



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

INSTITUTO DE CIENCIAS DEL MAR Y LIMNOLOGÍA
ECOLOGÍA

**DIVERSIDAD Y DISTRIBUCIÓN ESPACIAL Y TEMPORAL DE ORGANISMOS
DESNITRIFICANTES A LO LARGO DE UN TRANSECTO EN LA ZONA DE
MÍNIMO OXÍGENO DEL PACÍFICO MEXICANO**

TESIS

**QUE PARA OBTENER EL GRADO DE:
MAESTRO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS**

PRESENTA:

JOSÉ ANTONIO HERNÁNDEZ HERNÁNDEZ

TUTORA PRINCIPAL:

DRA. SILVIA PAJARES MORENO

Instituto de Ciencias del Mar y Limnología, UNAM

COMITÉ TUTOR:

DRA. ANA ELENA ESCALANTE HERNÁNDEZ

Instituto de Ecología, UNAM

DRA. LAURA ESPINOSA ASUAR

Instituto de Ecología, UNAM



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.



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

INSTITUTO DE CIENCIAS DEL MAR Y LIMNOLOGÍA
ECOLOGÍA

**DIVERSIDAD Y DISTRIBUCIÓN ESPACIAL Y TEMPORAL DE ORGANISMOS
DESNITRIFICANTES A LO LARGO DE UN TRANSECTO EN LA ZONA DE
MÍNIMO OXÍGENO DEL PACÍFICO MEXICANO**

TESIS

**QUE PARA OBTENER EL GRADO DE:
MAESTRO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS**

PRESENTA:

JOSÉ ANTONIO HERNÁNDEZ HERNÁNDEZ

TUTORA PRINCIPAL:

DRA. SILVIA PAJARES MORENO

Instituto de Ciencias del Mar y Limnología, UNAM

COMITÉ TUTOR:

DRA. ANA ELENA ESCALANTE HERNÁNDEZ

Instituto de Ecología, UNAM

DRA. LAURA ESPINOSA ASUAR

Instituto de Ecología, UNAM

COORDINACIÓN DEL POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS
FACULTAD DE CIENCIAS
DIVISIÓN ACADÉMICA DE INVESTIGACIÓN Y POSGRADO
OFICIO FCIE/DAIP/0559/2022

ASUNTO: Oficio de Jurado

M. en C. Ivonne Ramírez Wence
Directora General de Administración Escolar, UNAM
Presente

Me permito informar a usted que en la reunión ordinaria del Comité Académico del Posgrado en Ciencias Biológicas, celebrada el día **12 de septiembre de 2022** se aprobó el siguiente jurado para el examen de grado de **MAESTRO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS** en el campo de conocimiento de **Ecología** del estudiante **HERNÁNDEZ HERNÁNDEZ JOSÉ ANTONIO** con número de cuenta **520019256** con la tesis titulada **“Diversidad y distribución espacial y temporal de organismos desnitrificantes a lo largo de un transecto en la zona de mínimo oxígeno del Pacífico mexicano.”**, realizada bajo la dirección de la **DRA. SILVIA PAJARES MORENO**, quedando integrado de la siguiente manera:

Presidente: **DRA. VALERIA FRANCISCA EUGENIA LEOPOLDINA DE MARÍA DE GUADALUPE SOUZA SALDÍVAR**
Vocal: **DRA. PATRICIA VÉLEZ AGUILAR**
Vocal: **DR. ERIK CORIA MONTER**
Vocal: **DRA. PATRICIA THOMÉ ORTÍZ**
Secretario: **DRA. LAURA ESPINOSA ASUAR**

Sin otro particular, me es grato enviarle un cordial saludo.

ATENTAMENTE
“POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU”
Ciudad Universitaria, Cd. Mx., a 30 de noviembre de 2022

COORDINADOR DEL PROGRAMA



DR. ADOLFO GERARDO NAVARRO SIGÜENZA



COORDINACIÓN DEL POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

Unidad de Posgrado, Edificio D, 1º Piso. Circuito de Posgrados, Ciudad Universitaria
Alcaldía Coyoacán. C. P. 04510 CDMX. Tel. (+5255)5623 7002 <http://pcbiol.posgrado.unam.mx/>

AGRADECIMIENTOS INSTITUCIONALES

Primeramente, agradezco al **Posgrado de Ciencias Biológicas** de la **Universidad Nacional Autónoma de México** (UNAM), por darme la oportunidad de realizar mis estudios de Maestría, así como al **Instituto de Ciencias del Mar y Limnología** de la UNAM donde se encuentra adscrita la **Dra. Silvia Pajares Moreno**, encargada del **Laboratorio de Ecología Microbiana Acuática**, quien con sus proyectos Ciencia de Frontera CONACYT CF-2019-2266 y PAPIIT IA201617 me brindó la facilidad de obtener el espacio, materiales y reactivos para realizar el proyecto de Maestría. Además, le agradezco por ser mi tutora, por su comprensión, por sus consejos y sobre todo por su gran tolerancia.

Al **Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT)** por el apoyo brindado con número de beca **1033923** durante el desarrollo de esta tesis de Maestría en el **Posgrado en Ciencias Biológicas**.

A mi comité tutor, agradezco a la **Dra. Laura Espinosa Asuar** del Instituto de Ecología, UNAM, por brindarme siempre su apoyo y consejo durante mis evaluaciones, porque además de ser una gran mujer de la ciencia, es sobre todo muy humana. A la **Dra. Ana Elena Escalante Hernández** del Instituto de Ecología, UNAM, por su tolerancia, comprensión y consejos durante mis estudios de Maestría.

AGRADECIMIENTOS PERSONALES

Agradezco a la Dra. Valeria Sousa por el apoyo en la secuenciación masiva de mis muestras. También agradezco al Dr. Martín Merino y a su técnico Bio. Sergio Castillo Sandoval por facilitarme el análisis de los nutrientes de mis muestras, así como, a la Q.F.B. Susana Santiago Pérez, por el apoyo en el análisis de carbono orgánico.

Agradezco a la UNAM por brindarme la oportunidad de participar en una de las campañas del buque oceanográfico el PUMA y, en particular, al M. en C. Arturo Ronquillo por ayudarme a obtener los datos del CTD, además de ofrecerme una experiencia inolvidable. A mi madre Marcelina Hernández Obregón y mi padre Antonio Hernández Medina, mis frutos son producto de sus grandes esfuerzos. Les agradezco el brindarme apoyo, confianza y un sin fin de cualidades, principalmente amor y apoyo incondicional.

A Sandra Leticia Ortiz Cruz, una persona muy especial para mí, que con sus palabras y amor incondicional siempre me ha brindado la confianza para salir adelante.

A mi compañera y amiga de laboratorio Cinthya Vieyra Mexicano, agradezco su compañía y apoyo durante toda la maestría.

A la Mtra. Jazmín Sánchez Pérez por haberme apoyado en el manejo de datos bioinformáticos y procesamiento de datos por comandos, pero sobre todo por su gran vocación por la enseñanza.

A María del Carmen Zárate Pelayo por todo su apoyo dentro del laboratorio y fuera de él, por su amistad, tolerancia y consejos.

Por su amistad, consejo y apoyo dentro y fuera del laboratorio:

Diego Juárez Martínez

Paula Alejandra Salej Vargas

Ramiro Ramos de la Cruz

ÍNDICE

RESUMEN	1
ABSTRACT.....	2
1 INTRODUCCIÓN	3
1.1 Ciclo del nitrógeno marino	3
1.2 Desnitrificación en sistemas marinos.....	5
1.3 Factores que afectan a la desnitrificación en sistemas marinos.....	6
1.4 Diversidad funcional y distribución de bacterias desnitrificantes en sistemas marinos	8
1.5 Importancia de las zonas de mínimo oxígeno en la pérdida de N fijado	12
2 JUSTIFICACIÓN	13
3 HIPÓTESIS.....	14
4 OBJETIVOS	14
4.1 Objetivo general.....	14
4.2 Objetivos específicos	14
5 MATERIALES Y MÉTODOS	15
5.1 Área de estudio y muestreo.....	15
5.2 Toma de muestras	16
5.3 Análisis de las variables físico-químicas	16
5.4 Análisis moleculares	17
5.5 Secuenciación y análisis de las secuencias	18
5.6 Asignación de secuencias representantes.....	18
5.7 Análisis de diversidad y estadística	19
6 RESULTADOS.....	20
6.1 Condiciones climáticas	20
6.2 Características de las masas de agua.....	21
6.3 Características hidrográficas	21
6.4 Características bioquímicas del agua	24
6.5 Características físico-químicas y nutrimentales de los sedimentos durante El Niño...	26
6.6 Amplificación y secuenciación del gen <i>nirS</i> en las muestras	27
6.7 Asignación de secuencias, filogenia y distribución de la comunidad <i>nirS</i>	28
6.8 Diversidad alfa	34
6.9 Diversidad beta	36
6.10 AVS compartidos y únicos	38
7 DISCUSIÓN	40
7.1 Condiciones oceanográficas en la ZMO del Pacífico central mexicano.....	40
7.2 Influencia del O ₂ en la distribución de la comunidad <i>nirS</i>	41
7.3 Distribución de las comunidades <i>nirS</i> del agua de fondo y los sedimentos en el Pacífico central mexicano	43
7.4 Influencia de los factores ambientales en las comunidades <i>nirS</i>	47
8 CONCLUSIONES	48
9 REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	50
10 MATERIAL SUPLEMENTARIO	59

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1 Ciclo del N.....	4
Figura 2 Proceso de la reducción canónica microbiana del NO_3^- a N_2	6
Figura 3 Mapa de distribución de los principales estudios de diversidad de comunidades desnitrificantes en sistemas marinos basado en los genes <i>nirS</i> y <i>nirK</i>	11
Figura 4 Mapa de distribución del O_2 disuelto global del océano a 200 m de profundidad	13
Figura 5 Mapa de la localización del transecto de estudio frente al Puerto de Mazatlán	15
Figura 6 Evolución temporal de la temperatura en los eventos climáticos La Niña (Maz-IV) y El Niño (Maz-V).....	21
Figura 7 Secciones verticales de los parámetros hidrográficos durante La Niña (Maz-IV) y El Niño (Maz-V).....	23
Figura 8 Secciones verticales de la concentración de nutrientes (μM) durante La Niña (Maz-IV) y El Niño (Maz-V)	25
Figura 9 Características físico-químicos de los sedimentos durante el evento de El Niño (Maz-V).....	26
Figura 10 Concentración de nutrientes en los sedimentos durante el evento de El Niño (Maz-V)	27
Figura 11 Abundancia relativa de las asignaciones obtenidas del gen <i>nirS</i> en las 12 muestras agrupadas por ambiente	30
Figura 12 Árbol filogenético de las 70 ASV representantes del gen <i>nirS</i>	32
Figura 13 Mapa de calor de la distribución de las 41 AVS más abundantes.....	34
Figura 14 Diagrama de caja y bigotes de diferentes índices de diversidad alfa por ambiente y fase ENSO.....	35
Figura 15 Gráfica de NMDS de las muestras en las dos fases ENSO basada en el índice de disimilitud de Bray-Curtis.....	37
Figura 16 Diagrama UpSet	39
Figura S1 Diagrama TS-IV	65
Figura S2 Número de secuencias obtenidas por muestra y crucero.....	66
Figura S3 Curva de rarefacción	66
Figura S5 Gráfica de barras del Índice de Chao1	67
Figura S6 Gráfica de correspondencia canónica de las muestras de agua de ambas fases ENSO y sedimentos de El Niño (Maz-V).....	68
Figura S7 Diagrama de Venn-Euler.....	69

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1 Condiciones de termociclaje y reactivos para amplificar el gen <i>nirS</i>	18
Tabla S1 Estudios de comunidades <i>nirS</i>	59

Tabla S2 Amplificaciones <i>nirS</i>	62
Tabla S3 Procedencia de las 12 asignaciones más abundantes de las secuencias del gen <i>nirS</i>	63
Tabla S4 Resultados del análisis estadístico CCA de las variables ambientales	64

ABREVIATURAS

Ácido desoxirribonucleico: ADN

Análisis de multiescalamiento dimensional no métrico: NMDS

Análisis de correspondencia canónica: CCA

Amplificones de variantes de secuencias: ASV

Amonio: NH_4^+

Carbono: C

Centro Nacional para la Información Biotecnológica: NCBI

Costera: C

Dióxido de carbono: CO_2

El Niño/Oscilación del Sur: ENSO

Fosfato: PO_4^{3-}

Gen nitrato reductasa: *napA*

Gen nitrato reductasa: *narG*

Gen nitrito reductasa con Cu: *nirK*

Gen nitrito reductasa citocromo cd_1 : *nirS*

Hidrazina oxidorreductasa: *hzo*

Instituto de Ciencias del Mar y Limnología: ICMyL

Intermedia 1: M1

Intermedia 2: M2

Masa de agua de la Corriente de California: CCW

Masa de agua Subtropical Subsuperficial: StSsW

Masa de agua del Golfo de California: GCW

Masa de agua Intermedia del Pacífico: PIW

Masa de agua Transicional: TrW

Masa de agua Tropical Superficial: TSW

Administración nacional atmosférica y oceánica: NOAA

Nitrato: NO_3^-

Nitrógeno molecular: N_2

Nitrito: NO_2^-

Oceánica 1: O1

Oceánica 2: O2

Operón codificante de 16S rRNA: 16S rRNA

Oxígeno: O_2

Óxido nítrico: NO

Óxido nitroso: N_2O

Óxido nítrico reductasa: *nor*

Óxido nitroso reductasa: *nos*

Oxidación anaerobia del amonio: Anammox

Oxidación anaerobia del metano dependiente del nitrato/nitrito: N-Damo

Pacífico Tropical Noreste: ETNP

Pacífico Tropical Sureste: ETSP

Reacción en cadena de la polimerasa: PCR

Reducción desasimiladora del nitrato/nitrito a amonio: DNRA

Restricción de fragmentos polimórficos largos por fluorescencia: T-RFLP

Temperatura y salinidad: T/S

Unidades prácticas de salinidad: PSU

Unidad taxonómica operacional: OTU

Zonas de mínimo oxígeno: ZMO

RESUMEN

El ciclo del nitrógeno marino es uno de los ciclos biogeoquímicos más complejos. En él están involucrados diversos procesos microbianos que contribuyen a la fijación y pérdida de nitrógeno. Las principales pérdidas de nitrógeno suceden a través del anammox y la desnitrificación en condiciones subóxicas y anóxicas. En la desnitrificación bacteriana, el primer paso en la pérdida de nitrógeno es mediado por la enzima nitrito reductasa, la cual es codificada por los genes isofuncionales *nirS* y *nirK*. Uno de los factores que contribuye a la distribución de los desnitrificantes es la ausencia de oxígeno, por lo que las zonas de mínimo oxígeno oceánicas se consideran regiones idóneas para que suceda la desnitrificación. Sin embargo, se desconoce la distribución de las bacterias desnitrificantes en la zona de mínimo oxígeno del Pacífico central mexicano. Por lo tanto, este trabajo tuvo el propósito de estudiar la distribución y diversidad del gen *nirS* mediante secuenciación masiva, así como su relación con variables ambientales en la columna de agua y sedimentos superficiales en un transecto costa-océano abierto frente al Puerto de Mazatlán durante dos campañas oceanográficas en la época de surgencia, pero en dos eventos climáticos diferentes: abril 2018 (La Niña, crucero Maz-IV, cuatro estaciones) y abril 2019 (El Niño, crucero Maz-V, cinco estaciones). Los resultados mostraron que El Niño produjo un debilitamiento en la surgencia, promoviendo una disminución en la concentración de nutrientes en comparación con La Niña. El gen *nirS* estuvo presente en todas las muestras de agua y sedimento, pero solo se pudieron secuenciar 12 muestras: cinco de agua de fondo (tres de Maz-IV y dos de Maz-V) y siete de sedimento (cuatro de Maz-IV y tres de Maz-V). De las 6,181 ASV obtenidas del gen *nirS*, 2,578 ASV se asociaron a 117 clonas conocidas, de las cuales 12 representaron más del 0.5% de la abundancia de secuencias *nirS*. La composición de la comunidad entre ambos eventos climáticos fue similar, pero se encontraron diferencias entre ambientes (agua vs sedimento), debido a que las comunidades sedimentarias son más estables a las variaciones ambientales que las del agua de fondo. El árbol filogenético agrupó la mayor parte de las secuencias en un clúster que no ha sido propuesto hasta la fecha, además no fue específico a un determinado ambiente. Por otro lado, la estructura de la comunidad se diferenció en cuatro grupos: muestras costeras de agua-sedimento, sedimento intermedio, sedimento oceánico y agua oceánica, posiblemente por las diferencias físico-químicas. En general, NO_3^- , NO_2^- y PO_4^{3-} fueron los principales nutrientes que determinaron la distribución de la comunidad *nirS*. Finalmente, la comunidad *nirS* fue más diversa en los sedimentos que en el agua de fondo y también durante El Niño que durante La Niña.

ABSTRACT

The marine nitrogen cycle is one of the most complex biogeochemical cycles. In this cycle several microbial processes are involved, and they contribute to nitrogen fixation and loss. The main nitrogen losses occur through anammox and denitrification in suboxic and anoxic conditions. In bacterial denitrification, the first step implicated in the nitrogen loss is mediated by the nitrite reductase enzyme, which is encoded by the two isofunctional genes *nirK* and *nirS*. One of the factors that contributes to the distribution of denitrifiers is the absence of oxygen, thus the oceanic oxygen minimum zones are considered suitable regions for the occurrence of denitrification. However, little is known about the distribution of the denitrifiers in the oxygen minimum zone of the central Mexican Pacific. Therefore, this work had the purpose of studying the distribution and diversity of the *nirS* gene by high-throughput sequencing, as well as their relationship with environmental variables in the water column and surface sediments in a coastal-oceanic transect in front of the Puerto de Mazatlán in two oceanographic campaigns during the upwelling season, but with two different climatic events: in April 2018 (La Niña, Maz-IV cruise, four stations) and April 2019 (El Niño, Maz-V, five stations). The results showed that El Niño produced a weak upwelling, promoting a decrease in nutrient concentration compared with La Niña. The *nirS* gene was present in all the water and sediment samples, but only 12 samples could be sequenced: five from the bottom water (three for Maz-IV and two for Maz-V) and seven from sediments (four for Maz-IV and three for Maz-V). Of the 6,181 ASVs obtained from the *nirS* gene, 2,578 ASVs were associated with 117 known clones, of which 12 represented more than 0.5% of the *nirS* sequence abundance. The community composition was similar between the two climatic events, but it was different between environments (water vs sediment), because the sedimentary communities are more stable to the environmental variations than those of the bottom water. The phylogeny tree grouped most of the sequences in a cluster that has not been proposed to date, and it was not specific to a given environment. On the other hand, the community structure was differentiated in four groups: water-sediment coastal samples, intermedial sediment samples, oceanic sediment samples and oceanic water samples, possibly due to physical-chemical differences. In general, NO_3^- , NO_2^- and PO_4^{3-} influenced the *nirS* community structure. Finally, the *nirS* community was more diverse in sediments than in the bottom water, as well as during El Niño than during La Niña.

1 INTRODUCCIÓN

1.1 Ciclo del nitrógeno marino

Un gran volumen del océano permanece bien oxigenado, sin embargo, algunas regiones subsuperficiales presentan un agotamiento del oxígeno (O_2) que puede persistir a lo largo de los límites orientales de las cuencas oceánicas donde se dan fenómenos de surgencias. Estas regiones se conocen como zonas de mínimo oxígeno (ZMO) y están ubicadas dentro del Pacífico Tropical Noreste (ETNP), Pacífico Tropical Sureste (ETSP), el Mar Arábigo y en la costa de Namibia, donde el agotamiento del O_2 resulta de una ventilación deficiente y una alta exportación de materia orgánica por la producción primaria en aguas superficiales, generando altas tasas de consumo de O_2 bajo la superficie (Wyrski, 1962; Karstensen *et al.*, 2008; Paulmier & Ruiz-Pino, 2009; Revsbech *et al.*, 2009). Por lo tanto, las ZMO juegan un papel vital en los procesos biogeoquímicos oceánicos (Stramma *et al.*, 2008; Ulloa & Pantoja, 2009), principalmente el del nitrógeno (N).

El ciclo del N es tal vez uno de los ciclos biogeoquímicos marinos más complejos (Pajares & Ramos, 2019). La gran mayoría de N existe como gas dinitrógeno molecular (N_2), que solo está disponible para bacterias y arqueas que fijan N_2 . Por lo tanto, la principal fuente de N en el océano es mediante la fijación biológica de N_2 y la deposición atmosférica (Voss *et al.*, 2013). El N es escaso en el océano, como consecuencia, limita la productividad marina en muchas partes de ese bioma (Glibert *et al.*, 2016). El N ocupa un papel central en la biogeoquímica oceánica y ejerce una influencia significativa en los ciclos de otros elementos, como el carbono (C) (Gruber, 2008). Además, una de las formas intermedias en el ciclo del N es el óxido nitroso (N_2O), un gas de efecto invernadero 300 veces más potente que el dióxido de C (CO_2), el cual tiene un fuerte impacto en el clima global (Jackman *et al.*, 1980; Ravishankara *et al.*, 2009).

Debido a las alteraciones causadas por las actividades antropogénicas, y el impacto significativo que pueden tener en la salud del ecosistema marino, la biodiversidad y el cambio climático, el estudio de las comunidades procariontes involucradas en el ciclo del N marino ha ganado gran interés en los últimos años (Galloway *et al.*, 2003; Domangue & Mortazavi, 2018; Pajares & Ramos, 2019).

El N se presenta en diferentes estados de oxidación en el océano, desde -III en las formas más reducidas como el amonio (NH_4^+) y el N orgánico, hasta +V en la forma más oxidada como el nitrato (NO_3^-). Por lo tanto, el N puede actuar como donador o aceptor de electrones para el metabolismo procarionte en los ecosistemas marinos (Gruber, 2008).

El ciclo del N marino está mediado por procesos microbianos como la fijación del N_2 , la asimilación de N, la nitrificación, la desnitrificación, oxidación anaerobia del NH_4^+ (anammox), la reducción desasimiladora de NO_3^- a NH_4^+ (DNRA) y la oxidación anaerobia del metano dependiente del NO_3^- / nitrito (NO_2^-) (n-damo) (Pajares & Ramos, 2019) (**Figura 1**). Estos procesos, pueden clasificarse como aquellos que contribuyen a la fijación de N y lo retienen (fijación del N_2 , asimilación, nitrificación y DNRA), y los que contribuyen a la pérdida de N (desnitrificación, anammox y n-damo). Las principales pérdidas de N son en la forma de gas N_2 mediadas por la desnitrificación y el anammox (Ward *et al.*, 2009).

El estudio de genes que codifican para proteínas metabólicas claves proporciona importantes descubrimientos sobre el potencial biológico de los microorganismos que participan en el ciclo del N y proporciona una visión profunda de los factores ecológicos que determinan su biogeografía y actividad en los sistemas marinos (Damashek & Francis, 2018; Pajares & Ramos, 2019).

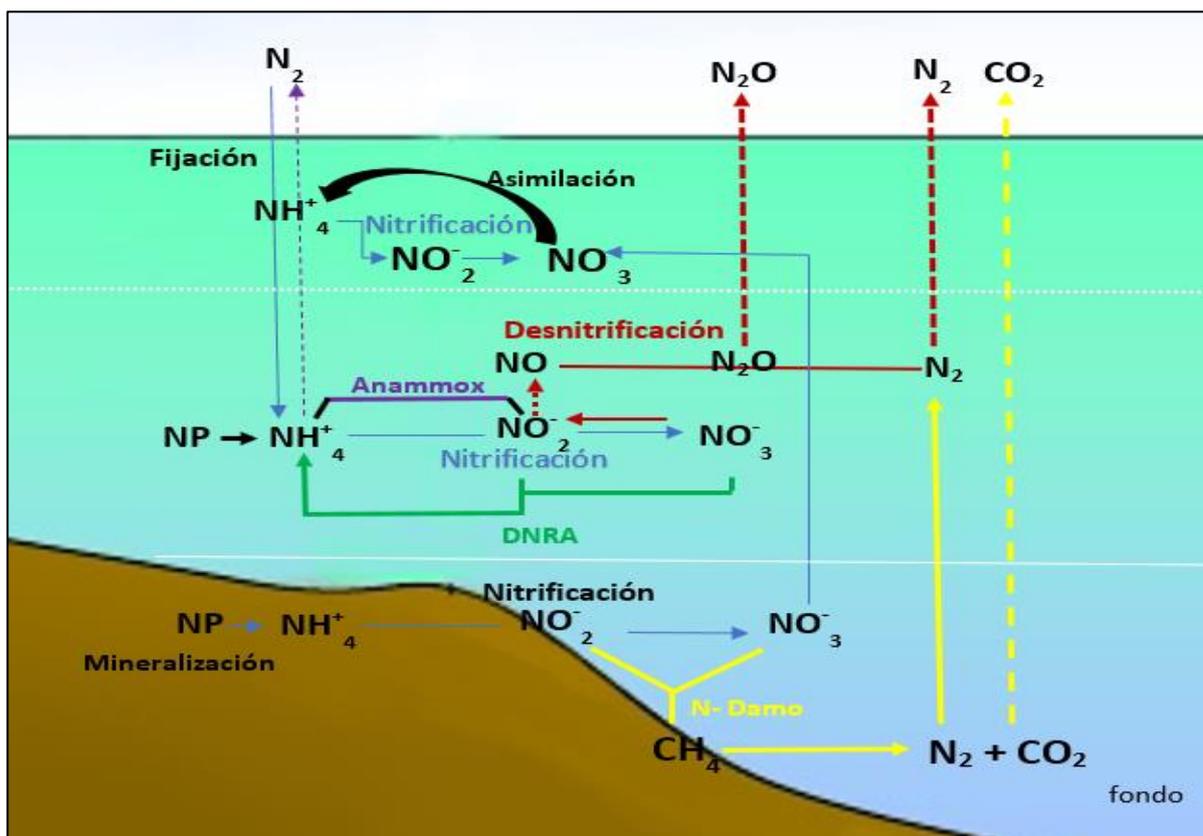


Figura 1. Ciclo del N marino. Los diferentes procesos metabólicos de óxido-reducción están diferenciados por color. Las flechas discontinuas indican compuestos gaseosos con la posibilidad de salir del sistema acuático o ser aprovechados por otros procesos en el ciclo del N.

1.2 Desnitrificación en sistemas marinos

La desnitrificación constituye uno de los procesos esenciales dentro del ciclo global del N (Zumft, 1997). Este proceso lo lleva a cabo un grupo diverso de organismos heterótrofos, aunque se han encontrado organismos autótrofos desnitrificantes que utilizan compuestos de hidrógeno o azufre como donadores de electrones, mientras realizan la reducción del NO_3^- y NO_2^- en muchos entornos marinos, incluidas las ZMO (Ghosh & Dam, 2009).

Generalmente, la desnitrificación está restringida a ambientes subóxicos y anóxicos con una concentración de $\text{O}_2 < 10 \mu\text{M}$ (Ji *et al.*, 2015), y está acoplada a la oxidación de C orgánico. Estrictamente, la desnitrificación es un proceso respiratorio en el que se utilizan los compuestos oxidados del N como aceptores terminales de electrones en ausencia de O_2 , donde diversos microorganismos participan en el proceso de manera secuencial para reducir los compuesto oxidados del N hasta N_2 (**Figura 2**) (Wallenstein *et al.*, 2006). En consecuencia, este proceso promueve la pérdida de N biodisponible en el océano en forma de N_2 y contribuye a la emisión de gases de efecto invernadero, tales como óxido nítrico (NO) y N_2O (Zumft, 1997).

Existen muchos genes que están involucrados en la vía de la desnitrificación canónica, el cual es un proceso modular en el que las bacterias participantes no poseen todas las enzimas involucradas, por lo tanto, solo participan en algunas reacciones (Graf *et al.*, 2014). El proceso comienza por la reducción de NO_3^- a NO_2^- , un compuesto importante para otros procesos en el ciclo del N (Zumft, 1997), mediado por dos enzimas, la NO_3^- reductasa unida a la membrana, codificada por los genes *nar*, y la NO_3^- reductasa periplásmica que codifican los genes *nap*, presente en bacterias Gram negativas principalmente. La reducción de NO_3^- a NO_2^- no es exclusiva de bacterias desnitrificantes, también ocurre en el proceso DNRA (Zumft, 1997).

La reducción subsecuente del NO_2^- a NO es mediada por la NO_2^- reductasa, codificada por los genes *nir*, los cuales presentan dos variaciones isofuncionales de origen evolutivo divergente (Jones *et al.*, 2008): una de estas enzimas es codificada por el gen *nirS*, que sintetiza la citocromo-cd1 que contiene un grupo hemo, mientras que, el gen *nirK* contiene cobre (Coyne *et al.*, 1989; Tamegai *et al.*, 2007). Este es el primer paso en la vía de desnitrificación donde se pierde N del sistema en forma de gas, y aunque los genes *nir* están presentes en muchos otros organismos, como los que realizan el proceso anammox, estos genes son los marcadores más usados para diferenciar a las comunidades desnitrificantes (Braker *et al.*, 2000). Diversos estudios sugieren que los microorganismos que portan genes

nirS o *nirK* ocupan diferentes nichos ecológicos, por lo tanto, se distribuyen en hábitats específicos, con bacterias desnitrificantes portando una de las dos enzimas, pero no ambas (Jones & Hallin, 2010; Wittorf *et al.*, 2016; Pajares *et al.*, 2019). Por otro lado, los desnitrificantes *nirS* se distribuyen más ampliamente, además, suelen tener una vía de desnitrificación casi completa, ya que presentan varios genes más, con la capacidad de realizar una reducción del NO_2^- a N_2 (Graf *et al.*, 2014).

El último paso de la desnitrificación es la reducción del N_2O a N_2 y es catalizada por la enzima N_2O reductasa, codificada por los genes *nosZ*, los cuales son frecuentemente usados como marcadores moleculares (Graf *et al.*, 2014). Se diferencian dos clados, aquellos organismos que poseen más de un gen de la desnitrificación (*nosZI*) y aquellos que solo poseen el gen *nosZ* (*nosZII*) (Jones *et al.*, 2014).

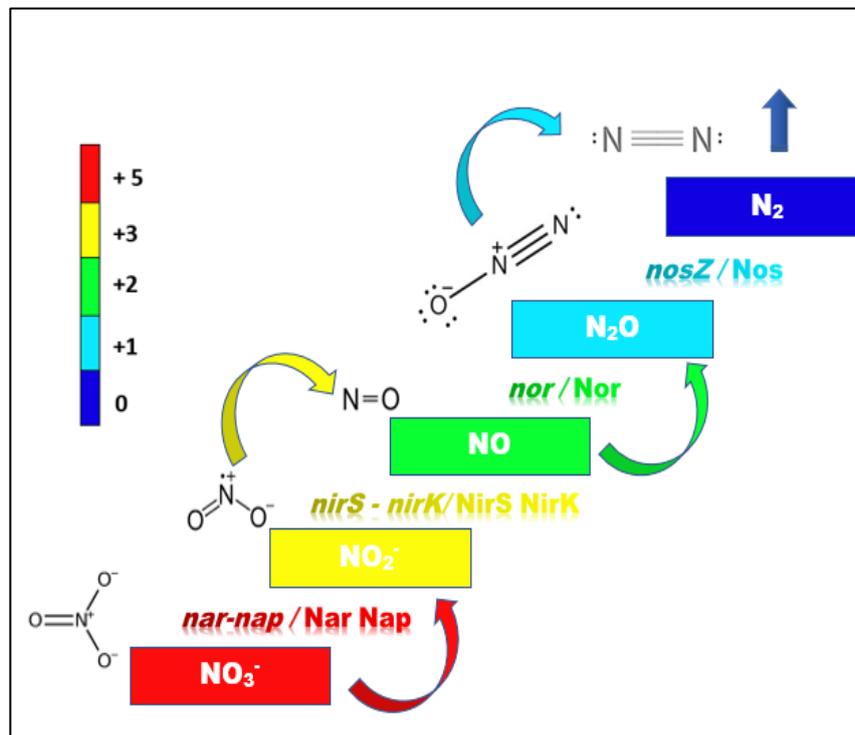


Figura 2. Proceso de la reducción canónica del NO_3^- a N_2 , mediada por diversos genes y enzimas. El color indica el estado de oxidación de las especies de N.

1.3 Factores que afectan a la desnitrificación en sistemas marinos

Los factores ambientales varían de un lugar a otro en los sistemas marinos. las bacterias desnitrificantes son principalmente heterótrofas, por ende, estos microorganismos dependen del suministro de C orgánico (Ward *et al.*, 2008; Kalvelage *et al.*, 2013). Además, la

composición y estequiometría de la fuente de materia orgánica pueden determinar qué proceso del ciclo del N será dominante en la pérdida de N; por ejemplo, cuando la materia orgánica se compone de una mayor proporción C:N se estimula la desnitrificación sobre la DNRA (Chang *et al.*, 2014). Así, en algunas ZMO como las del ETNP y ETSP la desnitrificación parece estar limitada por la disponibilidad de C orgánico, mientras que en el Mar Arábigo no se ve afectada por ésta (Ward *et al.*, 2008).

Por otro lado, la salinidad en combinación con la disponibilidad de C orgánico controla la desnitrificación y la distribución de la comunidad desnitrificante en los sistemas costeros (Mosier & Francis, 2010). En primer lugar, el cambio rápido de la salinidad impide la mezcla de agua y da como resultado zonas subóxicas. En segundo lugar, se ha observado que aquellos organismos que portan genes *nirK* presentan una baja diversidad cuando hay altas concentraciones de sal, manteniendo una relación inversamente proporcional con la salinidad (Mosier & Francis, 2010; Zhang *et al.*, 2014). En contraste, *nirS* es menos diverso cuando las concentraciones de sal son bajas y la disponibilidad de NO_3^- es alta (Santoro *et al.*, 2006). Además, se ha observado que la salinidad determina la actividad extracelular enzimática; cuando se incrementa la salinidad el proceso de la desnitrificación mejora y esto se ve reflejado en el aumento en la abundancia de genes *nirS* y *nirK* en sistemas estuarinos (Li *et al.*, 2019).

Otro factor que promueve el proceso de la desnitrificación es la temperatura, ya que se ha observado que las temperaturas por arriba de los 16°C favorecen las tasas de desnitrificación en el agua (Amatya *et al.*, 2009), mientras que por debajo de esta temperatura las tasas de desnitrificación disminuyen (Amatya *et al.*, 1970). Asimismo, el cobre actúa como factor limitante para el funcionamiento de la NO_2^- reductasa en organismos que requieren de él, como los desnitrificantes *nirK* (Granger & Ward, 2003). También, una alta disponibilidad de NO_3^- y NO_2^- estimulan la desnitrificación y podría aumentar la diversidad de bacterias desnitrificantes (Jayakumar *et al.*, 2009). Por ejemplo, cuando hay condiciones subóxicas y concentraciones máximas de NO_2^- , la desnitrificación es la vía respiratoria principal que tiene lugar utilizándose NO_2^- y reduciéndolo hasta N_2 (Devol, 1978; Morrison *et al.*, 1999).

Por último, el O_2 es un factor clave que controla la distribución de la comunidad desnitrificante (Braker *et al.*, 2001; Francis *et al.*, 2013; Cornwell *et al.*, 2014). En los sistemas marinos, el O_2 es el principal impulsor de la actividad de estas comunidades, ya que la desnitrificación ocurre en zonas subóxicas y anóxicas (Jayakumar *et al.*, 2009; Ward *et al.*, 2009). En consecuencia, una alta concentración de O_2 disuelto inhibe la actividad desnitrificante e indirectamente reduce la abundancia de estos microorganismos (Dalsgaard

et al., 2014). En estudios recientes se ha cuantificado la sensibilidad al O₂ en las transformaciones anaerobias de N en las ZMO, encontrando que la desnitrificación tiene una tolerancia al O₂ relativamente baja, con una concentración de inhibición media de 0.3 μM (Kalvelage *et al.*, 2011; Dalsgaard *et al.*, 2014). Esto se puede notar en la transcripción de los genes *nirS* y *nosZ*, que se restringen a concentraciones de O₂ por debajo de los 0.2 μM, mientras que el gen *nirK* tolera concentraciones más elevadas (Dalsgaard *et al.*, 2014). Teniendo en cuenta lo anterior, se ha establecido que la comunidad microbiana cambia de acuerdo con los estados de oxidación en las ZMO. Por ejemplo, una alta concentración de NO₂⁻ y condiciones subóxicas están asociada a una alta diversidad de desnitrificantes *nirS* y *nirK* (Jayakumar *et al.*, 2009). Por esta razón, las grandes pérdidas de N están asociadas a ambientes marinos donde el O₂ es escaso (< 5 μM) y existe una acumulación de N₂O (Jayakumar *et al.*, 2009; Galán *et al.*, 2014).

1.4 Diversidad funcional y distribución de bacterias desnitrificantes en sistemas marinos

Los microorganismos desnitrificantes son muy diversos filogenéticamente, por lo que su estudio a través del marcador molecular 16S rRNA se vuelve inapropiado (Falk *et al.*, 2007). El estudio de la diversidad genética de los desnitrificantes se ha dirigido a los genes *nirK*, *nirS* y *nosZ*, estudiados principalmente a través de métodos de clonación por medio de la amplificación por PCR (ej.: Scala & Kerkhof, 1998; Braker *et al.*, 2000; Jayakumar *et al.*, 2004). Por otro lado, en los últimos años apenas se ha empezado a estudiar la diversidad de genes de la desnitrificación en ambientes marinos a través de secuenciación de alto rendimiento por Illumina (Shi *et al.*, 2019; Chen *et al.*, 2020), pero aún no hay estudios en ZMO.

Si bien los microorganismos desnitrificantes se pueden encontrar en cualquier ambiente marino (ej., Ward *et al.*, 2009; Kim *et al.*, 2011; Li *et al.*, 2013; Ji *et al.*, 2015), la desnitrificación generalmente se restringe a ambientes subóxicos (O₂ < 10 μM) o anóxicos (O₂ < 0.1 μM) tales como las ZMO y los sedimentos bentónicos (**Figura 3, Tabla S1**).

Las ZMO se consideran una de las principales áreas oceánicas donde sucede la desnitrificación (Lipschultz *et al.*, 1990; Ward *et al.*, 2009). En la columna de agua de estas regiones generalmente predomina el gen desnitrificante *narG*, pero cuando la concentración de N₂O es alta, el gen desnitrificante dominante es el *nirK* (Fuchsman *et al.*, 2017). Por otro lado, los gradientes redox en los sedimentos marinos determinan las actividades metabólicas

que diferencian a las comunidades bacterianas del ETNP, siendo la diversidad funcional y filogenética del gen *nirS* alta en las capas superficiales (Braker *et al.*, 2001).

En la ZMO del Pacífico mexicano, la baja concentración de NO_3^- ($< 0.5 \mu\text{M}$) y la ausencia de O_2 en los sedimentos promueve una mayor diversidad de organismos *nirS* que los que contienen genes *nirK* (Liu *et al.*, 2003), mientras que en el núcleo de la ZMO de la columna de agua los altos niveles de NO_3^- , NH_4^+ y la alta abundancia del gen de la reducción de NO_2^- a NH_4^+ (*nrfA*) parecen indicar que la comunidad DNRA juega un papel fundamental en el ciclo del N en esta ZMO (Pajares *et al.*, 2019).

Por otro lado, el O_2 , NO_3^- , NO_2^- y la profundidad son los factores ambientales que rigen las comunidades desnitrificantes a lo largo del gradiente biogeoquímico en la columna de agua en el ETSP (Castro-Gonzalez *et al.*, 2005). Esto se puede notar en la transcripción de los genes desnitrificantes, donde *nirS*, *norB* y *nosZ* disminuyen cuando el $\text{O}_2 > 0.2 \mu\text{M}$. Sin embargo, bajo esta concentración de O_2 la transcripción de otros genes como *narG* y *nirK* no se ve afectada (Dalsgaard *et al.*, 2014).

En el Mar Árabe se ha identificado que la desnitrificación domina sobre el anammox, mientras que el anammox es dominante en la ZMO del ETSP (Ward *et al.*, 2009). No obstante, se ha observado que las distribuciones de los genes *nir* a lo largo de la columna de agua siguen el mismo patrón en el Mar Árabe y el ETSP, en el que se asocian con el segundo máximo de NO_2^- . Sin embargo, la composición de la comunidad desnitrificante de las dos regiones parece ser diferente (Castro-Gonzalez *et al.*, 2005; Jayakumar *et al.*, 2013), debido a que la diversidad de la comunidad varía en espacio y tiempo principalmente por los estados de oxidación (Jayakumar *et al.*, 2009). Por ejemplo, en presencia de O_2 el gen *nirK* es más diverso, pero cuando el O_2 es $< 5 \mu\text{M}$ y la concentración del NO_3^- es mayor a la del NO_2^- el gen *nirS* es más diverso (Jayakumar *et al.*, 2009).

En el Mar Negro, que es la cuenca subóxica más grande del mundo, las comunidades desnitrificantes generalmente varían con la profundidad (Oakley *et al.*, 2007). Se ha observado que cuando el NO_3^- y NO_2^- son altos y la concentración de O_2 es $< 10 \mu\text{M}$, la diversidad de genes *nirK* y *nirS* es alta. Por el contrario, cuando el NO_3^- y O_2 están ausentes se observa una baja diversidad. Adicionalmente, el Mar Negro parece tener una menor diversidad de genes *nirS* que otras ZMO (Oakley *et al.*, 2007).

Pocos estudios de comunidades desnitrificantes se han llevado a cabo en sedimentos de aguas profundas o respiraderos hidrotermales, donde se espera que la desnitrificación autótrofa sea un proceso importante dada la alta concentración de compuestos de azufre en tales entornos (Pajares & Ramos, 2019).

Por otro lado, los sistemas costeros representan más del 60% en la pérdida total del N bentónico (Thamdrup, 2012). En estos sistemas, la disponibilidad de donadores de electrones y C orgánico estimulan a la desnitrificación, la cual a menudo es el proceso principal que impulsa la eliminación de N de estos ambientes (Abell *et al.*, 2013; Devol, 2015; Li *et al.*, 2017; Damashek & Francis, 2018). En general, el gen *nirS* es más abundante y diverso que *nirK* en los sedimentos estuarinos (Santoro *et al.*, 2006; Abell *et al.*, 2010; Mosier & Francis, 2010; Lee & Francis, 2017a). Además, la diversidad y abundancia de desnitrificantes a menudo cambian a lo largo del gradiente de salinidad, por lo que las comunidades desnitrificantes serán diferentes entre la transición de agua dulce a salobre y salina en las regiones marinas (Abell *et al.*, 2013; Francis *et al.*, 2013).

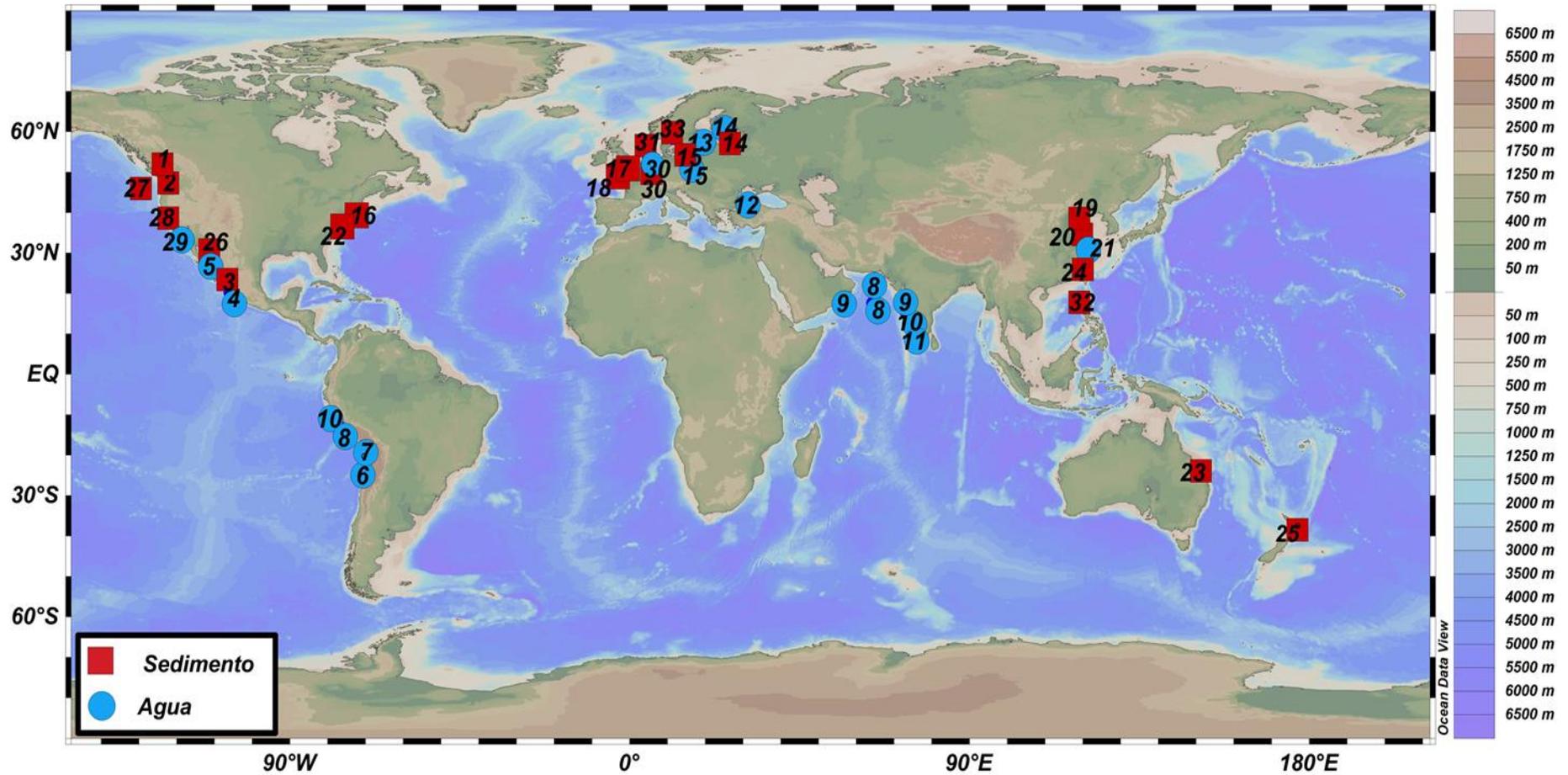


Figura 3. Mapa de distribución de comunidades desnitrificantes en sistemas marinos basado en los genes *nirS* y *nirK* de estudios representativos sobre diversidad. Cuadrado rojo: estudios en sedimentos, círculo azul: estudios en columna de agua. La numeración corresponde a cada artículo en la Tabla S1 del material suplementario.

1.5 Importancia de las zonas de mínimo oxígeno en la pérdida de N fijado

Las ZMO juegan un papel vital en los procesos biogeoquímicos oceánicos (Stramma *et al.*, 2008; Ulloa & Pantoja, 2009), ya que presentan ciclos de nutrientes bastante complejos (Karstensen *et al.*, 2008; Crowe *et al.*, 2018; Pajares *et al.*, 2019). Cuando se produce una surgencia, se inyecta agua rica en NO_3^- en las capas fóticas, promoviendo a una intensa productividad, lo que a su vez conduce al agotamiento del O_2 ($< 20 \mu\text{M}$) a profundidades intermedias (Revsbech *et al.*, 2009; Galán *et al.*, 2014). En general, las ZMO se encuentran entre 100 a 900 m de profundidad (Karstensen *et al.*, 2008). En la actualidad, estas ZMO se encuentran en expansión debido al calentamiento global y a las actividades antropogénicas, contribuyendo a la desoxigenación del océano global (**Figura 4**) (Stramma *et al.*, 2008; Horak *et al.*, 2016; Levin, 2018)).

En las ZMO se pierde alrededor del 30–50% de N (DeVries *et al.*, 2013, Codispoti *et al.*, 2001) mediante la desnitrificación y el anammox (Devol, 2015; Ward *et al.*, 2009). De hecho, el Mar Arábigo, que cubre solo $\sim 2\%$ del área oceánica global, contribuye con un 20% en la desnitrificación oceánica, por lo tanto, desempeña un papel importante en la pérdida de N (Codispoti *et al.*, 2001, Ward *et al.*, 2009). El Pacífico mexicano también representa una de las ZMO más importantes en la pérdida de N marino (Karstensen *et al.*, 2008), pero hasta la fecha existe poca información sobre el papel que juegan las comunidades microbianas en la pérdida de N a través de la desnitrificación en esta ZMO (Pajares & Ramos, 2019).

Además, eventos climáticos como El Niño-Oscilación del Sur (ENSO) pueden modificar la disponibilidad de O_2 en las capas superficiales en la zona del Pacífico tropical. Por ejemplo, la fase de El Niño promueve una termoclina más profunda y cálida con una mayor proporción de O_2 (Ito and Deutsch, 2013), debido a una reducción en el suministro de nutrientes (Morales *et al.*, 1999; Fuenzalida *et al.*, 2009; Czeschel *et al.*, 2012) y una caída en la actividad biológica (Trucco-Pignata *et al.*, 2019), por lo que este tipo de eventos climáticos en las ZMO influyen en la disponibilidad de O_2 y, por ende, en el tipo de actividad bacteriana (Paulmier *et al.* 2006).

Análisis recientes de datos del O_2 superficial oceánico actuales e históricos han mostrado una expansión global de las ZMO, las cuales se están desoxigenando a una velocidad de $0.09\text{--}0.34 \mu\text{mol kg}^{-1} \text{ año}^{-1}$, lo que en teoría exacerbaría aún más la pérdida de N debido a la desnitrificación (Stramma *et al.*, 2008; Breitburg *et al.*, 2018; Ruvalcaba-Baroni *et al.*, 2020). Por lo tanto, una clave importante para entender el desequilibrio en la pérdida de N en el océano son las ZMO (Revsbech *et al.*, 2009).

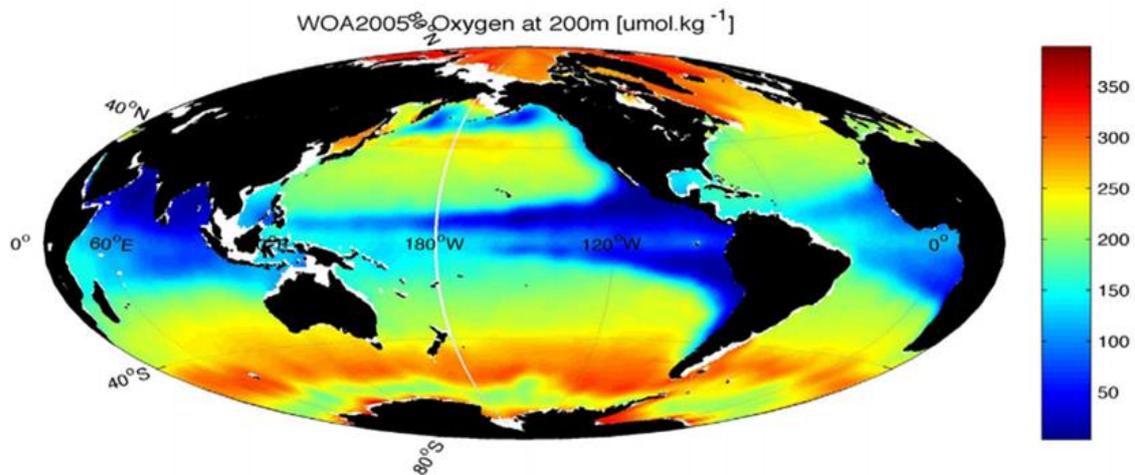


Figura 4. Mapa de distribución del O₂ disuelto global del océano a 200 m de profundidad. Los colores representan la concentración de O₂ expresada en $\mu\text{mol.kg}^{-1}$. Datos extraídos de “National Center for Environmental Information” (<https://www.nodc.noaa.gov/cgi-bin/OC5/SELECT/woaselect.pl>).

2 JUSTIFICACIÓN

Para entender la relación que existe entre las comunidades microbianas y el ciclo de N en las ZMO, así como sus implicaciones en el cambio global (emisión de gases de efecto invernadero), es de suma importancia conocer el efecto de la variación ambiental sobre las bacterias que participan en la desnitrificación en estas ZMO. Este trabajo supone el primer estudio sobre la distribución y diversidad de comunidades desnitrificantes portadoras del gen *nirS* y su relación con las condiciones oceanográficas (oxígeno, temperatura, salinidad, clorofila y nutrientes) bajo dos eventos climáticos diferentes en la ZMO del Pacífico mexicano. Se trata de una zona poco estudiada que pertenece al ETNP, una de las ZMO más extensas e intensas del océano global en la que se desconoce el papel que juegan las comunidades desnitrificantes en la pérdida de N marino. Por ello, se pretende aportar nuevo conocimiento sobre los efectos ambientales en la distribución de estas poblaciones microbianas desnitrificantes en la ZMO del Pacífico central mexicano.

3 HIPÓTESIS

- 1) Dado que la distribución de los microorganismos portadores del gen *nirS* está determinada principalmente por la concentración de O₂, no se espera encontrar el gen *nirS* en la zona eufótica oxigenada, mientras que este gen estará presente en la ZMO del Pacífico mexicano, con una mayor diversidad en los sedimentos anóxicos que en el agua subóxica.
- 2) La disponibilidad de nutrientes influirá en la diversidad del gen *nirS*, de manera que la diversidad aumentará en la zona costera y disminuirá en las zonas oceánicas, donde la concentración de nutrientes será menor.
- 3) Se espera que la comunidad desnitrificante *nirS* sea diferente bajo los eventos climáticos de La Niña y El Niño en dos épocas similares de surgencia en la ZMO del Pacífico mexicano.

4 OBJETIVOS

4.1 Objetivo general

Describir la distribución espacial y temporal, así como la diversidad alfa y beta de organismos desnitrificantes portadores del gen *nirS* en la columna de agua y sedimentos de un transecto costa-océano abierto en la ZMO del Pacífico central mexicano y determinar su relación con algunas variables oceanográficas.

4.2 Objetivos específicos

1. Realizar la secuenciación masiva del gen *nirS* en muestras obtenidas en la columna de agua y en sedimentos a lo largo de un transecto costa-océano abierto frente al Puerto de Mazatlán en la temporada de surgencia (primavera) en dos años consecutivos de muestreo.
2. Determinar la diversidad y distribución del gen *nirS* en esta ZMO en dos eventos climáticos diferentes (La Niña vs El Niño) en la época de surgencia.
3. Establecer una relación entre las propiedades oceanográficas (oxígeno, temperatura, salinidad, clorofila) y la concentración de nutrientes con la distribución del gen *nirS* en esta ZMO.

5 MATERIALES Y MÉTODOS

5.1 Área de estudio y muestreo

La zona de muestreo consta de un transecto con cuatro estaciones en abril del 2018 (crucero Maz-IV) y cinco estaciones en abril del 2019 (crucero Maz-V), que van desde la costa de Mazatlán al océano abierto, dentro de la ZMO del Pacífico central mexicano (**Figura 5**). En ambos cruceros, la estación C representa la estación más costera, con una profundidad media de 32 m, y la estación O2 la más oceánica, con una profundidad media de 690 m.

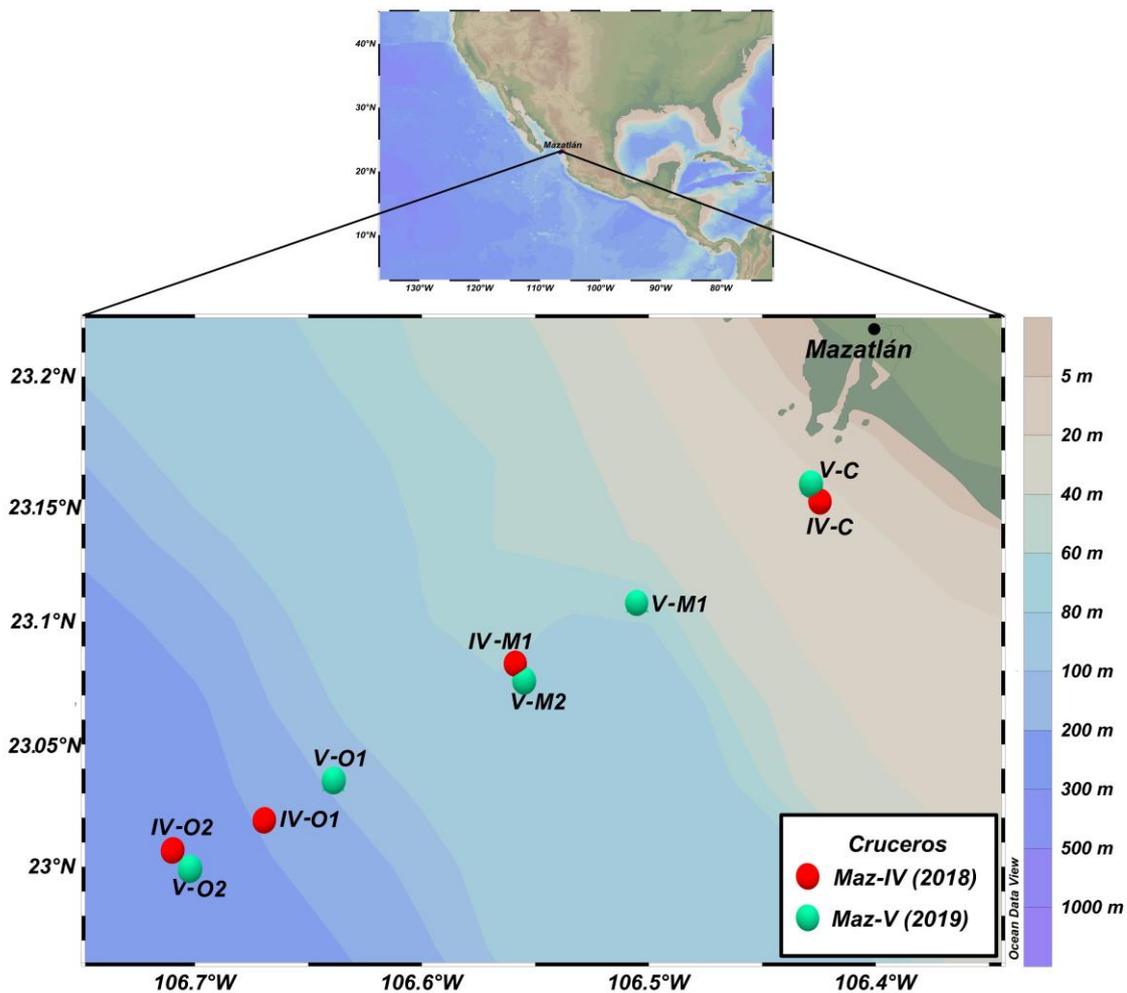


Figura 5. Mapa de la localización de las estaciones de muestreo en el transecto de estudio frente del Puerto de Mazatlán. Abreviaturas: C: costera, M1: intermedia 1, M2: intermedia 2, O1: oceánica 1, O2: oceánica 2. Los colores de los círculos denotan el crucero.

5.2 Toma de muestras

Los muestreos se realizaron a bordo del buque oceanográfico “El Puma” de la UNAM. En cada estación se midió la concentración de O₂, temperatura, salinidad y fluorescencia desde la superficie hasta el fondo mediante una sonda CTD (SeaBird 19 plus) acoplada a una roseta. Se tomaron muestras de agua mediante botellas tipo Niskin de 10 L de capacidad a cinco profundidades: superficie (5 m), máximo profundo de clorofila, base de la oxiclina, núcleo de la ZMO y fondo. Para los nutrientes se tomaron en cuenta otras profundidades, además de las mencionadas anteriormente. Las muestras de agua (4 L) se filtraron con membranas de 0.22 µm a bordo del buque; el agua filtrada se congeló a -20 °C para el análisis de los nutrientes y los filtros a -80 °C para el análisis molecular.

Los sedimentos en el crucero Maz-IV se muestrearon con un nucleador de caja, del cual se extrajeron núcleos, que fueron congelados a -80 °C hasta su traslado al laboratorio, donde fueron cortados por la mitad (en condiciones estériles) para obtener las muestras correspondientes a los primeros 10 cm de profundidad. Por otra parte, los sedimentos en el crucero Maz-V se muestrearon a partir de un multinucleador, donde por cada núcleo se colectaron 3 muestras (300 g en total): la primera para análisis de ADN, almacenado a -80 °C, la segunda para la determinación de pH y C orgánico, y la tercera para el análisis de nutrientes en el agua intersticial. El agua intersticial se obtuvo mediante centrifugación máxima (13,000 rpm) de los sedimentos, la cual se filtró con membranas 0.22 µm a bordo del buque mediante una jeringa acoplada a un sistema swinnex; las muestras de agua fueron congeladas a -20 °C hasta su traslado al laboratorio para los análisis de nutrientes.

5.3 Análisis de las variables físico-químicas

Los nutrientes (NO₃⁻, NO₂⁻, NH₄⁺, PO₄³⁻) de la columna de agua de los cruceros Maz-IV y Maz-V, así como los nutrientes y elementos totales (NT y PT) en sedimentos del crucero Maz-V fueron analizados con un autoanalizador de flujo segmentado (Skalar San-Plus) usando el método estándar adaptado para análisis de agua marina (Hansen & Koroleff, 1999), en el Laboratorio de Biogeoquímica Acuática del Instituto de Ciencias del Mar y Limnología (ICMyL-UNAM).

Las muestras de sedimento del crucero Maz-V se secaron a temperatura ambiente para el análisis del pH y C orgánico. El pH se midió mediante un pHmetro Hanna (Mod. HI2020-01) en el laboratorio de Ecología Microbiana Acuática del ICMyL. El sedimento fue triturado en mortero y el C orgánico se determinó en el laboratorio de Química Acuática del ICMyL por

el método de Walkley-Black (1947) modificado por Jackson (1958), que consiste en el calentamiento exotérmico y oxidación con dicromato de potasio.

Los datos de las variables hidrológicas se analizaron mediante el programa Ocean Data View (v.5.4.0.) (Schlitzer, 2018), con el cual se obtuvo un mapa de la zona de estudio. Para el análisis de masas de agua se realizaron diagramas T/S en ambos años de muestreo con el criterio de TEOS-10 (Portela *et al.*, 2016). Finalmente, se realizaron perfiles oceanográficos y de nutrientes.

Por otro lado, se utilizaron los datos obtenidos de la página web de la administración nacional oceánica y atmosférica (NOAA, por sus siglas en inglés) del índice de ENSO (MEI.v2) para observar las anomalías oceanográficas y atmosféricas que ocurrieron en el Pacífico mexicano. El índice toma datos bimestrales de la combinación de cinco variables (presión a nivel del mar, temperatura superficial del mar, componentes zonales y meridionales del viento superficial y radiación de onda larga).

5.4 Análisis moleculares

Los análisis moleculares se realizaron en las cuatro estaciones del crucero Maz-IV, mientras que en el crucero Maz-V se llevaron a cabo en la estación C (costera), M2 (intermedia 2), O1 (oceánica 1) y O2 (oceánica 2). La extracción del ADN de las muestras de agua y sedimento se hizo en el laboratorio de Ecología Microbiana Acuática del ICMyL y se utilizaron los kits DNeasy PowerWater y PowerSoil DNA Isolation (Qiagen), respectivamente. La concentración y calidad del ADN se midió mediante un Fluorómetro Qubit® 3.0 (Thermo Fisher Scientific) y un Nanodrop 2000 (Thermo Fisher Scientific).

Para la secuenciación de las muestras se pusieron a punto las condiciones de PCR para amplificar el gen *nirS* con los primers nirScd3af-nirSR3cd (425 pares de bases) (Braker *et al.*, 1998) (**Tabla 1**). Se utilizaron como positivos aislados bacterianos cercanos a la zona de estudio, con un genoma portador del gen *nirS*. Para cada muestra de agua y sedimento se realizaron PCRs del gen *nirS* y la purificación de los productos de PCR mediante el kit QIAquick Gel Extraction (Qiagen). Para la secuenciación por Illumina se usaron las muestras con una concentración mínima de 10 ng/μL de ADN después de la purificación.

Tabla 1. Condiciones de termociclaje y reactivos para amplificar el gen *nirS*.

Primers <i>nirS</i> (425 pb)	Condiciones de termociclaje	Concentración final de reactivos
nirScd3aF nirSR3cd	95°C x 15 min, 12 ciclos (95°Cx30 s, touchdown 54°-48°Cx30 s, 72°Cx1 min), 30 ciclos (95°Cx30 s, 48°Cx30s, 72°Cx30 s), 72°Cx5 min	Buffer (1X), MgCl ₂ (0.5 mM), primers (0.3 μM), dNTPs (0.2 mM), BSA (0.3 μg/μL) y Hotstar Taq (0.025 μ/μL) DNA (10 ng/μL).

5.5 Secuenciación y análisis de las secuencias

Los amplicones de *nirS* (425 pares de bases) se secuenciaron en el Laboratorio Nacional de Genómica para la Biodiversidad del CINVESTAV-LANGEBIO (Irapuato). Para la secuenciación se utilizó la plataforma Illumina MiSeq Pair-End 2 x 300 pb.

Se obtuvieron secuencias de 12 muestras (siete de Maz-IV y cinco de Maz-V) en formato FASTQ (**Tablas S2**). Se eliminaron los adaptadores y primers con el programa Fastqc (Andrews, 2010). Posteriormente, las secuencias se analizaron mediante el programa QIIME 2 (V.2021.2) (Bolyen *et al.*, 2019). Para ello, las secuencias fueron importadas bajo el formato CASAVA y se llevó a cabo la unión de las lecturas, así como la remoción y limpieza de quimeras con el algoritmo DADA2 (Callahan *et al.*, 2016). Se realizaron diversas pruebas, resultando como mejor opción un nivel de corte Q25 en forward (12/266 pb) y reverse (12/269 pb). Con ello se obtuvieron 6,181 variantes de secuencias de amplicones (ASV por sus siglas en inglés), con una longitud promedio de 374 nucleótidos. La frecuencia mínima de secuencias por muestra fue de 24,990 (IV-O1 en agua) y la mayor de 51,546 (IV-M1 en sedimento); por lo tanto, las muestras se rarificaron a 24,990 secuencias para realizar análisis de diversidad alfa y beta.

5.6 Asignación de secuencias representantes

Se realizó una base de datos de referencia del gen *nirS* a partir de la búsqueda de secuencias en el portal GenBank-NCBI (Centro Nacional para la Información Biotecnológica). El número de acceso de las secuencias se obtuvo de 31 artículos que usaron los primers nirScd3aF-nirSR3cd y nirS1F-nirS6R, que caen dentro de la sección de interés. Estos estudios abarcaron distintos sistemas marinos: zonas costeras, oceánicas y ZMO. La base de datos constó de 5,408 secuencias, la cual fue transformada al formato requerido por la paquetería de DADA2 v.1.20.0 en RStudio v.4.1.1 (R core Team, 2021), así como la base de secuencias rarificadas obtenida en QIIME 2. La clasificación de las ASV obtenidas en QIIME

2 se realizó mediante la base de datos de 5,408 secuencias del gen *nirS* con el comando “assignTaxonomy”. La tabla fue exportada a Excel, donde se agrupó con los datos de abundancia relativa para cada muestra. Posteriormente, se realizó una gráfica de barras en RStudio mediante la paquetería ggplot2 v.3.3.5 (Wickham, 2016) con las asignaciones que representaron más del 0.5% de la abundancia total, mientras que las asignaciones que estuvieron por debajo del 0.5% en abundancia se clasificaron como “Otros”.

Para el análisis filogenético se seleccionaron cinco ASV representantes de las asignaciones más abundantes y 15 secuencias de referencia, las cuales conforman siete agrupamientos filogenéticos diferentes de acuerdo con Falk *et al.* (2007). Dichas secuencias se obtuvieron del NCBI por medio de su número de acceso. Todas las secuencias fueron importadas a BioEdit (Hall & Carlsbad 2011), donde se editaron y se alinearon mediante el algoritmo ClustalW. El alineamiento se importó al programa MegaX (Kumar *et al.*, 2018), donde se realizó el agrupamiento por el método neighbor-joining. El árbol final se obtuvo con 10,000 bootstraps, el cual fue exportado en formato Newick y editado con el programa online Tree of Life (iTOL; Letunic & Bork, 2021).

5.7 Análisis de diversidad y estadística

Todos los análisis se llevaron a cabo en el programa RStudio.

Se construyó un mapa de calor con 41 ASV, que representaron más del 2% de la abundancia total, con las paqueterías Heatplus v.3.0.0 (Ploner, 2021), vegan v.2.5-7 (Jari *et al.*, 2020) y RColorBrewer v.1.1.2 (Erich, 2014). Para ello, se obtuvo una matriz de disimilitud de Manhattan y las agrupaciones se hicieron con el método “complete” para ambos dendogramas.

Para determinar las ASV únicas y compartidas entre muestras se realizó un diagrama Upset, transformando los datos de abundancia relativa a datos de presencia-ausencia. Se utilizaron las paqueterías lattice v.0.20-44 (Sarkar, 2008), UpSetR v.1.4.0 (Jake *et al.*, 2017) y RcolorBrewer. También se realizó un diagrama de Venn para determinar el número de ASV compartidas entre ambientes y cruceros, transformando las abundancias a datos de presencia-ausencia con la paquetería VennDiagram v.1.7.1 (Hanbo, 2018) .

Se calcularon los índices de diversidad alfa de abundancia (Chao1), diversidad específica (Shannon), dominancia (Simpson) y diversidad filogenética (Faith) a partir de los datos que se obtuvieron en QIIME 2. Se realizaron diagramas de caja y bigote para cada indicador con

la paquetería ggplot2 en donde las muestras se agruparon en sedimento y agua de fondo para cada crucero.

El análisis de la diversidad beta se realizó mediante un análisis de multiescalamiento dimensional no métrico (NMDS) con la matriz de disimilitud de Bray-Curtis mediante las paqueterías vegan y ggplot2. Con la paquetería Nbclust v.3.0 (Malika *et al.*, 2014) se emplearon 30 índices de permutación para obtener la mejor agrupación de las muestras y se hizo un análisis de similitud (ANOSIM) para probar la significancia del NMDS.

Se realizó una prueba de Mantel para evaluar la influencia de la distancia geográfica sobre la comunidad *nirS* usando dos matrices con las paqueterías ade4 v.1.17-18 (Thioulouse *et al.*, 2018) y extrafont v.0.17 (Winston, 2014): la misma matriz de disimilitud Bray-Curtis en el análisis de diversidad beta, la cual fue transformada a una matriz de similitud; y una matriz de distancia euclidiana con las coordenadas geográficas.

Con los datos fisicoquímicos y de nutrientes de las muestras de agua de fondo del crucero Maz-IV y de agua y sedimento del crucero Maz-V se realizó un análisis de correspondencia canónica (CCA) con las paqueterías vegan, ggord v.1.1.6 (Marcus, 2017), FactoMineR v.2.4 (Lê *et al.*, 2008) y ggplot2. Para determinar las variables redundantes, se usó el índice de criterio de información de Akaike mediante 1000 permutaciones, donde se determinó el mejor modelo que explicó la distribución de las muestras sobre el efecto ambiental. Para probar la significancia de la prueba se utilizó la función DBRA, que usa distancias euclidianas para datos ambientales.

6 RESULTADOS

6.1 Condiciones climáticas

Los dos años de muestreo cubrieron una transición de climática de un año frío en 2018, con un evento moderado de La Niña, a un año cálido en 2019, con un evento débil de El Niño en el ETNP (**Figura 6**). Según la NOAA, estos eventos estuvieron relacionados con una variación de la temperatura superficial del mar (aumento de 0.75°C en 2019) (<https://psl.noaa.gov/enso/mei/>).

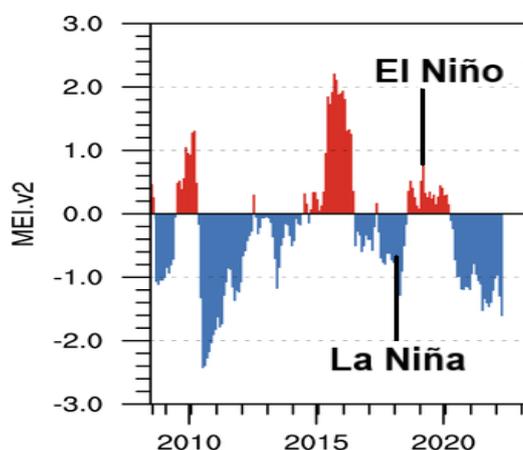


Figura 6. Evolución temporal de la temperatura en los eventos climáticos La Niña (Maz-IV, gráfico azul) y El Niño (Maz-V, gráfico rojo) indicados por el índice de la NOAA (MEI.v2).

6.2 Características de las masas de agua

Los diagramas T/S indicaron la presencia de cuatro masas de agua en la zona de estudio (**Figura S1**), de acuerdo con Portela *et al.* (2016). Se observó una interacción entre la masa de agua Subtropical Subsuperficial (StSsW; entre 17 y 440 m de profundidad, con temperatura $< 18^{\circ}\text{C}$ y salinidad $> 34.6 \text{ g kg}^{-1}$ y condiciones hipóxicas [$\text{O}_2 < 20 \mu\text{M}$] a subóxicas extremas [$0.6 \mu\text{M}$]) y la masa de agua del Golfo de California (GCW; entre 0 y 50 m de profundidad, bien oxigenada, con temperatura $> 12^{\circ}\text{C}$ y salinidad $> 35.1 \text{ g kg}^{-1}$), promoviendo características de una masa de agua transicional (TrW) que influyó en la costa durante La Niña, mientras que la masa GCW presentó mayor influencia en la costa durante El Niño. La masa de agua del Pacífico intermedio (PIW) se encontró por debajo de la masa StSsW, con agua más fría ($4\text{--}9^{\circ}\text{C}$), menos salada ($34.6\text{--}34.9 \text{ g kg}^{-1}$) y una concentración de $\text{O}_2 < 0.5 \mu\text{M}$.

6.3 Características hidrográficas

El O_2 disminuyó a lo largo de la columna de agua durante La Niña, con las mayores concentraciones ($\sim 210 \mu\text{M}$) en la superficie y en la estación más oceánica (IV-O2) (**Figura 7a**). El límite superior de la ZMO, con valores de $\text{O}_2 < 20 \mu\text{M}$, se encontró a una profundidad de 68 m en la estación más oceánica (IV-O2), mientras que en la estación costera (IV-C) se halló a los 17 m. Por otro lado, durante El Niño el O_2 disminuyó con la profundidad en todas las estaciones, excepto en la estación costera (V-C), donde el agua estuvo mezclada en toda la columna. El final de la oxiclina se observó a 70 m en la estación intermedia (V-M1) y 97 m en la estación oceánica (V-O2). Por debajo de estas profundidades los valores de O_2 fueron disminuyendo hasta alcanzar condiciones anóxicas en el fondo.

La temperatura en ambas fases climáticas disminuyó con la profundidad desde 20.6°C (La Niña) y 24°C (El Niño) en la superficie hasta 17°C (La Niña) y 13°C (El Niño) en el fondo de la estación costera y desde 24.4°C en la superficie y hasta 7°C (La Niña) y 6°C (El Niño) en el fondo de las estaciones oceánicas (**Figura 7b**). Cabe mencionar que la temperatura se mantuvo constante (22-23 °C) en toda la columna de agua en la estación costera (V-C) en el evento de El Niño.

La salinidad fue más alta en la superficie de las estaciones más oceánicas, con valores de 35 PSU en Maz-IV y 34 PSU en Maz-V. Esta disminuyó conforme aumentó la profundidad, mientras que en la superficie de la estación costera en ambos eventos climáticos se alcanzaron valores menores de 34.8 y 33 PSU, respectivamente (**Figura 7c**).

La clorofila *a* (fluorescencia) durante La Niña se concentró en la estación costera (IV-C) a 10 m de profundidad (6.2 mg/m³) y fue menor en las estaciones oceánicas, donde se alcanzó el pico máximo de clorofila *a* (2.1 mg/m³) a 34 m de profundidad. Durante El Niño, se observó un pico de clorofila *a* a 30 m de profundidad (1.9 mg/m³) en la estación intermedia V-M1 y a 40 m de profundidad en las estaciones oceánicas (1.5 mg/m³) (**Figura 7d**).

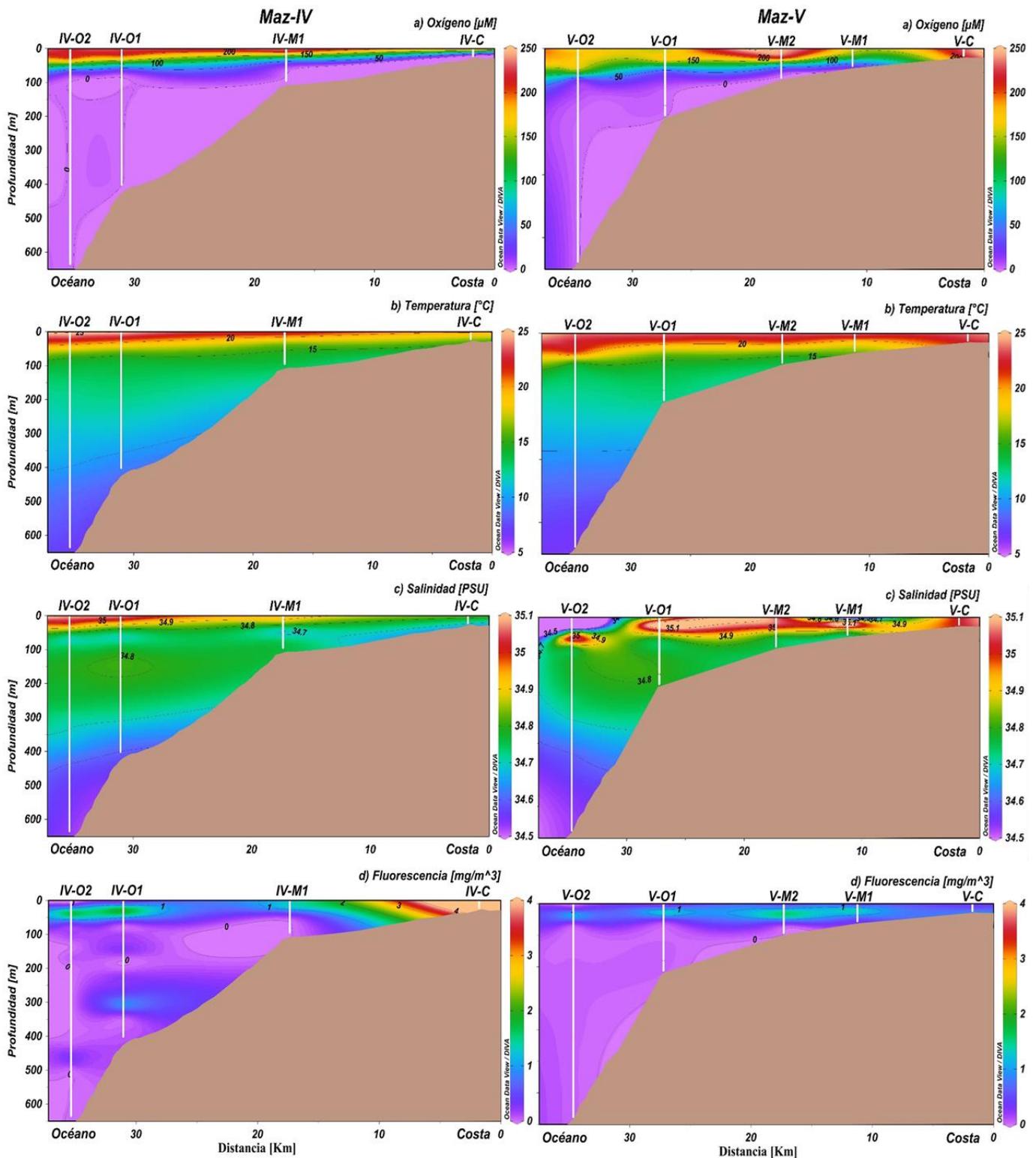


Figura 7. Secciones verticales de los parámetros hidrográficos durante La Niña (Maz-IV, paneles de la izquierda) y El Niño (Maz-V, paneles de la derecha): a) O_2 , b) temperatura, c) salinidad, d) fluorescencia (clorofila *a*). Abreviaturas: C: costera, M1: intermedia 1, M2: intermedia 2, O1: oceánica 1, O2: oceánica 2. El eje horizontal indica la distancia de la costa hacia el océano (Km), mientras que el eje vertical izquierdo indica la profundidad de la

columna de agua (m) y el eje vertical derecho indica el rango de concentración de cada parámetro.

6.4 Características bioquímicas del agua

Las secciones verticales de los nutrientes en los eventos climáticos de La Niña (Maz-IV) y El Niño (Maz-V) (**Figura 8**) reflejaron un aumento de la concentración de NO_3^- con la profundidad, con un valor mínimo de $0.1 \mu\text{M}$ (La Niña) y $0.09 \mu\text{M}$ (El Niño) en la superficie y un valor máximo de $35.9 \mu\text{M}$ (La Niña) y $44.6 \mu\text{M}$ (El Niño) en el fondo de las estaciones oceánicas, mientras que en la estación costera el valor mínimo fue de $0.6 \mu\text{M}$ (La Niña) y $0.04 \mu\text{M}$ (El Niño) en la superficie y el valor máximo de $27 \mu\text{M}$ (La Niña) y $20.9 \mu\text{M}$ (El Niño) en el fondo. El PO_4^{3-} aumentó también con la profundidad en ambos cruceros, con valores de $3.2 \mu\text{M}$ (La Niña) y $2.9 \mu\text{M}$ (El Niño) en el fondo de la estación más oceánica y de $3.4 \mu\text{M}$ (La Niña) y $2 \mu\text{M}$ (El Niño) en la estación costera.

El valor máximo de NO_2^- se encontró en el núcleo de la ZMO en las estaciones oceánicas e intermedias, con una concentración máxima de $1.96 \mu\text{M}$ a los 250 m de profundidad en La Niña (IV-O2) y de $1.32 \mu\text{M}$ a los 213 m en El Niño (V-O1). El NH_4^+ , presentó la mayor concentración ($6.2 \mu\text{M}$) a 22 m de profundidad en la estación costera, mientras que el valor mínimo ($0.01 \mu\text{M}$) se presentó en la más oceánica a una profundidad de 250 m en La Niña. Por el contrario, el NH_4^+ se incrementó con la profundidad en El Niño, con valores de $3.9 \mu\text{M}$ y $3.7 \mu\text{M}$ en el fondo de las estaciones oceánicas V-O2 y V-O1, respectivamente.

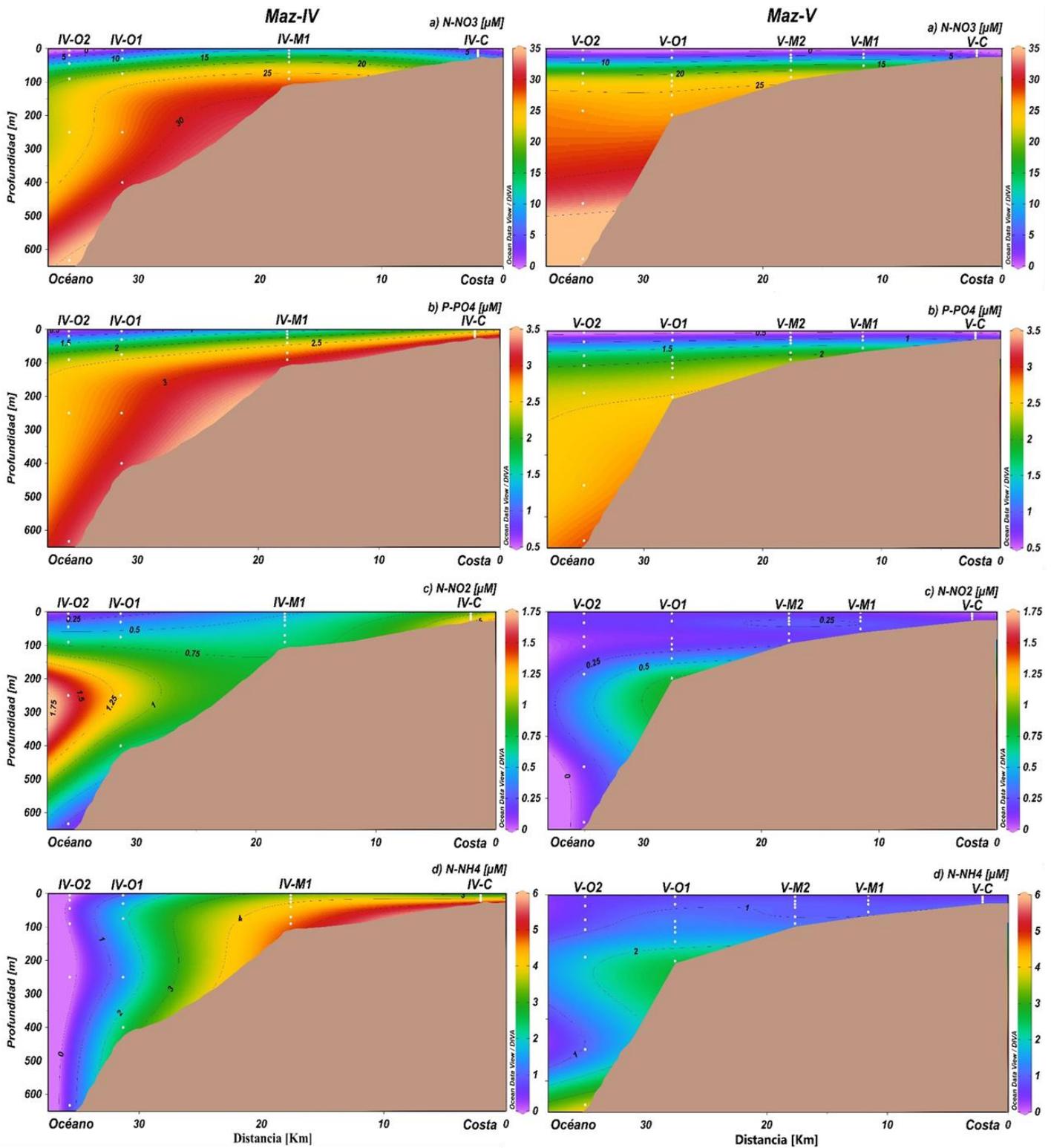


Figura 8. Secciones verticales de la concentración de nutrientes (μM) durante La Niña (Maz-IV, paneles de la izquierda) y El Niño (Maz-V, paneles de la derecha): a) N-NO_3^- , b) P-PO_4^{3-} , c) N-NO_2^- , d) N-NH_4^+ . Abreviaturas: C: costera, M1: intermedia 1, M2: intermedia 2, O1: oceánica 1, O2: oceánica 2. El eje horizontal indica la distancia de la costa hacia el océano

(Km), mientras que el eje vertical izquierdo indica la profundidad de la columna de agua (m) y el eje vertical derecho el rango de concentración de cada parámetro.

6.5 Características físico-químicas y nutrimentales de los sedimentos durante El Niño

El pH en los sedimentos superficiales en el evento de El Niño (cruce Maz-V) disminuyó desde la estación más costera (7.95) a la más oceánica (7.5) (**Figura 9a**). Por otra parte, el C orgánico en sedimentos siguió un patrón inverso al pH, con una mayor concentración en la estación más oceánica (7.2% en V-SO2) y menor en la estación costera (0.86% en V-SC) (**Figura 9b**).

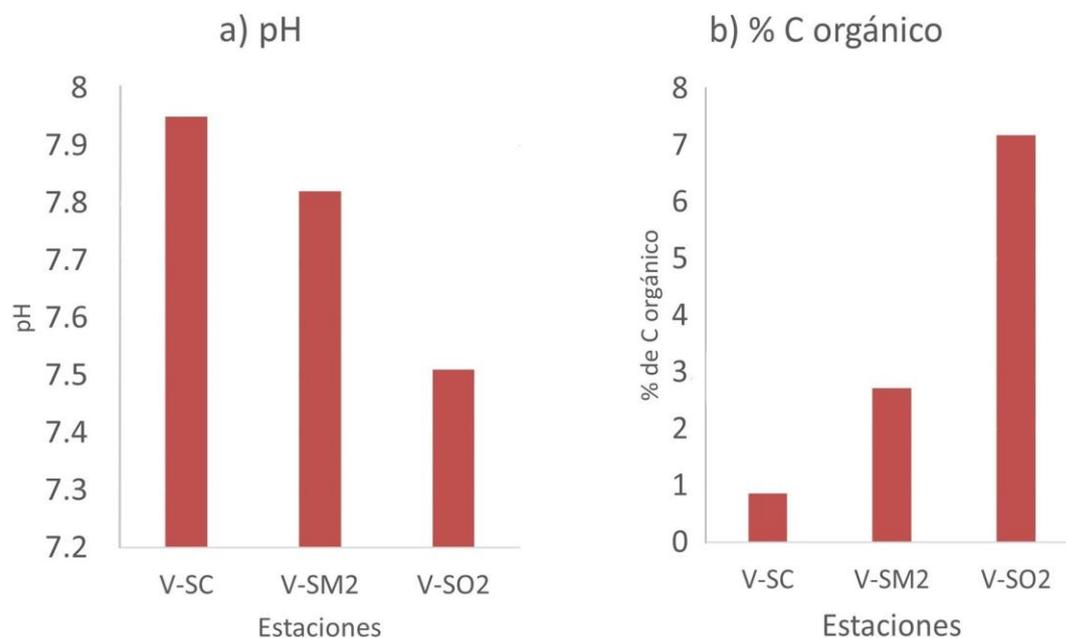


Figura 9. Parámetros físico-químicos de los sedimentos durante El Niño (Maz-V). a) pH, b) % C orgánico. Abreviaturas: V: Maz-V, SC: sedimento costero, SM2: sedimento intermedio 2, SO2: sedimento oceánico 2.

La concentración de NO_3^- en los sedimentos durante El Niño fue mayor en la estación intermedia, seguida de la estación oceánica y costera. La concentración de NO_2^- fue menor en la estación oceánica y mayor en la estación intermedia (**Figura 10a**). Por otra parte, el NH_4^+ fue mayor en la estación intermedia y oceánica, mientras que el PO_4^{3-} disminuyó de la estación oceánica a la costera (**Figura 10b**).

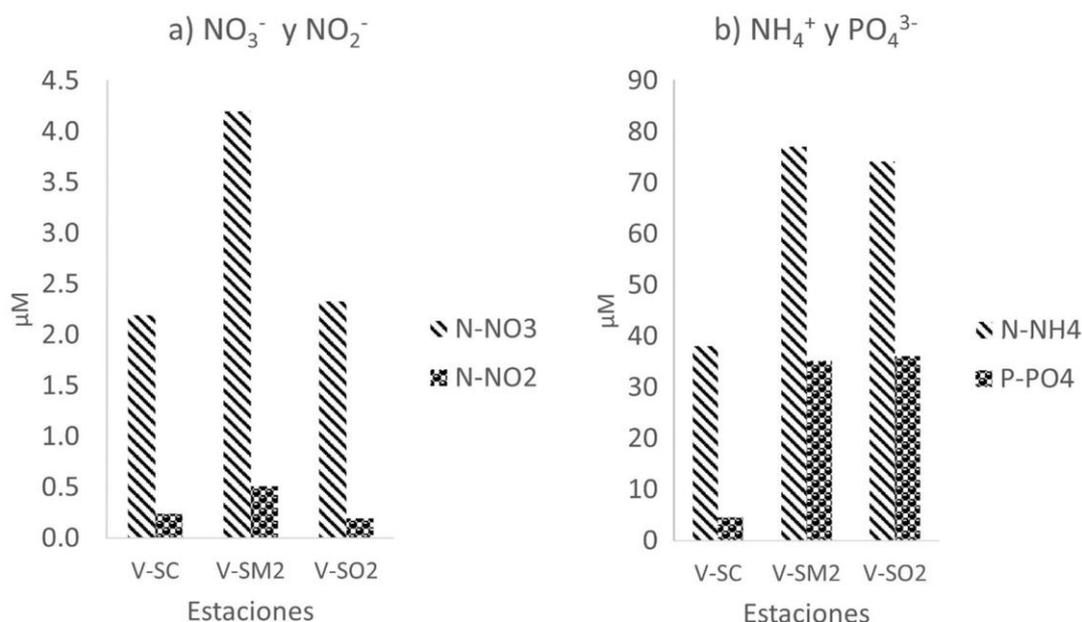


Figura 10. Concentración de nutrientes en los sedimentos durante El Niño (cruce Maz-V). a) NO₃⁻ y NO₂⁻, b) NH₄⁺ y PO₄³⁻. Abreviaturas: V: Maz-V, SC: sedimento costero, SM2: sedimento intermedio 2, SO2: sedimento oceánico 2.

6.6 Amplificación y secuenciación del gen *nirS* en las muestras

Se logró amplificar el gen *nirS* en todas las muestras de agua y sedimento de ambos cruceros (**Tabla S2**), lo que demuestra la presencia de microorganismos que poseen el gen desnitrificante *nirS* a lo largo de la columna de agua y en los sedimentos superficiales en todas las estaciones del transecto y en ambos cruceros.

Sin embargo, sólo se obtuvo suficiente producto de PCR purificado del gen *nirS* para secuenciación de 12 muestras (cinco de agua de fondo y siete de sedimento): Se pudieron secuenciar tres muestras del agua del fondo (IV-C, IV-O1 y IV-O2) y cuatro de sedimento (IV-C, IV-M1, IV-O1 y IV-O2) de La Niña, así como dos muestras de agua de fondo (V-M y V-O2) y tres de sedimento (V-C, V-M2 y V-O2) de El Niño.

Se obtuvo un total de 1,682,288 secuencias del gen *nirS* en las 12 muestras (**Figura S2**). Una vez filtradas y normalizadas a 24,990 secuencias por muestra, se obtuvo un total de 6,181 ASV, siendo la muestra V-C de sedimento la que tuvo un mayor número de ASVs (1050 ASVs), y la muestra IV-O1 del agua el menor (262 ASVs) (**Figura S3**).

6.7 Asignación de secuencias, filogenia y distribución de la comunidad *nirS*

De las 6,181 ASV obtenidas del gen *nirS* en este estudio, 2,578 ASV se asociaron a 117 clonas conocidas que se distribuyeron tanto en agua como en sedimento, de las cuales 12 asignaciones tuvieron una abundancia mayor al 0.5% del total de las secuencias *nirS* (**Figura 11, Tabla S3**). En cuanto a los ambientes, las secuencias *nirS* en los sedimentos se asociaron a 108 clonas conocidas y en el agua de fondo se asociaron a 78 clonas conocidas. Las 3,603 ASV no asignadas representaron el 54% de la abundancia relativa de las secuencias totales. Además, el 26% de las secuencias (1,454 ASV) fueron asignadas a la clona AB261494, aislada de sedimentos costeros de Japón (Nakano *et al.*, 2008), que fue la más abundante en todas las muestras durante los dos eventos ENSO.

En los sedimentos (**Figura 11, Tabla S3**), la segunda asignación más abundante fue la clona KP723717, aislada de los sedimentos del Mar de Amundsen en la Antártida (Choi *et al.*, 2015), que tuvo un rango de abundancia de 0.23-7.2% de las secuencias *nirS* en dicho ambiente (50 ASV). Esta asignación fue más abundante en los sedimentos costeros (4.2% en IV-C y 2.5% en V-C) e intermedios (7.2% en IV-M1 y 4.5% en V-M2) en ambos eventos ENSO. La tercera asignación más abundante encontrada fue la clona MF093501, aislada de sedimentos del Mar de China Meridional (Yu *et al.*, 2018), con una abundancia entre 0.53 y 5.2% de las secuencias *nirS* en estos sedimentos (89 ASV), dominando en la estación más oceánica durante El Niño. La siguiente asignación más abundante fue la clona GQ443968, aislada de sedimentos del Mar de China Meridional (Li *et al.*, 2013), que tuvo una abundancia entre 0.26 y 3.9% de las secuencias *nirS* en este ambiente (113 ASV), siendo más abundante en la estación intermedia (3.9% en V-M2) y en las estaciones oceánicas (3.5% en IV-O1, 3.2% en IV-O2 y 2.3% en V-O2). Otras asignaciones abundantes en sedimentos fueron las asociadas a la clona KP723711 (0.44-2.6%, principalmente en las estaciones intermedias y oceánicas), aislada de sedimentos del Mar de Amundsen en la Antártida (Choi *et al.*, 2015), las clonas AprY5BF79 (0.18-2.5%) y LC65.218.2 (0.32-2%) aisladas de sedimentos (Zheng *et al.*, 2015) y agua (Zhang *et al.*, 2014) del estuario Yangtzé en China, las clonas KP959682 (0.08-3.7%, predominando en los sedimentos costeros durante La Niña), KP959649 (0.1-2.6%, principalmente en las estaciones oceánicas O1 y O2 durante La Niña), KP959667 (0.14-2.7%) y KP959663 (0.12-1.4%), aisladas de sedimentos del Mar del Norte en el Atlántico (Fan *et al.*, 2015), y la clona KX389011 (0.1-1.6%), aislada de fuentes de hidrocarburo (Bae *et al.*, 2018).

En el agua de fondo (**Figura 11, Tabla S3**), la segunda asignación más abundante fue la clona GQ443968 (0.15-10.4% de las secuencias *nirS* y 146 ASV en este ambiente), la cual aumentó desde la costa (0.15% en IV-C) al océano (6% en IV-O2 y 10.4% en V-O2). Otras asignaciones abundantes fueron las asociadas a las clonas KP959663 (0.01-5.3% y 13 ASV, predominando en la estación oceánica IV-O1, seguida de la intermedia V-M2), KP723717 (0.42-3.9% y 65 ASV, principalmente en las estaciones costera IV-C e intermedia V-M2), MF093501 (0.28-2.7% y 110 ASV, predominando en las estaciones más oceánicas IV-O2 y V-O2) y KP723711 (0.05-2% y 41 ASV, siendo más abundante en la estación intermedia V-M2). Finalmente, otras asignaciones representativas en este ambiente fueron las asociadas a las clonas AprY5BF79 (0.19-1.5%), KP959667 (0.01-1.1%), KP959682 (0.06-1%), LC65.218.2 (0.01-0.7%), KP959649 (0.16-0.31%) y KX389011 (0.15-0.39%).

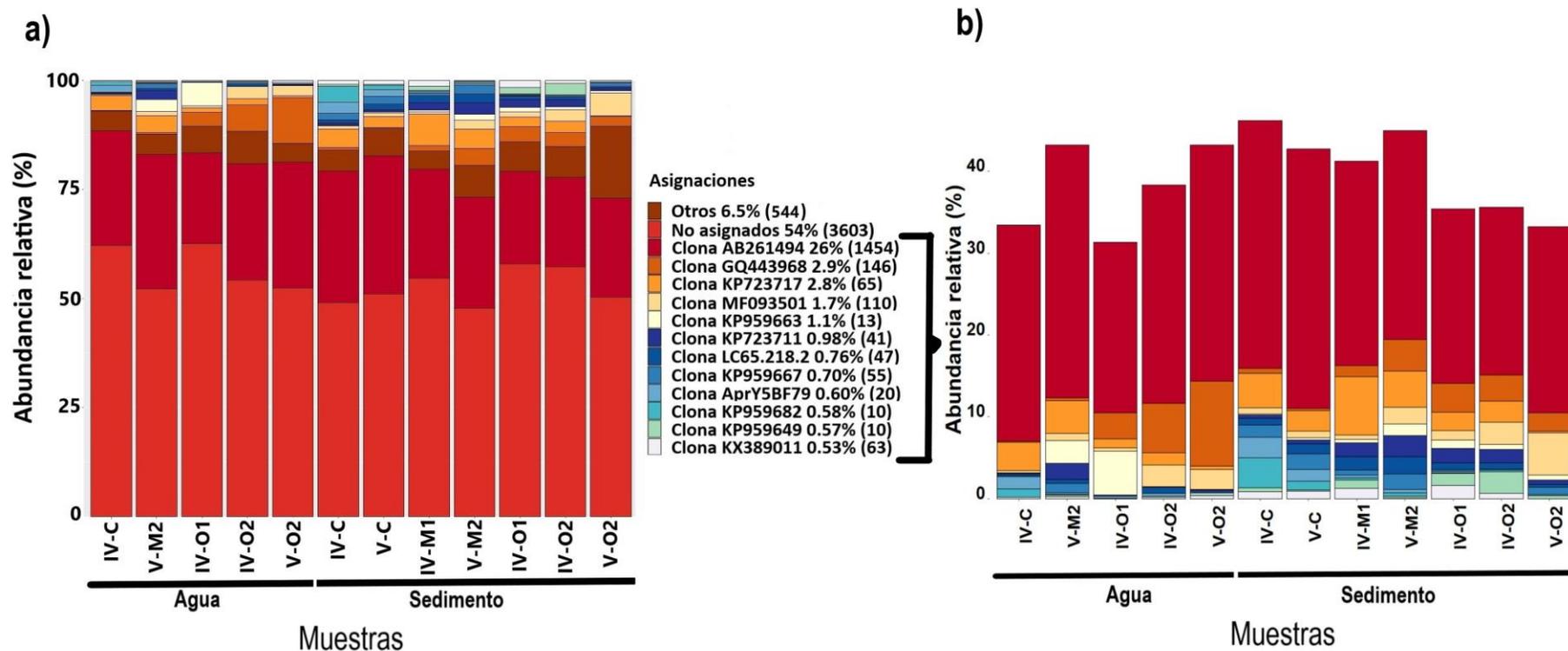


Figura 11. a) Abundancia relativa de las asignaciones obtenidas del gen *nirS* en las 12 muestras agrupadas por ambiente. b) Abundancia relativa de las 12 asignaciones del gen *nirS* asociadas a las clonas más abundantes. A lado de la clona asignada se muestra el porcentaje y entre paréntesis el número de ASV pertenecientes a dicha asignación. “Otros” hacen referencia a 105 asignaciones con una abundancia menor a 0.5% del total de las secuencias. Abreviaturas: IV: Maz-IV (La Niña), V: Maz-V (El Niño), C: costera, M1: intermedia 1, M2: intermedia 2, O1: oceánica 1, O2: oceánica 2.

El árbol filogenético se construyó con un total de 70 ASV (cinco ASV representantes de las 12 asignaciones más abundantes) y 15 secuencias de referencia del gen *nirS* obtenidas del NCBI (**Figura 12, Tabla S3**). Las ASV del gen *nirS* obtenidas de esta ZMO fueron agrupadas en cuatro clústeres (I, II, IV y VII).

El clúster I agrupó 18 ASV, de las cuales cinco fueron exclusivas del agua, dos de sedimento y 11 fueron más abundantes en el sedimento que en el agua. Este clúster se conformó por ocho secuencias de referencia pertenecientes a ZMO en la columna de agua del Mar Árabe, Mar Negro y el ETSP (V4003E, BO1067 y AC10017, respectivamente), así como de sedimentos del ETNP en Washington y el Pacífico mexicano (AJ248403, AJ248402 y M305059), y una cepa bacteriana (AY078272).

El clúster II agrupó 38 ASV y una sola secuencia de referencia (*Gammaproteobacterium* C10), por lo que este clúster podría representar ASV desconocidas de desnitrificantes para esta ZMO. Este clúster se dividió en cinco subclústeres: el primero por tres ASV (48, 324 y 856), el segundo por el ASV 114, el tercero por dos ASV (120 y 277), el cuarto por 16 ASV (3, 6, 14, 16, 93, 95, 116, 143, 172, 192, 207, 269, 415, 419, 482, 543) y el quinto por 17 ASV (7, 9, 10, 12, 24, 27, 44, 47, 119, 156, 166, 443, 647, 782, 799, 918 y 1456). Cabe mencionar que el clúster II presentó siete ASV principalmente del agua (3, 9, 10, 16, 324, 782, 1456), así como ocho ASV exclusivos del sedimento (95, 269, 415, 419, 482, 543, 647, 799), mientras que 23 ASV estuvieron en ambos ambientes, con mayor abundancia en sedimentos.

El clúster IV se conformó por cinco ASV (4, 5, 84, 461 y 175) y tres secuencias de referencia pertenecientes a dos cepas (*Ralsoniaeutropha* H16 y *Cupriavidus necator* H16) y una clona de sedimento del Pacífico mexicano (AY195925). Finalmente, el clúster VII estuvo conformado por dos secuencias de referencia, una de la columna de agua del Mar Árabe (AY336808) y una de sedimento del Golfo de México (DQ451283), además de ocho ASV (11, 23, 67, 86, 101, 225, 384 y 430) presentes en la mayoría de los sedimentos y con menor abundancia en muestras de agua costera. En ambos clústeres ninguna ASV fue exclusiva del agua o sedimento, pero fueron más abundantes en sedimento.

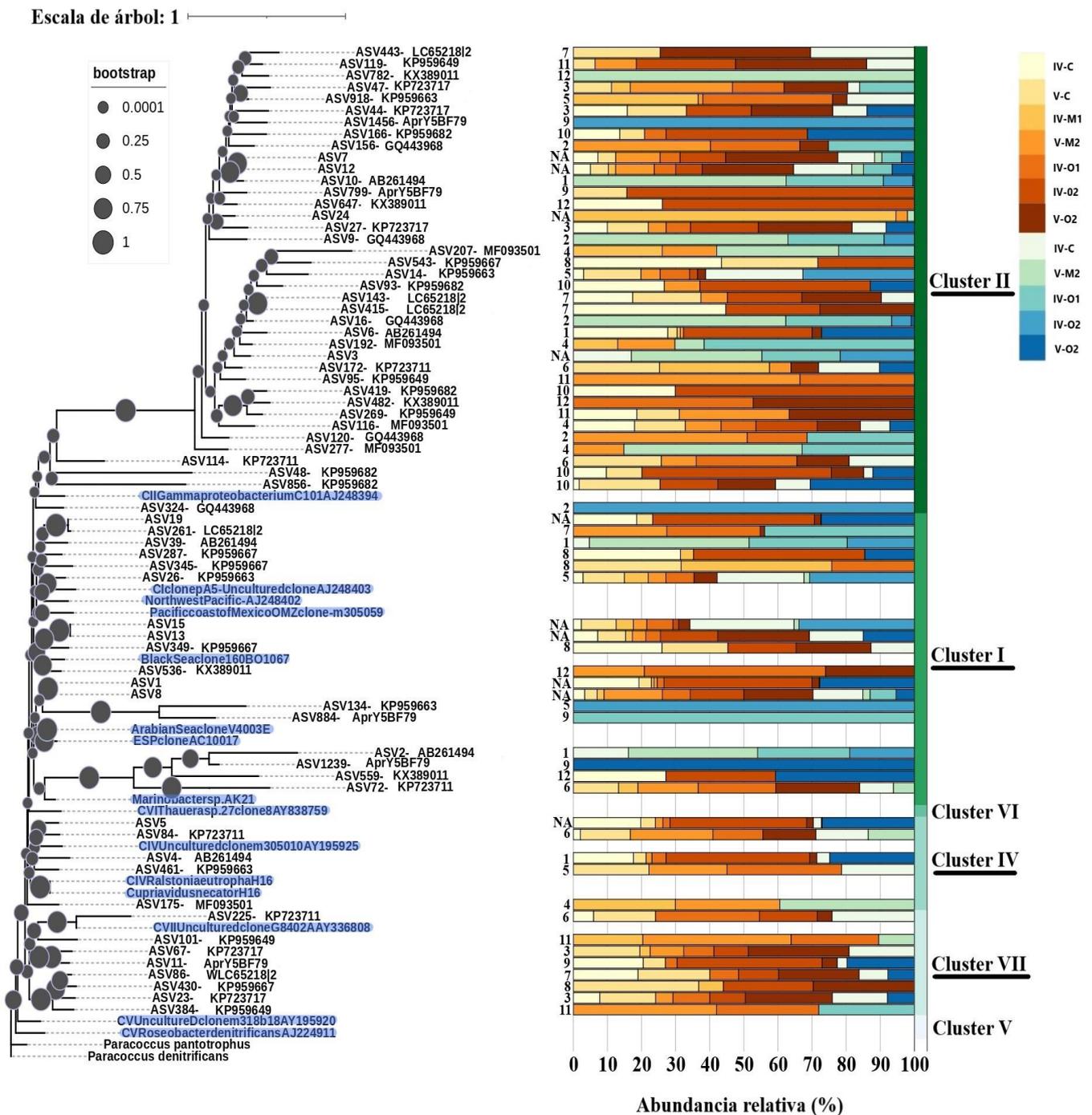


Figura 12. Árbol filogenético de las 70 ASV representantes del gen *nirS* construido con el método neighbor-joining. En azul se señalan las 15 secuencias de referencia obtenidas del NCBI. El valor del bootstrap aparece en los nodos con un círculo gris. *Paracoccus denitrificans* y *Paracoccus pantotrophus* fueron usados como outgroup. Los números a la derecha del árbol hacen referencia a las clonas asociadas en la Tabla S3, mientras que NA significa no asignado. Los colores en la gráfica de barras horizontales denotan la abundancia relativa de cada ASV en las 12 muestras. Los clústeres obtenidos en este estudio se señalan subrayados. La leyenda de colores representa los ambientes: degradado naranja (sedimentos)

y degradado azul (agua de fondo). Abreviaturas: IV: Maz-IV (La Niña), V: Maz-IV (El Niño), C: costa, M1: intermedia 1, M2: intermedia 2, O1: oceánica 1, O2: oceánica 2.

Se construyó un mapa de calor de la distribución de las 41 ASV más abundantes (con abundancia relativa individual de más del 0.25% del total de las secuencias *nirS*) (**Figura 13**). Se observaron dos grandes grupos. El primero formado con las dos muestras de agua más oceánicas (O2) de ambas fases ENSO, representado principalmente por ocho ASV (ASV23: KP723717, ASV25: NA, ASV27: KP723717, ASV29: AB261494, ASV32: NA, ASV33: NA, ASV34: AB261494 y ASV61: NA). El segundo grupo estuvo conformado por cuatro subgrupos: el primero estuvo formado por las muestras costeras de agua (IV-C) y sedimentos (IV-C y V-C), representado por cuatro ASV (ASV12: NA, ASV20: NA, ASV24: NA y ASV30: NA); el segundo lo formó una muestra de sedimento oceánico (V-O2), donde dos ASV fueron los más abundantes (ASV21: NA y ASV36: NA); el tercero se formó por las muestras de agua intermedia y oceánica (V-M2 y IV-O1), representadas principalmente por nueve ASV (ASV1: NA, ASV10: AB261494, ASV13: NA, ASV17: NA, ASV18: NA, ASV23: KP723717, ASV31: AB261494, ASV32: NA y ASV35: AB261494); finalmente, el cuarto se formó por muestras sedimentarias intermedias y oceánicas (IV-M1, V-M2, IV-O1 y IV-O2) con 24 ASV abundantes (ASV1: NA, ASV2: AB261494, ASV3: NA, ASV4: AB261494, ASV5: NA, ASV6: AB261494, ASV7: NA, ASV8: NA, ASV9: GQ443968, ASV10: AB261494, ASV11: AprY5BF79, ASV14: KP959663, ASV15: NA, ASV16: GQ443968, ASV17: NA, ASV18: NA, ASV19: NA, ASV22: NA, ASV26: KP959663, ASV28: NA, ASV39: AB261494, ASV42: NA, ASV49: AB261494 y ASV51: NA).

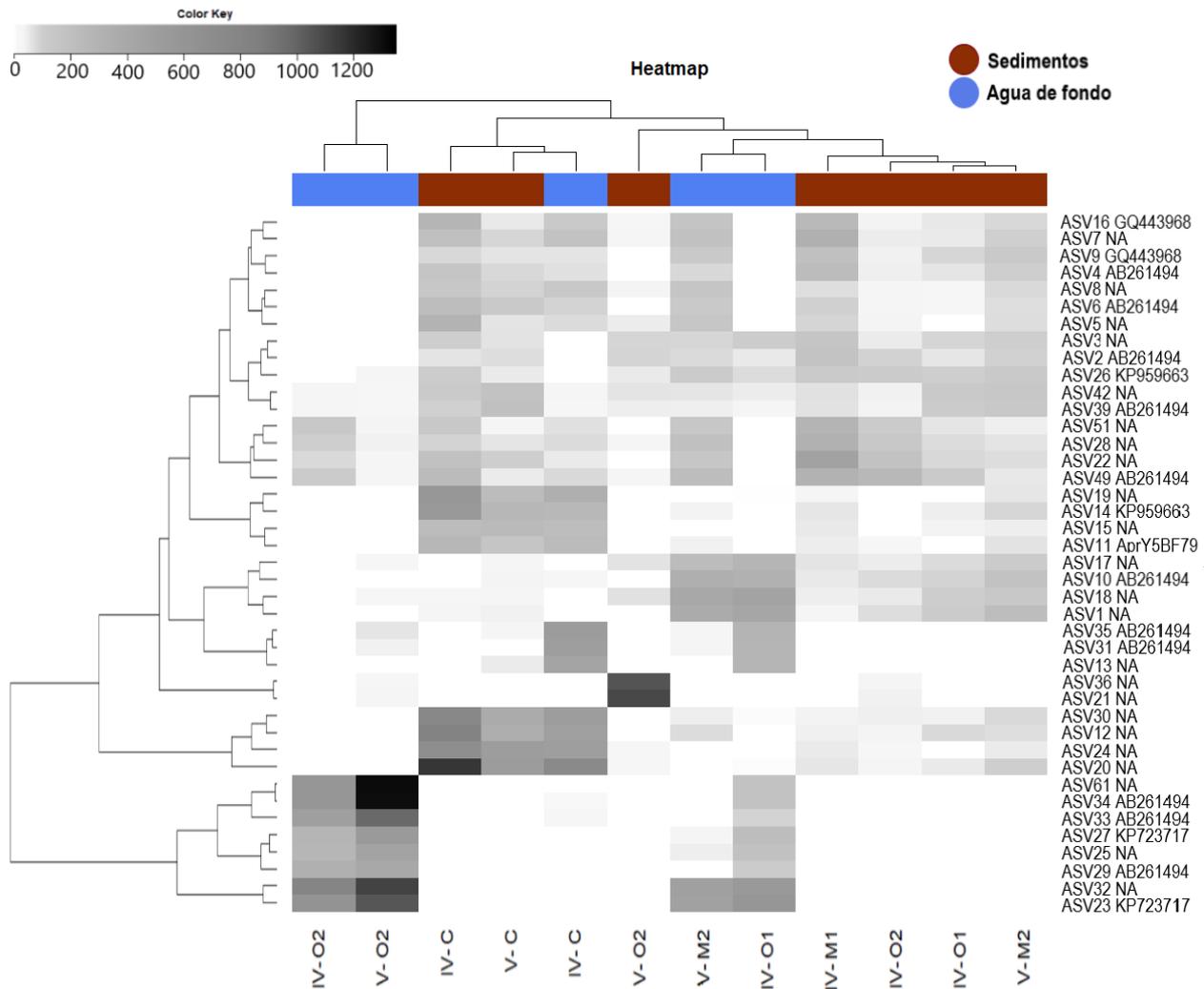


Figura 13. Mapa de calor de la distribución de las 41 AVS más abundantes que contribuyen más del 0.25 % del total de las secuencias *nirS*. El gradiente de grises refleja en número de secuencias de cada ASV en cada muestra: blanco (0-10), gris96 (11-100), gris70 (101-500), gris50 (501,1000), negro (1001-1350). Las filas indican las ASV con sus respectivas asignaciones (NA: No Asignada) y las columnas las 12 muestras. Etiquetas IV o V: Maz-IV (La Niña) o Maz-V (El Niño), C: costa, M1: intermedia 1, M2: intermedia 2, O1: oceánica 1, O2: oceánica 2.

6.8 Diversidad alfa

En general, los índices de Chao1 y Shannon señalaron que las muestras de sedimentos en ambos eventos ENSO presentaron mayor abundancia y diversidad, respectivamente, que las de agua de fondo (**Figura 14a y 14b**). El índice de Simpson indicó que las muestras de agua de fondo tuvieron mayor dominancia que los sedimentos durante La Niña (**Figura 14c**).

Finalmente, el índice de Faith mostró que las muestras de sedimento fueron filogenéticamente más diversas que las muestras de agua durante La Niña (**Figura 14d**).

En particular, los sedimentos tuvieron una diversidad prácticamente similar en ambas fases ENSO (**Figura 14a, 14b, 14c**), mientras que el agua durante el evento de El Niño tuvo mayor diversidad que en La Niña (**Figura 14a, 14d**).

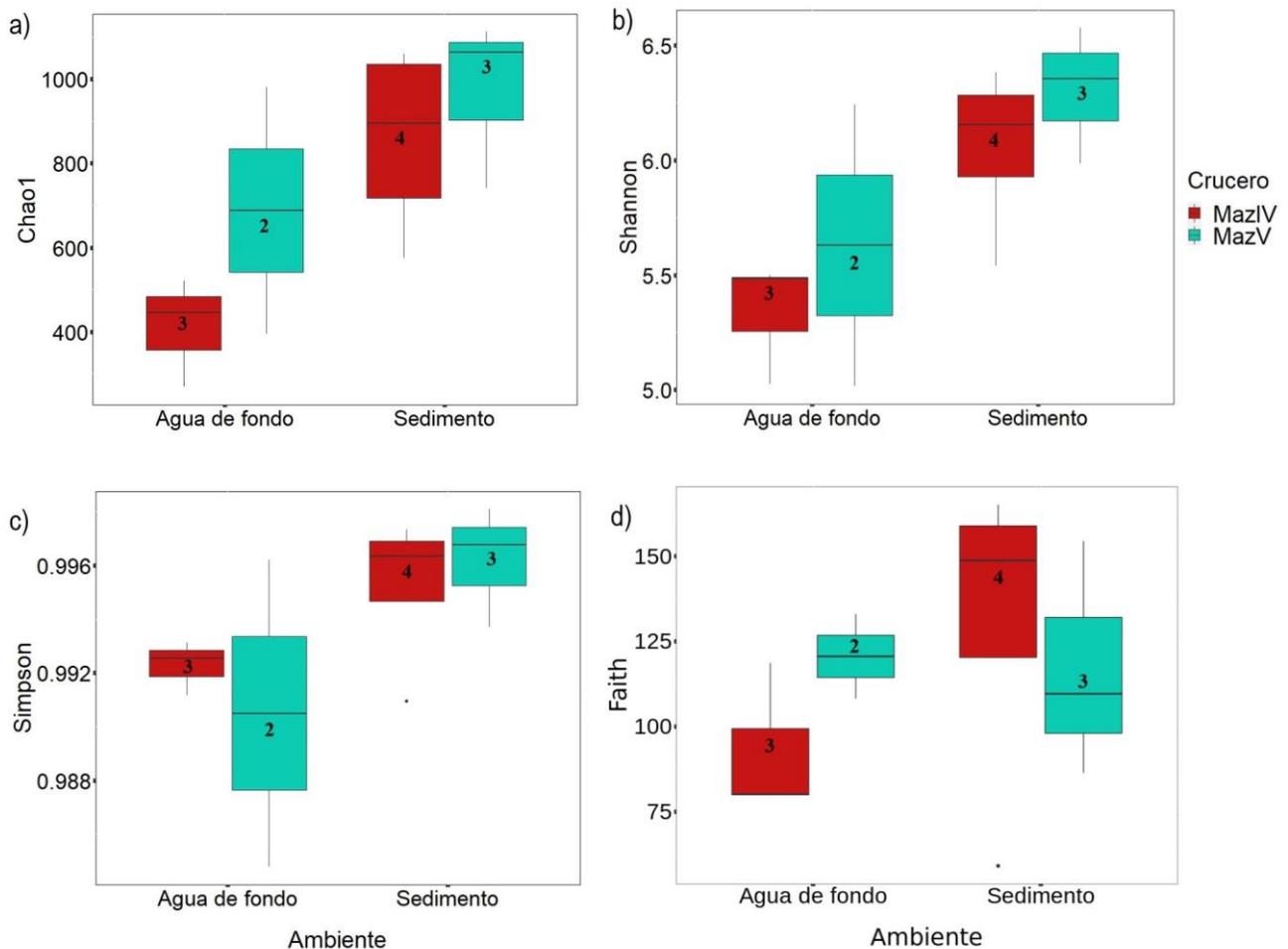


Figura 14. Diagrama de caja y bigotes de diferentes índices de diversidad alfa de la comunidad *nirS* por ambiente y fase ENSO (La Niña en Maz-IV y El Niño en Maz-V). Cada caja indica el número de muestras por las que se compone.

Por otro lado, en el sedimento, el índice de Chao1 indicó que la muestra más oceánica en La Niña (IV-O2) fue más abundante que en El Niño (V-O2), mientras que la costera fue más abundante en El Niño (V-C) que en La Niña (IV-C) (**Figura S5a**). El índice de Simpson mostró que las muestras costera e intermedia en La Niña (IV-C, IV-M1) presentaron mayor dominancia que durante El Niño (V-C, V-M2) (**Figura S5c**). El índice de Faith indicó que la

muestra costera en La Niña (IV-C) presentó menor diversidad filogenética que en El Niño (V-C), mientras que la intermedia (V-M2) y más oceánica (V-O2) en El Niño presentaron menor diversidad filogenética que en La Niña (IV-M1, IV-O2) (**Figura S5d**).

En agua de fondo, el índice de Shannon indicó que la muestra intermedia en El Niño (V-M2) fue la más diversa de todas, mientras que la más oceánica fue más diversa en La Niña (IV-O2) que en El Niño (V-O2) (**Figura S5b**). Asimismo, el índice de Simpson señaló que la más oceánica tuvo mayor dominancia en El Niño (V-O2) que en La Niña (IV-O2) (**Figura S5c**). Finalmente, en el índice de Faith (**Figura S5d**) la menor diversidad filogenética se encontró en la costera y oceánica durante La Niña (IV-C y IV-O1), mientras que la mayor diversidad filogenética se observó en la intermedia en El Niño (V-M2).

6.9 Diversidad beta

La comunidad *nirS* se distribuyó en cuatro grupos principales en el NMDS de Bray-Curtis: 1) muestras costeras de agua y sedimento, 2) intermedias de agua y sedimento, 3) oceánicas de sedimento y 4) oceánicas de agua; con un valor de significancia $p < 0.05$ y $r^2=0.85$ en la prueba de ANOSIM (**Figura 15**). En particular, en el clúster costero la comunidad en las muestras de sedimento durante ambas fases ENSO (IV-C y V-C) fue más similar, mientras que la muestra de agua costera (IV-C) se separó de estas muestras de sedimento. De la misma manera, en el clúster intermedio la comunidad de los sedimentos en ambas fases ENSO (IV-M1 y V-M2) estuvo más agrupada, mientras que la comunidad del agua intermedia (V-M2) estuvo más separada del sedimento. Por otro lado, la comunidad del clúster de los sedimentos oceánicos presentó diferencia en ambas fases ENSO, con la muestra V-O2 más alejada de los sedimentos en La Niña (IV-O1, IV-O2). Finalmente, la comunidad del clúster de agua oceánica no presentó diferencias claras entre ambas fases ENSO.

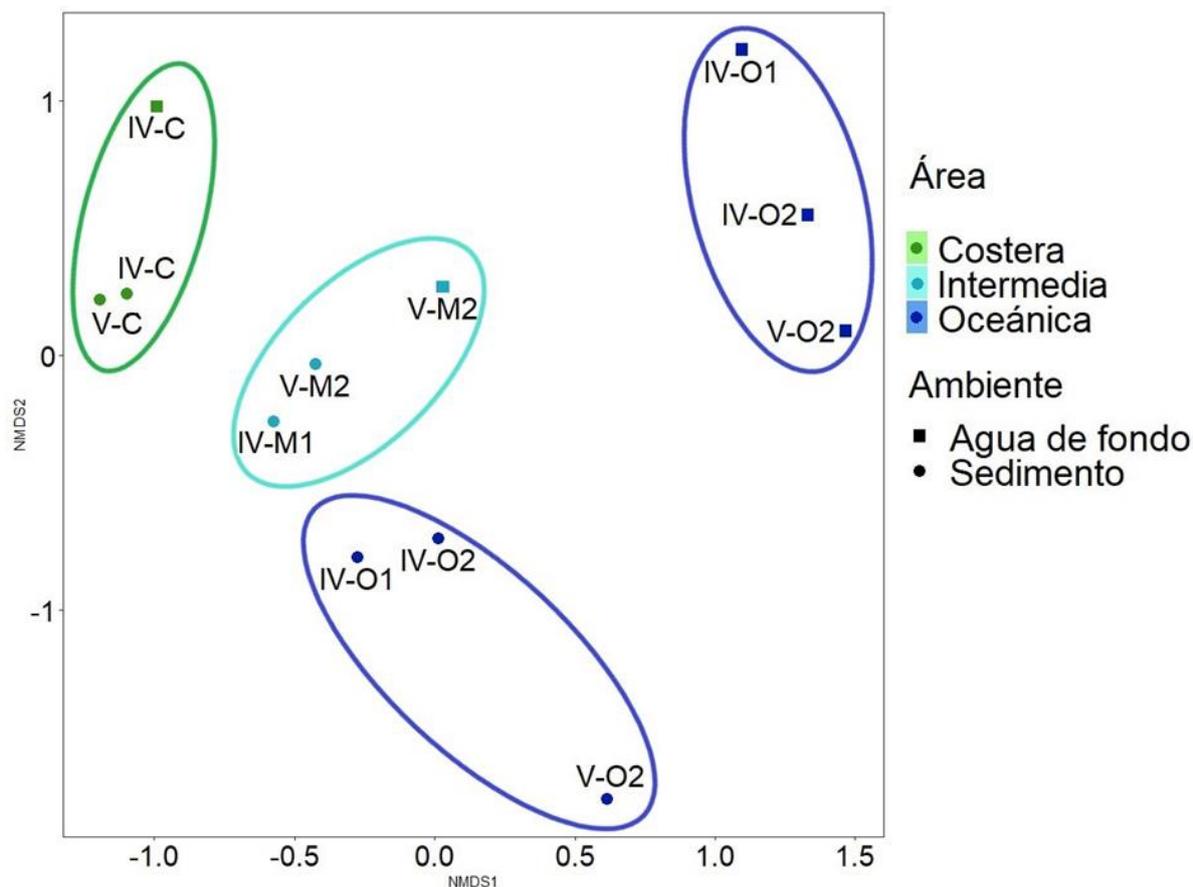


Figura 15. Gráfica de NMDS de las muestras a lo largo del transecto en las dos fases ENSO basada en el índice de disimilitud de Bray-Curtis de las ASV (stress = 0.075, $p < 0.05$ en ANOSIM). La forma de los símbolos indica el ambiente, mientras que el color indica la estación de muestreo. Abreviaturas: IV: Maz-IV (La Niña), V: Maz-V (El Niño), C: costa, M1: intermedia 1, M2: intermedia 2, O1: oceánica 1, O2: oceánica 2.

El análisis de correspondencia canónica (CCA) en las muestras de agua de fondo de las dos fases ENSO y en los sedimentos de El Niño (no se incluyeron las muestras de sedimentos de La Niña por ausencia de variables fisicoquímicas) evaluó la influencia de las principales variables ambientales sobre la distribución de la comunidad *nirS* (**Figura S6 y Tabla S4**). Los grupos obtenidos fueron cuatro: el primero se compuso por la estación costera con dos muestras, una de agua (IV-C) y otra de sedimento (V-C); el segundo agrupó estaciones oceánicas de agua (IV-O1, IV-O2 y V-O2); el tercero se compuso por la estación intermedia con dos muestras, una de agua (V-M2) y otra de sedimento (V-M2); finalmente, el cuarto grupo se conformó por una muestra de sedimento oceánico (V-O2). Las comunidades relacionadas positivamente con el NO_3^- fueron las pertenecientes a las muestras del agua de fondo de las estaciones oceánicas en ambas fases ENSO (IV-O1, IV-O2 y V-O2), donde el

NO_3^- presentó mayor concentración (**Figura 8**). Por otro lado, las comunidades del agua y sedimento costero (IV-C y V-C) estuvieron relacionadas positivamente con el NO_2^- y negativamente con el NO_3^- . Por último, la disponibilidad de PO_4^{3-} se relacionó positivamente con la comunidad del sedimento más oceánico en El Niño y en menor medida con las muestras intermedias del agua de fondo y sedimento de El Niño.

Las pruebas de Mantel realizadas con las muestras de sedimento de El Niño y de agua de fondo de ambas fases ENSO no resultaron significativas, indicando que la variación de la comunidad no estuvo significativamente relacionada con la distancia.

6.10 AVS compartidos y únicos

En el diagrama UpSet se observó un gran número de ASV únicas para cada evento ENSO (**Figura 16**). Durante La Niña, a lo largo del transecto, la estación más oceánica (IV-O2) presentó el mayor número de ASV (577), compartidos entre el agua de fondo y el sedimento de dicha estación, mientras que los sedimentos de la estación intermedia IV-M1 tuvieron 518 ASV únicos. En la estación costera IV-C se observó el menor número de ASV (235) compartidos entre el agua de fondo y el sedimento de dicha estación. Por otro lado, durante El Niño, la estación intermedia (V-M2) tuvo el mayor número de ASV (673) que se compartieron únicamente entre el agua de fondo y el sedimento de esta estación, mientras que los sedimentos de la estación costera (V-C) tuvieron 667 ASV únicas. Finalmente, la estación más oceánica (V-O2) en esta fase tuvo el menor número de ASV (567) compartidos entre el agua de fondo y el sedimento de dicha estación. Por lo anterior, claramente se observa que durante El Niño hubo mayor número de ASV únicos en cada estación que durante La Niña. Por otro lado, solo 14 ASV se encontraron en todas las muestras. También se observa que las muestras de sedimentos compartieron más ASV entre ellas que con las del agua de fondo.

El diagrama de Venn muestra el porcentaje de ASV únicas y compartidas por ambiente y crucero (**Figura S7**). Este diagrama reflejó un gran porcentaje de ASV únicas por cada ambiente y crucero, por lo que la comunidad *nirS* a nivel de ASV fue muy diferente entre ambientes y cruceros. Por otro lado, la comunidad en las muestras de sedimentos de ambos cruceros compartió un mayor número de ASV entre ellas con respecto a la comunidad del agua de fondo, lo que indicaría que los sedimentos podrían tener características ambientales más similares y/o estables que las del agua. Además, hubo 91 ASV compartidas entre ambos ambientes y cruceros que podrían tratarse de microorganismos cosmopolitas.

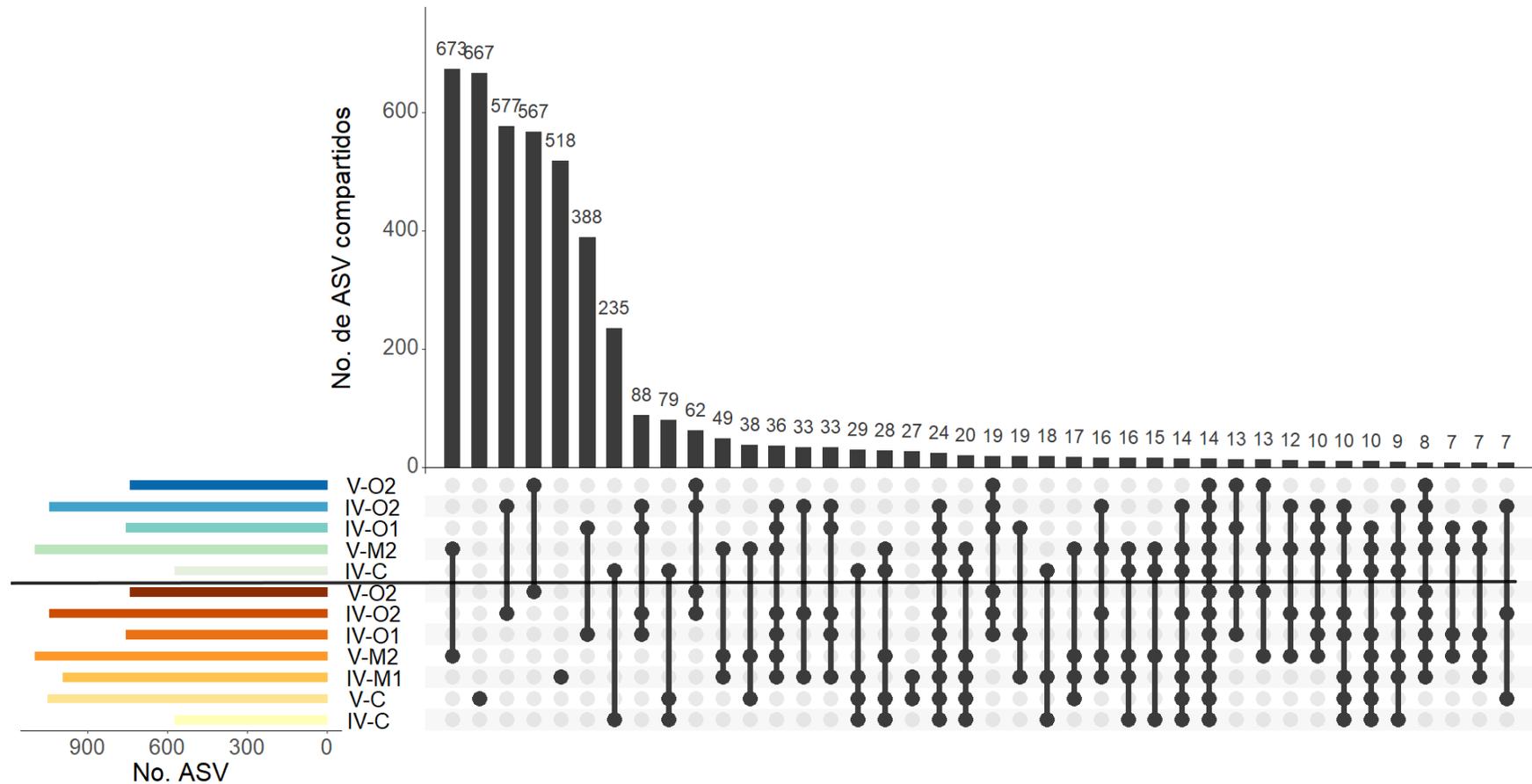


Figura 16. Diagrama UpSet. Se presenta el número total ASV de cada muestra en el diagrama de barras de colores de la izquierda. Cada posible interacción (ASV compartidas) está representada por la gráfica inferior de puntos negros y su ocurrencia (número de ASV) se muestra en la gráfica de barras superior. Las muestras de agua de fondo (degradado azul) y sedimentos (degradado naranja) están separadas por una línea horizontal. Abreviaturas: IV: Maz-IV (La Niña), V: Maz-V (El Niño), C: costera, M1: intermedia 1, M2: intermedia 2, O1: oceánica 1, O2: oceánica 2.

7 DISCUSIÓN

7.1 Condiciones oceanográficas en la ZMO del Pacífico central mexicano

El ETNP se considera una zona de transición, donde los procesos biogeoquímicos interactúan con la dinámica en la distribución temporal de las masas de agua (Portela *et al.*, 2016), que dan como resultado diferencias en las características físicas y de concentración de O₂ en la columna de agua (Karstensen *et al.*, 2008).

En el transecto de estudio dentro del ETNP se observaron diferencias oceanográficas entre ambas campañas, principalmente en la zona eufótica. Se observó una variación en la temperatura superficial oceánica, con un año frío en 2018 (La Niña) y un año más cálido en 2019 (El Niño). Dicha variación generó que durante El Niño la posición de la termoclina se encontrara a una mayor profundidad, además de presentar valores más altos de salinidad y O₂, pero una baja concentración de clorofila *a* respecto a La Niña. Además, debido a un evento débil de surgencia en El Niño la concentración de nutrientes en la zona eufótica fue baja comparada con el evento de La Niña (**Figura 8**).

En general, la circulación de masas de agua fue dominada por la masa TrW en zonas superficiales costeras, resultante de la posible mezcla por surgencia de la masa StSsW cálida con la masa GCW superficial, que se caracteriza por tener alta salinidad, baja concentración de nutrientes y, por lo general, valores relativamente altos de O₂ disuelto (Álvarez-Borrego, 2010; Portela *et al.*, 2016), lo que provocó que la GCW ampliara su distribución calentando un mayor volumen de la columna de agua en 2019. Un caso similar se observó en el 2015, cuando el fenómeno de El Niño modificó los patrones de circulación de las masas de agua en esta misma ZMO (Trucco-Pignata *et al.*, 2019).

El límite superior de la ZMO en las estaciones oceánicas (O1 y O2) en ambas fases ENSO coincidió con lo reportado para el ETNP (Maske *et al.*, 2010; Pajares *et al.*, 2020). Mientras que un cambio importante fue observado en la costa durante El Niño, puesto que no hubo ZMO, comparado con la estación costera durante La Niña, la cual coincidió con la presencia de aguas subóxicas (< 10 μM O₂) a partir de los 17 m de profundidad.

En el presente estudio se encontró la mayor concentración de NO₃⁻ y PO₄³⁻ en el agua de fondo de las estaciones oceánicas en ambas fases ENSO, lo cual es consistente con el patrón normal de la distribución de estos nutrientes en ZMO (Levitus *et al.*, 1993; Bustos-Serrano & Castro-Valdez, 2006; Graco *et al.*, 2007; Pajares *et al.*, 2019). Sin embargo, en la zona costera en La Niña se presentó mayor concentración de nutrientes en la columna de agua que en El Niño, la cual tuvo valores altos de salinidad y baja concentración de nutrientes,

probablemente por la influencia de El Niño (Santamaria-del-Angel *et al.*, 1994). La mayor concentración de NO_2^- se observó en el núcleo de la ZMO en las estaciones oceánicas de ambas fases ENSO y los valores están dentro del rango reportado por otros autores en el núcleo de la ZMO en el ETNP (Horak *et al.*, 2016; Pajares *et al.*, 2019). Por otra parte, durante El Niño la mayor concentración del NH_4^+ se observó en el fondo de las estaciones oceánicas, contrario al patrón observado en La Niña, con los valores más altos en el fondo de las estaciones costera e intermedias.

Por lo tanto, la distribución de las variables ambientales en el agua de fondo a lo largo del transecto no presentó diferencias significativas en ambos cruceros, pero sí se observó que la concentración de nutrientes fue mayor durante La Niña que durante El Niño.

Finalmente, el C orgánico aumentó de costa a océano en los sedimentos durante el evento de El Niño, similar a lo reportado por Liu *et al.* (2003) en esta misma ZMO. Además, los sedimentos intermedios y oceánicos en El Niño presentaron mayor concentración de NH_4^+ , NO_2^- y PO_4^{3-} que, en el agua de fondo, probablemente debido a procesos de nitrificación y desnitrificación acopladas y amonificación (Zhang *et al.*, 2014), mientras que el NO_3^- fue mayor en el agua de fondo de la estación oceánica de este mismo crucero, similar a lo reportado en el fondo del Mar Báltico por Falk *et al.* (2007).

7.2 Influencia del O_2 en la distribución de la comunidad *nirS*

Se comprobó la presencia del gen *nirS* en todas las profundidades muestreadas en la columna de agua (desde la superficie saturada en O_2 hasta el fondo subóxico/anóxico) y en el sedimento anóxico de ambas fases ENSO (**Tabla S2**). Sin embargo, solo se obtuvo suficiente producto de PCR purificado para la secuenciación de las muestras de agua de fondo y sedimento. Esto concuerda con los estudios realizados en el Mar Negro y el ETSP (Chile) donde reportaron mejores amplificaciones en sedimento y agua de fondo (Oakley *et al.*, 2007; y Ganesh *et al.*, 2014), debido a que los microorganismos desnitrificantes se desarrollan mejor bajo condiciones subóxicas ($< 10 \mu\text{M}$) y anóxicas ($< 1 \mu\text{M}$) (Ronner & Sorensson, 1985; Lefebvre *et al.*, 2006; Kirkpatrick *et al.*, 2006).

Diversos estudios siguieron que los primers utilizados en esta investigación para analizar el gen *nirS* (*nirScd3aF/nirSR3cd*) no amplifican con la misma eficiencia a diferentes profundidades en una columna de agua ni entre ambientes (Wei *et al.*, 2015; Bonilla-Rosso *et al.*, 2016; Murdock & Juniper, 2017) y que las condiciones de termociclaje pueden variar

dependiendo de la distribución de las comunidades, lo que refleja una dependencia ambiental que dificulta la amplificación bajo condiciones estandarizadas de termociclaje (Castro-Gonzales *et al.*, 2018; Murdock & Juniper, 2017). Por lo tanto, la diferencia de amplificación del gen *nirS* entre las muestras en la columna de agua en este estudio se atribuye, en parte, a la selección de los primers y a las condiciones de termociclaje utilizadas. Para futuras investigaciones, se requiere buscar otros primers y condiciones de termociclaje y que permitan la amplificación óptima del gen *nirS* en las muestras del resto de la columna de agua para su posterior secuenciación.

Los microorganismos que poseen el gen *nirS* suelen tener una amplia distribución en ambientes marinos (ej., Ward *et al.*, 2009; Kim *et al.*, 2011; Li *et al.*, 2013; Lee & Francis, 2017a; Castro-Gonzales *et al.*, 2018), lo que podría explicar la presencia de este gen (confirmado por PCR) en la zona eufótica (superficie y máximo profundo de clorofila) y la base de la oxiclina (donde la concentración de O₂ fue entre 5 y 10 μM) en ambos eventos climáticos. No obstante, la presencia de estos microorganismos no es indicativo de su actividad desnitrificante (Dalsgaard *et al.*, 2014), pero sugiere que pudieran estar presentes y activos a estas profundidades (ej., dentro de partículas, que funcionan como una fuente de C orgánico y N inorgánico) (Ganesh *et al.*, 2014; Zhang *et al.*, 2014). Aunque con los pocos datos con los que se cuentan hasta ahora es prematuro establecer que el O₂ influye en la distribución de los desnitrificantes *nirS* en esta ZMO.

La distribución de las comunidades desnitrificantes portadoras del gen *nirS* en las ZMO, tanto en agua como en sedimentos, ha sido explorada en distintas regiones oceánicas, como en el ETNP en Washington (Braker *et al.*, 2000) y el Pacífico central mexicano (Liu *et al.*, 2003), el ETSP en Chile (Castro-Gonzales *et al.*, 2005), el Mar Árabe (Jayakumar *et al.*, 2004) y el Mar Báltico (Hannig *et al.*, 2006). Estos estudios han evaluado la diversidad de los desnitrificantes en unidades taxonómicas operacionales (OTUs por sus siglas en inglés) a partir de librería de clonas y por restricción de fragmentos polimórficos largos por fluorescencia (T-RFLP). Sin embargo, hasta el momento existen pocos trabajos de estas comunidades a través de secuenciación masiva en ambientes marinos (Lee & Francis, 2017b; Cheng *et al.*, 2020) y ninguno en ZMO. Lee & Francis (2017b) hicieron una comparación de dos métodos (librería de clonas y secuenciación masiva) en sedimentos de la bahía de San Francisco (USA) y determinaron que la secuenciación masiva es más precisa para estudiar la composición y estructura de los desnitrificantes *nirS*.

Este estudio es uno de los primeros en analizar la distribución del gen *nirS* a través de secuenciación masiva y presentar los resultados en ASV (que hace referencia a especies que

difieren en un solo nucleótido). Por lo tanto, la comparación de los resultados obtenidos aquí con otros estudios en donde se utilizaron otras aproximaciones moleculares (ej., OTUs, que define las especies por porcentaje de similitud en nucleótidos) debe ser cuidadosa.

7.3 Distribución de las comunidades *nirS* del agua de fondo y los sedimentos en el Pacífico central mexicano

El 54% de las secuencias *nirS* en este estudio no se asignaron a una secuencia *nirS* conocida (Figura 11), lo cual indica una gran diversidad de organismos *nirS* por descubrir, así como la necesidad de realizar estudios más robustos para determinar el rol que cumple este alto porcentaje de secuencias no asignadas en esta ZMO.

Las secuencias asignadas a la clona AB261494 tuvieron la mayor abundancia relativa en este estudio (26%), con una distribución parecida en todas las muestras en ambos eventos ENSO (**Figura 11**). A pesar de que esta clona del gen *nirS* fue aislada de sedimentos marinos con una alta concentración de nutrientes (Nakano *et al.*, 2008), su distribución en esta ZMO parece ser cosmopolita y no estar influenciada por la disponibilidad de nutrientes y las condiciones ambientales.

También hubo secuencias *nirS* asignadas a clonas (KP723717, KP723711 y KX389011) que fueron abundantes y tuvieron una distribución uniforme en el agua de fondo y en los sedimentos a lo largo del transecto. Las clonas KP723717 y KP723711 han sido relacionadas a la clase Gammaproteobacteria, que presenta una distribución cosmopolita (Kathiravan & Krishnani, 2014; Choi *et al.*, 2016; Fan *et al.*, 2015b). Sin embargo, la clona KX389011 fue aislada de sedimentos del Golfo de México asociada a fuentes de hidrocarburo (Bae *et al.*, 2018), pero las secuencias asociadas a dicha clona en esta ZMO parecen presentar una distribución cosmopolita y no estar asociadas a un determinado factor ambiental.

Por otro lado, algunas asignaciones que también fueron abundantes presentaron diferencias en su distribución a lo largo del transecto y entre ambientes, lo que podría indicar que determinados desnitrificantes *nirS* están influenciados por factores fisicoquímicos específicos de cada sitio (véase siguiente sección). Por ejemplo, en el agua de fondo hubo cuatro clonas asignadas (KP723717, KP959667, AprY5BF79 y KP959682) que fueron principalmente costeras y tres clonas (GQ443968, MF093501 y KP959649) que predominaron en muestras oceánicas. Asimismo, en los sedimentos se presentaron tres asignaciones (KP959667,

AprY5BF79 y KP959682) que fueron preferentemente costeras, así como tres asignaciones (GQ443968, MF093501 y KP959649) que predominaron en muestras oceánicas.

En el transecto, las secuencias asignadas a las clonas AprY5BF79 y KP959682 fueron más abundantes en las muestras costeras (alrededor del 2%) y menos abundantes en las oceánicas (alrededor del 0.1%). Esto es consistente con lo reportado en los estudios donde se aislaron estas clonas, en el estuario Yangtzé (Zhang *et al.*, 2014) y en la costa del Mar del Norte (Fan *et al.*, 2015b), sugiriendo que la comunidad *nirS* asociada a ambas clonas es principalmente costera también en esta ZMO. Asimismo, las secuencias asignadas a las clonas GQ443968, MF093501 y KP959649 presentaron sus mayores abundancias en las estaciones oceánicas en ambos ambientes y fases ENSO (**Figura 11**), donde se encontraron las mayores concentraciones de nutrientes (**Figuras 8 y 10**), así como de C orgánico en los sedimentos durante El Niño (**Figura 9**). Este hallazgo concuerda con lo reportado para estas clonas. Por ejemplo, la clona GQ443968 se ha relacionado con *Scalindua-nirS* (Li *et al.*, 2013, Dang *et al.*, 2010), la cual juega un papel importante en la reducción del NO_2^- en los sedimentos superficiales oceánicos, además de correlacionarse positivamente con el contenido de N inorgánico (Li *et al.*, 2013; Fan *et al.*, 2015b). La clona MF093501 fue aislada de sedimentos en el Mar de China asociada a una alta concentración de compuestos de N inorgánico y C orgánico (Yu *et al.*, 2018). Asimismo, la clona KP959649 fue aislada de sedimentos con alto contenido de C orgánico en el Mar del Norte (Fan *et al.*, 2015b).

Se observaron algunas variaciones en la comunidad *nirS* de los sitios muestreados en las dos fases ENSO. Por ejemplo, en la estación más oceánica, las secuencias asociadas a la clona KP959649 tuvieron una abundancia similar en el agua de fondo y el sedimento (0.32 y 0.35%) durante El Niño (V-O2), donde las concentraciones de NH_4^+ y NO_2^- fueron elevadas; en cambio, su abundancia fue menor en el agua de fondo (0.16%) y mayor en el sedimento (2.7%) durante La Niña (IV-O2). Sin embargo, no se dispone de datos de nutrientes ni de C orgánico del sedimento en La Niña para saber si la comunidad *nirS* asociada a esta clona respondió a la concentración de NO_2^- o C orgánico, como sugiere Fan *et al.* (2015b). Asimismo, las secuencias asociadas a las clonas KP723717, AprY5BF79 y KP959682 fueron más abundantes durante La Niña que durante El Niño en los sedimentos de la estación costera.

Por otro lado, el árbol filogenético de ASV representantes de las secuencias *nirS* de esta ZMO (**Figura 12**) mostró cuatro agrupaciones (clústeres I, II, IV y VII) de las siete sugeridas por Falk *et al.*, (2007). En general, ningún clúster fue específico a un determinado ambiente o estación a lo largo del transecto; por lo tanto, estas agrupaciones no tuvieron un patrón de

distribución en esta ZMO. Este hallazgo parece ser característico del ETNP porque se han encontrado resultados similares en la costa de Washington (Braker *et al.*, 2001) y en el Pacífico central mexicano (Liu *et al.*, 2003). Además, los clústeres I, IV y VII tuvieron secuencias *nirS* provenientes del agua y del sedimento, concordando con otros estudios en ZMO como en el ETNP (Braker *et al.*, 2000; Liu *et al.*, 2003), el ETPS (Castro-Gonzales *et al.*, 2005), el Mar Báltico (Falk *et al.*, 2007) y estuarios (Nogales *et al.*, 2002; Santoro *et al.*, 2006; Tiquia *et al.*, 2006; Dang *et al.*, 2009; Abell *et al.*, 2010; Mosier & Francis, 2010; Stauffert *et al.*, 2014). Sin embargo, dentro de estas agrupaciones filogenéticas se observaron algunas diferencias. Por ejemplo, el clúster I agrupó cinco ASV exclusivas del agua oceánica y dos ASV únicas del sedimento oceánico. En cambio, en el clúster IV no hubo ASV exclusivas de un ambiente particular, pero las ASV presentes en el agua de fondo fueron principalmente costeras. El clúster VII se conformó por ocho ASV, que fueron más abundantes en la mayoría de las muestras sedimentarias.

En cuanto al clúster II, éste estuvo conformado por una secuencia de referencia (Gammaproteobacterium C10), ocho ASV exclusivas del sedimento (seis costeros y dos oceánicos), siete ASV del agua de fondo oceánica y 23 ASV de distintas procedencias (**Figura 12**). Por lo tanto, el clúster II tampoco fue exclusivo de un ambiente o sitio particular. Sin embargo, estos resultados no son consistentes con lo que se ha observado en otros estudios, puesto que el clúster II se asocia con secuencias *nirS* obtenidas principalmente de sistemas costeros y estuarios (Nogales *et al.*, 2002; Jayakumar *et al.*, 2004; Castro-González *et al.*, 2005; Hannig *et al.*, 2006; Santoro *et al.*, 2006). Estos resultados podrían explicar porqué este clúster obtuvo el valor de bootstrap más bajo (0.0001) con la secuencia de referencia Gammaproteobacterium C10, la cual fue obtenida de sedimentos en el ETNP frente a las costas de Washington (Braker *et al.* 2000) y fue considerada una secuencia novedosa, por tener poca relación filogenética con otras secuencias. En resumen, las secuencias que conformaron el clúster II podrían ser desconocidas, por lo que hace falta más investigación en esta ZMO para el reconocimiento de nuevos organismos implicados en la desnitrificación.

Aunque el árbol filogenético no mostró grupos exclusivos de un ambiente determinado, el mapa de calor diferenció a las ASV más abundantes por estación de muestreo y tipo de ambiente (**Figura 13**). Se observó que las comunidades costeras del agua de fondo y sedimento se agruparon, probablemente porque están sometidas a la misma presión ambiental. Por otra parte, las ASV de las estaciones intermedias y oceánicas del sedimento se agruparon en el dendograma, mientras que las ASV de la muestra de agua oceánica IV-O1 y

del sedimento V-O2 se separaron del resto de las muestras, al igual que las muestras de agua de fondo más oceánicas (O2) de ambas fases ENSO, probablemente por las diferencias en las propiedades bioquímicas (disponibilidad de nutrientes, C orgánico, pH) y físicas (presión, temperatura, etc.) entre los sedimentos y el agua de fondo.

Los índices de diversidad alfa mostraron también diferencias en las comunidades *nirS* entre ambientes (**Figuras 14, S5**), siendo las comunidades del agua de fondo menos diversas que las de sedimentos, lo que concordó con estudios realizados en zonas costeras y ZMO (Braker *et al.*, 2001; Liu *et al.*, 2003; Hannig *et al.*, 2006; Falk *et al.*, 2007; Francis *et al.*, 2013), pese a que las técnicas moleculares usadas fueron diferentes. Esto sugiere que las comunidades *nirS* son más estables en los sedimentos (Hannig *et al.*, 2006; Falk *et al.*, 2007; Kim *et al.*, 2011), puesto que en este ambiente no se ven limitadas en compuestos orgánicos y nutrientes, como lo estarían las comunidades del agua (Hoshino *et al.*, 2020).

Por otra parte, se encontró un gran porcentaje de ASV específicas de cada ambiente (**Figuras 16 y S7**). Cabe señalar que los sedimentos compartieron más ASV entre ellos que las muestras de agua entre ellas, lo que sugiere una comunidad *nirS* más parecida entre las muestras de sedimento, posiblemente porque este ambiente es más estable que el agua de fondo, que está más influenciada por fenómenos oceanográficos (ej.: corrientes marinas, surgencia, etc.).

Finalmente, aunque la prueba de Mantel no resultó significativa debido al número limitado de muestras, el NMDS sugiere que la estructura de la comunidad *nirS* fue diferente a lo largo del transecto, así como entre ambientes (**Figura 15**). En particular, la estación costera en ambas fases ENSO (IV-C, V-C) presentó una estructura relativamente parecida en agua y sedimento, así como las estaciones intermedias (IV-M1 y V-M2) entre ellas. En cambio, la comunidad de las estaciones oceánicas (IV-O1, IV-O2 y V-O2) se separó completamente por ambiente, lo que sugiere que existen características químicas (ej: nutrientes, disponibilidad de C orgánico) que afectan la estructura de la comunidad *nirS* oceánica. Los estudios realizados en el ETNP del Pacífico central mexicano (Liu *et al.*, 2003) y el ETSP de Chile (Castro-Gonzales *et al.*, 2005) muestran resultados similares a lo observado en esta región, puesto que la estructura de las comunidades *nirS* fue más similar cuando las muestras fueron más cercanas. También, Scala y Kerkhof (2000) encontraron que la distancia geográfica es un factor que afecta la estructura de las comunidades desnitrificantes marinas.

7.4 Influencia de los factores ambientales en las comunidades *nirS*

En la zona de estudio se presentó el fenómeno de La Niña en 2018 (Maz-IV) y El Niño en 2019 (Maz-V), lo que promovió diferencias en las características oceanográficas en la parte superior de la columna de agua entre fases ENSO (mayor profundidad de la termoclina y menor concentración de clorofila *a* durante El Niño), afectando principalmente a la estación costera, donde la abundancia de nutrientes en la columna de agua fue mayor durante La Niña debido a una fuerte surgencia. Por lo tanto, el fenómeno climático ENSO es probablemente la causa principal de las diferencias encontradas en la diversidad alfa de la comunidad *nirS* entre los dos años de muestreo en la estación costera (mayor diversidad alfa en El Niño que en La Niña). Por otro lado, la diversidad alfa en la estación más oceánica fue mayor en La Niña que en El Niño y en los sedimentos que en el agua de fondo. Probablemente los procesos oceanográficos (surgencias, corrientes marinas, etc.) sean la causa de las diferencias encontradas en la composición, diversidad y estructura de la comunidad *nirS* entre el agua fondo y el sedimento y entre ambas fases ENSO en esta estación.

En general, se ha observado que el O₂ controla la composición microbiana y los procesos biogeoquímicos en las ZMO (Liu *et al.*, 2003; Ulloa *et al.*, 2012; Pajares *et al.*, 2019, 2020). Generalmente, los sedimentos presentan condiciones anóxicas comparado con la columna de agua de las ZMO, donde el gradiente de O₂ varía desde condiciones óxicas a subóxicas/anóxicas (Dalsgaard *et al.*, 2014). Esto explicaría que la estructura de las comunidades *nirS* sea más similar entre las muestras de sedimento que entre las de agua de fondo en cada estación (**Figura 15**).

Por otro lado, las diferencias encontradas en la estructura (diversidad beta) de las comunidades a lo largo del transecto indican que la distancia geográfica y las propiedades fisicoquímicas propias de cada estación pueden estar jugando un papel importante en la estructura de estas comunidades desnitrificantes (Braker & Tiedje, 2003; Langenheder & Ragnarsson, 2007; Steenbergh *et al.*, 2014). Por ejemplo, se ha sugerido que los nutrientes influyen en la estructura de las comunidades (Pommier *et al.*, 2007; James *et al.*, 2022), con microorganismos adaptados a baja concentración de nutrientes (regiones oceánicas), mientras que en ambientes costeros los microorganismos están adaptados a condiciones ambientales más fluctuantes y a mayor disponibilidad de nutrientes y C orgánico (Cronwell *et al.*, 2014). Por lo tanto, la estructura entre las comunidades oceánicas y costeras suele ser diferente, como sucede en este estudio, en donde la distribución de los nutrientes pudo influir en los microorganismos *nirS* a lo largo del transecto. Además, la concentración de nutrientes en el

agua durante La Niña fue mayor que durante El Niño, fenómeno que ocasionó un debilitamiento de la surgencia y, por lo tanto, una menor disponibilidad de nutrientes en la columna de agua, afectando a la diversidad y estructura de la comunidad *nirS*.

En general, la estructura de la comunidad del agua de fondo en ambas fases ENSO y los sedimentos en El Niño estuvo influenciada por la disponibilidad de NO_3^- , NO_2^- y PO_4^{3-} (**Figura S7**). En particular, la alta concentración de NO_3^- se relacionó positivamente con las comunidades de las estaciones oceánicas, mientras que el NO_2^- se relacionó positivamente con las comunidades de las estaciones costera (IV-C en agua de fondo y V-C en sedimento) e intermedia (V-M). Estos resultados concuerdan con estudios realizados en el Pacífico central mexicano (Liu *et al.*, 2003), el Golfo de México (Tiquia *et al.*, 2006), el ETSP (Castro-Gonzales *et al.*, 2005) y el Mar Negro (Dang *et al.*, 2009), donde la estructura de los desnitrificantes *nirS* estuvo influenciada positivamente por el NO_3^- y el NO_2^- . Finalmente, la disponibilidad de PO_4^{3-} se relacionó positivamente con la comunidad de las muestras del agua de fondo intermedia y del sedimento oceánico durante El Niño (V-AM2 y V-SO2). No existe una clara explicación del rol del PO_4^{3-} en la estructura de las comunidades *nirS*, pero se sabe que la degradación de C orgánico por los desnitrificantes genera nutrientes inorgánicos, como el PO_4^{3-} (Ward *et al.*, 2009), por lo que la alta disponibilidad de este nutriente puede deberse a la actividad de los desnitrificantes en estos sitios.

8 CONCLUSIONES

1. Mediante la amplificación del gen *nirS* por medio de PCR se demostró la presencia del gen *nirS* en la columna de agua y los sedimentos en la ZMO del Pacífico central mexicano. Sin embargo, la presencia de organismos desnitrificantes *nirS* en la zona eufótica oxigenada indica que podrían encontrarse en el interior de partículas y agregados de materia orgánica, lo que explicaría su distribución en zonas oxigenadas.
2. A pesar de que las condiciones oceanográficas fueron diferentes durante los eventos ENSO, con una variación de la temperatura y la concentración de nutrientes (principalmente en la capa eufótica), la composición de la comunidad *nirS* fue similar entre ambos eventos ENSO, por lo que la tercera hipótesis no se cumple. Sin embargo, la composición fue diferente entre ambientes (agua de fondo vs sedimentos).
3. En los sedimentos hubo cambios en las variables bioquímicas entre la costa y el océano abierto. Sin embargo, la comunidad *nirS* no presentó una distribución

diferencial clara, lo que indica una comunidad estable en los sedimentos a lo largo del transecto.

4. La estructura de la comunidad *nirS* del agua de fondo en la costa y la zona intermedia fue diferente a la comunidad más oceánica debido a las condiciones físico-químicas cambiantes del agua que afectan a su distribución.
5. Durante el evento de El Niño hubo un debilitamiento de la intensidad de la surgencia, lo que causó una disminución en la concentración de nutrientes, principalmente en la zona costera y, con ello, un cambio en la comunidad *nirS* del agua de fondo a nivel de diversidad alfa (El Niño > a La Niña) y estructura con respecto al evento de La Niña.
6. La estructura de la comunidad desnitrificante *nirS* se relacionó positivamente con NO_2^- , NO_3^- y PO_4^{3-} . Sin embargo, se debe considerar que las variables están sujetas a cambios temporales, por lo que hace falta más investigación para determinar si realmente las comunidades son afectadas por estos factores o si existen otras variables que determinen la composición y estructura de los desnitrificantes *nirS* en esta ZMO.
7. Según el árbol filogenético, se encontró un clúster diferente a lo reportado en previos estudios, el cual agrupó ASV que podrían representar microorganismos únicos para esta ZMO. Por lo tanto, es necesario realizar más estudios enfocados en analizar la ecología de los desnitrificantes que poseen el gen *nirS* en esta ZMO del Pacífico mexicano.

9 REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abell, G. C. J., Revill, A. T., Smith, C., Bissett, A. P., Volkman, J. K., & Robert, S. S. (2010). Archaeal ammonia oxidizers and *nirS*-type denitrifiers dominate sediment nitrifying and denitrifying populations in a subtropical macrotidal estuary. *The ISME Journal*, 4(2), 286-300. doi:10.1038/ismej.2009.105
- Abell, G., Ross, D., Keane, J., Oakes, J., Eyre, B., Robert, S., & Volkman, J. (2013). Nitrifying and denitrifying microbial communities and their relationship to nutrient fluxes and sediment geochemistry in the Derwent Estuary, Tasmania. *Aquatic Microbial Ecology*, 70(1), 63-75. doi:10.3354/ame01642
- Álvarez-Borrego, S. (2010). Physical, chemical, and biological oceanography of the Gulf of California. *The Gulf of California: Biodiversity and Conservation*. 24-48. University of Arizona Press. <http://www.jstor.org/stable/j.ctt181hwrc.6>.
- Amatya, I. M., Kansakar, B. R., Tare, V., & Fiksdal, L. (2009). Impact of temperature on biological denitrification process. *Journal of the Institute of Engineering*, 7(1), 121-126. doi:10.3126/jie.v7i1.2070
- Andrews, S. (2010). FastQC: A quality control tool for high throughput sequence data. Available online at: <https://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc/>
- Bae, H. S., Huang, L., White, J. R., Wang, J., DeLaune, R. D., & Ogram, A. (2018). Response of microbial populations regulating nutrient biogeochemical cycles to oiling of coastal saltmarshes from the Deepwater Horizon oil spill. *Environmental Pollution*, 241, 136-147. doi:10.1016/j.envpol.2018.05.033
- Bonilla-Rosso, G., L. Wittorf, Ch.M. Jones & S. Hallin. (2016). Design and evaluation of primers targeting genes encoding NO-forming nitrite reductase: implications for ecological inference of denitrifying communities. *Scientific Reports*, 6(1), 39208. doi: 10.1038/srep 39208.
- Bourbonnais, A., Juniper, S. K., Butterfield, D. A., Anderson, R. E., & Lehmann, M. F. (2014). Diversity and abundance of bacteria and *nirS*-encoding denitrifiers associated with the Juan de Fuca Ridge hydrothermal system. *Annals of Microbiology*, 64(4), 1691-1705. doi:10.1007/s13213-014-0813-3
- Bowles, M. W., Nigro, L. M., Teske, A. P., & Joye, S. B. (2012). Denitrification and environmental factors influencing nitrate removal in Guaymas Basin hydrothermally altered sediments. *Frontiers in Microbiology*, 3, 377. doi:10.3389/fmicb.2012.00377
- Bolyen, E., Rideout, J. R., Dillon, M. R., Bokulich, N. A., Abnet, C. C., Al-Ghalith, G. A., ... & Caporaso, J. G. (2019). Reproducible, interactive, scalable and extensible microbiome data science using QIIME 2. *Nature Biotechnology*, 37(8), 852-857. doi: 10.1038/s41587-019-0209-9
- Braker, G., Fesefeldt, A., & Witzel, K. P. (1998). Development of PCR primer systems for amplification of nitrite reductase genes (*nirK* and *nirS*) to detect denitrifying bacteria in environmental samples. *Applied and Environmental Microbiology*, 64(10), 3769-3775. doi:10.1128/aem.64.10.3769-3775.1998
- Braker, G., Ayala-del-Río, H. L., Devol, A. H., Fesefeldt, A., & Tiedje, J. M. (2001). Community structure of denitrifiers, bacteria, and archaea along redox gradients in Pacific Northwest marine sediments by terminal restriction fragment length polymorphism analysis of amplified nitrite reductase (*nirS*) and 16S rRNA genes. *Applied and Environmental Microbiology*, 67(4), 1893-1901. doi:10.1128/AEM.67.4.1893-1901.2001
- Braker, G., Zhou, J., Wu, L., Devol, A. H., & Tiedje, J. M. (2000). Nitrite reductase genes (*nirK* and *nirS*) as functional markers to investigate diversity of denitrifying bacteria in Pacific Northwest marine sediment communities. *Applied and Environmental Microbiology*, 66(5), 2096-2104. doi:10.1128/AEM.66.5.2096-2104.2000
- Braker, G., & Tiedje, J. M. (2003). Nitric oxide reductase (*norB*) genes from pure cultures and environmental samples. *Applied and Environmental Microbiology*, 69(6), 3476-3483. doi:10.1128/AEM.69.6.3476-3483.2003

- Breitburg, D., Levin, L. A., Oschlies, A., Grégoire, M., Chavez, F. P., Conley, D. J., Garçon, V., Gilbert, D., Gutiérrez, D., Isensee, K., Jacinto, G. S., Limburg, K. E., Montes, I., Naqvi, S. W. A., Pitcher, G. C., Rabalais, N. N., Roman, M. R., Rose, K. A., Seibel, B. A., ... Zhang, J. (2018). Declining oxygen in the global ocean and coastal waters. *Science*, 359(6371), eaam7240. doi:10.1126/science.aam7240
- Bustos-Serrano, H., & Castro-Valdez, R. (2006). Flux of nutrients in the Gulf of California: Geostrophic approach. *Marine Chemistry*, 99(1-4), 210-219. doi:10.1016/j.marchem.2005.09.012
- Castro-Gonzalez, M., Braker, G., Farias, L., & Ulloa, O. (2005). Communities of *nirS*-type denitrifiers in the water column of the oxygen minimum zone in the eastern South Pacific. *Environmental Microbiology*, 7(9), 1298-1306. doi:10.1111/j.1462-2920.2005.00809.x
- Callahan, B. J., McMurdie, P. J., Rosen, M. J., Han, A. W., Johnson, A. J. A., & Holmes, S. P. (2016). DADA2: high-resolution sample inference from Illumina amplicon data. *Nature Methods*, 13(7), 581-583. doi:10.1038/nmeth.3869
- Chang, B. X., Rich, J. R., Jayakumar, A., Naik, H., Pratihary, A. K., Keil, R. G., Ward, B. B., & Devol, A. H. (2014). The effect of organic carbon on fixed nitrogen loss in the eastern tropical South Pacific and Arabian Sea oxygen deficient zones. *Limnology and Oceanography*, 59(4), 1267-1274. doi:10.4319/lo.2014.59.4.1267
- Chen, Q., Fan, J., Ming, H., Su, J., Wang, Y., & Wang, B. (2020). Effects of environmental factors on denitrifying bacteria and functional genes in sediments of Bohai Sea, China. *Marine Pollution Bulletin*, 160, 111621. doi: 10.1016/j.marpolbul.2020.111621
- Choi, A., Cho, H., Kim, S. H., Thamdrup, B., Lee, S., & Hyun, J. H. (2016). Rates of N₂ production and diversity and abundance of functional genes associated with denitrification and anaerobic ammonium oxidation in the sediment of the Amundsen Sea Polynya, Antarctica. *Deep Sea Research Part II: Topical Studies in Oceanography*, 123, 113-125. doi:10.1016/j.dsr2.2015.07.016
- Codispoti, L. A., Brandes, J. A., Christensen, J. P., Devol, A. H., Naqvi, S. W. A., Paerl, H. W., & Yoshinari, T. (2001). The oceanic fixed nitrogen and nitrous oxide budgets: Moving targets as we enter the anthropocene? *Scientia Marina*, 65(S2), 85-105. doi:10.3989/scimar.2001.65s285
- Cornwell, J. C., Glibert, P. M., & Owens, M. S. (2014). Nutrient fluxes from sediments in the San Francisco Bay Delta. *Estuaries and Coasts*, 37(5), 1120-1133. doi:10.1007/s12237-013-9755-4
- Coyne, M. S., Arunakumari, A., Averill, B. A., & Tiedje, J. M. (1989). Immunological identification and distribution of dissimilatory heme cdl and nonheme copper nitrite reductases in denitrifying bacteria. *Applied and Environmental Microbiology*, 55(11), 2924-31. doi:10.1128/aem.55.11.2924-2931.1989
- Crowe, S. A., Cox, R. P., Jones, C., Fowle, D. A., Santibañez-Bustos, J. F., Ulloa, O., & Canfield, D. E. (2018). Decrypting the sulfur cycle in oceanic oxygen minimum zones. *The ISME Journal*, 12(9), 2322-2329. doi:10.1038/s41396-018-0149-2
- Curtis, T.P., W.T. Sloan & J.W. Scannell. (2002). Estimating prokaryotic diversity and its limits. *Proceedings of the National Academy of Sciences. USA*, 99(16), 10494-10499. doi:10.1073/pnas.142680199
- Czeschel, R., Stramma, L., & Johnson, G. C. (2012). Oxygen decreases and variability in the eastern equatorial Pacific. *Journal of Geophysical Research: Oceans*, 117, 1-12. doi: 10.1029/2012JC008043
- Dalsgaard, T., Stewart, F. J., Thamdrup, B., De Brabandere, L., Revsbech, N. P., Ulloa, O., Canfield, D. E., & DeLong, E. F. (2014). Oxygen at nanomolar levels reversibly suppresses process rates and gene expression in anammox and denitrification in the oxygen minimum zone off Northern Chile. *MBio*, 5(6), e01966-14. doi: 10.1128/mBio.01966-14
- Damashek, J., & Francis, C. A. (2018). Microbial nitrogen cycling in estuaries: From genes to ecosystem processes. *Estuaries and Coasts*, 41(3), 626-660. doi:10.1007/s12237-017-0306-2
- Dang, H., Wang, C., Li, J., Li, T., Tian, F., Jin, W., Ding, Y., & Zhang, Z. (2009). Diversity and distribution of sediment *nirS*-encoding bacterial assemblages in response to environmental

- gradients in the eutrophied Jiaozhou Bay, China. *Microbial Ecology*, 58(1), 161-169. doi:10.1007/s00248-008-9469-5
- Dang, H., Chen, R., Wang, L., Guo, L., Chen, P., Tang, Z., ... & Klotz, M. G. (2010). Environmental factors shape sediment anammox bacterial communities in hypernutrified Jiaozhou Bay, China. *Applied and Environmental Microbiology*, 76(21), 7036-7047. doi:10.1128/AEM.01264-10
- Devol, A. H. (1978). Bacterial oxygen uptake kinetics as related to biological processes in oxygen deficient zones of the oceans. *Deep Sea Research*, 25(2), 137-146. doi:10.1016/0146-6291(78)90001-2
- Devol, A. H. (2015). Denitrification, anammox, and N₂ production in marine sediments. *Annual Review of Marine Science*, 7(1), 403-423. doi:10.1146/annurev-marine-010213-135040
- DeVries, T., Deutsch, C., Rafter, P. A., & Primeau, F. (2013). Marine denitrification rates determined from a global 3-D inverse model. *Biogeosciences*, 10(4), 2481-2496. doi: 10.5194/bg-10-2481-2013
- Domangue, R. J., & Mortazavi, B. (2018). Nitrate reduction pathways in the presence of excess nitrogen in a shallow eutrophic estuary. *Environmental Pollution*, 238, 599-606. doi:10.1016/j.envpol.2018.03.033
- Erich N. (2014). RColorBrewer: ColorBrewer Palettes. R package version 1.1-2. <https://CRAN.R-project.org/package=RColorBrewer>.
- Falk, S., Hannig, M., Gliesche, C., Wardenga, R., & Koster, M. (2007). *nirS*-containing denitrifier communities in the water column and sediment of the Baltic Sea. *Biogeosciences*, 4(3), 255-268. doi:10.5194/bg-4-255-2007.
- Fan, H., Bolhuis, H., & Stal, L. J. (2015a). Denitrification and the denitrifier community in coastal microbial mats. *FEMS Microbiology Ecology*, 91(3), fiu033. doi: 10.1093/femsec/fiu033
- Fan, H., Bolhuis, H., & Stal, L. J. (2015b). Drivers of the dynamics of diazotrophs and denitrifiers in North Sea bottom waters and sediments. *Frontiers in Microbiology*, 6, 738. doi:10.3389/fmicb.2015.00738
- Francis, C. A., O'Mullan, G. D., Cornwell, J. C., & Ward, B. B. (2013). Transitions in *nirS*-type denitrifier diversity, community composition, and biogeochemical activity along the Chesapeake Bay estuary. *Frontiers in Microbiology*, 4, 237. doi:10.3389/fmicb.2013.00237
- Fuchsman, C. A., Devol, A. H., Saunders, J. K., McKay, C., & Rocap, G. (2017). Niche partitioning of the N cycling microbial community of an offshore oxygen deficient zone. *Frontiers in Microbiology*, 8, 2384. doi:10.3389/fmicb.2017.02384
- Fuenzalida, R., Schneider, W., Garcés-Vargas, J., Bravo, L., & Lange, C. (2009). Vertical and horizontal extension of the oxygen minimum zone in the eastern South Pacific *Deep Sea Research Part II: Topical Studies in Oceanography*, 56(16), 992-1008. doi: 10.1016/j.dsr2.2008.11.001
- Galán, A., Faúndez, J., Thamdrup, B., Santibáñez, J. F., & Farías, L. (2014). Temporal dynamics of nitrogen loss in the coastal upwelling ecosystem off central Chile: Evidence of autotrophic denitrification through sulfide oxidation. *Limnology and Oceanography*, 59(6), 1865-1878. doi:10.4319/lo.2014.59.6.1865
- Galloway, J. N., Aber, J. D., Erisman, J. W., Seitzinger, S. P., Howarth, R. W., Cowling, E. B., & Cosby, B. J. (2003). The nitrogen cascade. *BioScience*, 53(4), 341-356. doi:10.1641/0006-3568(2003)053[0341:TNC]2.0.CO;2
- Ganesh, S., D.J. Parris., E.F. DeLong & F.J. Stewart. (2014). Metagenomic analysis of size-fractionated picoplankton in a marine oxygen minimum zone. *The ISME Journal*, 8: 187-211. doi:10.1038/ismej.2013.144
- Ghosh, W., & Dam, B. (2009). Biochemistry and molecular biology of lithotrophic sulfur oxidation by taxonomically and ecologically diverse bacteria and archaea. *FEMS Microbiology Reviews*, 33(6), 999-1043. doi:10.1111/j.1574-6976.2009.00187.x
- Glibert, P. M., Wilkerson, F. P., Dugdale, R. C., Raven, J. A., Dupont, C. L., Leavitt, P. R., Parker, A. E., Burkholder, J. M., & Kana, T. M. (2016). Pluses and minuses of ammonium and nitrate uptake and assimilation by phytoplankton and implications for productivity and community composition, with emphasis on nitrogen-enriched conditions: Pluses and minuses of NH₄⁺ and NO₃⁻. *Limnology and Oceanography*, 61(1), 165-197. doi:10.1002/lno.10203

- Graco, M. I., Ledesma, J., Flores, G., & Girón, M. (2007). Nutrientes, oxígeno y procesos biogeoquímicos en el sistema de surgencias de la corriente de Humboldt frente a Perú. *Revista peruana de biología*, 14(1), 117-128. doi:10.15381/rpb.v14i1.2165
- Graf, D. R. H., Jones, C. M., & Hallin, S. (2014). Intergenomic comparisons highlight modularity of the denitrification pathway and underpin the importance of community structure for N₂O emissions. *PLoS ONE*, 9(12), 1-20. doi: 10.1371/journal.pone.0114118
- Granger, J., & Ward, B. B. (2003). Accumulation of nitrogen oxides in copper-limited cultures of denitrifying bacteria. *Limnology and Oceanography*, 48(1), 313-318. doi:10.4319/lo.2003.48.1.0313
- Gruber, N. (2008). The marine nitrogen cycle: Overview and challenges. *Nitrogen in the Marine Environment*, 1-50. doi:10.1016/B978-0-12-372522-6.00001-3
- Hall, T., Biosciences, I., & Carlsbad, C. (2011). BioEdit: an important software for molecular biology. *GERF Bulletin Biosciences*, 2(1), 60-61.
- Hanbo C. (2018). VennDiagram: Generate high-resolution Venn and Euler Plots. R package version 1.6.20. <https://CRAN.R-project.org/package=VennDiagram>
- Hannig, M., Braker, G., Dippner, J., & Jürgens, K. (2006). Linking denitrifier community structure and prevalent biogeochemical parameters in the pelagial of the central Baltic proper (Baltic Sea). *FEMS Microbiology Ecology*, 57(2), 260-271. doi:10.1111/j.1574-6941.2006.00116.x
- Hansen, H. P., & Koroleff, F. (1999). Determination of nutrients. *Methods of seawater analysis*, 159-228. doi: 10.1002/9783527613984.ch10
- Horak, R. E., Ruef, W., Ward, B. B., & Devol, A. H. (2016). Expansion of denitrification and anoxia in the eastern tropical North Pacific from 1972 to 2012. *Geophysical Research Letters*, 43(10), 5252-5260. doi:10.1002/2016GL068871
- Hoshino, T., Doi, H., Uramoto, G. I., Wörmer, L., Adhikari, R. R., Xiao, N., ... & Inagaki, F. (2020). Global diversity of microbial communities in marine sediment. *Proceedings of the national academy of sciences*, 117(44), 27587-27597. doi:10.1073/pnas.1919139117
- Ito, T., & Deutsch, C. (2013). Variability of the oxygen minimum zone in the tropical North Pacific during the late twentieth century. *Global Biogeochemical Cycles*, 27, 1119-1128. doi: 10.1002/2013GB004567
- Jackman, C. H., Frederick, J. E., & Stolarski, R. S. (1980). Production of odd nitrogen in the stratosphere and mesosphere: An intercomparison of source strengths. *Journal of Geophysical Research: Oceans*, 85, 7495-7505. doi:10.1029/JC085iC12p07495
- Jackson, M. L. (1958). Organic matter determination for soils. *Soil chemical analysis*.
- James, C. C., Barton, A. D., Allen, L. Z., Lampe, R. H., Rabines, A., Schulberg, A., ... & Allen, A. E. (2022). Influence of nutrient supply on plankton microbiome biodiversity and distribution in a coastal upwelling region. *Nature communications*, 13(1), 1-13. doi:10.1038/s41467-022-30139-4
- Jake R Conway, Alexander Lex, Nils Gehlenborg (2017). UpSetR: An R package for the visualization of intersecting sets and their properties, 33(18), 2938-2940. doi:10.1093/bioinformatics/btx364
- Jayakumar, A., O'Mullan, G. D., Naqvi, S. W. A., & Ward, B. B. (2009). Denitrifying bacterial community composition changes associated with stages of denitrification in oxygen minimum zones. *Microbial Ecology*, 58(2), 350-362. doi:10.1007/s00248-009-9487-y
- Jayakumar, A., Peng, X., & Ward, B. (2013). Community composition of bacteria involved in fixed nitrogen loss in the water column of two major oxygen minimum zones in the ocean. *Aquatic Microbial Ecology*, 70(3), 245-259. doi:10.3354/ame01654
- Jayakumar, D., Francis, C., Naqvi, S., & Ward, B. (2004). Diversity of nitrite reductase genes (*nirS*) in the denitrifying water column of the coastal Arabian Sea. *Aquatic Microbial Ecology*, 34, 69-78. doi:10.3354/ame034069
- Jari O., Guillaume B., Michael F., Roeland K., Pierre L., Dan M., Peter R. Minchin, R. B. O'Hara, Gavin L. Simpson, Peter Solymos, M. Henry H. Stevens, Eduard Szoecs & Helene Wagner (2020). vegan: Community ecology package. R package version 2.5-7. <https://CRAN.R-project.org/package=vegan>.
- Ji, Q., Babbín, A. R., Jayakumar, A., Oleynik, S., & Ward, B. B. (2015). Nitrous oxide production by nitrification and denitrification in the Eastern Tropical South Pacific oxygen minimum zone:

- Nitrous oxide production in OMZ. *Geophysical Research Letters*, 42(24), 10,755-10,764. doi:10.1002/2015GL066853
- Jones, C. M., & Hallin, S. (2010). Ecological and evolutionary factors underlying global and local assembly of denitrifier communities. *The ISME Journal*, 4(5), 633-641. doi: 10.1038/ismej.2009.152
- Jones, C. M., Spor, A., Brennan, F. P., Breuil, M.-C., Bru, D., Lemanceau, P., Griffiths, B., Hallin, S., & Philippot, L. (2014). Recently identified microbial guild mediates soil N₂O sink capacity. *Nature Climate Change*, 4(9), 801-805. doi:10.1038/nclimate2301
- Jones, C. M., Stres, B., Rosenquist, M., & Hallin, S. (2008). Phylogenetic analysis of nitrite, nitric oxide, and nitrous oxide respiratory enzymes reveal a complex evolutionary history for denitrification. *Molecular Biology and Evolution*, 25(9), 1955-1966. doi:10.1093/molbev/msn146
- Kalvelage, T., Jensen, M. M., Contreras, S., Revsbech, N. P., Lam, P., Günter, M., LaRoche, J., Lavik, G., & Kuypers, M. M. M. (2011). Oxygen Sensitivity of Anammox and coupled N-cycle processes in oxygen minimum zones. *PLoS ONE*, 6(12), e29299. doi:10.1371/journal.pone.0029299
- Kalvelage, T., Lavik, G., Lam, P., Contreras, S., Arteaga, L., Löscher, C. R., Oschlies, A., Paulmier, A., Stramma, L., & Kuypers, M. M. M. (2013). Nitrogen cycling driven by organic matter export in the South Pacific oxygen minimum zone. *Nature Geoscience*, 6(3), 228-234. doi:10.1038/ngeo1739
- Karstensen, J., Stramma, L., & Visbeck, M. (2008). Oxygen minimum zones in the eastern tropical Atlantic and Pacific oceans. *Progress in Oceanography*, 77(4), 331-350. doi: 10.1016/j.pocean.2007.05.009
- Kathiravan, V., & Krishnani, K. K. (2014). *Pseudomonas aeruginosa* and *Achromobacter sp.*: nitrifying aerobic denitrifiers have a plasmid encoding for denitrifying functional genes. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 30(4), 1187-1198. doi:10.1007/s11274-013-1543-6.
- Kirkpatrick, J., Oakley, B., Fuchsman, C., Srinivasan, S., Staley, J. T., & Murray, J. W. (2006). Diversity and distribution of planctomycetes and related bacteria in the suboxic zone of the Black Sea. *Applied and Environmental Microbiology*, 72(4), 3079-3083. doi:10.1128/AEM.72.4.3079-3083.2006
- Kim, O.-S., Imhoff, J. F., Witzel, K.-P., & Junier, P. (2011). Distribution of denitrifying bacterial communities in the stratified water column and sediment–water interface in two freshwater lakes and the Baltic Sea. *Aquatic Ecology*, 45(1), 99-112. doi:10.1007/s10452-010-9335-7
- Kumar, S., Stecher, G., Li, M., Knyaz, C., & Tamura, K. (2018). MEGA X: molecular evolutionary genetics analysis across computing platforms. *Molecular Biology and Evolution*, 35(6), 1547-1549. doi:10.1093/molbev/msy096.
- Langenheder, S., & Ragnarsson, H. (2007). The role of environmental and spatial factors for the composition of aquatic bacterial communities. *Ecology*, 88(9), 2154-2161. doi:10.1890/06-2098.1
- Lê, S., Josse, J. & Husson, F. (2008). FactoMineR: An R package for multivariate analysis. *Journal of Statistical Software*. 25(1).1-18. doi:10.18637/jss.v025.i01
- Lee, J. A., & Francis, C. A. (2017a). Spatiotemporal characterization of San Francisco Bay denitrifying communities: A comparison of *nirK* and *nirS* diversity and abundance. *Microbial Ecology*, 73(2), 271-284. doi:10.1007/s00248-016-0865-y
- Lee, J. A., & Francis, C. A. (2017b). Deep *nirS* amplicon sequencing of San Francisco Bay sediments enables prediction of geography and environmental conditions from denitrifying community composition. *Environmental microbiology*, 19(12), 4897-4912. doi:10.1111/1462-2920.13920
- Lefebvre, S., Marmonier, P., & Peiry, J. L. (2006). Nitrogen dynamics in rural streams: Differences between geomorphologic units. *Annales de Limnologie - International Journal of Limnology*, 42(1), 43-52. doi:10.1051/limn/2006005
- Letunic, I., & Bork, P. (2021). Interactive tree of life (iTOL) v5: An online tool for phylogenetic tree display and annotation. *Nucleic Acids Research*, gkab301. doi:10.1093/nar/gkab301
- Levin, L. A. (2018). Manifestation, drivers, and emergence of open ocean deoxygenation. *Annual review of marine science*, 10, 229-260. doi:10.1146/annurev-marine-121916-063359

- Levitus, S., Conkright, M. E., Reid, J. L., Najjar, R. G., & Mantyla, A. (1993). Distribution of nitrate, phosphate and silicate in the world oceans. *Progress in Oceanography*, 31(3), 245-273. doi: 10.1016/0079-6611(93)90003-V
- Li, F., Li, M., Shi, W., Li, H., Sun, Z., & Gao, Z. (2017). Distinct distribution patterns of proteobacterial *nirK*—and *nirS* -type denitrifiers in the Yellow River estuary, China. *Canadian Journal of Microbiology*, 63(8), 708-718. doi:10.1139/cjm-2017-0053
- Li, M., Hong, Y., Cao, H., Klotz, M. G., & Gu, J.-D. (2013). Diversity, abundance, and distribution of NO-forming nitrite reductase-encoding genes in deep-sea subsurface sediments of the South China Sea. *Geobiology*, 11(2), 170-179. doi:10.1111/gbi.12020
- Li, X., Gao, D., Hou, L., & Liu, M. (2019). Salinity stress changed the biogeochemical controls on CH₄ and N₂O emissions of estuarine and intertidal sediments. *Science of The Total Environment*, 652, 593-601. doi:10.1016/j.scitotenv.2018.10.294
- Lipschultz, F., Wofsy, S. C., Ward, B. B., Codispoti, L. A., Friedrich, G., & Elkins, J. W. (1990). Bacterial transformations of inorganic nitrogen in the oxygen-deficient waters of the Eastern Tropical South Pacific Ocean. *Deep Sea Research Part A. Oceanographic Research Papers*, 37(10), 1513-1541. doi:10.1016/0198-0149(90)90060-9
- Liu, X., Tiquia, S. M., Holguin, G., Wu, L., Nold, S. C., Devol, A. H., Luo, K., Palumbo, A. V., Tiedje, J. M., & Zhou, J. (2003). Molecular diversity of denitrifying genes in continental margin sediments within the oxygen-deficient zone off the Pacific Coast of Mexico. *Applied and Environmental Microbiology*, 69(6), 3549-3560. doi:10.1128/AEM.69.6.3549-3560.2003
- Malika C., Nadia G., Veronique B., Azam N. (2014). NbClust: An R package for determining the relevant number of clusters in a data set. *Journal of Statistical Software*, 61(6), 1-36. URL <http://www.jstatsoft.org/v61/i06/>.
- Marcus W. Beck (2017). ggord: Ordination plots with ggplot2. R package version 1.0.0.
- Maske, H., Cajal M., R., Trasviñ C., A., J. M., A., Almeda J., C. O., Gaxiola C., G., et al. (2010). Inorganic carbon and biological oceanography above a shallow oxygen minimum in the entrance to the Gulf of California in the Mexican Pacific. *Limnology and Oceanography*. 55, 481–491. doi:10.4319/lo.2010.55.2.0481.
- Morales, C. E., Hormazábal, S. E., & Blanco, J. (1999). Interannual variability in the mesoscale distribution of the depth of the upper boundary of the oxygen minimum layer off northern Chile (18–24S): Implications for the pelagic system and biogeochemical cycling. *Journal of Marine Research*, 57(6), 909-932.
- Morrison, J. M., Codispoti, L. A., Smith, S. L., Wishner, K., Flagg, C., Gardner, W. D., Gaurin, S., Naqvi, S. W. A., Manghnani, V., Prosperie, L., & Gundersen, J. S. (1999). The oxygen minimum zone in the Arabian Sea during 1995. *Deep Sea Research Part II: Topical Studies in Oceanography*, 46(8-9), 1903-1931. doi:10.1016/S0967-0645(99)00048-X
- Mosier, A. C., & Francis, C. A. (2010). Denitrifier abundance and activity across the San Francisco Bay estuary: Estuarine denitrifier abundance and activity. *Environmental Microbiology Reports*, 2(5), 667-676. doi:10.1111/j.1758-2229.2010.00156.x
- Murdock, S. A., & Juniper, S. K. (2017). Capturing compositional variation in denitrifying communities: A multiple-primer approach that includes Epsilonproteobacteria. *Applied and Environmental Microbiology*, 83(6), e02753-16. doi:10.1128/AEM.02753-16
- Nakano, M., Shimizu, Y., Okumura, H., Sugahara, I., & Maeda, H. (2008). Construction of a consortium comprising ammonia-oxidizing bacteria and denitrifying bacteria isolated from marine sediment. *Biocontrol Science*, 13(3), 73-89. doi:10.4265/bio.13.73
- Nogales, B., Timmis, K. N., Nedwell, D. B., & Osborn, A. M. (2002). Detection and diversity of expressed denitrification genes in estuarine sediments after reverse transcription-PCR amplification from mRNA. *Applied and Environmental Microbiology*, 68(10), 5017-5025. doi:10.1128/AEM.68.10.5017-5025.2002
- Oakley, B. B., Francis, C. A., Roberts, K. J., Fuchsman, C. A., Srinivasan, S., & Staley, J. T. (2007). Analysis of nitrite reductase (*nirK* and *nirS*) genes and cultivation reveal depauperate community of denitrifying bacteria in the Black Sea suboxic zone. *Environmental Microbiology*, 9(1), 118-130. doi:10.1111/j.1462-2920.2006.01121.x

- Pajares, S., & Ramos, R. (2019). Processes and microorganisms involved in the marine nitrogen cycle: Knowledge and gaps. *Frontiers in Marine Science*, 6, 739. doi:10.3389/fmars.2019.00739
- Pajares, S., Soto-Jiménez, M. F., & Merino-Ibarra, M. (2019). Molecular and isotopic evidence of the distribution of nitrogen-cycling microbial communities in the oxygen minimum zone of the Tropical Mexican Pacific. *FEMS Microbiology Ecology*, 95(10), fiz143. doi:10.1093/femsec/fiz143
- Pajares, S., Varona-Cordero, F., & Hernández-Becerril, D. U. (2020). Spatial distribution patterns of bacterioplankton in the oxygen minimum zone of the tropical Mexican Pacific. *Microbial Ecology*, 80(3), 519-536. doi:10.1007/s00248-020-01508-7
- Paulmier, A., Ruiz-Pino, D., Garçon, V., and Farías, L. (2006). Maintaining of the eastern south pacific oxygen minimum zone (OMZ) off Chile. *Geophysical Research Letters* 33, 2–7. doi: 10.1029/2006GL026801
- Paulmier, A., & Ruiz-Pino, D. (2009). Oxygen minimum zones (OMZs) in the modern ocean. *Progress in Oceanography*, 80(3-4), 113-128. doi:10.1016/j.pocean.2008.08.001
- Ploner A (2021). Heatplus: Heatmaps with row and/or column covariates and colored clusters. R package version 3.0.0, <https://github.com/alexploner/Heatplus>.
- Pommier, T., Canbäck, B., Riemann, L., Boström, K. H., Simu, K., Lundberg, P., ... & Hagström, Å. (2007). Global patterns of diversity and community structure in marine bacterioplankton. *Molecular Ecology*, 16(4), 867-880. doi:10.1111/j.1365-294X.2006.03189.x
- Portela, E., Beier, E., Barton, E. D., Castro, R., Godínez, V., Palacios-Hernández, E., ... & Trasviña, A. (2016). Water masses and circulation in the tropical Pacific off central Mexico and surrounding areas. *Journal of Physical Oceanography*, 46(10), 3069-3081. doi:10.1175/JPO-D-16-0068.1
- R Core Team (2021). R: A language and environment for statistical computing. R foundation for statistical computing, Vienna, Austria. URL <https://www.R-project.org/>
- Ramos de la Cruz, R., Pajares, S., Merino-Ibarra, M., Monreal-Gómez, M. A., & Coria-Monter, E. (2021). Distribution of nitrogen-cycling genes in an oxygen-depleted cyclonic eddy in the Alfonso Basin, Gulf of California. *Marine and Freshwater Research*, 72(8), 1173-1184. doi:10.1071/MF20074
- Ravishankara, A. R., Daniel, J. S., & Portmann, R. W. (2009). Nitrous oxide (N₂O): The dominant ozone-depleting substance emitted in the 21st century. *Science*, 326(5949), 123-125. doi:10.1126/science.1176985
- Revsbech, N. P., Larsen, L. H., Gundersen, J., Dalsgaard, T., Ulloa, O., & Thamdrup, B. (2009). Determination of ultra-low oxygen concentrations in oxygen minimum zones by the STOX sensor: STOX oxygen sensor. *Limnology and Oceanography: Methods*, 7(5), 371-381. doi:10.4319/lom.2009.7.371
- Ronner, U., & Sorensson, F. (1985). Denitrification rates in the low-oxygen waters of the stratified Baltic proper. *Applied and Environmental Microbiology*, 50(4), 801-806. doi:10.1128/aem.50.4.801-806.1985
- Ruvalcaba-Baroni, I., Palastanga, V., & Slomp, C. P. (2020). Enhanced organic carbon burial in sediments of oxygen minimum zones upon ocean deoxygenation. *Frontiers in Marine Science*, 6, 839. doi:10.3389/fmars.2019.00839
- Santoro, A. E., Boehm, A. B., & Francis, C. A. (2006). Denitrifier community composition along a nitrate and salinity gradient in a coastal aquifer. *Applied and Environmental Microbiology*, 72(3), 2102-2109. doi:10.1128/AEM.72.3.2102-2109.2006
- Santamaría-del-Angel, E., Alvarez-Borrego, S., & Müller-Karger, F. E. (1994). The 1982–1984 El Niño in the Gulf of California as seen in coastal zone color scanner imagery. *Journal of Geophysical Research: Oceans*, 99(C4), 7423-7431. doi:10.1029/93JC02147
- Sarkar, D. (2008). Lattice: Multivariate data visualization with R. *Springer*. <http://lmdvr.r-forge.r-project.org>
- Scala, D.J., & Kerkhof, L. J. (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

- Scala, D.J., & Kerkhof, L.J. (2000). Horizontal heterogeneity of denitrifying bacterial communities in marine sediments by terminal restriction fragment length polymorphism analysis. *Applied and Environmental Microbiology*, 66(5), 1980-1986. doi:10.1128/AEM.66.5.1980-1986.2000
- Schlitzer, R., (2018). Ocean Data View, <https://odv.awi.de>
- Shi, R., Xu, S., Qi, Z., Huang, H., & Liang, Q. (2019). Seasonal patterns and environmental drivers of *nirS*- and *nirK*-encoding denitrifiers in sediments of Daya Bay, China. *Oceanologia*, 61(3), 308-320. doi:10.1016/j.oceano.2019.01.002
- Smith, C. J., Nedwell, D. B., Dong, L. F., & Osborn, A. M. (2007). Diversity and abundance of nitrate reductase genes (*narG* and *napA*), nitrite reductase genes (*nirS* and *nrfA*), and their transcripts in estuarine sediments. *Applied and Environmental Microbiology*, 73(11), 3612-3622. doi:10.1128/AEM.02894-06
- Stauffert, M., Cravo-Laureau, C., & Duran, R. (2014). Structure of hydrocarbonoclastic nitrate-reducing bacterial communities in bioturbated coastal marine sediments. *FEMS Microbiology Ecology*, 89(3), 580-593. doi:10.1111/1574-6941.12359
- Steenbergh, A. K., Bodelier, P. L. E., Slomp, C. P., & Laanbroek, H. J. (2014). Effect of redox conditions on bacterial community structure in Baltic Sea sediments with contrasting phosphorus fluxes. *PLoS ONE*, 9(3), e92401. doi:10.1371/journal.pone.0092401
- Stramma, L., Johnson, G. C., Sprintall, J., & Mohrholz, V. (2008). Expanding oxygen-minimum zones in the tropical oceans. *Science*, 320(5876), 655-658. doi:10.1126/science.1153847
- Tamegai, H., Aoki, R., Arakawa, S., & Kato, C. (2007). Molecular analysis of the nitrogen cycle in deep-sea microorganisms from the Nankai Trough: Genes for nitrification and denitrification from deep-sea environmental DNA. *Extremophiles*, 11(2), 269-275. doi:10.1007/s00792-006-0035-0
- Thamdrup, B. (2012). New pathways and processes in the global nitrogen cycle. *Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics*, 43(1), 407-428. doi:10.1146/annurev-ecolsys-102710-145048
- Thioulouse J, Dray S, Dufour A, Siberchicot A, Jombart T, Pavoine S (2018). Multivariate analysis of ecological data with ade4. *Springer*. doi:10.1007/978-1-4939-8850-1.
- Tiquia, S. M., Masson, S. A., & Devol, A. (2006). Vertical distribution of nitrite reductase genes (*nirS*) in continental margin sediments of the Gulf of Mexico. *FEMS Microbiology Ecology*, 58(3), 464-475. doi:10.1111/j.1574-6941.2006.00173.x
- Trucco-Pignata, P. N., Hernández-Ayón, J. M., Santamaria-del-Angel, E., Beier, E., Sánchez-Velasco, L., Godínez, V. M., & Norzagaray, O. (2019). Ventilation of the upper oxygen minimum zone in the coastal region off Mexico: Implications of El Niño 2015–2016. *Frontiers in Marine Science*, 459. doi:10.3389/fmars.2019.00459
- Ulloa, O., & Pantoja, S. (2009). The oxygen minimum zone of the eastern South Pacific. *Deep Sea Research Part II: Topical Studies in Oceanography*, 56(16), 987-991. doi:10.1016/j.dsr2.2008.12.004
- Ulloa, O., Canfield, D. E., DeLong, E. F., Letelier, R. M., & Stewart, F. J. (2012). Microbial oceanography of anoxic oxygen minimum zones. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 109, 15996–16003. doi:10.1073/pnas.1205009109.
- Voss, M., Bange, H. W., Dippner, J. W., Middelburg, J. J., Montoya, J. P., & Ward, B. (2013). The marine nitrogen cycle: Recent discoveries, uncertainties and the potential relevance of climate change. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, 368(1621), 20130121. doi:10.1098/rstb.2013.0121
- Walkley, A. (1947). Organic carbon by the Walkley-Black oxidation procedure. *Soil Science*, 63, 251-264.
- Wallenstein, M. D., Myrold, D. D., Firestone, M., & Voytek, M. (2006). Environmental controls on denitrifying communities and denitrification rates: Insights from molecular methods. *Ecological Applications*, 16(6), 2143-2152. doi:10.1890/1051-0761(2006)016[2143:ecodca]2.0.co;2.
- Ward, B. B., Devol, A. H., Rich, J. J., Chang, B. X., Bulow, S. E., Naik, H., Pratihary, A., & Jayakumar, A. (2009). Denitrification as the dominant nitrogen loss process in the Arabian Sea. *Nature*, 461(7260), 78-81. doi:10.1038/nature08276

- Ward, Bess B., Tuit, C. B., Jayakumar, A., Rich, J. J., Moffett, J., & Naqvi, S. W. A. (2008). Organic carbon, and not copper, controls denitrification in oxygen minimum zones of the ocean. *Deep Sea Research Part I: Oceanographic Research Papers*, 55(12), 1672-1683. doi:10.1016/j.dsr.2008.07.005
- Wei, W., Isobe, K., Nishizawa, T., Zhu, L., Shiratori, Y., Ohte, N., ... & Senoo, K. (2015). Higher diversity and abundance of denitrifying microorganisms in environments than considered previously. *The ISME Journal*, 9(9), 1954-1965. doi:10.1038/ismej.2015.9
- Wickham H (2016). ggplot2: Elegant graphics for data analysis. *Media*, 35(211), 10-1007.
- Winston C. (2014). extrafont: Tools for using fonts. R package version 0.17. <https://CRAN.R-project.org/package=extrafont>.
- Wittorf, L., Bonilla-Rosso, G., Jones, C. M., Bäckman, O., Hulth, S., & Hallin, S. (2016). Habitat partitioning of marine benthic denitrifier communities in response to oxygen availability. *Environmental Microbiology Reports*, 8(4), 486-492. doi:10.1111/1758-2229.12393
- Wyrski, K. (1962). The oxygen minima in relation to ocean circulation. *Deep Sea Research and Oceanographic Abstracts*, 9(1-2), 11-23. doi:10.1016/0011-7471(62)90243-7
- Yu, T., Li, M., Niu, M., Fan, X., Liang, W., & Wang, F. (2018). Difference of nitrogen-cycling microbes between shallow bay and deep-sea sediments in the South China Sea. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 102(1), 447-459. doi:10.1007/s00253-017-8594-9
- Zhang, Y., Xie, X., Jiao, N., Hsiao, S. S.-Y., & Kao, S.-J. (2014). Diversity and distribution of amoA nitrifying and nirS denitrifying microbial communities in the Yangtze River estuary. *Biogeosciences*, 11(8), 2131-2145. doi:10.5194/bg-11-2131-2014
- Zheng, Y., Hou, L., Liu, M., Gao, J., Yin, G., Li, X., Deng, F., Lin, X., Jiang, X., Chen, F., Zong, H., & Zhou, J. (2015). Diversity, abundance, and distribution of nirS-harboring denitrifiers in intertidal sediments of the Yangtze Estuary. *Microbial Ecology*, 70(1), 30-40. doi:10.1007/s00248-015-0567-x
- Zumft, W. G. (1997). Cell biology and molecular basis of denitrification. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*. 61(4), 533-616. doi:10.1128/.61.4.533-616.1997

10 Material suplementario

Tabla S1. Estudios representativos sobre comunidades desnitrificantes en zonas oceánicas.

No.	Primers	Ambiente	Región oceánica	Principales hallazgos	Referencias
1	nirS1F- nirS6R	Sedimentos	ETNP	Mayor diversidad de genes <i>nirS</i> que <i>nirK</i>	(Braker <i>et al.</i> , 2000)
2	nirK1F- nirK5R, nirS1F- nirS6R	Sedimentos	ETNP	Alto nivel de diversidad funcional y filogenética del gen <i>nirS</i> en bacterias	(Braker <i>et al.</i> , 2001)
3	Heme 832F- 1606R, Copper 583F- 909R	Sedimentos	ETNP México	Identidad de nucleótidos inferior al 80 % con desnitrificantes conocidos	(Liu <i>et al.</i> , 2003)
4	cd3F- cd4R, nirK876- nirK1040	Columna de agua	ETNP México	Genes <i>nir</i> más abundantes en la base de la oxiclina y a 250 m, asociados al segundo máximo de NO ₂ ⁻ donde la desnitrificación es un proceso fundamental que promueve la pérdida de N en esta capa	(Pajares <i>et al.</i> , 2019)
5	Cd3aF- R3cd	Giro ciclónico, agua	ETNP México	La circulación ciclónica afecta la distribución de nutrientes y la abundancia del gen <i>nirS</i> , correlacionando su abundancia con la salinidad y el NO ₃ ⁻	(Ramos de la Cruz <i>et al.</i> , 2021)
6	Metatras criptoma	Columna de Agua	ETSP, Chile	La concentración de O ₂ > 200 nM afecta la transcripción de <i>nirS</i> y <i>nosZ</i> , pero no a <i>nirK</i>	(Dalsgaard <i>et al.</i> , 2014)
7	nirS1F- nirS6R	Columna de agua	ETSP, Chile	Los factores que controlan a estas comunidades son O ₂ , NO ₃ ⁻ , NO ₂ ⁻ y profundidad. Mayor diversidad de <i>nirS</i> asociada al máximo de NO ₂ ⁻ y condiciones subóxicas	(Castro-Gonzalez <i>et al.</i> , 2005)
8	nirS1F- nirS6R, 583F- nirK5R	Columna de agua	ETSP, Perú	Comunidad asociada al segundo máximo de NO ₂ ⁻ en condiciones subóxicas	(Jayakumar <i>et al.</i> , 2013)
9	nirS1F- nirS6R, 583F- nirK5R	Columna de Agua	Mar Arábigo	Comunidad desnitrificante asociada a condiciones subóxicas y bajas concentraciones de NO ₃ ⁻	(Jayakumar <i>et al.</i> , 2009)
10	nirS1F- nirS6R, 583F- nirK5R	Columna de agua	Mar Arábigo y ETPS, Perú	La desnitrificación domina sobre el anammox, y es responsable del 87-99 % de la pérdida de N ₂	(Ward <i>et al.</i> , 2009)
11	nirS1F- nirS6R	Columna de agua	Mar Arábigo	Alta diversidad en concentraciones altas de NO ₂ ⁻	(Jayakumar <i>et al.</i> , 2004)

12	nirS1F- nirS6R nirK1F- nirK583F dgR	Columna de agua	Mar Negro	Comunidad <i>nirK</i> más diversa en la superficie subóxica ($O_2 < 10\mu M$) asociado a altos niveles de NO_3^-/NO_2^- ; <i>nirS</i> más diverso en zonas más profundas asociado a altos niveles de NO_2^- y NO_3^- escaso	(Oakley <i>et al.</i> , 2007)
13	nirS1F- nirS6R	Columna de agua	Mar Báltico	A > disponibilidad de O_2 , y $NO_3^- >$ diversidad, mientras que las zonas subóxicas presentan baja diversidad y alta dominancia	(Hannig <i>et al.</i> , 2006)
14	nirS1F- nirS6R	Columna de agua y sedimentos	Mar Báltico	Diversidad alta en condiciones $O_2 < 10\mu M$, NO_3^- alto y bajas concentraciones de NO_2^- en la columna de agua, mientras que la diversidad está asociada a la disponibilidad de S^{2-} en sedimentos	(Falk <i>et al.</i> , 2007)
15	cd3aF- R3cd, F1aCu- R3Cu	Columna de agua y sedimentos	Mar Báltico	<i>nirS</i> más diverso que <i>nirK</i>	(Kim <i>et al.</i> , 2011)
16	Nos661F - Nos1773 R	Sedimentos	Bahía del Atlántico Medio, EE. UU	63% relacionadas con secuencias conocidas de desnitrificantes <i>nosZ</i>	(Scala & Kerkhof, 1998)
17	Metatran scriptom a	Sedimentos	Estuario río Colne, Reino Unido	Alta diversidad de <i>nirS</i> con organismos específicos para cada sitio. No se detectaron genes <i>narG</i> , <i>napA</i> y <i>nirK</i>	(Nogales <i>et al.</i> , 2002)
18	Metatran scriptom a	Sedimentos	Estuario río Colne, Reino Unido	El número de copias de los genes <i>nar</i> y <i>nir</i> disminuye significativamente desde la cabeza del estuario hacia la boca del estuario, siguiendo un gradiente de NO_3^-	(Smith <i>et al.</i> , 2007)
19	nirS1F- nirS6R	Sedimentos	Estuario bahía Jiaozhou, China	La distribución y diversidad de estas comunidades se diferencian de acuerdo con el contenido de limo en sedimentos, concentración de NH_4^+ , contenido de C y N orgánico	(Dang <i>et al.</i> , 2009)
20	nirS1F- nirS6R, F1aCu- R3Cu	Sedimentos	Estuario río Yellow, China	La diversidad de <i>nirK</i> responde más a los factores ambientales que <i>nirS</i> , pero la abundancia de <i>nirS</i> se ve afectada por los factores ambientales	(Li <i>et al.</i> , 2017)
21	nirS1F- nirS6R	Columna de agua	Estuario río Yangtze, China	78% de secuencias relacionadas con ambientes marinos, alta diversidad a $O_2 < 10\mu M$, pero con bajo potencial desnitrificante	(Zhang <i>et al.</i> , 2014)
22	nirS1F- nirS6R	Sedimentos	Bahía Chesapeake, EE. UU	Menor diversidad a > PSU y < NO_3^- . 25 % de las secuencias relacionadas con el medio marino	(Francis <i>et al.</i> , 2013)
23	nirS1F- nirS6R	Sedimentos	Estuario Fitzroy, Australia	Correlación negativa con el O_2 y la salinidad	(Abell <i>et al.</i> , 2010)

24	nirS1F-nirS6R	Sedimentos	Estuario Yangtze. China	Correlación positiva con la salinidad, NH_4^+ y NO_3^-	(Zheng <i>et al.</i> , 2015)
25	nirS1F-nirS6R, cd3aF-R3cd, EPSnirS511F-1100R o 1105R	Sedimentos	Ventila hidrotermal Calypso, Nueva Zelanda	Los primers EPSnirs511F/ESPnirS1105R presentan un mejor rango de amplificación de la diversidad del gen <i>nirS</i> en diversas muestras ambientales	(Murdock & Juniper, 2017)
26	nosZ661f - nosZ1773r	Sedimentos	Ventila hidrotermal Guaymas, Golfo de California	Esta comunidad presenta una alta afinidad al NO_3^- y altas concentraciones de C orgánico disuelto	(Bowles <i>et al.</i> , 2012)
27	nirS1F-nirS6R	Sedimentos	Ventila hidrotermal Juan de Fuca Ridge, EE. UU	Baja diversidad de <i>nirS</i> asociada a baja concentración de NO_3^-	(Bourbonnais <i>et al.</i> , 2014)
28	nirS1F-nirS-q-R, nirK-q-F-nirK1040	Sedimentos	Bahía de San Francisco, EE. UU	La abundancia de <i>nirK</i> fue alta en zona ribereña y <i>nirS</i> en zonas marinas	(Mosier & Francis, 2010)
29	nirS1F-nirS6R, 583F-nirK5R CuNIR4	Acuífero	Playa Huntington, California. EE. UU	<i>nirK</i> diferenciado por dos grupos: uno asociado a baja concentración de NO_3^- /alta salinidad, el segundo a alta concentración de NO_3^- /baja salinidad. <i>nirS</i> más diverso sin ninguna especialización ambiental	(Santoro <i>et al.</i> , 2006)
30	cd3aF-R3cd	Sedimentos y fondo del agua	Mar del Norte, Holanda	Mayor diversidad en estaciones oceánicas que en costeras, diversidad controlada por la disponibilidad de C orgánico	(Fan <i>et al.</i> , 2015b)
31	cd3aF-R3cd, F1aCu-R3Cu.	Tapetes microbianos costeros	Costa norte isla Schiermonnikoog, Holanda	Mayor diversidad de <i>nirS</i> y <i>nirK</i> con mayor disponibilidad de NH_4^+ , PO_4^{3-} , NT y C orgánico.	(Fan <i>et al.</i> , 2015a)
32	cd3aF-R3cd, nirK1F-nirK5R	Sedimentos costeros	Mar del Sur, China	Mayor diversidad de <i>nirS</i> a una baja relación $\text{NO}_3^-/\text{NO}_2^-$, contrario a <i>nirK</i> con mayor diversidad a una relación alta	(Li <i>et al.</i> , 2013)
33	nirS1F-nirS6R, 583F-nirK5R, Nos661F - Nos1773R	Sedimentos costeros	Gullmarsfjor, Suecia	Desnitrificación como proceso dominante	(Wittorf <i>et al.</i> , 2016)

Tabla S2. Muestras amplificadas y secuenciadas de la columna de agua y sedimento de ambos fases ENSO. Abreviaturas: AC: Agua costera, AM1: Agua intermedia 1, AM2: Agua intermedia 2, AO1: Agua oceánica 1, AO2: Agua oceánica 2, SC: Sedimento costero, SM1: Sedimento intermedio 1, SM2: Sedimento intermedio 2, SO1: Sedimento oceánico 1, SO2: Sedimento oceánico 2. Gris: Muestra inexistente, punto negro: Muestra secuenciada.

Estación	Profundidad	Amplificadas		Secuenciadas	
		Maz-IV	Maz-V	Maz-IV	Maz-V
AC [32 m]	Superficie	SI	SI		
	Máximo profundo de clorofila	SI	SI		
	Agua mezclada		SI		
	Fondo	SI	SI	●	
AM1 [110 m]	Superficie	SI			
	Máximo profundo de clorofila	SI			
	Base oxiclina	SI			
	Fondo	SI			
AM2 [105 m]	Superficie		SI		
	Máximo profundo de clorofila		SI		
	Base oxiclina		SI		
	Fondo		SI		●
AO1 [422 m]	Superficie	SI	SI		
	Máximo profundo de clorofila	SI	SI		
	Base oxiclina	SI	SI		
	Núcleo ZMO	SI	SI		
	Fondo	SI	SI	●	
AO2 [690 m]	Superficie	SI	SI		
	Máximo profundo de clorofila	SI	SI		
	Base oxiclina	SI	SI		
	Núcleo ZMO	SI	SI		
	Fondo	SI	SI	●	●
SC	0-10 cm	SI	SI	●	●
SM1	0-10 cm	SI		●	
SM2	0-10 cm		SI		●
SO1	0-10 cm	SI	SI	●	
SO2	0-10 cm	SI	SI	●	●

Tabla S3. Procedencia de las 12 asignaciones más abundantes de las secuencias del gen *nirS*.

Muestras	Número	Procedencia	Características	Autor
AB261494	1	Sedimentos de la costa de Japón	Asociada a lodos activos	Nakano <i>et al.</i> , 2008
GQ443968	2	Sedimentos del Mar de China Meridional	Relacionada con <i>Scalindua-nirS</i> y participa en la degradación de NO ₂ ⁻	Li <i>et al.</i> , 2013
KP723717	3	Sedimentos del Mar de Amundsen Polynya, Antártida	Relacionada con <i>Pseudomonas aeruginosa</i> , con una capacidad metabólica flexible en la reducción de compuestos oxidados del N	Choi <i>et al.</i> , 2015
MF093501	4	Sedimentos del Mar de China Meridional	Relacionada con <i>Scalindua-nirS</i> y participa en la degradación de NO ₂ ⁻	Yu <i>et al.</i> , 2018
KP959663	5	Sedimentos del Mar del Norte, Atlántico	Relacionada con clonas de diferentes ambientes (ej: habías, ambientes hipersalinos y clonas del Mar Báltico)	Fan <i>et al.</i> , 2015a
KP723711	6	Sedimentos del Mar de Amundsen Polynya, Antártida	Relacionada con <i>Pseudomonas aeruginosa</i> , con una capacidad metabólica flexible en la reducción de compuestos oxidados del N	Choi <i>et al.</i> , 2015
LC65.218.2	7	Sedimentos del estuario Yangtze, China	Asociadas a hábitats con alta salinidad	Zheng <i>et al.</i> , 2015
KP959667	8	Sedimentos del Mar del Norte, Atlántico	Relacionada con clonas de diferentes ambientes (ej: bahías, ambientes hipersalinos y Mar Báltico)	Fan <i>et al.</i> , 2015a
AprY5BF79	9	Agua costera, estuario Yangtze, China	Asociada a partículas suspendidas	Zhang <i>et al.</i> , 2014
KP959682	10	Sedimentos del Mar del Norte, Atlántico	Relacionada con clonas de diferentes ambientes (ej: bahías, ambientes hipersalinos y Mar Báltico)	Fan <i>et al.</i> , 2015a
KP959649	11	Sedimentos del Mar del Norte, Atlántico	Relacionada con clonas de diferentes ambientes (ej: bahías, ambientes hipersalinos y Mar Báltico)	Fan <i>et al.</i> , 2015a
KX389011	12	Sedimentos de marismas costeras del Golfo de México	Asociada a fuentes de hidrocarburo	Bae <i>et al.</i> , 2018

Tabla S4. Resultados del análisis estadístico del análisis de CCA de las variables ambientales.

	DF	ChiSquare	F	pr(>F)
NO₂⁻	1	0.14749	0.8616	0.553
NO₃⁻	1	0.4117	2.4051	0.032 *
PO₄⁺	1	0.3495	2.0417	0.055 .
Residual	4	0.68472		

Significancia: 0: ***, 0.001: **, 0.01: *, 0.05: .
pr (>F) valores basados en 999 permutaciones.

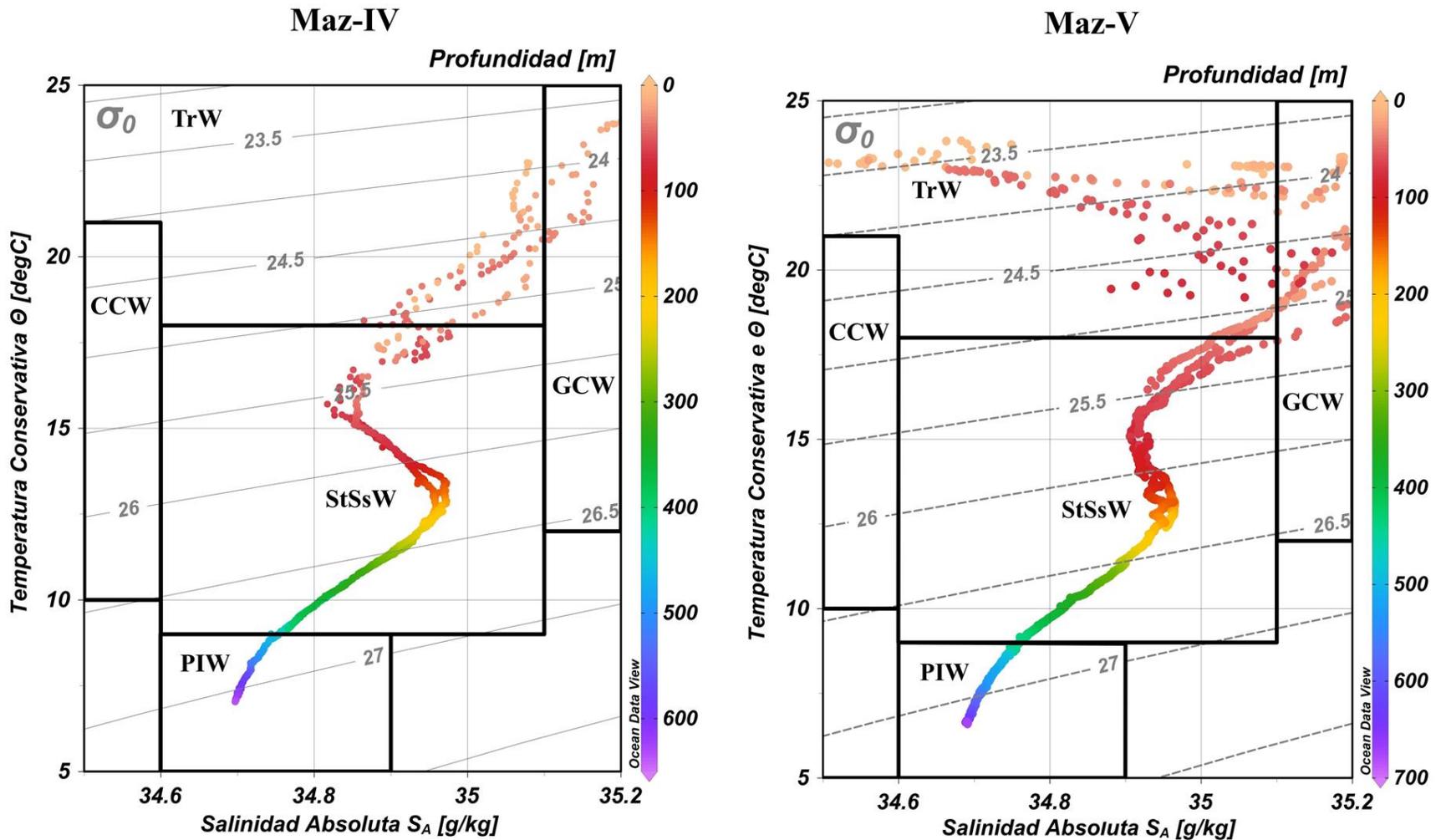


Figura S1. Diagramas T/S de La Niña (Maz-IV, izquierda) y El Niño (Maz-V, derecha) frente al Puerto de Mazatlán. Abreviaturas de las masas de agua: Golfo de California (GCW), Corriente de California (CCW), Agua Transicional (TrW), Subtropical Subsuperficial (StSsW), Intermedia del Pacífico (PIW).

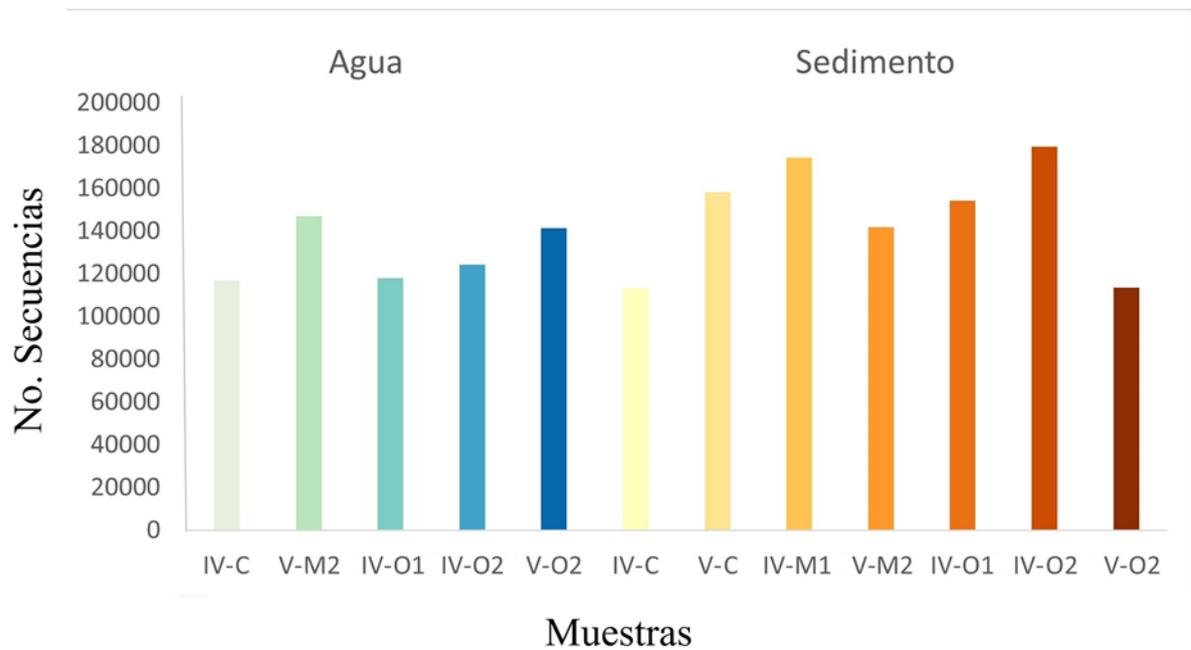


Figura S2. Número de secuencias obtenidas por muestra y cruceros en la secuenciación por Illumina. Las muestras se encuentran ordenadas por ambiente y zona: Agua (degradado azul), sedimento (degradado naranja). Abreviaturas: IV: La Niña (Maz-IV), V: El Niño (Maz-V), C: costera, M1: intermedia 1, M2: intermedia 2, O1: oceánica 1, O2: oceánica 2.

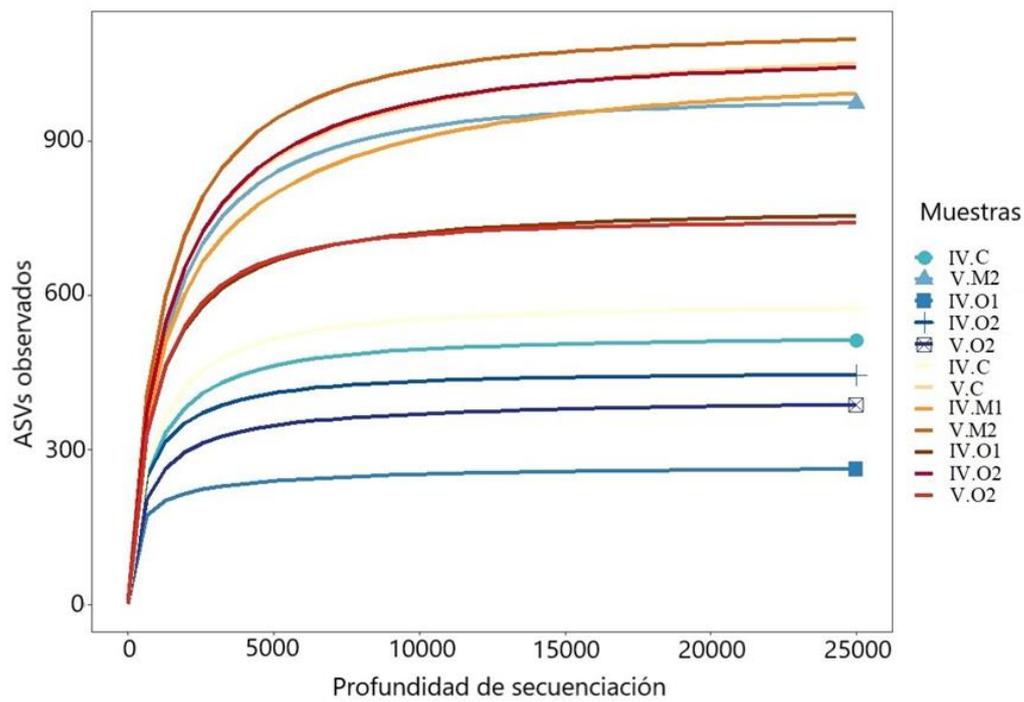


Figura S3. Curvas de rarefacción. Se muestra el número de ASV obtenido por muestra y la profundidad de secuenciación. Muestras de agua de fondo (degradado azul) muestras de sedimento (degradado naranja) de ambos cruceros. Abreviaturas: IV: La Niña (Maz-IV), V: El Niño (Maz-V). C: costeros, M1: intermedios 1, M2: intermedios 2, O1: oceánicos 1, O2: oceánicos 2.

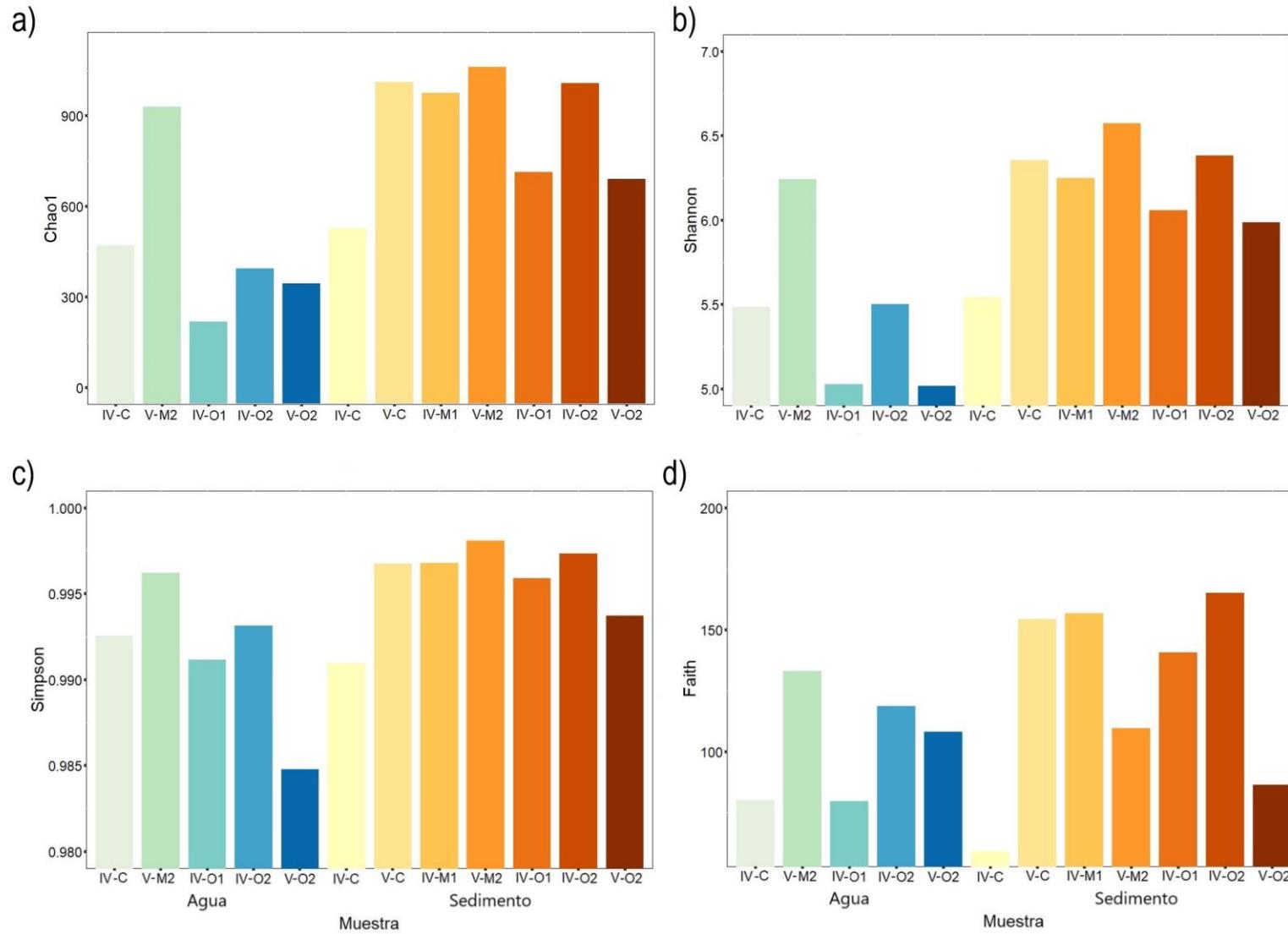


Figura S5. Gráfica de barras de los índice a) Chao-1, b) Shannon, c) Simpson y d) Faith de las muestras de agua (degradado azul) y sedimento (degrado naranja) de ambos cruceros. Abreviaturas: IV: La Niña (Maz-IV), V: El Niño (Maz-V). C: costeros, M1: intermedios 1, M2: intermedios 2, O1: oceánicos 1, O2: oceánicos 2.

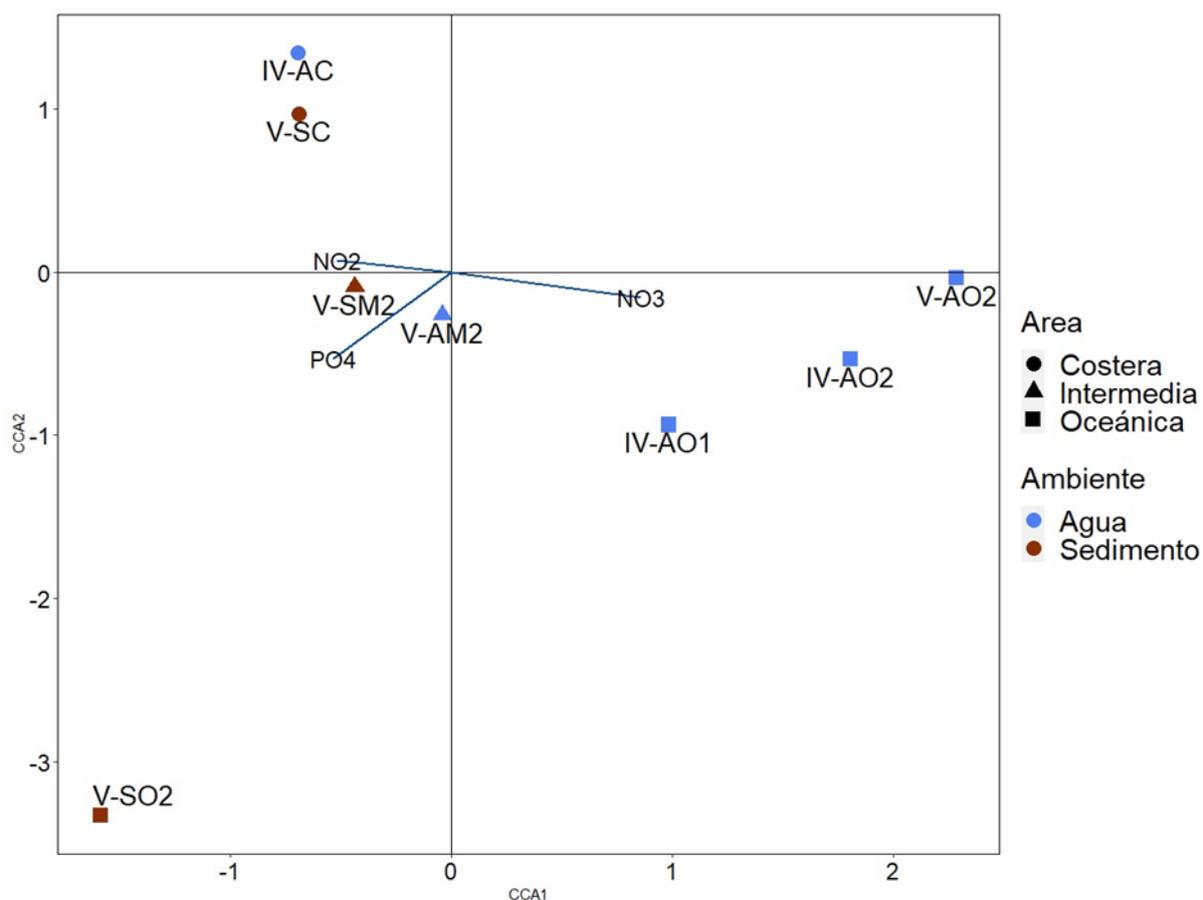


Figura S6. Gráfica de correspondencia canónica (CCA) de las muestras de de agua de ambas fases ENSO y las muestras de sedimento durante El Niño (Maz-V). Cada vector y su longitud indican la fuerza de correlación de la variable con las muestras ($p < 0.05$). Abreviaturas: AC: agua costera, AM2: agua intemerdia 2, AO1: agua oceánica 1, AO2: agua oceánica 2, SC: sedimento costero, SM2: sedimeno intermedio 2, SO2: sedimento oceánico 2.

