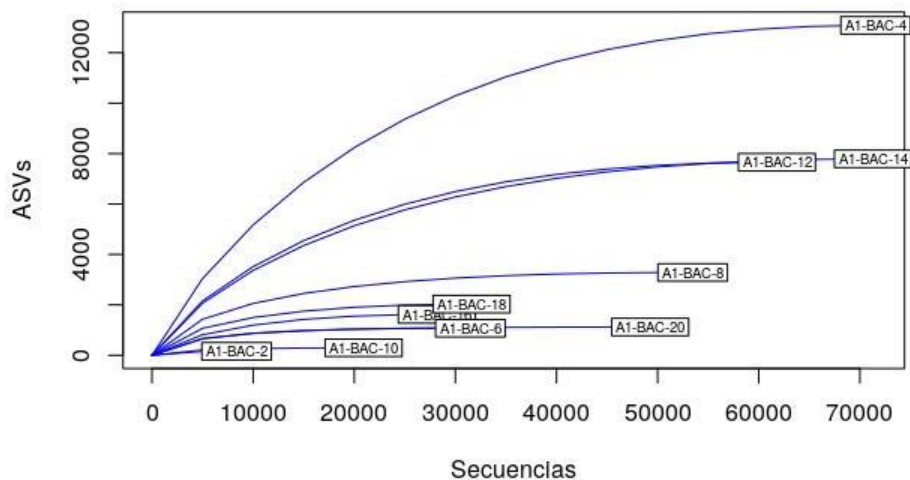
Muestra	Secuencias iniciales	Secuencias procesadas	Número de ASVs
Núcleo C11			
C11-ARC-2	90399	89178	308
C11-ARC-4	107738	104093	488
C11-ARC-6	69386	67344	455
C11-ARC-8	155292	152170	1062

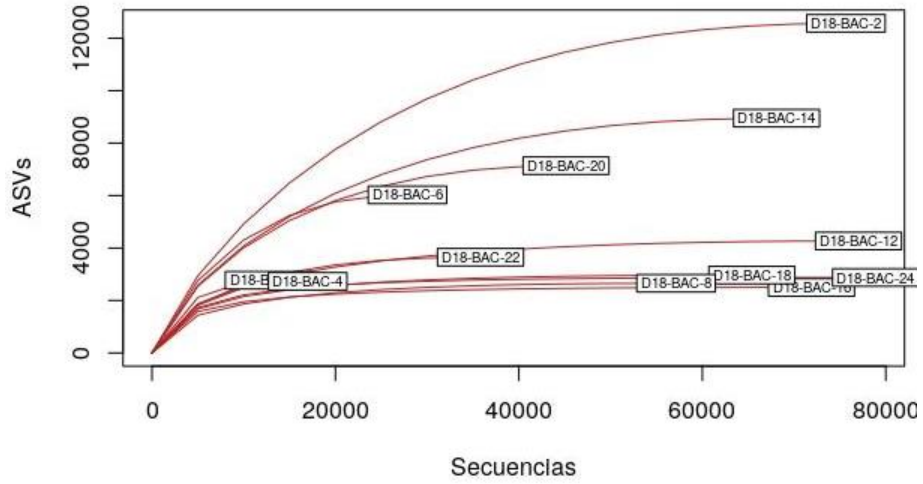
C11-ARC-10	81512	77811	879
C11-ARC-12	107034	104093	1075
C11-ARC-14	102282	99240	1297
C11-ARC-16	20905	25796	393
C11-ARC-18	74260	77811	689
C11-ARC-20	74574	71867	760
C11-ARC-22	52347	51196	531
C11-ARC-24	59546	58688	672
C11-ARC-26	56372	55438	624
C11-ARC-28	71217	70193	763
Núcleo D18			
D18-ARC-2	25102	24162	122
D18-ARC-4	56214	51131	300
D18-ARC-6	28559	26491	117
D18-ARC-8	75520	73118	473
D18-ARC-10	88606	87988	340
D18-ARC-12	44993	23456	604
D18-ARC-14	87385	83772	697
D18-ARC-16	132349	130598	490
D18-ARC-18	86597	84782	492
D18-ARC-20	106343	104042	420
D18-ARC-22	85639	75361	587
D18-ARC-24	132377	121009	629

Anexo 2. Curvas de rarefacción para cada núcleo

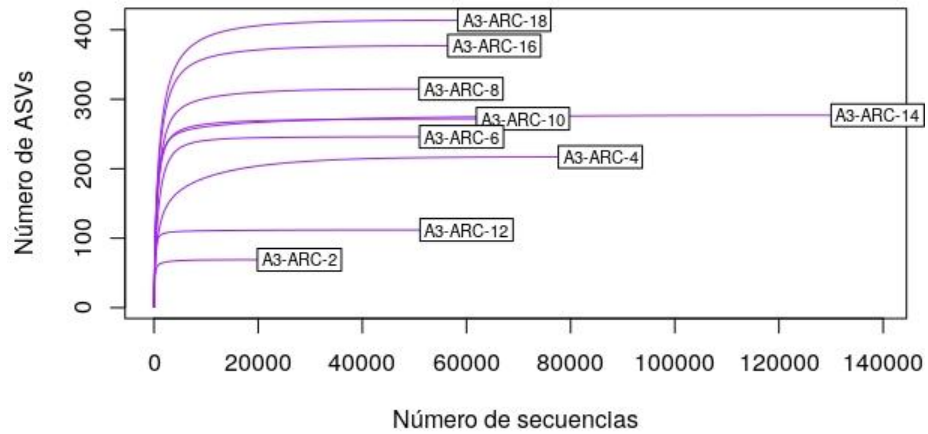
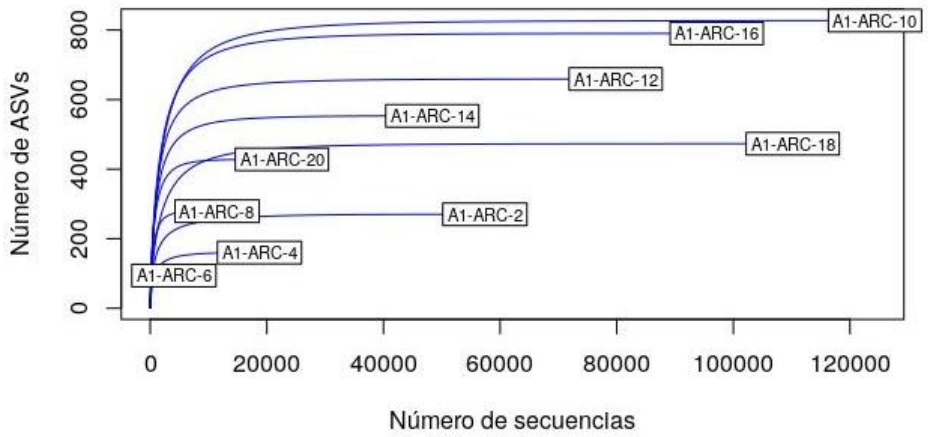
Se representa el número de ASVs encontrados (eje Y) contra el número de secuencias de cada muestra (eje X) En azul el núcleo A1, en morado el núcleo A3., en verde el núcleo C11 y en morado el núcleo D18.

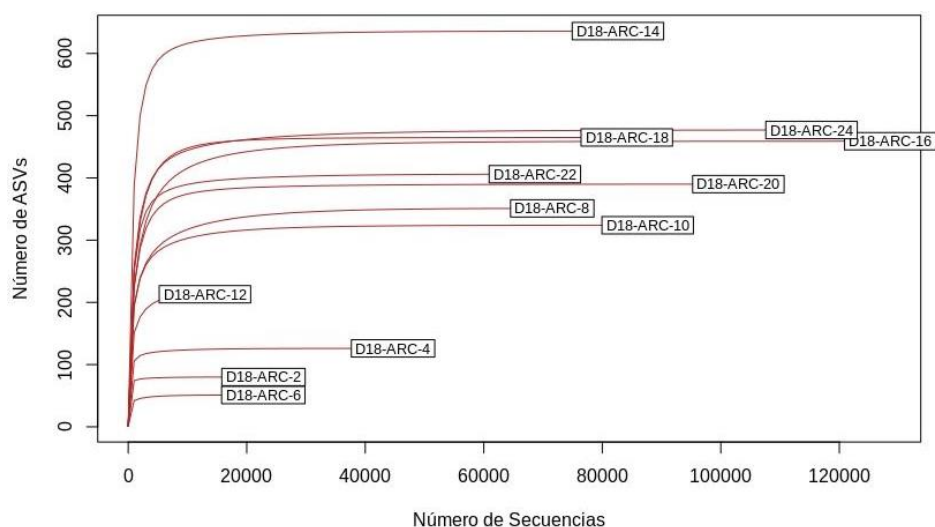
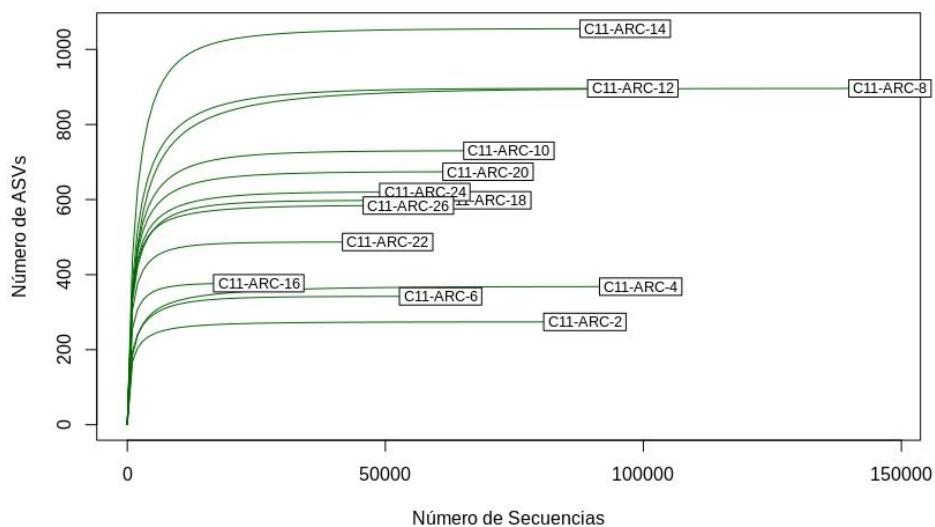
Anexo 2.1 Curvas de rarefacción para las secuencias de bacteria (V3-V4)





Anexo 2.2. Curvas de rarefacción las secuencias de arquea (V1-V2-V3).





Anexo 3. Índices de diversidad alfa de cada muestra.

Anexo 3.1 Resultados de bacteria. Número de ASVs, Índices de Simpson, Índice de Shannon y Cobertura (Número de ASVs necesarias para representar el 50% de la abundancia).

Muestras	ASVs	Simpson inverso	Simpson	Shannon	Cobertura
A1-BAC-2	160	7.64280737	0.86915803	3.02423945	3
A1-BAC-4	13088	853.044943	0.99882773	8.46776324	1083
A1-BAC-6	1075	15.1699854	0.93408036	4.18816233	5
A1-BAC-8	3287	67.6944177	0.98522773	6.14819258	69
A1-BAC-10	298	17.327444	0.94228808	3.62791218	6
A1-BAC-12	7658	72.6459903	0.98623462	7.03140649	191
A1-BAC-14	7790	55.2269025	0.98189288	6.81818781	154
A1-BAC-16	1623	17.012721	0.94122045	4.54385856	6

A1-BAC-18	2029	103.502253	0.99033837	5.97914921	57
A1-BAC-20	1123	17.0450334	0.94133188	4.21722593	6
A3-BAC-2	5689	437.537553	0.99771448	7.43362098	314
A3-BAC-4	4404	279.297937	0.99641959	7.08667168	196
A3-BAC-6	5528	685.444676	0.99854109	7.83912432	622
A3-BAC-8	5552	757.453774	0.99867979	7.86566329	627
A3-BAC-10	3814	203.965446	0.99509721	6.96668099	216
A3-BAC-12	1742	43.172657	0.97683719	5.77534263	63
A3-BAC-14	2247	107.432581	0.99069184	6.44914563	146
A3-BAC-16	1675	474.663082	0.99789324	6.64498034	206
A3-BAC-18	2148	68.6248237	0.98542801	6.19842887	112
C11-BAC-2	3826	879.485854	0.99886297	7.49527957	427
C11-BAC-4	2827	382.346299	0.99738457	6.76615628	163
C11-BAC-6	8249	968.155138	0.99896711	8.2130221	823
C11-BAC-8	1713	172.021966	0.99418679	6.15527578	89
C11-BAC-10	2488	269.340151	0.99628722	6.62358197	131
C11-BAC-12	2841	137.556855	0.99273028	6.64471207	182
C11-BAC-14	6243	1481.23673	0.99932489	8.19127944	976
C11-BAC-16	4496	547.493165	0.99817349	7.20247169	226
C11-BAC-18	2125	176.438054	0.99433229	6.26657279	80
C11-BAC-20	7450	1117.31714	0.999105	8.07800062	620
C11-BAC-22	1208	100.045185	0.99000452	5.66890958	44
C11-BAC-24	5963	858.156199	0.99883471	7.6913875	395
C11-BAC-26	2701	584.673731	0.99828964	7.11253287	278
C11-BAC-28	5610	479.91634	0.9979163	7.54464821	335
D18-BAC-2	7831	648.319673	0.99845755	8.05162357	731
D18-BAC-4	1852	259.990414	0.9961537	6.69604473	171
D18-BAC-6	3530	384.657577	0.99740029	7.44187702	545
D18-BAC-8	1673	189.97004	0.99473601	6.31790516	119
D18-BAC-10	1650	240.316242	0.99583882	6.73224796	261
D18-BAC-12	2774	283.053414	0.9964671	6.82416951	202
D18-BAC-14	5364	481.677664	0.99792392	7.54690816	336
D18-BAC-16	1518	394.467351	0.99746494	6.65218716	200
D18-BAC-18	1778	368.526058	0.99728649	6.67742828	184
D18-BAC-20	4472	521.919423	0.998084	7.49884667	339
D18-BAC-22	2376	288.551513	0.99653441	6.7372787	151
D18-BAC-24	1911	557.932595	0.99820767	6.8858804	216

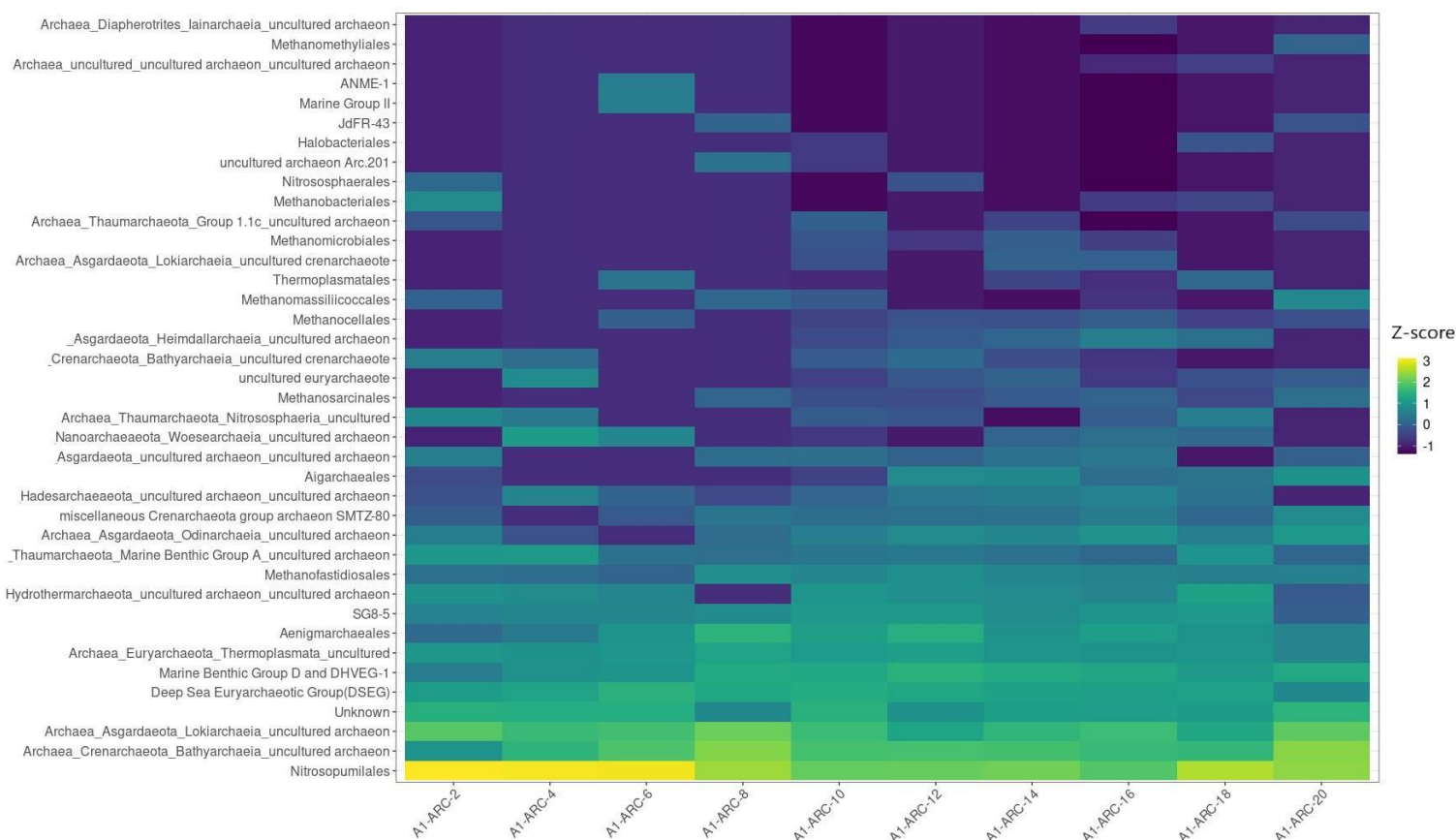
Anexo 3.2 Resultados de arquea. Número de ASVs, Índices de Simpson, Índice de Shannon y Cobertura (Número de ASVs necesarias para representar el 50% de la abundancia).

Muestra	ASVs	Simpson Inverso	Simpson	Shannon	Cobertura
A1-ARC-2	245	36.0732548	0.97227863	4.51927292	20
A1-ARC-4	99	4.05651458	0.75348295	2.70897748	2
A1-ARC-6	57	2.13041327	0.53060751	1.76140275	1
A1-ARC-8	222	66.4631639	0.98495407	4.81480381	35
A1-ARC-10	879	141.124178	0.99291404	5.8788074	69
A1-ARC-12	638	83.0487194	0.98795888	5.59666988	64
A1-ARC-14	430	24.2134647	0.95870066	4.9546104	42
A1-ARC-16	778	31.1031494	0.96784892	5.49468782	67
A1-ARC-18	458	32.3206846	0.96906006	4.80366838	23
A1-ARC-20	392	121.04203	0.99173841	5.43102504	63
A3-ARC-2	114	49.899827	0.97995985	4.21823741	17
A3-ARC-4	269	30.4771861	0.96718857	4.27339625	16
A3-ARC-6	270	42.180277	0.97629224	4.47764784	17
A3-ARC-8	359	36.6295026	0.9726996	4.75397602	23
A3-ARC-10	350	48.6775702	0.97945666	4.86221809	24
A3-ARC-12	147	49.633824	0.97985245	4.4378768	21
A3-ARC-14	361	56.4114123	0.98227309	4.90874021	25
A3-ARC-16	435	45.8730817	0.97820072	4.92748656	23
A3-ARC-18	496	69.2058175	0.98555035	5.20174255	35
C11-ARC-2	283	56.0690818	0.98216486	4.66778827	21
C11-ARC-4	368	40.0655617	0.97504091	4.60180773	17
C11-ARC-6	330	27.4020015	0.96350632	4.61726695	23
C11-ARC-8	906	88.4981634	0.98870033	5.64950433	51
C11-ARC-10	720	46.7099954	0.97859131	5.54609411	74
C11-ARC-12	884	73.859794	0.98646083	5.82001977	88
C11-ARC-14	1002	123.465196	0.99190055	6.18144289	132
C11-ARC-16	341	75.9385735	0.98683146	5.14360546	47
C11-ARC-18	589	76.3139809	0.98689624	5.59177885	79
C11-ARC-20	622	71.1748054	0.98595008	5.58642316	77
C11-ARC-22	447	64.1910035	0.98442149	5.35479181	65
C11-ARC-24	571	106.404053	0.99060186	5.65650874	83
C11-ARC-26	518	101.188835	0.99011749	5.58402777	78
C11-ARC-28	647	141.599419	0.99293782	5.8120918	94
D18-ARC-2	75	12.5931236	0.92059158	3.5883921	13
D18-ARC-4	119	9.78284942	0.89778029	3.68506497	12
D18-ARC-6	44	3.5497018	0.7182862	2.25619789	1
D18-ARC-8	336	56.204547	0.98220785	4.85035038	25

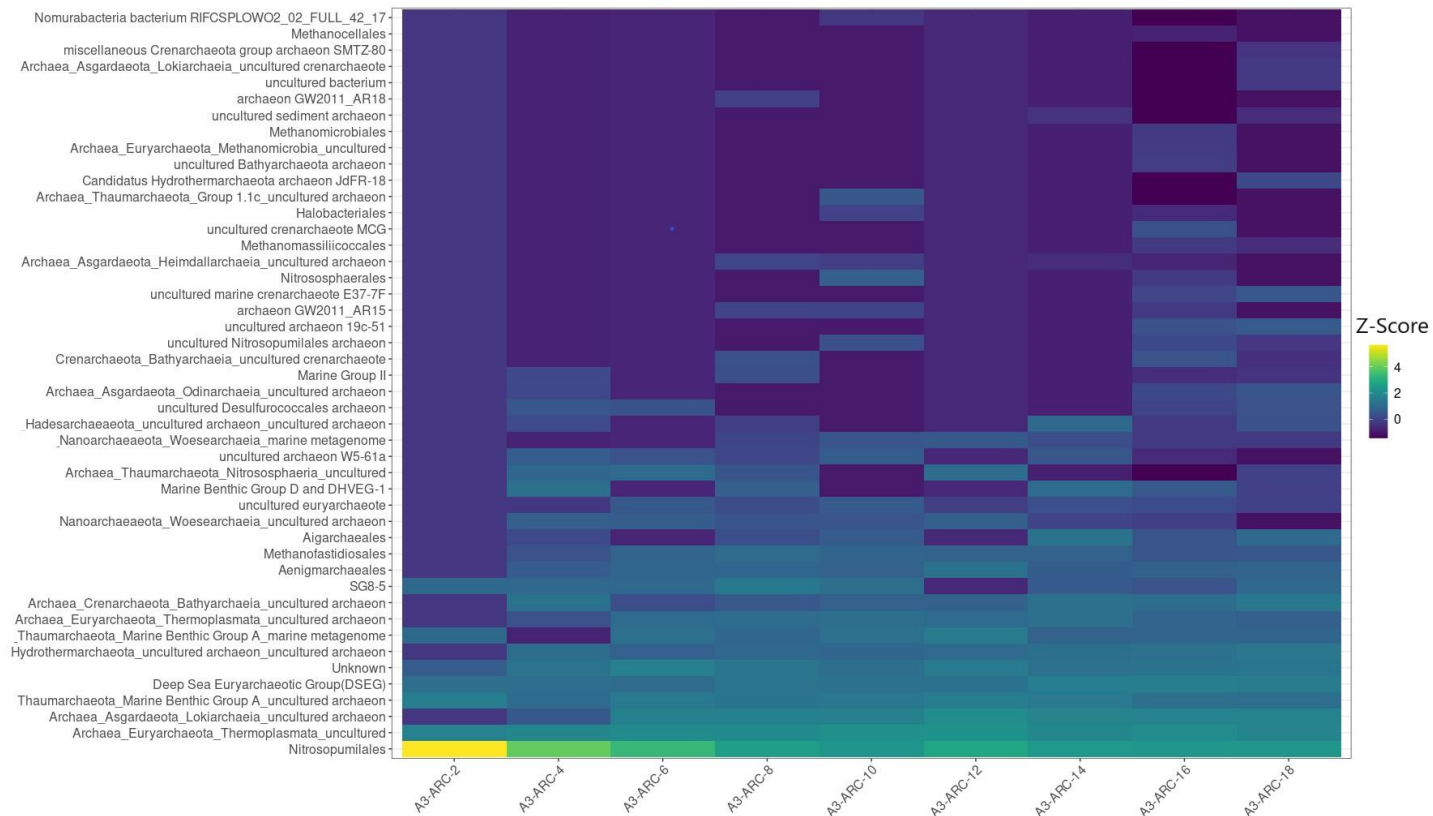
D18-ARC-10	333	75.6074305	0.98677379	4.98405816	31
D18-ARC-12	212	86.8222574	0.98848222	4.74909033	34
D18-ARC-14	750	190.85177	0.99476033	6.0638535	118
D18-ARC-16	489	99.4315484	0.98994283	5.25693381	39
D18-ARC-18	487	77.3198582	0.98706671	5.29323789	41
D18-ARC-20	436	104.285952	0.99041098	5.30677113	44
D18-ARC-22	435	54.6329141	0.98169602	5.22378427	43
D18-ARC-24	546	65.6442118	0.98476636	5.32917804	44

Anexo 4. Órdenes de archaeas encontrados en las muestras.

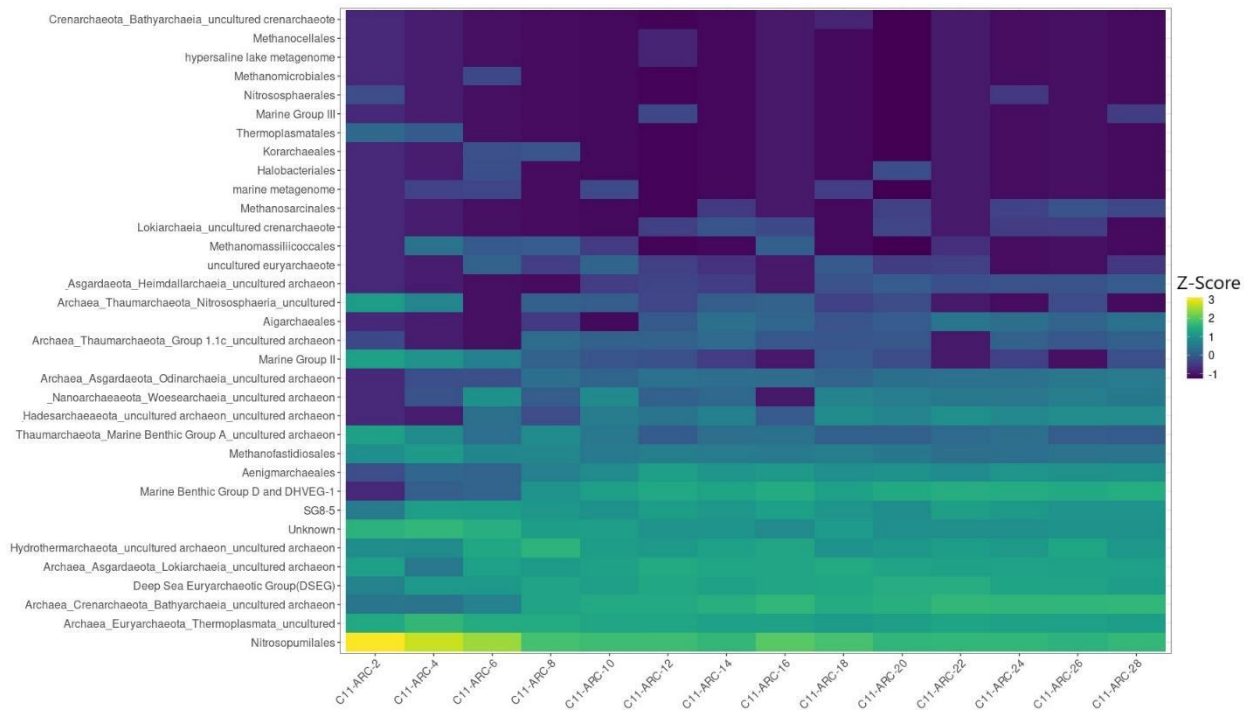
Para estos heatmaps se colapsó la taxonomía a nivel de orden y se agruparon las muestras que no tuvieron orden clasificado como "Unknown". La abundancia relativa se transformó en puntuación estándar, mejor conocido como "Z-score" para poder apreciar mejor las diferencias.



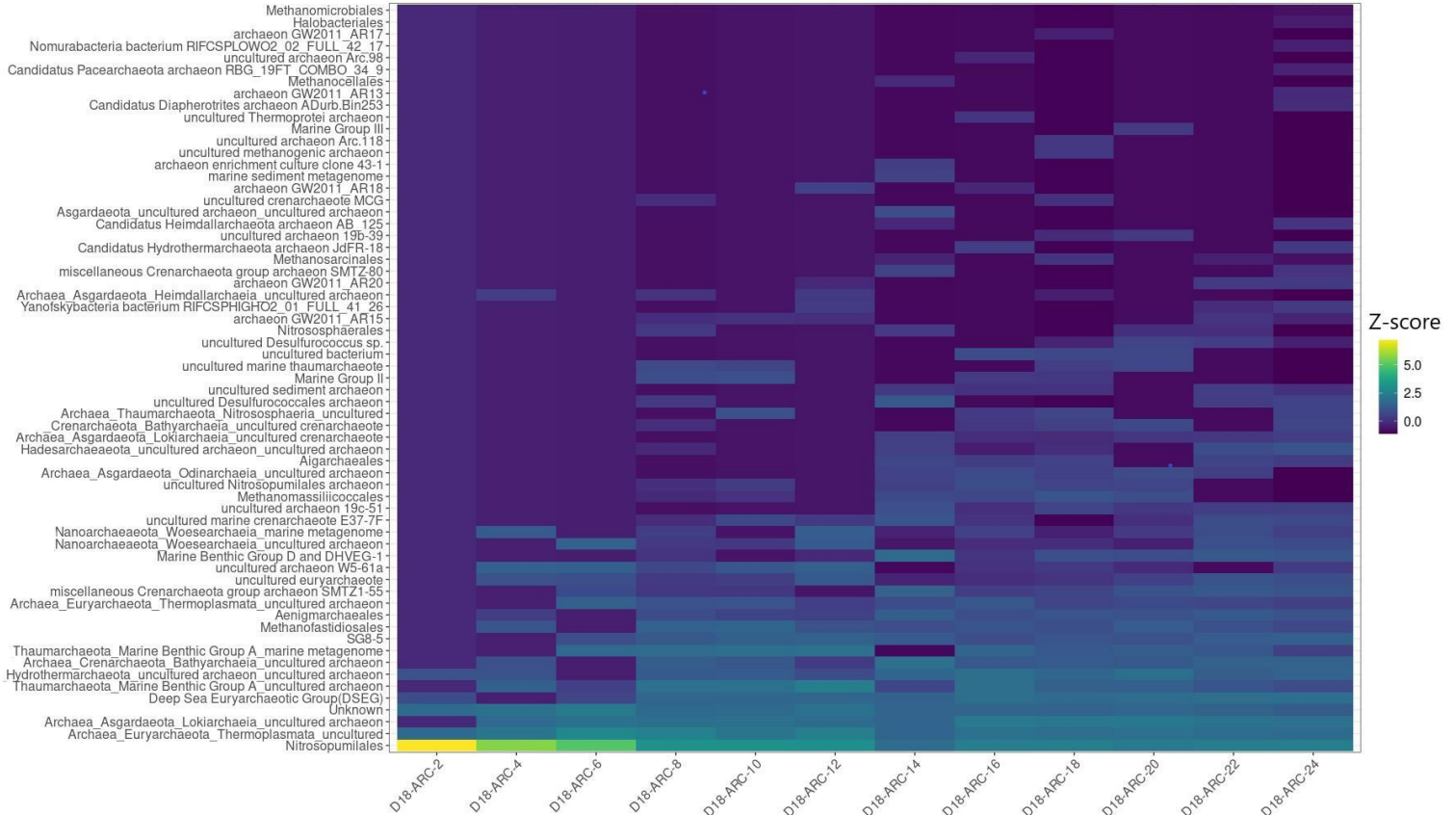
Anexo 4.1. Órdenes encontrados de arquea para el núcleo A1, las muestras se ordenaron conforme la profundidad (menor a mayor de izquierda a derecha) y los taxones conforme a su abundancia (En orden ascendente).



Anexo 4.2. Órdenes encontrados de arquea para el núcleo A3, las muestras se ordenaron conforme la profundidad (menor a mayor de izquierda a derecha) y los taxones conforme su abundancia (en orden ascendente).



Anexo 4.3. Órdenes encontrados de arquea para el núcleo C11, las muestras se ordenaron conforme la profundidad (menor a mayor de izquierda a derecha) y los taxones conforme su abundancia (en orden ascendente).



Anexo 4.4. Órdenes encontrados de arquea para el núcleo D18, las muestras se ordenaron conforme la profundidad (menor a mayor de izquierda a derecha) y los taxones conforme su abundancia (en orden ascendente).

Anexo 5. Valores de media y mediana de las clases diferencialmente abundantes encontradas por ANCOM.

Anexo 5.1. Valores de abundancia media y mediana de las clases de arquea diferencialmente abundantes entre los núcleos.

Clases de arquea	A1 media	A3 media	C11 media	D18 media	A1 mediana	A3 mediana	C11 mediana	D18 mediana
Bathyarchaeia	14.76	1.11	12.49	4.9	15.95	0.47	13.02	0.82
Marine_Benthic_Group_A	0.27	2.08	1.02	3.58	0.17	1.81	0.36	2.12
Methanomicrobia	0.04	0.0099	0.0056	0.0076	0.03	0	0	0

Nitrososphaeria	62.45	76.11	45.24	60.99	52	75.03	39.3	53.2
Odinarchaeia	0.41	0.027	0.28	0.098	0.22	0	0.23	0.06
Thermoplasmata	4.81	10.17	16.63	10.61	4.1	9.82	18.36	12.2

Anexo 5.2. Valores de abundancia media y mediana de las clases de arquea diferencialmente abundantes entre las categorías del sedimento

Clases de arquea	Superficie media	Medio media	Profundo media	Superficie mediana	Medio mediana	Profundo mediana
Bathyarchaeia	0.44	11.31	12.1	0.044	9.92	8.01
Discoba	0.0057	0	0	0	0	0
Nanohaloarchaeia	0.47	5.72	7.74	0.2	6.05	7.27
Nitrososphaeria	94.16	49.72	43.72	95	45.69	42.45
Odinarchaeia	0.0068	0.17	0.4	0	0.095	0.2
Thermoplasmata	1.86	14.68	14.25	1.1	14.77	12.9
Verstraetearchaeia	0	0	0.0041	0	0	0
Unclassified	0.33	2.11	2.56	0.29	1.49	1.9
uncultured_archaeon	0.36	3.71	4.75	0.12	1.74	4.48
Núcleo C11	Superficie media	Medio media	Profundo media	Superficie mediana	Medio mediana	Profundo mediana
Bathyarchaeia	0.13	12.12	18.97	0.03	10.64	21.78

Anexo 5.3. Valores de abundancia media y mediana de las clases de bacteria diferencialmente abundantes entre los núcleos.

Clases de bacteria	A1 media	A3 media	C11 media	D18 media	A1 mediana	A3 mediana	C11 mediana	D18 mediana
Acidobacteriia	0.045	0.3	0.14	0.95	0.04	0.25	0.11	0.94
Actinobacteria	0.3	0.69	0.11	0.085	0.17	0.78	0.065	0.088
Bacilli	0.29	1.16	0.13	0.094	0.16	1.42	0.095	0.079
Bacteroidia	0.24	0.72	1.02	1.5	0.26	0.69	0.86	1.43
Planctomycetes; BD7-11	0.0043	0.076	0.097	0.18	0.0028	0.056	0.094	0.17
Calditrichia	0.087	0.44	0.49	0.87	0.083	0.43	0.46	0.88
Clostridia	2.06	0.26	0.26	0.28	1.97	0.2	0.22	0.15
Elusimicrobia	0.0025	0.12	0.028	0.042	0	0.094	0.017	0.028
Fimbriimonadia	0	0.033	0.0018	0.03	0	0.025	0	0.019
Fusobacteriia	0.32	0.15	0.3	0.017	0.094	0.087	0.0088	0
Gammaproteobacteria	57.19	28.91	16.27	10.73	59.26	28.59	16.02	11.28
Gemmatimonadetes	0.51	1.73	1.1	2.83	0.43	1.72	0.83	2.86
Hydrogenedentia	0.059	0.36	0.28	0.72	0.05	0.39	0.18	0.65

Atribacteria; JS1	0.049	0.004 1	0.036	0.0046	0.032	0	0.01	0
Lentisphaeria	0.006 9	0.004 7	0.062	0.036	0.0013	0	0.051	0.036
Moduliflexia	0.021	0.095	0.48	0.18	0.015	0.1	0.5	0.032
Mollicutes	0.029	0.001 6	0.0016	0.0008 9	0.017	0	0	0
Omnitrophia	0.004	0.2	0.072	0.18	0	0.092	0.022	0.12
Oxyphotobacteria	0.089	0.092	0.047	0.013	0.033	0.076	0.0056	0.0015
Rhodothermia	0.031	0.092	0.028	0.13	0.028	0.066	0.012	0.12
Planctomycetes; SPG12-343-353-B69	0.022	0.039	0.23	0.15	0.0064	0.049	0.18	0.087
Acidobacteria; Subgroup_15	0.009 4	0.14	0.023	0.12	0.0076	0.14	0.012	0.093
Acidobacteria; Subgroup_6	0.046	0.27	0.054	0.33	0.042	0.28	0.019	0.33
Chloroflexi; TK17	0.07	0.19	0.094	0.35	0.025	0.18	0.01	0.24
Planctomycetes; vadinHA49	0.12	0.61	1	1.14	0.12	0.65	1.05	1.02
Actinobacteria; WCHB1-81	0.28	0.07	0.15	0.074	0.18	0.026	0.13	0.026

Clases de bacteria	Superficie media	Medio media	Profundo media	Superficie mediana	Medio mediana	Profundo mediana
Aminicenantia	0.14	1.46	2.23	0.076	0.84	1.8
Armatimonadetes; DG-56	0.023	0.091	0.091	0.002	0.074	0.057
Entotheonellia	0.12	0.063	0.0099	0.11	0.035	0
Chlamydiae; LD1-PA32	0.025	0.099	0.21	0.022	0.086	0.18
Moduliflexia	0.039	0.21	0.34	0.014	0.063	0.31
Nitrospira	0.93	0.17	0.066	0.99	0.11	0.034
Planctomycetes; SPG12-343-353-B69	0.02	0.16	0.16	0.0086	0.067	0.11
Spirochaetia	0.12	0.64	1.16	0.13	0.3	1.28
Acidobacteria; Subgroup_21	2.08	0.85	0.41	2.06	0.67	0.25
Chloroflexi; TK17	0.34	0.2	0.072	0.28	0.06	0.015
C11	Superficie media	Medio media	Profundo media	Superficie mediana	Medio mediana	Profundo mediana
Acidimicrobiia	3.82	1.21	0.18	3.25	0.61	0.15
Gematimonadetes; AKAU4049	0.23	0.24	0.013	0.23	0.23	0.0084
Aminicenantia	0.15	2.55	3.87	0.054	1.95	3.44
Entotheonellia	0.16	0.021	0	0.16	0.018	0
Rhodothermia	0.098	0.024	0.0011	0.079	0.018	0
Acidobacteria; Subgroup_21	1.84	0.42	0.12	1.83	0.44	0.12
Chloroflexi; TK17	0.37	0.015	0.0034	0.21	0.011	0

D18	Superficie media	Medio media	Profundo media	Superficie mediana	Medio mediana	Profundo mediana
Modulifelxia	0	0.04	0.5	0	0.023	0.52

Anexo 6. Valores de la concentración de metales, sulfato, nitrato y pH. (se representan en mg/kg excepto pH y profundidad)

C11-14	C11-12	C11-10	C11-8	C11-6	C11-4	C11-2	Muestra
7000	45000	70000	70000	50000	40000	40000	SO4
17403.396	12531.772	19964.521	17465.05	14458.701	17135.139	20183.178	Na
9768.3535	8124.5211	13514.475	9426.0767	8278.4354	11210.948	12450.917	Al
4759.8218	2980.8812	6476.4431	3678.1754	3638.4524	3651.01	3985.9817	K
3040.0428	2775.5875	3699.4881	3356.4683	3718.665	3117.5096	3814.5505	Fe
2528.2466	2442.5607	3287.617	2984.7533	2986.5391	2891.9507	3255.3486	Ca
313.00071	226.03895	402.16593	289.70791	253.38435	973.99383	1202.1835	Mn
117.2402	60.73129	72.46346	113.92326	144.23469	77.909792	120.55138	B
430.97006	408.23499	539.58694	495.9953	566.57058	460.77255	569.02936	Mg
307.48681	224.29374	410.06178	312.04699	254.06378	327.78566	313.70367	P
110.04205	88.007663	142.61342	122.79796	97.375	119.1357	122.15505	Sr
26.108553	48.42484	24.983319	43.039781	46.796684	75.79468	23.41633	Ba
17.243407	11.546424	22.200088	15.828974	12.159779	17.822745	17.181743	Cu
29.748325	22.101341	41.160282	28.075724	26.996259	28.907633	31.876973	Zn
0	26.016092	0	0	41.457653	2.9008558	0	Si
28	28.333333	25	20	28	20	21.666667	NO3
21.868639	16.327203	28.164872	22.890368	18.41284	24.392136	25.913762	V
22.21675	15.583717	31.233275	20.619342	16.87585	22.664302	24.811101	LI
22.82794	16.387548	30.354987	22.094284	19.202466	25.740324	25.438257	Ni
18.355096	13.262388	24.603001	17.518794	14.87602	17.782652	17.919633	Cr
7.1047826	5.8467433	9.9443954	8.2155051	6.6149405	10.367541	12.026239	Pb
2.8658731	2.2878672	2.8952074	5.8658183	1.9843878	8.0117965	8.0683945	As
0.4258375	0.3223755	0.5636452	0.3287236	0	3.1096839	7.2696881	Mo
0.665923	0.2395211	0.9112533	0	0	0.8060756	0	Co
0	0	0	0	0	4.1864071	4.6593028	Tl
0.9483892	0.7392082	1.0012621	1.2257948	0	1.4487587	0.8858349	Sb
0	0	0	0	0	1.6899229	0	Se
0	0.2495275	0.2427096	0	0	0	0	Sn
0	0	0.1294351	0	0	0	0	Cd
0	0	0	0	0	0	0	Be
8.2	7.91	8.04	7.89	8.03	8	7.78	pH
857.14	857.12	857.1	857.08	857.06	857.04	857.02	Prof.

A1-6	A1-4	A1-2	C11-28	C11-26	C11-24	C11-22	C11-20	C11-18	C11-16
55000	50000	30000	70000	60000	80000	55000	60000	55000	70000
11905.617	15443.526	19887.202	15997.369	17790.819	17550.575	15568.432	16312.568	16720.35	16817.084
6426.2424	9554.6617	10572.232	11058.858	11636.955	12395.427	10479.456	9855.8915	11088.417	10450.135
3504.2667	8064.6617	8965.8036	6954.557	5660.3045	4766.1777	6618.1769	4088.907	3373.9928	4112.0882
2478.8364	3134.7368	3699.9821	3080.9118	3487.4897	3688.3434	2934.6871	3302.938	2921.5971	3858.4609
2091.0667	2633.2331	2676.9018	2782.5426	3218.8642	3242.5022	2634.381	2885.4419	2659.7194	3620.4951
178.26849	268.11504	638.33661	283.6427	292.11523	323.65919	244.75986	277.46357	928.84892	292.94329
2380.8182	2729.8872	3343.5357	124.84729	139.61317	156.83693	103.82925	126.17674	104.89281	96.426643
363.03455	462.81579	555.93661	452.26464	512.76049	539.78343	435.17959	491.1814	437.02086	575.41494
184.53091	322.10902	335.43393	331.20979	334.84115	360.33046	291.1415	328.38295	332.13309	306.38074
111.30424	147.66842	181.825	118.32913	126.9679	128.74892	101.80408	121.66279	110.39928	117.60036
49.422061	80.742105	32.554464	64.805634	66.819753	67.639172	18.801837	62.578682	16.813381	62.663186
11.187212	19.401128	20.051071	17.668792	18.092181	19.17308	14.525578	17.337442	16.868633	15.557156
20.068121	28.73188	33.406429	30.384211	32.512263	33.811217	28.331293	30.163566	28.293094	31.126553
64.169091	64.718496	66.449196	0	0	10.916307	11.996054	3.9256047	26.653381	50.241944
10	16.666667	18.333333	40.476191	20.454546	25	20	42.5	37.5	37.5
16.57897	19.021353	22.293393	25.246257	26.822222	32.679724	24.410136	25.106667	21.190791	24.39487
13.906182	19.722857	22.760536	24.664789	25.89037	27.595686	22.144966	22.588372	20.836907	22.291359
9.3035758	13.502105	15.688304	23.673462	24.853004	26.546851	22.181701	23.225194	26.873166	22.535554
6.7250303	10.106917	10.985625	18.625056	19.869465	21.054185	17.806599	17.00969	17.52518	17.423042
5.4136	9.373609	10.365179	7.9175686	8.3355556	8.3696463	6.6650952	7.8964341	8.1327338	7.8805491
1.3706424	4.3469173	4.24175	2.415063	2.7679671	2.6178775	2.2660952	2.4619845	6.7412878	2.879802
0.1272848	0.3590526	0.5720089	0.4091179	0.4980329	0.4313201	0.3751088	0.2872558	1.5180216	0.4219712
0.0894121	0	1.5590089	0.6029578	0	0.5834858	0.7240612	0.8804651	3.3265827	0.1259676
0	0	0	0	0	0	0	0	2.5463022	0
0	1.0378496	0	1.3865901	1.2856955	1.3780673	0.3924558	0.8808217	0.592813	0.6058236
0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
0.0930182	0.559985	0	0	0.2120741	0.2622088	0	0.4482171	0.2514173	0.059595
0	0	0	0.09149	0	0	0	0	0	0
0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
8.34	8.24	7.61	8.42	8.3	8.2	8.4	8.1	8.07	7.99
877.06	877.04	877.02	857.28	857.26	857.24	857.22	857.2	857.18	857.16

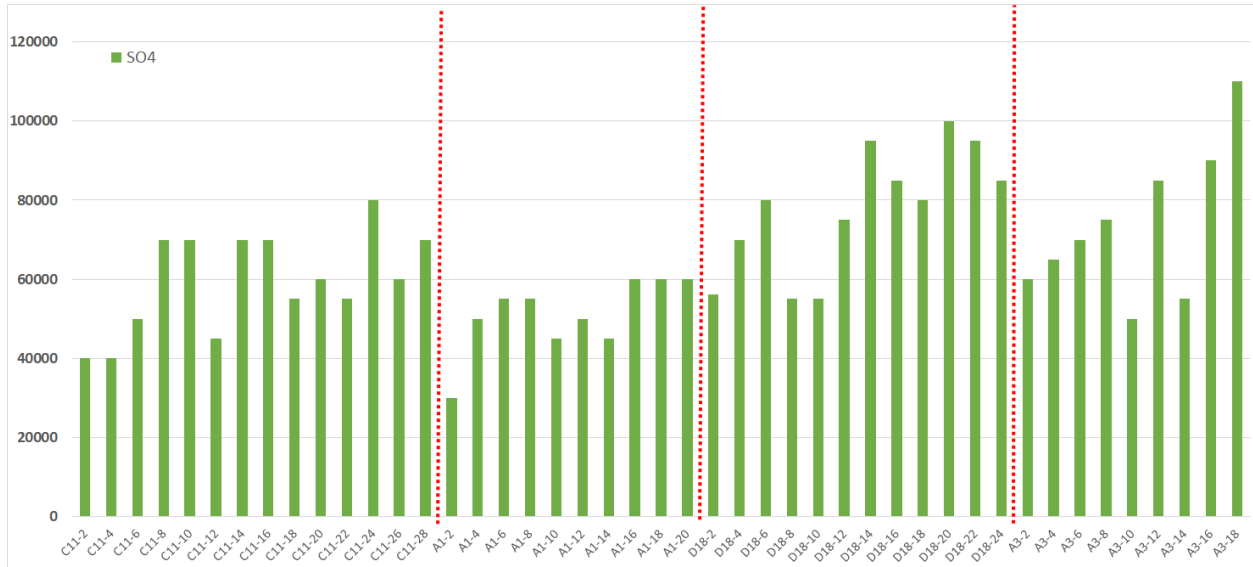
D18-6	D18-4	D18-2	A1-20	A1-18	A1-16	A1-14	A1-12	A1-10	A1-8
80000	70000	56250	60000	60000	60000	45000	50000	45000	55000
13697.631	16602.859	16727.301	13500.372	13957.41	13341.384	11870.347	10855.378	15796.784	13148.748
9113.0901	10847.312	9164.6285	8405.679	8953.1429	8587.551	5744.08	5821.5984	7549.7489	8401.9167
3399.2632	3859.0246	3548.7694	6811.7901	9060.7143	6600.5238	3404.2467	3671.9055	4849.3559	4243.725
2836.3591	3027.3349	3038.2972	2590.4815	2991.4357	2875	2646.8267	3002.5197	4046.845	3507.1417
2467.5823	2714.0092	2502.0743	2280.7407	2534.4786	2196.068	2537.6467	3314.3937	4491.2227	3339.85
652.65022	946.82028	781.24613	239.70617	253.59571	259.12245	170.03867	162.54646	209.51856	190.5525
45.000143	63.513441	28.998065	89.333333	2016.5	129.47551	1751.06	3042.8976	3386.4847	1954.2
418.55723	443.76421	467.33746	385.65803	451.62929	430.53197	417.38933	519.09764	668.16157	539.2425
276.12733	316.23349	303.45201	230.49568	251.97857	244.01769	188.83067	178.30079	237.85699	237.64417
134.30901	147.07911	143.72755	115.66049	138.80786	127.46463	111.23133	110.54016	148.29476	130.03583
19.36166	31.938249	54.908204	12.204815	65.313429	21.666939	30.7866	65.735433	85.640284	18.1335
16.178827	20.78871	17.967647	13.066667	14.325357	14.02517	11.2936	11.090472	1180.6332	14.439583
25.11495	27.417204	24.963622	25.153827	28.620714	27.707619	22.7792	21.849449	442.9083	30.40325
8.5379113	23.123118	112.40403	8.7232099	45.481286	6.6411361	52.504667	77.820236	0	18.59825
27.5	16	10	22.5	32	17	18.75	13	11.25	10
18.385479	23.301843	20.67678	18.535988	17.976357	18.471293	14.4764	15.446772	18.527183	21.286
17.793991	20.621659	19.154721	18.239074	18.869857	19.126054	12.689333	12.023622	15.608843	16.081583
14.795637	21.914286	20.129412	12.95858	14.125357	13.623333	10.374733	9.9958268	64.731223	12.981833
12.134764	13.733257	12.24017	9.4547531	9.6195714	10.053197	6.5125867	6.5438976	8.9305568	9.2740833
6.8249356	8.2519969	7.7839783	6.647284	7.5335	7.2029252	5.76826	5.5695827	43.812773	7.0606333
5.7669242	7.4367338	5.9253019	1.465321	1.4401286	1.3913401	1.1532	0.8681024	1.6232751	1.6008583
0.5890558	2.5554916	1.9424923	0.1657716	0.1743286	0.134932	0	0.1222677	0	0.0781917
0.7795351	1.0265899	1.3788081	0.9566667	1.12515	0.7579388	0.67172	0.3277717	0.5735153	0.3601
0	1.6506528	0	0.0722469	0	0	0	0	0	0
0.7524106	0.6834946	0	0.771216	2.4332429	1.2639592	0.95186	0.7257244	0	0
0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
0	0	0	0	0	0	0	0	0.4775546	0
0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
0	0	0	0.0082407	0	0	0	0	0	0
7.6	7.77	7.7	8.56	8.6	8.34	8.25	8.21	8.27	8.59
1281.06	1281.04	1281.02	877.2	877.18	877.16	877.14	877.12	877.1	877.08

A3-2	D18-24	D18-22	D18-20	D18-18	D18-16	D18-14	D18-12	D18-10	D18-8
60000	85000	95000	100000	80000	85000	95000	75000	55000	55000
14664.372	7891.0001	10182.337	11205.952	13450.921	14768.094	11109.871	12474.057	14130.42	15076.429
8966.9683	5724.5692	6356.2564	8129.8498	8790.57	8858.6083	7980.5556	8468.5319	6838.2563	10088.665
3855.7617	2544.8343	2788.8821	3116.793	3407.9522	3373.6227	3111.929	3060.0263	2770.652	3594.6801
2996.1086	1817.9054	2114.9846	2699.8041	2855.6228	2916.0904	3058.8272	2637.0507	2944.4883	2751.4882
2531.9834	1554.0742	1671.7949	2480.6401	2419.8522	2499.9857	3175.3704	2164.5886	3107.7862	2306.0988
665.49623	145.35882	166.02615	202.9275	228.51795	586.19584	808.32562	812.1659	870.36391	860.89013
38.520211	35.442819	32.662923	50.475441	24.31323	45.913558	60.762577	49.530941	41.497801	42.555842
440.51735	260.73663	309.44	392.13913	427.07389	433.43257	483.58642	381.15932	454.17058	406.19958
286.2632	166.47371	207.63231	247.45656	284.43772	293.89598	254.40818	263.07768	226.86732	293.23783
164.2911	83.023862	98.523077	120.74788	130.44476	134.93257	126.70911	126.15866	114.02199	133.67038
68.796078	36.575122	17.194872	66.270412	69.552076	66.280201	65.273534	34.090586	23.410387	14.43637
22.03273	11.894521	12.424769	13.365382	15.640535	17.117073	14.340664	17.047992	15.039424	19.311892
24.928582	15.752939	18.585641	22.306009	23.724912	25.407317	24.670756	26.844371	22.455269	26.297705
68.257994	23.336235	0	74.888308	0	14.568938	117.85725	76.0632	0	0
10	21.666667	26	23.333333	18.333333	25	31.666667	11.666667	27.5	10
18.871267	13.631198	13.646205	14.395493	17.329346	16.105237	15.018827	17.184529	16.985671	20.97274
18.564404	12.490941	14.262769	17.354409	17.853695	18.621951	17.111497	17.148321	15.131842	20.267942
14.243062	10.408794	12.266462	14.070412	14.358761	15.87891	16.732562	16.745359	16.587036	19.665508
9.2159879	8.1091913	8.8993846	10.598367	10.920971	12.195194	13.265046	11.200198	10.698635	13.15765
7.9033183	4.2122183	5.1086154	5.9786088	6.201893	7.124132	6.3595833	6.5153456	6.1424109	7.2666203
4.8034314	2.2295537	3.1238513	4.7604507	9.029064	8.5885222	7.0609491	7.1188282	6.6403108	6.6277608
1.9035747	0.238776	0.1891385	0.1382691	0.3921956	0.3691105	0.2440586	0.8372877	1.3638742	1.8889847
1.545445	0.0848564	0.2545949	0	0.2312878	1.3746628	1.8950386	1.9491639	0	1.2575591
0	0.1984048	0	0	0	0	0	1.1131402	1.0976422	1.6385744
0.5876621	0.3967963	0	0.4958393	0	0	0	0.6375049	0	0.5904103
0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
0	0	0.0805487	0	0	0.2113989	0.1858951	0.145181	0	0
0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
7.45	8	8.26	7.78	8.09	7.4	7.6	8.2	7.78	7.8
1926.02	1281.24	1281.22	1281.2	1281.18	1281.16	1281.14	1281.12	1281.1	1281.08

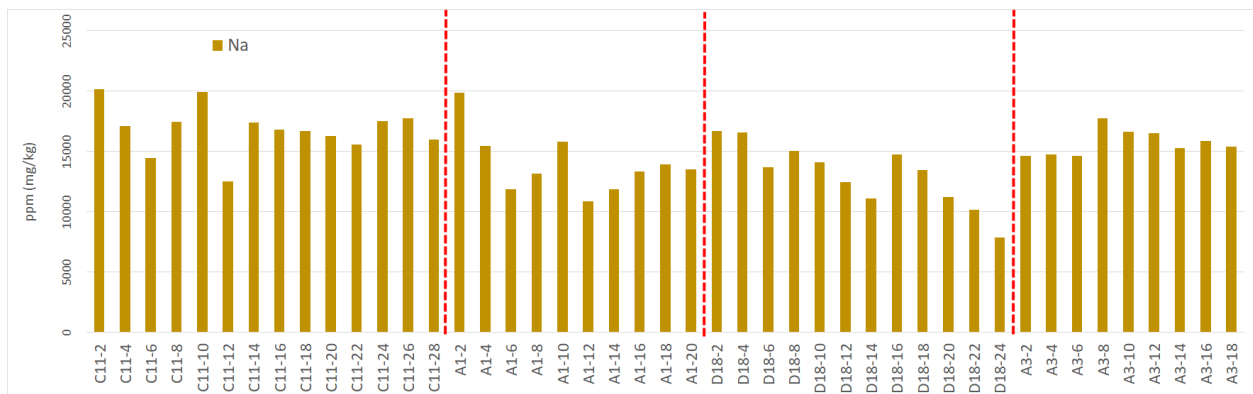
A3-18	A3-16	A3-14	A3-12	A3-10	A3-8	A3-6	A3-4
110000	90000	55000	85000	50000	75000	70000	65000
15386.034	15884.14	15291.737	16552.595	16666.718	17771.496	14650.095	14764.779
7647.3715	7592.656	8861.6609	8007.7004	8414.1272	8999.8258	7137.8097	7833.288
3873.3867	3685.3881	3988.7059	3777.0283	3759.2234	4025.1655	3305.5867	3582.5051
3385.417	3040.1598	2749.3702	3245.9433	2921.7456	3423.2666	2507.0991	2702.8523
3044.9537	2630.9817	2376.0554	3127.3927	2589.4009	3237.5697	2216.7992	2252.7638
738.68155	702.66971	807.29412	1008.1539	949.98521	1114.0157	787.24902	703.55344
119.32603	83.097413	59.387336	51.846397	43.736834	41.564547	26.595567	29.055888
510.4027	436.44673	411.64637	470.95304	420.06287	504.43902	388.7399	381.73043
264.00084	268.76941	279.97301	273.21862	289.46228	285.60889	246.52021	275.62287
164.97304	153.95662	153.64152	158.10283	149.84615	158.10714	127.37027	147.19333
38.680876	41.184018	53.01391	60.355871	40.231509	55.345122	21.422555	21.074064
20.756024	21.84726	22.492526	21.198381	23.101775	23.640767	21.529205	22.529476
25.511879	25.219178	24.574048	25.394575	25.541716	27.515418	22.266688	24.722532
17.016849	23.552968	19.423945	19.32834	13.523077	5.1113066	15.826532	44.245541
21.666667	26	23.333333	18.333333	25	31.666667	11.666667	27.5
15.400674	15.97169	17.382976	18.132065	18.333062	22.395906	18.243025	17.242886
17.368239	17.253729	18.108927	17.459028	17.731139	18.447387	16.322881	17.910279
15.284667	13.709894	14.994533	16.398138	14.44105	18.674042	14.528618	14.8774
9.6582982	9.2528919	9.5438062	9.7047773	9.722855	10.695035	8.1531291	8.8534377
7.4765712	7.4935312	7.5587543	7.7988097	8.0019231	8.6734582	7.0076271	7.0628319
4.9644061	4.9933181	5.3551073	5.0423482	5.2427885	5.7277788	4.7322425	5.1624711
0.145476	0.2729604	0.6277439	1.0173279	1.5171228	4.8700958	6.7430248	2.3395848
1.939781	1.836796	2.8389066	2.8591579	2.6115976	2.2436411	1.5857953	1.8391423
0	0	1.0031211	1.2464049	2.5955547	5.3989547	4.6122164	0.8976787
0	1.1689422	0.4459585	0.6196113	0.7009098	0.9415941	0.7696415	0
0	0	0	0	1.5145192	1.9567422	1.8055802	0
0	0	0	0	0.3410355	0.2841899	0	0.201307
0	0	0	0	0	0	0	0
0	0	0	0	0	0	0	0
7.98	7.99	8.05	8.11	7.97	7.92	8.2	8.02
1926.18	1926.16	1926.14	1926.12	1926.1	1926.08	1926.06	1926.04

Para representar de mejor manera los datos el resultado de los siete metales y compuestos más abundantes se representaron como gráficas de barras y el resto como barras apiladas. Esto debido a que los valores de concentración de estos siete compuestos fueron muy grandes en comparación con el resto. También se hizo lo mismo con los valores de pH al tratarse de otra medida y ppm

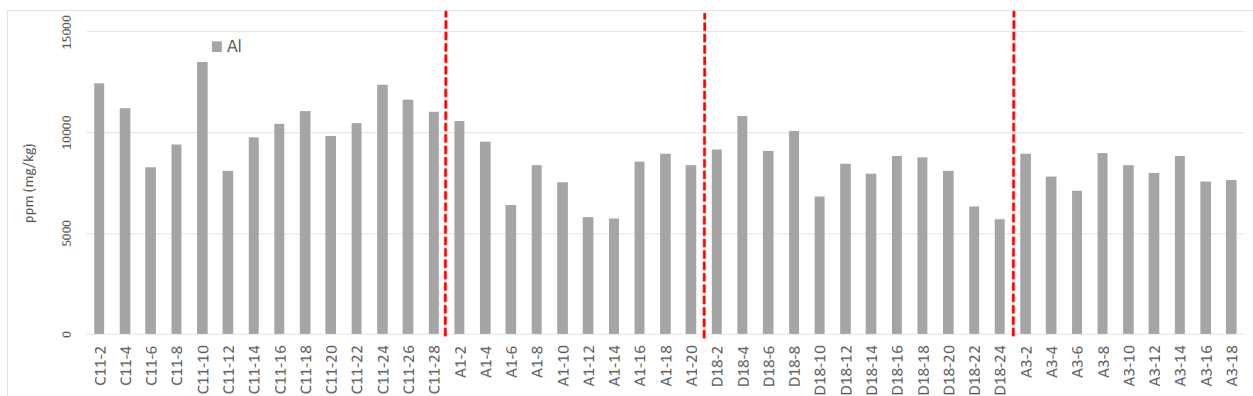
Anexo 6.2. Concentraciones de sulfato conforme la profundidad de las muestras. Resultados en mg/Kg.



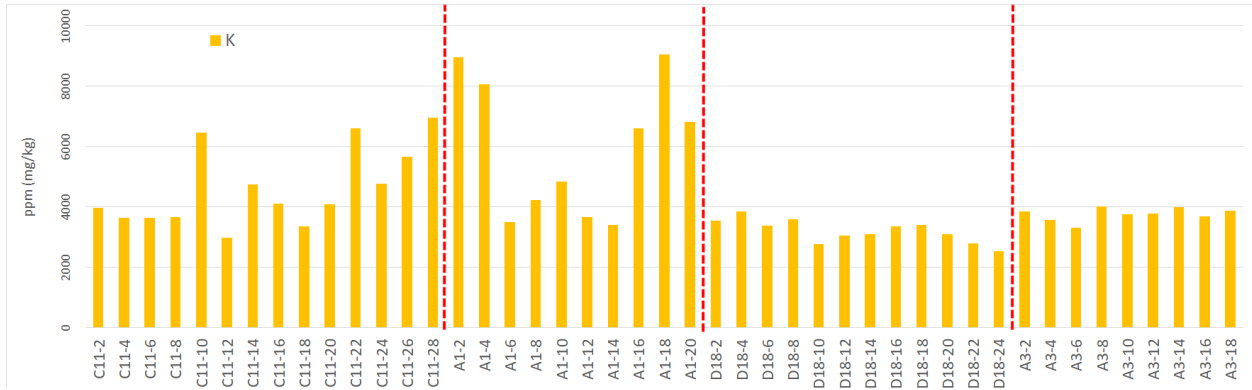
Anexo 6.3. Concentraciones de sodio conforme la profundidad de las muestras. Resultados en mg/Kg.



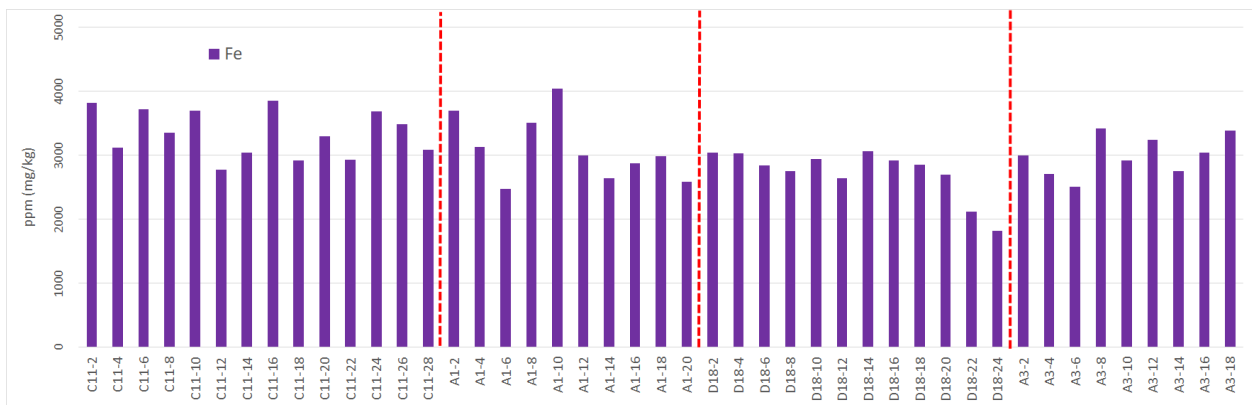
Anexo 6.4. Concentraciones de aluminio conforme la profundidad de las muestras. Resultados en mg/Kg



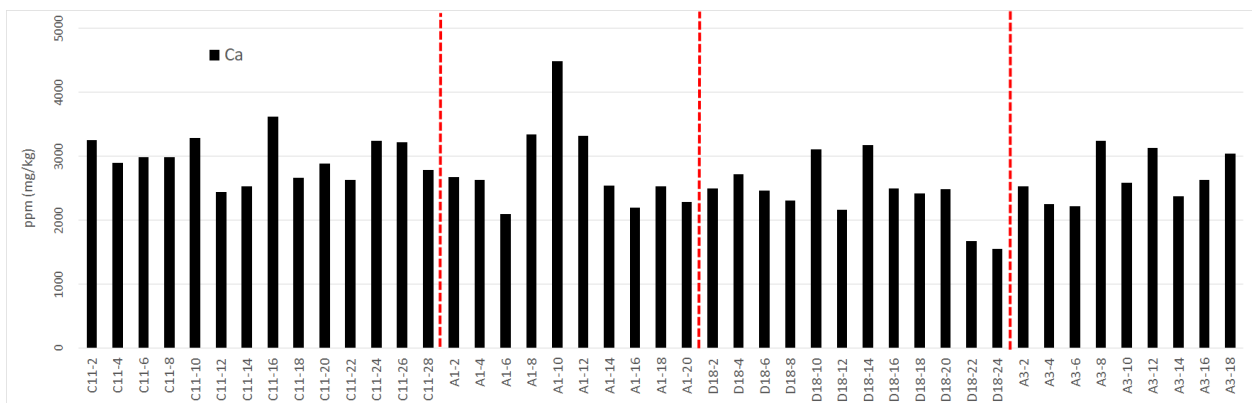
Anexo 6.5. Concentraciones de potasio conforme la profundidad de las muestras. Resultados en mg/Kg



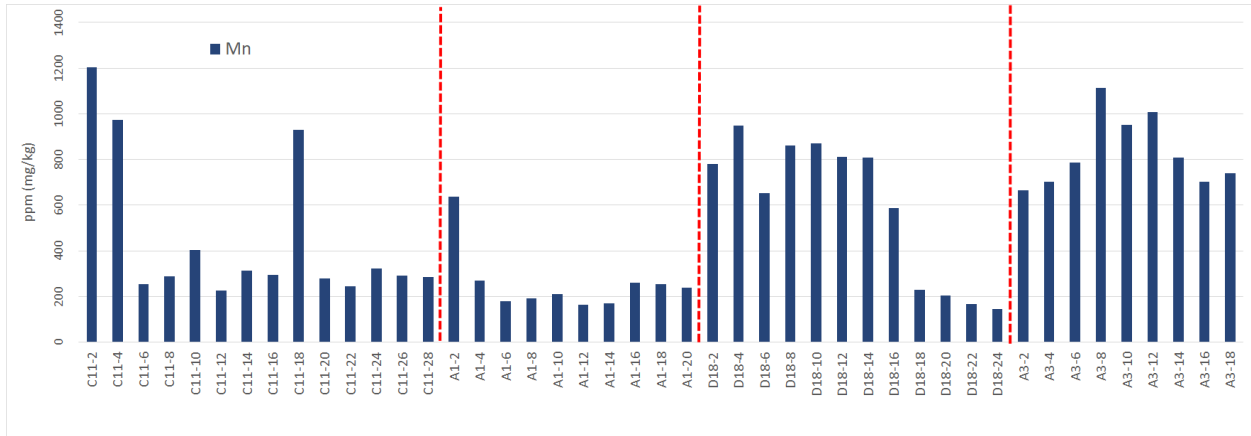
Anexo 6.6. Concentraciones de hierro conforme la profundidad de las muestras. Resultados en mg/Kg



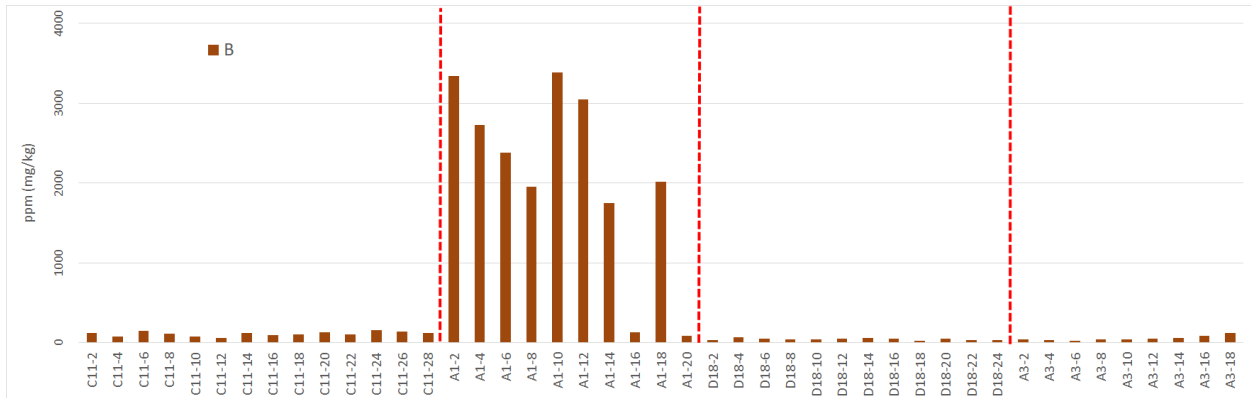
Anexo 6.7. Concentraciones de calcio conforme la profundidad de las muestras. Resultados en mg/Kg



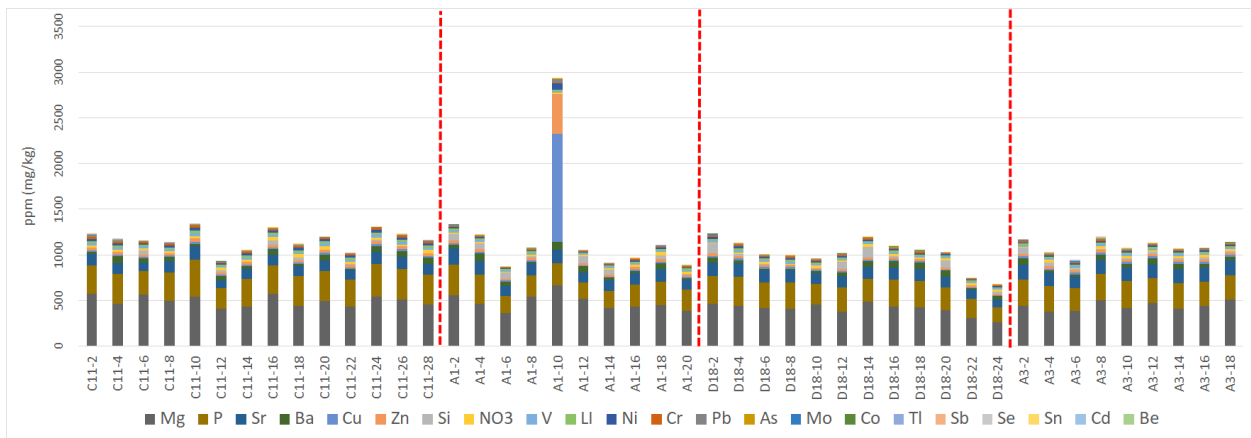
Anexo 6.8. Concentraciones de manganeso conforme la profundidad de las muestras. Resultados en mg/Kg



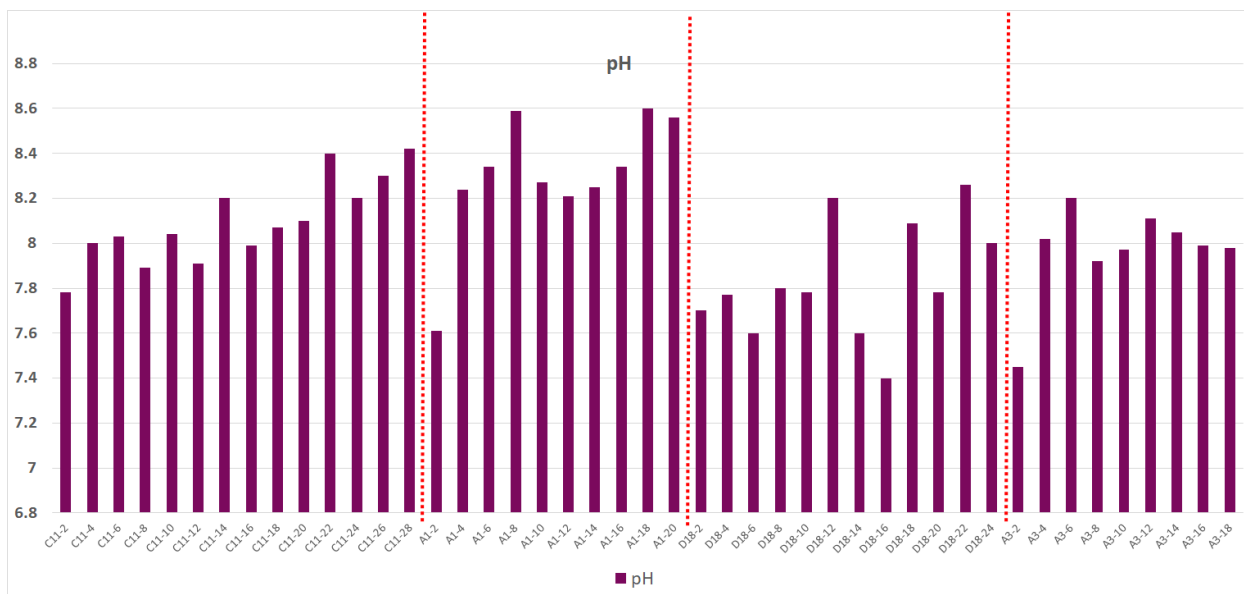
Anexo 6.9. Concentraciones de boro conforme la profundidad de la muestra. Resultados en mg/Kg.



Anexo 6.10. Concentraciones de los 21 metales restantes en las muestras ordenadas conforme su profundidad. Resultados en mg/Kg



Anexo 6.11. Resultado de las mediciones de pH en las muestras. Valores ordenados conforme la profundidad de las muestras.



Anexo 7. Resultado de las múltiples comparaciones por un ANOVA de 2 vías. Para cada núcleo se comparó la concentración media del metal o compuesto para cada categoría definida anteriormente (Tabla 10).

Anexo 7.1 Resultado de los núcleos A1 y A3. Se representa el valor de P de cada comparación y se resaltan los valores significativamente diferentes en negritas y cursiva

	Núcleo A1			Núcleo A3		
	Sup vs Med	Sup vs Prof	Med vs Prof	Sup vs Med	Sup vs Prof	Med vs Prof
Na	0.044	0.2033	0.8302	0.6971	0.9544	0.8621
Al	0.2148	0.9858	0.2889	0.9835	0.9998	0.9869
K	0.2148	0.9858	0.2889	0.9949	0.9951	>0.9999
Fe	0.9847	0.9718	0.9112	0.9856	0.9929	0.9987
Ca	0.6953	0.9941	0.6258	0.9715	0.9917	0.9938
Mn	0.9873	0.9957	0.9982	0.9937	>0.9999	0.9949
B	0.9681	0.2258	0.2813	>0.9999	0.9998	0.9999
Mg	0.9977	0.9995	0.9949	0.9997	0.9998	>0.9999
P	0.998	0.9995	0.9996	>0.9999	>0.9999	>0.9999
Sr	0.9998	0.9999	>0.9999	>0.9999	>0.9999	>0.9999
Ba	>0.9999	0.9998	0.9999	>0.9999	>0.9999	>0.9999
Cu	0.9674	>0.9999	0.9667	>0.9999	>0.9999	>0.9999
Zn	0.9958	>0.9999	0.9958	>0.9999	>0.9999	>0.9999
Si	0.9997	0.9993	0.9999	>0.9999	>0.9999	>0.9999
V	>0.9999	>0.9999	>0.9999	>0.9999	>0.9999	>0.9999
Li	>0.9999	>0.9999	>0.9999	>0.9999	>0.9999	>0.9999

Ni	>0.9999	>0.9999	>0.9999	>0.9999	>0.9999	>0.9999
Cr	>0.9999	>0.9999	>0.9999	>0.9999	>0.9999	>0.9999
Pb	>0.9999	>0.9999	>0.9999	>0.9999	>0.9999	>0.9999
As	>0.9999	>0.9999	>0.9999	>0.9999	>0.9999	>0.9999
Mo	>0.9999	>0.9999	>0.9999	>0.9999	>0.9999	>0.9999
Co	>0.9999	>0.9999	>0.9999	>0.9999	>0.9999	>0.9999
Tl	>0.9999	>0.9999	>0.9999	>0.9999	>0.9999	>0.9999
Sb	>0.9999	>0.9999	>0.9999	>0.9999	>0.9999	>0.9999
Se	>0.9999	>0.9999	>0.9999	>0.9999	>0.9999	>0.9999
Sn	>0.9999	>0.9999	>0.9999	>0.9999	>0.9999	>0.9999
SO 4	<i>0.0045</i>	<i><0.0001</i>	<i><0.0001</i>	0.1866	<i><0.0001</i>	<i><0.0001</i>
NO 3	>0.9999	>0.9999	>0.9999	>0.9999	>0.9999	>0.9999
pH	>0.9999	>0.9999	>0.9999	>0.9999	>0.9999	>0.9999

Anexo 7.2 Resultado de los núcleos C11 y D18. Se representa el valor de P de cada comparación y se resaltan los valores significativamente diferentes en negritas y cursiva

	Núcleo C11			Núcleo D18		
	Sup vs Med	Sup vs Prof	Med vs Prof	Sup vs Med	Sup vs Prof	Med vs Prof
Na	0.9467	0.8882	0.9857	0.4865	<i>0.0321</i>	0.2342
Al	0.9544	0.9389	0.7364	0.7822	0.4279	0.7696
K	0.881	0.4877	0.7293	0.9731	0.9441	0.9914
Fe	0.9873	0.9682	0.9946	0.9983	0.9512	0.957
Ca	0.9984	0.9935	0.9979	0.9988	0.9611	0.9322
Mn	0.9984	0.9935	0.9979	>0.9999	0.9491	0.9358
B	0.9984	0.9935	0.9979	>0.9999	0.9491	0.9358
Mg	0.9995	0.999	>0.9999	>0.9999	0.9987	0.9987
P	>0.9999	0.9997	0.9999	0.9998	0.9993	0.9997
Sr	>0.9999	>0.9999	>0.9999	>0.9999	0.9998	>0.9999
Ba	>0.9999	>0.9999	>0.9999	>0.9999	>0.9999	>0.9999
Cu	>0.9999	>0.9999	>0.9999	>0.9999	>0.9999	>0.9999
Zn	>0.9999	>0.9999	>0.9999	>0.9999	>0.9999	>0.9999
Si	>0.9999	>0.9999	>0.9999	>0.9999	>0.9999	>0.9999
V	>0.9999	>0.9999	>0.9999	>0.9999	>0.9999	>0.9999
Li	>0.9999	>0.9999	>0.9999	>0.9999	>0.9999	>0.9999
Ni	>0.9999	>0.9999	>0.9999	>0.9999	>0.9999	>0.9999
Cr	>0.9999	>0.9999	>0.9999	>0.9999	>0.9999	>0.9999

Pb	>0.9999	>0.9999	>0.9999	>0.9999	>0.9999	>0.9999
As	>0.9999	>0.9999	>0.9999	>0.9999	>0.9999	>0.9999
Mo	>0.9999	>0.9999	>0.9999	>0.9999	>0.9999	>0.9999
Co	>0.9999	>0.9999	>0.9999	>0.9999	>0.9999	>0.9999
Tl	>0.9999	>0.9999	>0.9999	>0.9999	>0.9999	>0.9999
Sb	>0.9999	>0.9999	>0.9999	>0.9999	>0.9999	>0.9999
Se	>0.9999	>0.9999	>0.9999	NA	NA	NA
Sn	>0.9999	>0.9999	>0.9999	>0.9999	>0.9999	>0.9999
Cd	>0.9999	>0.9999	>0.9999	NA	NA	NA
SO 4	<0.0001	<0.0001	0.2927	0.0647	<0.0001	<0.0001
NO 3	>0.9999	>0.9999	>0.9999	>0.9999	>0.9999	>0.9999
pH	>0.9999	>0.9999	>0.9999	>0.9999	>0.9999	>0.9999

Anexo 8. Coeficiente de correlación de Spearman del análisis de regresión múltiple entre taxones y valores geoquímicos

	Proteobacteria	Rokubacteria	Planctomyces	Chloroflexi	Acidobacteria	γ -proteobacteria	δ -proteobacteria	α -proteobacteria
Prof.	-0.227	-27.766	-10.921	0.072	-0.589	5.169	-2.584	0.951
Na	-0.001	0	0	0	0	-0.001	0	0
Al	-0.001	0	0.001	0	0	-0.001	0	0
K	0	0	0	0	0	0	0	0
Fe	0.004	-0.006	-0.004	-0.007	-0.003	0.006	-0.006	-0.006
Ca	0.001	0.001	0.002	0.001	0	0.001	0.001	0
Mn	0.002	-0.003	-0.002	0	0.002	0.001	0.001	0.005
B	-0.001	0.001	0	-0.001	0	-0.002	0	0
Mg	-0.026	0.046	0.022	0.036	0.007	-0.026	0.016	0.009
P	0.025	-0.025	0.001	0.02	0.033	0.015	0.034	0.054
Sr	0.109	-0.021	-0.046	-0.017	0.024	0.172	-0.005	0.026
Ba	-0.007	-0.009	-0.006	0.006	0.005	-0.029	0.011	0.009
Cu	0.159	0.004	0.035	0.002	-0.058	0.317	-0.138	-0.144
Zn	-0.442	-0.009	-0.141	0.067	0.173	-0.94	0.396	0.428
Si	0.001	-0.002	-0.002	0.007	0.003	0.001	0.006	0.014
V	-0.082	-0.448	-0.279	-0.027	-0.09	0.108	-0.005	0.051
Li	-0.156	0.953	0.514	0.068	-0.305	-0.271	-0.295	-0.66
Ni	-0.191	0.3	0.192	-0.224	0.042	-0.285	-0.05	-0.055
Cr	0.645	-0.613	-0.67	0.037	0.133	0.621	-0.016	0.171
Pb	0.306	-0.511	0.095	-0.416	-0.196	1.034	0.054	-0.082

As	-0.374	0.185	0.06	-0.113	-0.227	-0.494	-0.302	-0.462
Mo	0.534	-0.489	0.046	-0.178	0.596	0.528	0.027	0.224
Co	0.071	0.148	0.382	-0.315	-0.716	1.076	-0.528	-1.474
Tl	0.273	0.571	-0.386	0.657	-0.165	0.051	0.416	0.158
Sb	-0.476	1.936	0.947	0.22	0.153	-0.306	-0.259	-0.503
Se	-0.904	-0.175	0.357	-1.048	-0.535	-0.374	-1.108	-0.307
Sn	-0.698	1.272	1.389	1.401	-0.426	0.595	-0.166	-2.311
Cd	-0.781	-4.443	-10.354	-7.889	-14.068	24.455	-9.872	-12.817
Be	-108.683	34.683	-118.126	-330.633	-121.525	-124.612	-59.487	30.319
SO4	0	0	0	0	0	0	0	0
NO3	0.001	0.022	-0.011	0.001	0.008	-0.008	-0.006	0.018
pH	1.238	0.511	0.801	0.439	-0.083	2.054	-0.544	-0.848
	Dehalococci dia	Anaeroline ae	Moritella	Pseudomon as	Klebsiella	Colwellia	wb1A12	Woeseia
Prof.	8.021	-4.256	31.666	-13.039	-24.461	-38.042	-27.549	-27.868
Na	0.001	0	-0.002	-0.001	-0.002	-0.001	0	0
Al	0	0	-0.002	0.002	0	0	0	-0.001
K	0	0	0	0	0.001	0	0	0
Fe	-0.01	-0.01	0.018	0.016	0.04	0.01	-0.005	-0.002
Ca	0	0.003	0	0.012	0.015	0	0.001	0.001
Mn	0.002	-0.004	-0.005	-0.008	-0.022	-0.003	-0.006	-0.006
B	-0.001	-0.001	-0.001	0	-0.004	0.001	0.001	0.001
Mg	0.047	0.048	-0.098	-0.152	-0.228	-0.031	0.053	0.037
P	0.018	0.03	0.072	-0.228	-0.189	0.024	-0.043	-0.048
Sr	-0.024	-0.022	0.063	0.119	0.482	-0.014	-0.07	-0.029
Ba	0.02	-0.011	-0.057	-0.075	-0.108	-0.05	-0.026	-0.03
Cu	-0.134	0.05	0.156	0.217	1.281	0.269	0.007	0.02
Zn	0.47	-0.035	-0.563	-0.902	-4.071	-1.012	-0.024	-0.138
Si	0.015	0.004	0.02	-0.006	-0.036	0.006	0.007	0.002
V	0.113	-0.078	0.427	-0.086	-0.614	0.226	-0.341	-0.262
Li	-0.369	0.761	-0.459	1.462	1.918	-0.507	1.369	1.395
Ni	-0.236	-0.512	0.23	0.484	0.218	0.348	0.341	0.281
Cr	-0.045	-0.516	0.496	-0.538	0.638	-0.269	-1.223	-0.707
Pb	-0.692	-0.375	1.238	2.402	4.498	2.508	-0.564	0.463
As	-0.256	-0.171	-0.204	0.518	1.042	-0.391	0.536	0.501
Mo	-0.078	-1.123	1.813	-0.145	-0.846	1.197	-0.747	-0.778
Co	-0.635	0.869	1.856	3.737	5.617	2.519	0.876	1.063
Tl	0.263	1.841	-0.139	-2.547	-0.688	-1.906	0.474	0.886
Sb	-0.222	0.418	-0.818	-0.116	3.173	0.602	2.842	2.417
Se	-0.467	-1.515	-0.209	2.616	2.256	2.201	0.406	-0.225
Sn	0.809	0.992	0.566	3.232	10.904	-0.668	2.075	1.471
Cd	2.93	-4.557	4.916	-10.878	30.289	15.128	8.706	-4.609
Be	-249.673	-422.535	-790.159	-90.666	1464.242	-241.795	-41.447	184.006

SO4	0	0	0	0	0	0	0	0
NO3	0.013	-0.038	0.046	-0.09	-0.238	-0.015	0.017	-0.002
pH	-0.196	-0.344	-1.918	1.064	5.52	-1.92	-0.052	-0.365

	Hydrothermarchaeota	Thermoplasmata	MBG-A	Lokiarchaeia	Bathyarchaeia	Nanohaloarchaeia	Nitrosopumilaceae
Prof.	8.714	6.892	-1.773	3.822	14.621	-4.412	-16.144
Na	0	0	0	0	-0.001	0	0
Al	-0.001	0	0	0	0	0	0
K	0	0	0	0	0	0	0
Fe	0.003	0	-0.004	0.008	0.003	-0.004	-0.001
Ca	0	-0.001	-0.002	0.001	0.001	0	-0.001
Mn	-0.008	0.003	0.003	0	0.002	0.001	-0.002
B	0	0	0	0	0	0	0.001
Mg	-0.01	0.016	0.025	-0.047	-0.018	0.015	0.015
P	-0.03	0.02	0.009	0.056	0.037	0.003	-0.037
Sr	0.028	0	-0.057	-0.031	0.079	-0.03	-0.058
Ba	-0.015	-0.011	0.015	0.015	-0.009	0.007	-0.001
Cu	0.093	0.087	-0.186	0.009	0.145	-0.059	-0.018
Zn	-0.314	-0.146	0.576	0.011	-0.386	0.185	-0.035
Si	0.005	0.009	0.002	-0.01	0.007	0.002	-0.011
V	-0.142	-0.024	0.079	-0.313	-0.064	0.02	0.077
Li	0.143	0.32	0.14	-0.143	-0.643	-0.143	0.458
Ni	0.089	-0.488	-0.125	-0.332	-0.294	-0.09	0.575
Cr	0.723	0.16	-0.548	0.206	1.602	-0.058	-1.132
Pb	0.424	-0.421	-0.395	0.048	0.224	-0.075	0.136
As	0.405	-0.047	0.215	-0.384	-0.25	-0.07	0.187
Mo	-0.134	-0.401	-0.991	0.643	1.492	0.055	-0.865
Co	0.662	-0.209	-0.629	0.467	-0.168	-0.238	0.097
Tl	0.617	0.541	1.13	0.014	-1.427	-0.335	0.4
Sb	0.311	0.185	0.339	-1.101	-1.108	-0.657	1.062
Se	-0.412	0.315	-0.921	0.215	0.987	0.523	-0.577
Sn	0.746	1.1	0.881	-2.34	-2.488	0.828	0.406
Cd	-2.922	4.253	7.244	-1.991	-13.537	-4.724	10.103
Be	-82.003	-75.987	113.677	-14.59	162.388	-249.071	-26.771
SO4	0	0	0	0	0	0	0
NO3	-0.01	-0.025	-0.048	-0.037	0.046	-0.004	0.024
pH	-0.97	0.511	-0.905	-1.419	2.056	-0.813	-0.128

Anexo 9. Programas y bases de datos utilizadas para el análisis bioinformático de las secuencias.

Software	Descripción	Referencia y sitio de descarga
Fast Length Adjustment of Short reads (FLASH)	Herramienta para extender la longitud de lecturas cortas superponiendo lecturas de extremos pareados.	Magoc & Salzberg, 2011 https://sourceforge.net/projects/flashpage/files/
Quantitative Insides into microbial Ecology 2 (QIIME2)	Plataforma bioinformática para el procesamiento de datos de amplicones y análisis de microbioma.	Bolyen et al., 2019 https://docs.qiime2.org/2021.2/
Divisive Amplicon Denoising Algorithm (DADA2)	Software para generar ASVs, el cual modela y corrige errores en los amplicones generados por Illumina. Actualmente dentro de QIIME2.	Callahan et al., 2016 https://docs.qiime2.org/2021.2/ https://benjjneb.github.io/dada2/index.html
GraftM	Software para el análisis de metagenomas metatranscriptomas, contigs, ensamblados y genomas completos que identifica y clasifica homólogos de genes marcadores en las secuencias analizadas.	Boyd et al., 2018 http://geronimp.github.io/graftM/
Base de Datos	Descripción	Sitio URL de consulta
Silva ARB 132	Base de datos de genes alineados de ARN ribosómico de Bacteria, Aquea y Eukaryota. Existe desde julio de 2012 y se mantiene actualizada constantemente. Se uso la versión 132 lanzada en 2018.	https://www.arb-silva.de
Uniprot	Una base de datos de secuencias de proteínas con información tanto funcional como taxonómica. Mantenido por el Instituto Europeo de Bioinformática (EBI), el Instituto Suizo de Bioinformática (SIB) y el Protein Information Resource (PIR)	https://www.uniprot.org
Paquete de R	Descripción	Sitio URL de descarga

Phyloseq	El paquete phyloseq es una herramienta para analizar y graficar datos provenientes de OTUS o ASVs. Utiliza herramientas para análisis ecológico y filogenético	https://joey711.github.io/phyloseq/index.html
Microbiome	El paquete de microbiome contiene herramientas para la manipulación, análisis estadístico y visualización de datos de perfiles taxonómicos provenientes de microbiomas por amplicones de 16s ARN.	https://microbiome.github.io
Vegan	El paquete vegan posee herramientas para la ecología comunitaria descriptiva, de análisis de diversidad, ordenación comunitaria y análisis de disimilitud.	https://cran.rproject.org/web/packages/vegan.html