



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES ZARAGOZA

CARRERA DE BIOLOGÍA

**Estudio de la distribución de bacterias desnitrificantes aisladas de
sedimentos en la Bahía de San Quintín, Baja California**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:
LICENCIADO EN BIOLOGÍA

P R E S E N T A :

PEDRO PEÑA ZUÑIGA

JURADO DE EXÁMEN

DIRECTORA: DRA. SILVIA PAJARES MORENO
Instituto de Ciencias del mar y Limnología

ASESOR: DR. JUSTO SALVADOR HERNÁNDEZ AVILÉS
Facultad de Estudios Superiores Zaragoza

ASESOR: DR. JORGE ANTONIO VALDIVIA ANISTRO
Facultad de Estudios Superiores Zaragoza

SINODAL: DRA. GUERRA HERNANDEZ ELOISA ADRIANA
Facultad de Estudios Superiores Zaragoza

SINODAL: M. EN C. ORTIZ BURGOS GABRIELA SELENE
Facultad de Estudios Superiores Zaragoza

CIUDAD DE MÉXICO

21 de noviembre de 2023



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

Agradecimientos y dedicatorias

Quisiera expresar mi más sincero agradecimiento a todas las instituciones que hicieron posible la culminación de este proyecto de tesis. En primer lugar, agradezco a la Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM) por ser mi segundo hogar, por formarme académicamente y por ser mi principal fuente de conocimiento desde la preparatoria. Así mismo, agradezco al Instituto de Ciencias del Mar y Limnología (ICMyL-UNAM) por brindarme la oportunidad de realizar esta investigación y por proporcionarme los recursos necesarios para llevarla a cabo. Además, le doy las gracias al Consejo Nacional de Humanidades, Ciencias y Tecnologías (CONAHCYT) por financiar este estudio y por la beca de ocho meses que me fue otorgada a través del proyecto de grupo Ciencia de Frontera “*Ciclo del Nitrógeno en sedimentos marinos: procesos canónicos y nuevos actores evaluados en una laguna costera influenciada por surgencias y con acuicultura de ostras* (CF-2019-682328), en donde la Dra. Pajares (ICMyL-UNAM) es una de las co-representantes técnicas y el Dr. Guillermo Alberto Samperio Ramos (UABC) es el representante principal.

Estoy muy agradecido con mi directora, la Dra. Silvia Pajares Moreno (ICMyL-UNAM), por su dedicación, paciencia y guía durante cada etapa de este proyecto. Quiero reconocer su compromiso incansable, su apoyo constante y su valioso tiempo dedicado a revisar mis avances y proporcionarme retroalimentación constructiva. Su pasión por la investigación y su profundo conocimiento en el campo de estudio, así como su eficiencia y organización al trabajar, fueron una inspiración para mí durante todo este proceso. Agradezco sinceramente sus enseñanzas y el fomento de mi crecimiento académico, profesional y personal. La admiro, respeto y aprecio mucho doctora.

Los resultados de esta tesis fueron enriquecidos por los datos y el esfuerzo de dos diferentes grupos académicos. Es por ello que le agradezco profundamente al equipo del Dr. Guillermo Alberto Samperio Ramos (UABC) por realizar los análisis físico-químicos y de textura en las muestras sedimentarias. Así mismo, le doy las gracias a la División de Ecología del Atlántico de la Agencia de Protección Ambiental de EE.UU por proporcionarme las concentraciones de carbono orgánico total y nitrógeno total de las muestras.

Agradezco profundamente a Marisela Zuñiga Flores y a Cesar Peña Carvajal por ser mis papás, por ustedes soy quien soy y es por eso que quisiera dedicarles esta tesis, me gustaría que sepan que estoy haciendo lo que me gusta y lo que más me hace más feliz y todo gracias al amor, esfuerzo, dedicación y confianza que han depositado en mí. Mamá gracias por cuidarme, quererme, preocuparte por mí, recordarme que tengo que comer, ser mi médico de cabecera (y de hecho de toda la familia) y mi sostén emocional, por pararme todas las mañanas (incluso cuando tenía que ir a la FES), por ayudarme

a hacer las tareas de la casa que me correspondían y por ser la primera en mencionarme la palabra “Biología marina”. Tomé prestado tu sueño y al final lo hice mío, gracias a ti comencé esta bonita aventura. Papá gracias por sostener económicamente a los cuatro y por enseñarme un poco de lo mucho que sabes. Aún me resulta increíble ver como pudiste darnos para comer, para estudiar, para vestir y al mismo tiempo estar construyendo una casa desde cero, con tus propias manos, eres la persona más correcta que he conocido y algún día quisiera tener un poco de tu carácter, tus principios y tus valores; me gustaría mucho triunfar en el ámbito laboral como tú lo has hecho. Ambos son las personas más inteligentes, admirables y resilientes que he conocido, los amo y siempre serán mis héroes, mis mayores ejemplos a seguir.

Agradezco a Citlali Peña Zuñiga y Angel Peña Zuñiga por todo el apoyo que me han dado. Gorditos siempre atesoraré el tiempo que hemos compartido juntos, los días que nos hemos pasado viendo anime, paseando, platicando o jugando cualquier cosa han sido los momentos más felices de mi vida. Son mi motor para poder seguirme esforzando, me han enseñado mucho, admiro lo fieles que son a sí mismos y el empeño que ponen para cumplir sus metas, de hecho, me encanta ver como poco a poco van cumpliendo sus objetivos, estoy seguro de que los dos lograrán cosas muy grandes. Los amo y me siento muy orgulloso de poder ser su hermano.

Agradezco a Akira por haber llegado a mi vida, por estar siempre junto a mí y por recibirme con tanta alegría cada vez que llego a casa.

Le doy las gracias a todos mis compañeros y amigos con los que he compartido momentos dentro y fuera de la escuela. Especialmente a David Ruiz Blancas, Roman Ramos Castañeda, Luis Alfonso Muñoz Rodea y Omar Franco Rodríguez, ustedes han formado parte de momentos clave en mi vida.

Gracias a mis amigas de laboratorio Andrea Coss Alcantar y Karla Zeferino García por las risas, las historias, las comidas y todos los momentos que compartimos, las dos hicieron que mi último año de la carrera fuera muy feliz. Karlita fuiste la mejor maestra de laboratorio que he tenido. Andy gracias por confiarme todo lo que me contaste, por escucharme y por aconsejarme tanto en lo personal como en lo académico.

No podría concluir sin agradecerle al Dr. Justo Salvador Hernández Avilés (FES-Zaragoza) por recordarme el amor que siento por la biología tras una pandemia que me dejó mal anímicamente. No solo me ayudó a recuperar la confianza que tenía en mí, también me mostró como aplicar la investigación para ayudar a las comunidades marginadas y me enseñó que la ciencia también puede ser arte.

¡Gracias a todos por su apoyo y confianza!

Índice

I. Índice de tablas, figuras y anexos	6
II. Resumen.....	9
III. Introducción.....	10
IV. Marco teórico.....	12
4.1.- Definición de estuario y laguna costera	12
4.2.- Regulación de la desnitrificación en sedimentos costeros.....	13
4.3.- Microorganismos involucrados en la desnitrificación de sistemas marinos y sus condiciones de cultivo.....	14
4.4.- Desnitrificación en estuarios inversos: El caso de la bahía de San Quintín.....	15
4.5.- Importancia del pasto marino en la desnitrificación de la Bahía de San Quintín	16
V. Planteamiento del problema y preguntas de investigación.....	17
5.1.- Planteamiento del problema.....	17
5.2.- Preguntas de investigación.....	17
VI. Hipótesis.....	17
VII. Objetivos	18
7.1.- Objetivo general.....	18
7.2.- Objetivos particulares	18
VIII. Materiales y métodos	19
8.1.- Zona de estudio	19
8.2.- Muestreo	19
8.3.- Análisis fisicoquímicos de agua y sedimento del brazo San Quintín	20
8.4.- Aislamiento de bacterias desnitrificantes aerobias	21
8.5.- Caracterización de la morfología colonial de los aislados obtenidos	21
8.6.- Extracción de DNA de los aislados representantes por morfotipo	21
8.7.- Amplificación de genes marcadores desnitrificantes por PCR en DNA de aislados representantes.....	22
8.8.- Cepario de aislados bacterianos con genes marcadores desnitrificantes.....	23
8.9.- Análisis filogenético de los aislados bacterianos con genes marcadores desnitrificantes	23
8.10.- Diversidad α y β de los aislados con genes marcadores desnitrificantes	24

8.11.- Relación entre la distribución de los aislados bacterianos con genes marcadores desnitrificantes y las propiedades fisicoquímicas de las muestras	25
8.12.- Pruebas de reducción de NO_3^- y NO_2^- (modificada de Norris & Ribbons, 1972)	25
IX. Resultados	26
9.1.- Análisis fisicoquímicos de agua y sedimento del brazo San Quintín	26
9.2.- Aislamiento, caracterización morfológica y extracción de DNA de las bacterias presentes en las muestras sedimentarias del brazo San Quintín	30
9.3.- Distribución de los aislados desnitrificantes y de sus genes marcadores.....	31
9.4.- Taxonomía, filogenia y distribución de las especies con genes marcadores desnitrificantes	35
9.5.- Diversidad α de los aislados bacterianos con genes marcadores desnitrificantes.....	40
9.6.- Diversidad β y relación entre la distribución de los aislados bacterianas con genes marcadores desnitrificantes y las propiedades fisicoquímicas de las muestras	41
9.7.- Verificación de actividad desnitrificante en los aislados bacterianos con genes <i>nirK</i> , <i>nirS</i> y/o <i>nosZ</i>	44
X. Discusión	46
10.1.- Comportamiento de las variables fisicoquímicas en el brazo San Quintín	46
10.2.- Distribución de bacterias con genes desnitrificantes aisladas de los sedimentos del brazo San Quintín.....	47
10.3.- Taxonomía y filogenia de las especies con genes marcadores desnitrificantes	48
10.4.- Diversidad α y β y distribución de las especies con genes marcadores desnitrificantes	50
10.5.- Relación entre la distribución de los aislados bacterianos con genes marcadores desnitrificantes y las propiedades fisicoquímicas de las muestras	50
10.6.- Verificación de la actividad desnitrificante en los representantes bacterianos con genes desnitrificantes	51
10.7.- Perspectivas y sugerencias	52
XI. Conclusiones	53
XII. Referencias.....	54
XIII. Anexos	62

I. Índice de tablas, figuras y anexos

Tabla 1 Taxones representativos poseedores del gen <i>nosZ</i> de los clados I y II (Jones et al., 2013, modificado por Shan et al., 2021).	15
Tabla 2 Cebadores usados para amplificar fragmentos de los genes <i>nirK</i> , <i>nirS</i> , <i>nosZ</i> y <i>16S rRNA</i>	22
Tabla 3 Condiciones de amplificación de los dos pares de cebadores utilizados para amplificar fragmentos de los genes desnitrificantes <i>nirK</i> , <i>nirS</i> , <i>nosZ</i> y <i>16S rRNA</i>	23
Tabla 4 Índices de diversidad α utilizados en este estudio.	24
Tabla 5 Temperatura, salinidad y oxígeno disuelto del agua en las tres estaciones de muestreo.	26
Tabla 6 Índices de diversidad α : Riqueza específica (número de especies presentes por muestra), Chao1, Simpson y Shannon-Wiener calculados a partir de las abundancias de los aislados bacterianos con genes desnitrificantes por ambiente estudiado.	41
Tabla 7 Características de los aislados representantes cuya actividad de los genes desnitrificantes identificados por PCR pudo ser comprobada mediante la prueba colorimétrica modificada de Norris & Ribbons (1972).	44
Tabla 8 Registro de genes <i>nirS</i> , <i>nirK</i> y/o <i>nosZ</i> en especies bacterianas con genomas completos en el NCBI.	45
Figura 1 Genes, enzimas y cofactores involucrados en el ciclo del nitrógeno (N).	11
Figura 2 Mapa de la bahía de San Quintín, Baja California, modificado de Watson et al. (2020). Los puntos negros señalan las estaciones de muestreo y los gradientes verdes y grises muestran los diferentes ecotonos y entradas fluviales esporádicas de la bahía.	20
Figura 3 Perfiles verticales de la concentración de oxígeno disuelto (mg L ⁻¹) en las muestras sedimentarias con (derecha) y sin (izquierda) <i>Zostera marina</i> del brazo San Quintín.	26
Figura 4 Distribución de los valores promedio de pH \pm error estándar de la media de muestras de sedimento (superficie: 0-5 cm, fondo: 15-20 cm) analizadas por triplicado.	27
Figura 5 Porcentajes promedios \pm error estándar de la media de la granulometría en las muestras de sedimento (superficie: 0-5 cm, fondo: 15-20 cm) con (■) y sin (■) <i>Zostera marina</i> , analizadas por triplicado en las tres estaciones: a) Boca, b) Zona media y c) Cabeza.	27

Figura 6 Porcentaje promedio de a) Carbono orgánico total y b) Nitrógeno total \pm error estándar de la media de muestras de sedimento (superficie: 0-5 cm, fondo: 15-20 cm) con (■) y sin (■) <i>Zostera marina</i> , analizadas por triplicado.	28
Figura 7 Concentración promedio de materia orgánica lábil \pm error estándar de la media de muestras de sedimento (superficie: 0-5 cm, fondo: 15-20 cm) analizadas por triplicado.	29
Figura 8 Concentración promedio de a) Fe(II) y b) Fe(III) \pm error estándar de la media de muestras de sedimento (superficie: 0-5 cm, fondo: 15-20 cm) con (■) y sin (■) <i>Zostera marina</i> , analizadas por triplicado.	30
Figura 9 a) Número de bacterias aisladas con genes desnitrificantes. El número encima de la barra refleja la abundancia registrada. b) Distribución de los tres genes desnitrificantes en las 1371 bacterias aisladas del brazo San Quintín.	31
Figura 10 a) Número de bacterias con gen <i>nirS</i> aisladas en cada estación. El número encima de la barra indica la abundancia de bacterias registradas. b) Porcentaje de la abundancia de bacterias con gen <i>nirS</i> por profundidad y hábitat.	32
Figura 11 a) Número de bacterias con gen <i>nirK</i> aisladas en cada estación. El número encima de la barra indica la abundancia de bacterias registradas. b) Porcentaje de la abundancia de bacterias con gen <i>nirK</i> por profundidad y hábitat.	33
Figura 12 a) Número de bacterias con gen <i>nosZ</i> aisladas en cada estación. El número encima de la barra indica la abundancia de bacterias registradas. b) Porcentaje de la abundancia de bacterias con gen <i>nosZ</i> por profundidad y hábitat.	34
Figura 13 Diagramas de Venn de la distribución de las 25 especies de bacterias desnitrificantes en: a) estaciones de muestreo, b) profundidad del estrato, c) hábitat de la muestra.	36
Figura 14 Distribución de la abundancia de los aislados representados por 17 de las 25 especies clasificadas en los diferentes ambientes evaluados en el brazo San Quintín. Las especies se dividieron en las clases a) γ -Proteobacteria y b) α -Proteobacteria, Bacilli y Actinobacteria. P/D: Con <i>Zostera marina</i> / Desnudo; S/F: Superficie (0-5 cm) / Fondo (15-20 cm).	37
Figura 15 Árbol filogenético de las secuencias de 16S rRNA de los representantes bacterianos desnitrificantes aislados en sedimentos del brazo San Quintín. El valor del bootstrap se muestra en círculos azules en los nodos. El color de los nombres bacterianos denota los diferentes géneros encontrados y el color de las ramas representa la clase correspondiente: γ -Proteobacteria (—), α -Proteobacteria (—), Bacilli (—) y Actinobacteria (—). En paréntesis se indica el medio de cultivo de aislamiento: Marino (M) o nutritivo (N). La gráfica de barras a la derecha del árbol presenta la	

abundancia relativa de los aislados obtenidos de cada representante en cada estación: boca (■), zona media (■) y cabeza (■). En el sistema binario se muestra la presencia (■) o ausencia (□) de los genes nirK, nirS y nosZ..... 40

Figura 16 | a) Mapa de calor y b) Matriz de correlación de Spearman realizados a partir de las abundancias de especies y datos fisicoquímicos de los sedimentos. P/D: Con *Zostera marina* / Desnudo; S/F: Superficie (0-5 cm) / Fondo (15-20 cm); TCCHO: Materia orgánica lábil; C: Carbono orgánico total; N: Nitrógeno total. *= Datos significativos (p-value ≤ 0.05)..... 42

Figura 17 | Escalamiento multidimensional no métrico (NMDS, por sus siglas en inglés) de la distribución de las muestras en función de la abundancia de aislados de las especies bacterianas clasificadas y su relación con los vectores ambientales significativos (p-value ≤ 0.05). Nivel de estrés (Bray-Curtis): 0.069. C: Carbono orgánico total; N: Nitrógeno total. 43

Anexo 1 Características de los medios de cultivo empleados	62
Anexo 2 Prueba de reducción de NO ₃ ⁻ y NO ₂ ⁻ (modificada de Norris & Ribbons, 1972)	63
Anexo 3 Abundancia de colonias bacterianas aisladas	64
Anexo 4 Taxonomía de los aislados bacterianos con genes marcadores desnitrificantes.....	65
Anexo 5 Especies bacterianas desnitrificantes únicas y compartidas.....	66
Anexo 6 Diferencias y similitudes morfológicas de los aislados.....	68
Anexo 7 Aislados bacterianos con genes marcadores desnitrificantes	70
Anexo 8 Árbol filogenético por hábitat y profundidad.....	71
Anexo 9 NMDS	72

II. Resumen

El ciclo del nitrógeno es uno de los principales responsables de la regulación de la productividad primaria en los sistemas marinos. La desnitrificación es un importante proceso de este ciclo que consiste en la respiración de nitrato a nitrógeno molecular principalmente a través de microorganismos heterótrofos anaerobios facultativos. Este proceso puede liberar óxido nitroso a la atmósfera, participa en el reciclaje de la materia orgánica y controla la eutrofización de los estuarios. Debido a que los sedimentos estuarinos representan un nicho importante para la desnitrificación, el objetivo de este trabajo fue evaluar la distribución y actividad de bacterias aerobias desnitrificantes aisladas de sedimentos a dos profundidades y en dos hábitats (con y sin *Zostera marina*) a lo largo de un transecto en la bahía de San Quintín, Baja California, y su relación con diferentes parámetros ambientales. Se aislaron 1611 colonias bacterianas agrupadas, por similitud en su morfología colonial, en 155 grupos, de los cuales 66 representantes de 1371 aislados bacterianos presentaron genes marcadores desnitrificantes (*nirK*, *nirS* y/o *nosZ*) detectados por la reacción en cadena de la polimerasa. La mayor abundancia de bacterias desnitrificantes se encontró en las muestras de sedimento superficiales, en particular, en aquellas con *Zostera marina* y de la boca del estuario. La distribución de estos aislados fue heterogénea y estuvo influenciada principalmente por el pH, el carbono orgánico total, el nitrógeno total y la textura del sedimento. Las bacterias se clasificaron en 23 especies pertenecientes a 4 clases: γ -Proteobacteria (82.4% de bacterias aisladas), α -Proteobacteria (7.9%), Bacilli (5.7%) y Actinobacteria (4%). También se realizó la prueba colorimétrica de reducción de nitratos y nitritos en las bacterias portadoras de estos genes, presentando actividad desnitrificante 7 especies pertenecientes a *Paracoccus marcusii*, *Pseudomonas songnenensis*, *Psychrobacter piscatorii*, *Psychrobacter celer*, *Psychrobacter alimentarius*, *Planococcus maritimus* y *Planococcus rifietaensis*. Los resultados sugieren que estos sedimentos presentan una elevada abundancia de bacterias aerobias cultivables con genes *nirK*, *nirS* y *nosZ*, sin embargo, en la mayoría no se pudo comprobar su actividad desnitrificante, posiblemente debido a la inactividad de estos genes o de aquellos involucrados en la reducción de nitrato a nitrito (*nas*, *nar* y/o *nap*).

III. Introducción

El nitrógeno (N) es ecológicamente importante ya que, junto con el fósforo, es el responsable directo de la producción primaria en medios acuáticos (Tyrrell, 1999). Además, la disponibilidad de N también regula la fuerza de la bomba biológica, uno de los mecanismos que contribuyen a la absorción oceánica del dióxido de carbono (CO₂) atmosférico (Gruber & Galloway, 2008; Herndl & Reinthaler, 2013).

El ciclo marino del N presenta una amplia variedad de estados de oxidación en sus subproductos (Figura 1). Su ruta biogeoquímica puede ser descrita por tres procesos (Pajares & Ramos, 2019): **1)** Adición de N: Fijación biológica de N molecular (N₂) y deposición atmosférica; **2)** retención de N: Nitrificación, reducción desasimilatoria de nitrato (NO₃⁻) a amonio (NH₄⁺) (DNRA) y asimilación de N; y **3)** pérdida de N: Desnitrificación y oxidación anaeróbica del NH₄⁺ (anammox).

De las anteriores rutas mencionadas destaca la desnitrificación por su influencia en tres procesos ecológicos importantes: **1)** sumidero o emisor de óxido nitroso (N₂O), un potente gas de efecto invernadero 300 veces más fuerte que el CO₂ y el principal degradador del ozono estratosférico (Lassey et al., 2007; Ravishankara et al., 2009); **2)** descomposición, mineralización y posterior reciclaje de la materia orgánica (Jahnke et al., 1982); **3)** vía de eliminación biológica de N en zonas deficientes en oxígeno (O₂), como los sedimentos marinos (Devol, 2015). En ambientes estuarinos se ha propuesto a la desnitrificación como un “filtro” o “sumidero” natural de compuestos reactivos nitrogenados pues elimina hasta un 50% del N (Naqvi et al., 2006), contrarrestando procesos de eutrofización y aportes de NO₃⁻ fluviales (Seitzinger et al., 1985; Hellemann et al., 2017).

La desnitrificación heterótrofa es una vía respiratoria modular realizada por diversos microorganismos anaerobios facultativos y consiste en la reducción secuencial de NO₃⁻, nitrito (NO₂⁻), óxido nítrico (NO) y N₂O a N₂ en una vía completa, o quedándose en N₂O en una vía incompleta, lo anterior, por medio de metaloenzimas (Figura 1; Zumft, 1997; Jones et al., 2013). El primer paso es la reducción del NO₃⁻ a NO₂⁻ a través de las enzimas nitrato reductasas dependientes de molibdeno Nas (nitrato reductasa asimilatoria citoplásmica), Nar (nitrato reductasa unida a membrana) y Nap (nitrato reductasa disimilatoria periplásmica) (Einsle & Kroneck, 2004). El NO₂⁻ producido es reducido a NO mediante enzimas nitrito reductasas con sitio activo de cobre (CuNir o NirK) o de hierro hemo (cdNIR o NirS), debido a que este es el primer paso hacia un producto gaseoso de N, los genes codificantes de esta reducción (*nir*) son los marcadores más utilizados para el estudio de la distribución de organismos desnitrificantes (Mosier & Francis, 2010; Pajares & Ramos, 2019). Posteriormente, las enzimas óxido nítrico reductasas (NORs) reducen el NO a N₂O con ayuda de su

cofactor de hierro, las principales enzimas de este tipo son qNOR (oxidantes de quinonas) y cNOR (oxidantes de citocromos), diferenciadas entre sí por la fuente de energía que utilizan (Zhang et al., 2020). El último paso de reducción del N₂O a N₂ se lleva a cabo por las enzimas óxido nitroso reductasas (N₂OR) en un proceso dependiente de cobre, cuyo gen codificante (*nosZ*) es ecológicamente importantes debido a que representa el principal sumidero del N₂O (Graf et al., 2014). Hay dos clados de microorganismos *nosZ* filogenéticamente distintos, los cuales fueron descritos por Jones et al. (2013).

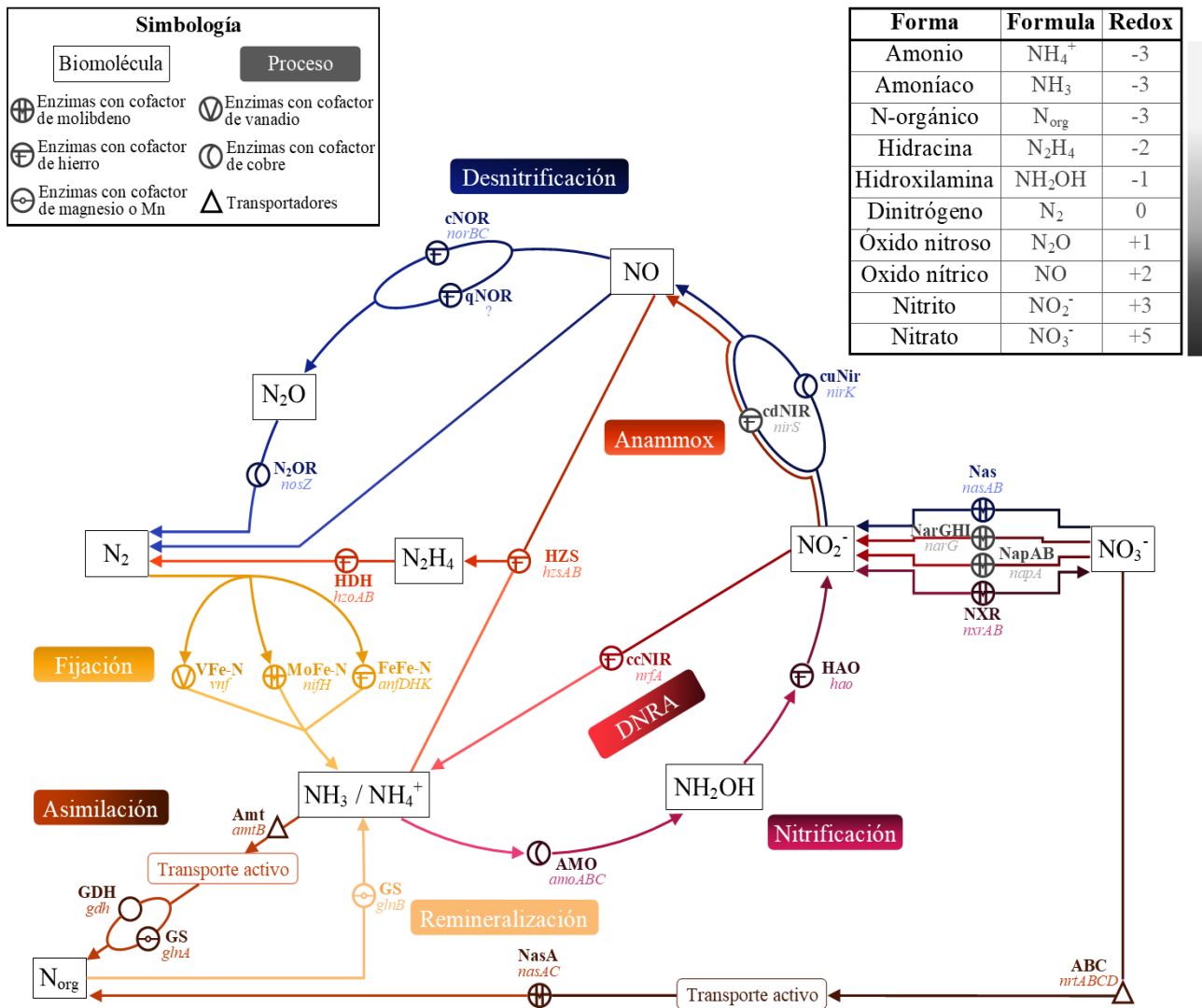


Figura 1 | Genes, enzimas y cofactores involucrados en el ciclo del N. ABC: transportadores tipo ABC; AMO: amonio monooxigenasa; Amt: transportadores de amonio; ccNIR: citocromo c nitrito reductasa periplásmica; cdNIR: nitrito reductasa de hierro hemo; cNOR: óxido nítrico reductasa de citocromo; CuNir: nitrito reductasa de cobre; FeFe-N: nitrogenasa de hierro; GDH: deshidrogenasa de glutamato; GS: sintetasa de glutamina; HAO: hidroxilamina oxidorreductasa; HDH: hidracina oxidasa; HZS: hidracina sintasa; MoFe-N: nitrogenasa de molibdeno; N₂OR: óxido

nitroso reductasa; NapAB: nitrato reductasas disimilatorias periplásmicas; NarGHI: nitrato reductasas unidas a membrana; Nas(A): nitrato reductasas asimilatorias citoplásmicas; NXR: nitrato oxidorreductasa; qNOR: óxido nítrico reductasa de quinona; VFe-N: nitrogenasa de vanadio.

La desnitrificación también puede llevarse a cabo en condiciones aeróbicas, comúnmente en sedimentos costeros permeables, donde las bacterias desnitrificantes utilizan simultáneamente el O₂ y el NO₃⁻ como aceptores de electrones (Gao et al., 2010; Marchant et al., 2017). La desnitrificación aeróbica sigue la misma secuencia de reducciones que la desnitrificación anaeróbica, sin embargo, en la desnitrificación aeróbica la reducción de NO₃⁻ suele ser catalizada, predominantemente, por Nap (Yang et al., 2020). Así mismo, la desnitrificación aeróbica supone dos ventajas ecológicas sobre la desnitrificación anaeróbica: una mayor disponibilidad de sustrato (NO₃⁻) mediante la facilitación de la coocurrencia nitrificación-desnitrificación, y una actividad metabólica ininterrumpida por el O₂ (Damashek & Francis, 2018; Yang et al., 2020).

Las zonas costeras son responsables del 44% de la desnitrificación global (Seitzinger et al., 2006), destacando las lagunas costeras por ocupar el 13% de las áreas litorales del mundo (Barnes, 1989) y cumplir importantes servicios ecológicos como la regulación del flujo de agua, nutrientes y organismos entre sistemas lóticos y marinos (Newton et al., 2014). En aquellas zonas costeras influenciadas por eventos de surgencia, como la bahía de San Quintín (Península de Baja California), la desnitrificación juega un papel importante, ya que previene la eutrofización del medio al eliminar el NO₃⁻ y la materia orgánica originada por el crecimiento poblacional de los microorganismos debido al excedente de nutrientes (Seitzinger, 1988; Hernández-Ayón et al., 2004; Paerl et al., 2020). Sin embargo, este proceso está siendo afectado por diversas actividades antropogénicas y sus consecuencias se ven reflejadas en el paso de los estuarios de sumidero a emisor de N₂O (Wells et al., 2018).

IV. Marco teórico

4.1.- Definición de estuario y laguna costera

Un *estuario* es un cuerpo de agua costero conectado al mar de manera periódica o permanente (Potter et al., 2010). Su hidrodinámica está dada por el nivel de *confinamiento* en función del océano, siendo bajo para aquellos sistemas regulados por el océano a través de las mareas y alto para los dominados por los aportes fluviales (Canu et al., 2016). Así, los estuarios se pueden clasificar en dos categorías (Pritchard, 1952): **1) Estuario clásico o positivo**: sistema costero donde el agua de mar se diluye con

los aportes fluviales y, 2) *Estuario inverso o negativo*: sistema costero donde el agua de mar se concentra en la cabeza por la ausencia o esporádica contribución fluvial.

Cuando el estuario contiene barreras geológicas o hidrológicas su nivel de salinidad aumenta, volviéndolo hipersalino (Potter et al., 2010). Si además se encuentra en regiones con climas áridos o semiáridos se formarán *lagunas costeras* (Moore & Slinn, 1984), también nombradas *estuarios hipersalinos* (Potter et al., 2010) o *estuarios lagunares* (Kennish & Paerl, 2010). Una laguna costera es un cuerpo de agua somero paralelo a la costa, separada del océano por barreras sedimentarias originadas por la acción de las mareas (*marismas*) y cuyos niveles de evaporación superan a los de precipitación (Kjerfve, 1994).

4.2.- Regulación de la desnitrificación en sedimentos costeros.

La desnitrificación en los sedimentos de los sistemas costeros se encuentra regulada principalmente por las concentraciones de O₂ disuelto, la materia orgánica y el NO₃⁻ (Cornwell et al., 1999).

Las bajas o nulas concentraciones de O₂ disuelto en los sedimentos de los sistemas costeros suelen favorecer a la desnitrificación (Damashek y Francis 2017), ya que la limitación de este compuesto promueve la síntesis y expresión de las enzimas desnitrificantes en los microorganismos (Zumft, 1997). Sin embargo, la desnitrificación también ha sido reportada en sedimentos costeros permeables utilizando simultáneamente el O₂ y el NO₃⁻ como aceptores de electrones (Gao et al., 2010; Marchant et al., 2017). Así mismo, esta co-respiración ha sido demostrada en diversos aislados bacterianos (Patureau et al., 2000; Kim et al., 2008).

La materia orgánica es la principal fuente de carbono (C) de los microorganismos desnitrificantes, por lo que a medida que aumenta su concentración en los sedimentos de las zonas costeras también incrementan las tasas de desnitrificación de estos lugares (Devol, 2015). Además, cuando el C orgánico se presenta en formas lábiles o disueltas los niveles de desnitrificación suelen ser altos, ya que los microorganismos lo asimilan fácilmente (García-Montiel et al., 2003; Stow et al., 2005).

El NO₃⁻ es relevante en la desnitrificación porque da inicio al proceso (Zumft, 1997). Debido a que las áreas litorales presentan elevadas concentraciones de NO₃⁻, los procesos desnitrificantes en estas zonas suelen ser elevados (Naqvi et al., 2006), sobre todo en aquellas influenciadas por eventos de surgencia como las zonas costeras del Pacífico de la Península de Baja California (Zaytsev et al., 2003; Hernández-Ayón, 2004).

Entre otras variables ambientales, las altas concentraciones de salinidad y los elevados valores de pH suelen reducir las abundancias de los microorganismos portadores de los genes *nirK*, *nirS* y *nosZ* en

sedimentos de sistemas costeros (Pan et al., 2023). Además, la disponibilidad de cobre puede favorecer la síntesis y expresión de los genes *nirK* y *nosZ*, en tanto que la de hierro lo hace con el gen *nirS* (Sullivan et al., 2013; Kessler et al., 2018). Por otra parte, la textura de los sedimentos suele influir en sus tasas de desnitrificación, disminuyendo en suelos limo-arcillosos y aumentando en aquellos dominados por arena (Gihring et al., 2010; Suykens et al., 2011).

4.3.- Microorganismos involucrados en la desnitrificación de sistemas marinos y sus condiciones de cultivo

La diversidad microbiana involucrada en la desnitrificación representa cerca del 10% de la población bacteriana cultivable, presentándose con características facultativas tanto en su respiración como en su alimentación (Heylen et al., 2006). Las bacterias desnitrificantes más abundantes se encuentran en las clases α , β y γ de las proteobacterias, destacando los géneros *Pseudomonas*, *Alcaligenes* y *Paracoccus* (Sousa & Bhosle, 2011). También se ha reportado este proceso en el dominio Archaea dentro de los géneros *Halobacterium*, *Haloarcula*, *Pyrobaculum*, *Halovibrio*, *Halospina* y *Ferroglobus* (Zumft, 1997; Sorokin et al., 2006). Entre los organismos eucariontes, ciertos hongos pertenecientes a los géneros *Fusarium*, *Giberella*, *Trichoderma*, *Cylindrocarpon*, *Chaetomium*, *Penicillium*, *Aspergillus* y *Hansenula*, así como algunas levaduras, son capaces de realizar la desnitrificación (Koyabashi et al., 1996; Zumft, 1997). Cabe resaltar que los sistemas enzimáticos de desnitrificación fúngica generalmente carecen de *nosZ*, por lo que este tipo de organismos representan una posible fuente de N_2O (Sousa & Bhosle, 2011). Así mismo, se han descrito procesos de desnitrificación en los foraminíferos bentónicos *Globobulimina turgida* y *Nonionella stella* (Piña-Ochoa et al., 2010).

La mayoría de las bacterias desnitrificantes crecen en diversas fuentes de C y energía (Payne, 1983; Zumft, 1997). Idealmente, un medio para aislar microorganismos desnitrificantes marinos debe consistir en una mezcla de sales, una fuente de C y NO_3^- , con un pH neutro (7.0–7.2) y una temperatura entre 28–30°C (Sousa & Bhosle, 2011). Para verificar si los genes desnitrificantes se encuentran “activos”, el cultivo bacteriano puede ser sometido a una evaluación visual mediante la *prueba de reducción de nitrato* utilizando α -naftilamina ($C_{10}H_9N$), ácido sulfanílico ($C_6H_7NO_3S$) y polvo de zinc (Norris & Ribbons, 1972).

En cuanto a los microorganismos poseedores del gen *nosZ*, Jones et al. (2013) los agruparon en dos clados. El clado I está representado por bacterias pertenecientes a α , β o γ -proteobacterias, mientras que el clado II está formado por diversos filos de bacterias (Tabla 1).

Tabla 1 | Taxones representativos poseedores del gen *nosZ* de los clados I y II (Jones et al., 2013, modificado por Shan et al., 2021).

<i>nosZ</i>	Filo	Taxón representativo
Clado I	α -Proteobacteria	<i>Paracoccus denitrificans</i> <i>Bradyrhizobium japonicum</i>
	β -Proteobacteria	<i>Thauera aromatica K172</i>
	γ -Proteobacteria	<i>Pseudomonas stutzeri DCP-Ps1</i> <i>Shewanella loihica PV-4</i>
	β -Proteobacteria	<i>Dechloromonas aromatica RCB</i>
	δ -Proteobacteria	<i>Anaeromyxobacter dehalogenans</i>
	ϵ -Proteobacteria	<i>Wolinella succinogenes</i>
Clado II	Gemmatimonadetes	<i>Gemmatirosa kalamazoonesis</i> <i>Gemmatimonas aurantiaca</i>
		<i>Dyadobacter fermentans</i>
	Bacteroidetes	<i>Solitalea canadensis</i> <i>Flavobacterium columnare</i>
		<i>Bacillus azotoformans</i>
	Firmicutes	<i>Desulfitobacterium hafniense</i> <i>Geobacillus denitrificans NG80-2</i>
	Chloroflexi	<i>Caldilinea aerophila STL-6-01</i>
	Verrucomicrobia	<i>Opitutus terrae PB90-1</i>
	Aquificae	<i>Hydrogenobacter thermophilus</i>
	Crenarchaeota	<i>Pyrobaculum calidifontis</i>
	Spirochaetes	<i>Lepiospira biflexa</i>
	Deferribacteres	<i>Denitrovibrio acetiphilus</i>

Existen pocos trabajos sobre aislamiento de bacterias desnitrificantes aerobias en sistemas marinos y aún menos en sistemas costeros. Se ha reportado desnitrificación aeróbica en el aislado *Pseudomonas bauzanensis*, proveniente de muestras tomadas en el océano Atlántico, Índico y Pacífico (Zhang et al., 2020). Así mismo, se ha logrado aislar bacterias desnitrificantes aeróbicas de sistemas costeros en China, como *Psychrobacter* sp. aislada de un sistema de acuicultura marina en Tianjing (Zheng et al., 2011), *Vibrio* sp. aislada de la bahía de Jiaozhou (Li et al., 2017) y *Pseudomonas denitrificans* aislada de la costa del Mar Amarillo (Chen et al., 2020).

4.4.- Desnitrificación en estuarios inversos: El caso de la bahía de San Quintín

La bahía de San Quintín es considerada como un estuario inverso de tipo lagunar costero debido a la baja precipitación anual y al aporte mínimo de agua dulce, lo que provoca un aumento en la temperatura y salinidad de la boca a la cabeza en el agua del estuario (Valle-Levinson et al., 2009).

El metabolismo de la bahía de San Quintín se encuentra dominado hasta en un 70% por procesos bentónicos (Ibarra-Obondo et al., 2004). Algunos autores consideran esta bahía como un sumidero de N (Camacho-Ibar et al., 2003; Ibarra-Obando et al., 2004), mientras que otros proponen un

equilibrio entre las entradas de N nuevo por fijación y su pérdida por desnitrificación (Hernández-López et al., 2017). Su hidrodinámica es estacionalmente versátil, alternando una producción autótrofa neta del ecosistema durante las etapas de surgencia o *mareas vivas* con una heterótrofa en los períodos de relajación o *mareas muertas* (Ribas-Ribas et al., 2011). La principal fuente de nutrientes está dada por las surgencias permanentes de la corriente de California mediante las mareas (Checkley & Barth, 2009; Valle-Levinson et al., 2009; García et al., 2015; Canu et al., 2016), intensificadas durante la fase de “La Niña” del fenómeno climático ENOS (Hernández-Ayón, 2004). A pesar de ello, el estado oligotrófico de la bahía se mantiene muy probablemente por la intensificación de los procesos desnitrificantes a través de su principal productor primario: *Zostera marina* (Ibarra-Obando et al., 2004; Hernández-López et al., 2017).

4.5.- Importancia del pasto marino en la desnitrificación de la Bahía de San Quintín

Los pastos marinos son los hábitats bentónicos más importantes para la pérdida de N a través de la desnitrificación porque facilitan la disponibilidad de NO_3^- y acumulan tejidos en los sedimentos, los cuales, servirán como fuente de materia orgánica (Eyre et al., 2016). La importancia de los pastos marinos para promover la eliminación del exceso de nutrientes nitrogenados procedentes de la contaminación antropogénica, surgencias o escorrentías se ha demostrado en múltiples trabajos. Por ejemplo, los pastos marinos aumentan hasta un 40% la remoción de NO_3^- mediante la desnitrificación (Aoki & McGlathery, 2018), impulsan una desnitrificación completa (Welsh et al., 2001), intensifican las tasas de respiración bentónica (Smyth et al., 2013), y favorecen la asociación entre bacterias nitrificantes y desnitrificantes mitigando con ello la eutrofización en sistemas costeros con pastos marinos (Hoffman et al., 2019).

La especie de pasto marino de interés para la zona de estudio es *Zostera marina*, la cual, cubre ~46% del área de la bahía (Hernández-López et al., 2017) y lleva a cabo cerca del 80% de su desnitrificación (Camacho-Ibar et al., 2004). En las costas de Baja California, se ha reportado a *Zostera marina* con un ciclo de vida anual (Meling-López & Ibarra-Obando, 1999), además, a lo largo de la costa del Pacífico de América del Norte se han observado dos estrategias reproductivas (vegetativa y germinación) posiblemente reguladas por la temperatura o la salinidad (Phillips et al., 1983). Por otra parte, un estudio de comparación en la composición bioquímica de *Zostera marina* entre diferentes lagunas costeras de Baja California determinó que los niveles de clorofila y carbohidratos solubles eran mayores en aquellas ubicadas en San Quintín, mientras que, la concentración de proteínas era ligeramente menor (Cabello-Pasini et al., 2003).

V. Planteamiento del problema y preguntas de investigación

5.1.- Planteamiento del problema

La desnitrificación en las áreas costeras representa el 44% de la desnitrificación global (Seitzinger et al., 2006). Esta ruta metabólica puede llevarse a cabo mediante una desnitrificación completa o incompleta teniendo como producto final N_2 o N_2O , respectivamente (Zumft, 1997). Debido a que estos gases intervienen de manera directa en el clima (N_2O) y en la composición atmosférica (N_2 y N_2O), es importante conocer los organismos que las llevan a cabo en los sistemas costeros y los factores ambientales que regulan su distribución, particularmente en bahías inversas influenciadas por fuertes eventos de surgencia y, por tanto, por la llegada de nutrientes desde el océano, como es el caso de Bahía de San Quintín. Además, a la fecha, no se han realizado estudios enfocados en la diversidad de bacterias desnitrificantes aisladas de sedimentos en este tipo de bahías. Por lo tanto, el presente trabajo busca describir la distribución espacial y las relaciones filogenéticas de bacterias portadoras de genes desnitrificantes aisladas de sedimentos presentes en dos hábitats (desnudo y con *Zostera marina*) del brazo este de la bahía de San Quintín, así como la relación de este grupo funcional de bacterias con variables fisicoquímicas. Adicionalmente, este trabajo proporcionará un inventario de aislados bacterianos aerobios desnitrificantes para futuros estudios.

5.2.- Preguntas de investigación

1. ¿Qué propiedades físicas (textura) y químicas de los sedimentos del brazo San Quintín determinarán la distribución espacial de aislados bacterianos con genes marcadores desnitrificantes?
2. ¿Cómo influirá la presencia o ausencia de *Zostera marina* en la distribución de las bacterias con genes marcadores desnitrificantes aisladas de sedimentos del brazo San Quintín?

VI. Hipótesis

- Si se observa un aumento en los valores de pH, carbohidratos totales, C orgánico total y N total, así como un cambio de textura limo-arcillosa a una arenosa de la boca a la cabeza debido a la hidrodinámica de la bahía, entonces se encontrará una alta abundancia y diversidad de aislados bacterianos con genes marcadores desnitrificantes en las muestras superficiales de la cabeza del brazo San Quintín. Además, tomando en cuenta las altas concentraciones de hierro en la zona de estudio, se espera encontrar un mayor número de aislados con genes *nirS* en comparación con los aislados que tengan los genes *nirK* o *nosZ*.

- Si *Zostera marina* mejora la desnitrificación proporcionando más NO_3^- y materia orgánica, entonces se observará una mayor abundancia y diversidad de aislados bacterianos con genes marcadores desnitrificantes en los sitios que presenten esta macrófita con respecto a aquellos sedimentos desnudos.

VII. Objetivos

7.1.- Objetivo general

Estudiar la distribución de bacterias desnitrificantes aerobias aisladas de sedimentos en el brazo este de la bahía de San Quintín, Baja California.

7.2.- Objetivos particulares

1. Analizar las propiedades físicas (textura) y químicas de las muestras sedimentarias con y sin *Zostera marina*, tomadas a dos profundidades en tres estaciones del brazo San Quintín.
2. Aislar bacterias desnitrificantes aerobias en medios de cultivo selectivos a partir de muestras sedimentarias con y sin *Zostera marina*, tomadas a dos profundidades en tres estaciones del brazo San Quintín.
3. Identificar la morfología colonial de los aislados obtenidos.
4. Analizar la presencia de genes marcadores desnitrificantes (*nirS*, *nirK* y *nosZ*) mediante PCR en el DNA de los aislados representantes.
5. Analizar filogenéticamente a los aislados bacterianos con genes marcadores desnitrificantes.
6. Determinar la diversidad α y β de los aislados bacterianos con genes marcadores desnitrificantes.
7. Relacionar la distribución de los aislados portadores de genes marcadores desnitrificantes con las propiedades físicas (textura) y químicas de las muestras sedimentarias.
8. Realizar un cepario con los aislados bacterianos portadores de genes marcadores desnitrificantes.
9. Comprobar la actividad desnitrificante de los aislados bacterianos portadores de genes *nirS*, *nirK* y/o *nosZ*.

VIII. Materiales y métodos

8.1.- Zona de estudio

La bahía de San Quintín se encuentra ubicada en la costa noroeste de la Península de Baja California (México) entre las latitudes 30° 22' N | 30° 31' N y las longitudes 115° 58' O | 115° 59' O. Con una geoforma de “Y”, su brazo este se denomina San Quintín y exhibe un estado prístino (Aguirre-Muñoz et al., 2001), mientras que su brazo oeste, denominado Bahía Falsa, presenta cultivos de ostiones locales (García-Esquivel et al., 2004; Figura 2). La bahía de San Quintín es considerada una laguna costera hipersalina (Camacho-Ibar et al., 2003) sujeta a permanentes eventos de surgencia, principalmente en primavera y verano, que la abastecen de nutrientes (Hernández-Ayón, 2004). Derivado de estas surgencias permanentes, la hidrodinámica de la bahía es regulada por las mareas, presentando un nivel de confinamiento bajo (Canu et al., 2016). Comprende un área de 42 km² y una profundidad media de 2.0 m. Tiene una precipitación media anual de 150 mm, una evaporación media anual de 1400 mm, una temperatura media anual de entre 18–22°C y un clima *muy árido o seco*, clasificado como BW_{hs} (García, 2004; INEGI, 2021). Por lo antes expuesto, la bahía también puede ser propuesta como una laguna costera subtropical, mezclada y semiárida (la evaporación supera a la precipitación en un ciclo anual) (Valle-Levinson et al., 2009). Cabe mencionar que la bahía recibe aportes esporádicos de agua y material terrígeno en el brazo San Quintín durante temporadas de lluvia extrema a través del delta San Simón (Canu et al., 2016).

8.2.- Muestreo

Se llevó a cabo un muestreo el 22 de octubre de 2021, durante el periodo de relajación o *mareas muertas* caracterizado por una producción heterótrofa neta, a través de un transecto abarcado por tres estaciones en el brazo San Quintín (boca: 30° 24' 50" N | 115° 58' 51" W; zona media: 30° 27' 16" N | 115° 57' 15" W; cabeza: 30° 29' 05" N | 115° 58' 56" W; Figura 2). Los núcleos de sedimentos se colectaron de parcelas con y sin *Zostera marina*. Cada núcleo (20 cm de profundidad) se extrajo con nucleadores de PVC transparentes ($\emptyset_{int} = 60$ cm) y, en condiciones asépticas, se seleccionaron los estratos superiores (0-5 cm) e inferiores (15-20 cm). Una parte de las muestras se utilizó para caracterizar las propiedades fisicoquímicas del sedimento en el laboratorio de Biogeoquímica de Nutrientes del Instituto de Investigaciones Oceanológicas de la Universidad Autónoma de Baja California (UABC, Ensenada). Otra parte de las muestras fueron congeladas a -20°C en bolsas de polietileno esterilizadas, para su traslado al laboratorio de Ecología Microbiana Acuática en el Instituto de Ciencias del Mar y Limnología (ICMyL) de la UNAM (CDMX).

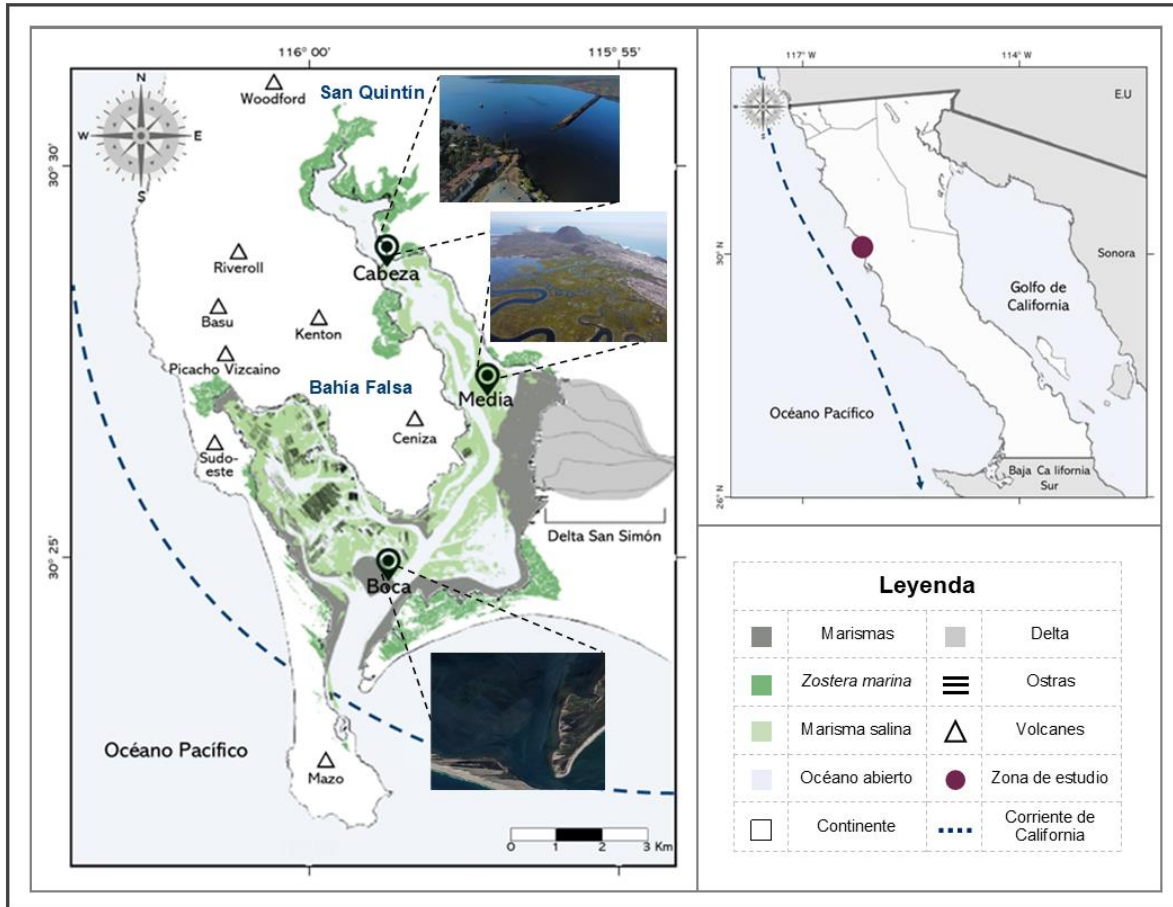


Figura 2 | Mapa de la bahía de San Quintín, Baja California, modificado de Watson et al. (2020). Los puntos negros señalan las estaciones de muestreo y los gradientes verdes y grises muestran los diferentes ecotonos y entradas fluviales esporádicas de la bahía.

8.3.- Análisis fisicoquímicos de agua y sedimento del brazo San Quintín

Se midió *in situ* la temperatura, salinidad y oxígeno disuelto del agua en las tres estaciones de muestreo utilizando una sonda multiparamétrica YSI 6-Series (precisión de temperatura: $\pm 0.15^\circ\text{C}$; precisión de salinidad: $\pm 0.1 \%$).

Los análisis de textura y concentraciones de oxígeno disuelto, materia orgánica lábil, Fe(II) y Fe(III) de las muestras de sedimentos recolectadas fueron realizados por el grupo del Dr. Guillermo Samperio, en el laboratorio de Biogeoquímica de Nutrientes del Instituto de Investigaciones Oceanológicas, UABC. La textura de los sedimentos colectados se determinó con el analizador de partículas Horiba LA-910 (precisión: $\pm 0.001 \text{ nm}$). Se midió el oxígeno disuelto de los núcleos obtenidos (previamente equilibrados por burbujeo constante durante 6-12 h) con un microsensar Unisense y el pH con un medidor de pH OHAUS Starter 2100 (precisión: $\pm 0.01 \text{ pH}$). Se determinó la concentración de materia orgánica lábil (monosacáridos y polisacáridos) por medio de hidrólisis

ácida con ácido sulfúrico (H₂SO₄) a 105°C durante 25 h (Jones & Willet, 2006). Además, se obtuvieron las concentraciones de Fe(II) y Fe(III) por el método de extracción con ácido clorhídrico (HCl) 0.5 M y ferrozina (1.0 g L⁻¹) (Lovley & Phillips, 1987) utilizando un espectrofotómetro FLAME-S UV-Vis (Ocean Insight).

La División de Ecología del Atlántico de la Agencia de Protección Ambiental de EE. UU. Analizó el C orgánico total y el N total de las muestras de sedimentos en un analizador Elementar Vario (Elementar Americas), previamente tratadas con HCl 12 M por 6 h.

Todos los análisis se realizaron por triplicado y sus valores promedio se graficaron con el paquete *ggplot2* en *Rstudio* v. 2023.3.0.386 (Wickham, 2016; Posit team, 2023). Las concentraciones de oxígeno disuelto se representaron con perfiles verticales mediante las funciones *geom_line* y *geom_point*. Los demás resultados se mostraron con la función *geom_bar* y *geom_errorbar*.

8.4.- Aislamiento de bacterias desnitrificantes aerobias

De la superficie (0-5 cm) y del fondo (15-20 cm) de los núcleos sedimentarios obtenidos se hicieron diluciones en serie (10⁻¹, 10⁻² y 10⁻³) de 0.1 g por muestra de sedimento. Posteriormente, se tomaron alícuotas de 100 µL para la siembra en medios de cultivo selectivos para bacterias desnitrificantes (medio marino suplementado con nitrato de potasio y peptona de caseína; y medio Braker o nutritivo suplementado con nitrato de potasio y extracto de levadura; Anexo 1) incubados en condiciones aerobias de 2 a 4 días a una temperatura de 28±1°C.

8.5.- Caracterización de la morfología colonial de los aislados obtenidos

Tras la incubación, se describió la morfología colonial de los aislados obtenidos. Los criterios tomados en cuenta durante la caracterización fueron: tamaño (grande: 5.0 mm; mediano: 2.0-5.0 mm y, pequeño: 2.0 mm), forma (circular, irregular, rizoide, filamentosa y puntiforme), elevación (cóncava, elevada, ondulada, protuberante, achatada y convexa), bordes (liso, lacerado, lobulado, filamentoso y ondulado), estructura (lisa, granulosa, filamentosa y rugosa), brillo (transparente, translúcido y opaco), color y aspecto (Guzmán, 2018).

8.6.- Extracción de DNA de los aislados representantes por morfotipo

Una vez caracterizadas las colonias bacterianas, se formaron *in silico* grupos con los aislados que presentaban morfología colonial similar (morfotipo). Se seleccionó al azar un representante por cada morfotipo para su resiembra en incubaciones de 1 a 2 días a una temperatura de 28±1°C, con el fin de producir una cantidad óptima de biomasa bacteriana para su posterior extracción de DNA.

La extracción de DNA se llevó a cabo mediante la técnica de bromuro de hexadeciltrimetilamonio (CTAB, por sus siglas en inglés) al 2.0%. Dicha técnica consiste en la lisis de la membrana celular, la degradación de proteínas y lípidos, y la posterior condensación y precipitación del DNA (modificado de Surzycki, 2000). La calidad y concentración de DNA extraído se verificó a través del espectrofotómetro NanoDrop 2000c (Thermo Scientific).

8.7.- Amplificación de genes marcadores desnitrificantes por PCR en DNA de aislados representativos

La concentración del DNA extraído de las colonias representativas con buena calidad ($^{260}/_{280}$: >1.7; $^{260}/_{230}$: >1.8) fue estandarizada a 25 ng μL^{-1} . Posteriormente, se detectaron los genes *nirK*, *nirS* y *nosZ* por la reacción en cadena de la polimerasa (PCR, por sus siglas en inglés) usando dos pares de cebadores por gen para verificar en cada caso su presencia o ausencia. Los cebadores y las condiciones de amplificación se describen en las Tablas 2 y 3. La concentración final de los reactivos usados, con un volumen de 15 μL , en la PCR fueron: 0.9 X Buffer suplementado con 2.7 mM de MgCl_2 y 0.9 mM de dNTPs, 0.2 $\mu\text{g } \mu\text{L}^{-1}$ albúmina de suero bovino grado molecular (BSA, BioLabs), 0.025 U μL^{-1} ADN polimerasa (MyTaq, Bioneer), 1.7 ng μL^{-1} muestras de DNA, agua de grado molecular y los cebadores indicados en la Tabla 2.

Para verificar la presencia de los genes de interés (*nirK*, *nirS* y *nosZ*) en los productos obtenidos de la PCR, se realizaron electroforesis de 4.0 μL de producto de PCR inoculados con 1.0 μL de Loading buffer en geles de agarosa al 1.5% y con 1.0 μL de GelRed (Invitrogen).

Tabla 2 | Cebadores usados para amplificar fragmentos de los genes *nirK*, *nirS*, *nosZ* y *16S rRNA*.

Gen marcador	Cebador	Secuencia	Posición	Referencia
<i>nirK</i>	nirK1F	5'-GG(A/C)ATGGT(G/T)CC(C/G)TGGCA-3'	510 pb	(Braker et al., 1998)
	nirK5R	5'-GCCTCGATCAG(A/G)TT(A/G)TGG-3'		
	F1aCu	5'-ATCATGGT(C/G)CTGCCGCG-3'	473 pb	(Hallin et al., 1999)
	R3Cu	5'-GCCTCGATCAG(A/G)TTGTGGTT-3'		
<i>nirS</i>	cd3aF	5'-GT(C/G)AACGT(C/G)AAGGA(A/G)AC(C/G)GG-3'	425 pb	(Michotey et al., 2000)
	R3cd	5'-GA(C/G)TTCGG(A/G)TG(C/G)GTCTTGA-3'		
	nirS1F	5'-CCTA(C/T)TGGCCGCC(A/G)CA(A/G)T-3'	890 pb	(Braker et al., 1998)
	nirS6R	5'-CGTTGAACTT(A/G)CCGGT-3'		
<i>nosZ</i>	nosZ1-2F	5'-CGCRACGGCAASAAGGTSMSSGT-3'	267 pb	(Throbäck et al., 2004) (Henry et al., 2006)
	nosZ1-2R	5'-CAKRTGACKSGCRTGGCAGAA-3'		
	Nos661F	5'-CGGCTGGGGGCTGACCAA-3'	1140 pb	(Scala & Kerkhof, 1998)
	Nos1773R	5'-AACGA(A/C/G)CAG(T/C)TGATCGA(T/C)AT-3'		
<i>16S rRNA</i>	27F	5'-TACCTTGTTACGACTT-3'	1465 pb	(Lane et al., 1985)
	1492R	5'-AGAGTTTGATCMTGGCTCAG-3'		

Tabla 3 | Condiciones de amplificación de los dos pares de cebadores utilizados para amplificar fragmentos de los genes desnitrificantes *nirK*, *nirS*, *nosZ* y *16S rRNA*.

Gen	Cebadores	C _f (μM)	Condiciones termociclado
<i>nirK</i>	nirK1F	0.4	95 °C x 5 min, 10 TD (95 °C x 30 seg, 56-51 °C x 30 seg, 72 °C x 45 seg),
	nirK5R	0.4	25 c (95 °C x 30 seg, 51 °C x 30 seg, 72 °C x 45 seg), 72 °C x 7 min.
	F1aCu	0.5	95 °C x 5 min, 6 TD (95 °C x 15 seg, 63-58 °C x 30 seg, 72 °C x 30 seg),
	R3Cu	0.5	34 c (95 °C x 15 seg, 58 °C x 30 seg, 72 °C x 30 seg), 72 °C x 5 min.
<i>nirS</i>	cd3aF	0.3	95 °C x 5 min, 6 TD (95 °C x 30 seg, 62-57 °C x 20 seg, 72 °C x 40 seg),
	R3cd	0.3	34 c (95 °C x 30 seg, 57 °C x 20 seg, 72 °C x 40 seg), 72 °C x 5 min.
	nirS1F	0.4	95 °C x 5 min, 10 TD (95 °C x 30 seg, 57-52 °C x 30 seg, 72 °C x 1 min),
	nirS6R	0.4	30 c (95 °C x 30 seg, 52 °C x 30 seg, 72 °C x 1 min), 72 °C x 7 min.
<i>nosZ</i>	nosZI-2F	0.5	95 °C x 5 min, 35 c (95 °C x 30 seg, 60 °C x 30 seg, 72 °C x 30 seg),
	nosZI-2R	0.5	72 °C x 5 min
	Nos661F	0.5	94 °C x 5 min, 35 c (94 °C x 30 seg, 55 °C x 1 min, 72 °C x 1 min),
	Nos1773R	0.5	72 °C x 10 min
<i>16S rRNA</i>	27F	0.3	94 °C x 5 min, 30 c (94 °C x 1 min, 52 °C x 1 min, 72 °C x 1.20 min),
	1492R	0.3	72 °C x 10 min

Cf: Concentración final; TD: Ciclos en touchdown; c: Ciclos

En *Rstudio*, las abundancias de los genes marcadores desnitrificantes y de sus aislados contenedores fueron cuantificadas con tablas de frecuencia de doble y triple entrada con la función *table*, y representadas con la función *geom_bar* de *ggplot2* y con diagramas de Venn (Wickham, 2016).

8.8.- Cepario de aislados bacterianos con genes marcadores desnitrificantes

Las cepas que presentaron los genes *nirK*, *nirS* y/o *nosZ* se conservaron en glicerol al 20%. Para ello, los aislados fueron inoculados en 800 μL del caldo de cultivo correspondiente a su medio de aislamiento, e incubados en una incubadora de agitación a 28±1°C y 150-250 rpm durante 3 a 5 h. Pasado el periodo de incubación, se agregaron 200 μL de glicerol 100% a cada cultivo. Finalmente, los cultivos se incubaron a 4°C por ~12 h y, posteriormente, se almacenaron a -80°C en un ultracongelador ubicado en el laboratorio de Ecología Microbiana Acuática del ICML (UNAM).

8.9.- Análisis filogenético de los aislados bacterianos con genes marcadores desnitrificantes

Se realizó una PCR del gen *16S rRNA* al DNA de las colonias portadoras de uno o más genes desnitrificantes (Tablas 2 y 3). Los productos obtenidos fueron secuenciados mediante el método de Sanger en el Instituto de Biología de la UNAM, CDMX.

Las secuencias de *16S rRNA* se clasificaron taxonómicamente con la herramienta *Classifier* del programa en línea *Ribosomal Database Project* (RDP; <https://rdp.cme.msu.edu/>) (Cole et al., 2014) y *Nucleotide BLAST* (*blastn*) del *Basic Local Alignment Search Tool* (BLAST;

<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) (Altschul et al., 1990). Posteriormente, las secuencias fueron alineadas y editadas manualmente con el algoritmo *Clustal W* en el software *BioEdit* (Hall, 1999). El árbol filogenético se realizó con el software *MEGA 11* por el método de *Neighbour-joining* (Tamura et al., 2021) con un *bootstrap* de 10000 repeticiones. Por último, el árbol filogenético se editó en el programa en línea *Tree of Life* (iTOL; <https://itol.embl.de/>) (Ciccarelli et al., 2006).

A través de la función *table* de *Rstudio* se cuantificaron las abundancias de las familias, géneros y especies identificadas. Sus distribuciones se representaron con las funciones *geom_bar* y *geom_violin* del paquete *ggplot2* (Wickham, 2016).

8.10.- Diversidad α y β de los aislados con genes marcadores desnitrificantes

Para determinar la diversidad α , se utilizaron los índices de Chao1, Simpson y Shannon-Wiener en *Rstudio* (Tabla 4). El índice de Chao1 se calculó con el paquete *fossil* (Vavrek, 2011) y los índices de Simpson ($1-\lambda$) y Shannon- Wiener con el paquete *vegan* (Oksanen et al., 2021).

Tabla 4 | Índices de diversidad α utilizados en este estudio.

Índice	Descripción	Fórmula	Referencia
Chao1	Riqueza con sesgo en las especies de baja abundancia	$Chao1 = S + \frac{F^2}{2G}$	(Chao, 1984)
Simpson	Dominancia en la distribución de especies	$\lambda = \sum_{i=1}^S p_i^2$	(Magurran, 1988)
Shannon-Wiener	Equilibrio en la distribución de especies	$H' = - \sum_{i=1}^S p_i \ln p_i$	(Magurran, 1988)
Uniformidad	Cuan igualmente abundantes son las especies	$E = \frac{H'}{H_{max}} = \frac{H'}{\ln S}$	(Pielou, 1969)

S : especies observadas; F : singletons; G : doubletons; p_i : proporción de individuos encontrados en la i -ésima especie; H_{max} : máximo valor teórico del índice Shannon-Wiener.

La diversidad β se estimó por comparaciones entre las abundancias de los aislados con genes desnitrificantes pertenecientes a las especies encontradas por muestra. Dichas comparaciones se llevaron a cabo con un mapa de calor con cladograma y con un escalamiento multidimensional no métrico (NMDS, por sus siglas en inglés) en *Rstudio*. El mapa de calor con cladograma se construyó mediante una matriz de disimilitud de Canberra, elaborada con la función *dist*, y se representó con el agrupamiento “*average*” a través del paquete *ComplexHeatmap* (Gu, 2016). Para realizar el NMDS, primero se transformaron las abundancias por especie en abundancias relativas con la función *decostand*, después se obtuvo la matriz de disimilitud de Bray-Curtis con la función *vegdist* y,

finalmente, se calculó con la función *metaMDS* del paquete *vegan* y se graficó por medio del paquete *ggplot2* (Wickham, 2016; Oksanen et al., 2021).

8.11.- Relación entre la distribución de los aislados bacterianos con genes marcadores desnitrificantes y las propiedades fisicoquímicas de las muestras

En *Rstudio*, se buscaron relaciones significativas ($p\text{-value} \leq 0.05$) entre los resultados obtenidos en los análisis de diversidad β y en los análisis fisicoquímicos. El mapa de calor se contrastó con una matriz de correlación de Spearman graficada mediante el paquete *corrplot* (Wei & Simko, 2021), con datos previamente estandarizados por el método de desviación estándar a través del paquete *psych* (William, 2023). Mientras que, para comparar los datos fisicoquímicos en el NMDS, se crearon vectores con la función *envfit* del paquete *vegan* y se graficaron con la función *geom_segment* del paquete *ggplot2* (Wickham, 2016; Oksanen et al., 2021).

8.12.- Pruebas de reducción de NO_3^- y NO_2^- (modificada de Norris & Ribbons, 1972)

Para realizar las pruebas de reducción de NO_3^- y NO_2^- en los aislados con genes marcadores desnitrificantes, primero, se reactivaron los aislados fijados en glicerol inoculándolos en medio de cultivo marino o nutritivo (según el medio utilizado en su aislamiento; Anexo 1) e incubándolos a $28 \pm 1^\circ\text{C}$ durante 2 o 3 días.

Posteriormente, se estableció el tiempo de incubación necesario para realizar la prueba de reducción de NO_3^- y NO_2^- . Para ello, se determinó el momento en el que se presentaba la fase exponencial y el inicio de la fase senescente mediante incubaciones en caldos de cultivo (Anexo 1, omitiendo la adición de agar) a $28 \pm 1^\circ\text{C}$ de 12 aislados seleccionados al azar. Las fases exponencial y senescente se observaron en curvas de crecimiento de absorbancia (OD_{600}) contra tiempo de incubación.

Finalmente, se realizaron cultivos (en tubos con caldo de cultivo y campana Durham) a $28 \pm 1^\circ\text{C}$ de los aislados bacterianos con genes marcadores desnitrificantes, y se tomaron alícuotas de 5.0 mL durante su fase exponencial (tras 48 h de incubación). A cada alícuota se le agregó 5 gotas de reactivo β y 5 gotas de reactivo α para generar colorantes azoicos rojos por reacción con sales de diazonio formadas en medios con NO_2^- . En los casos en los que no se produjo un viraje rojo en la solución (ausencia de NO_2^-), se añadía ~ 0.1 g de zinc en polvo para reducir los NO_3^- en NO_2^- (Anexo 2).

Adicionalmente, se contrastó la presencia de los genes *nirK*, *nirS* y/o *nosZ* encontrados en las especies de los aislados con la herramienta en línea *blastn* del NCBI (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov>). Para ello, se accedió a los genomas de referencia de las especies con el alineamiento que presentó el mayor porcentaje de identidad y se buscó el locus del gen en la tabla de proteínas.

IX. Resultados

9.1.- Análisis fisicoquímicos de agua y sedimento del brazo San Quintín

En el agua del brazo se registró un aumento en la temperatura (de 20.8 a 22.7°C), salinidad (de 32.42 a 35.39 ‰) y oxígeno disuelto (de 7.02 a 7.59 mg L⁻¹) de la boca a la cabeza (Tabla 5).

Tabla 5 | Temperatura, salinidad y oxígeno disuelto del agua en las tres estaciones de muestreo.

Estación	Temperatura (°C)	Salinidad (‰)	[O ₂] (mg L ⁻¹)
Boca	20.8	32.42	7.02
Intermedia	21.7	34.45	7.11
Cabeza	22.7	35.39	7.59

Las muestras de sedimentos de las tres estaciones carecieron de oxígeno por debajo de los 2.0 mm de profundidad (Figura 3) y tuvieron valores de pH de 7.89 a 8.20 (Figura 4), por lo que pueden ser consideradas anóxicas y alcalinas.

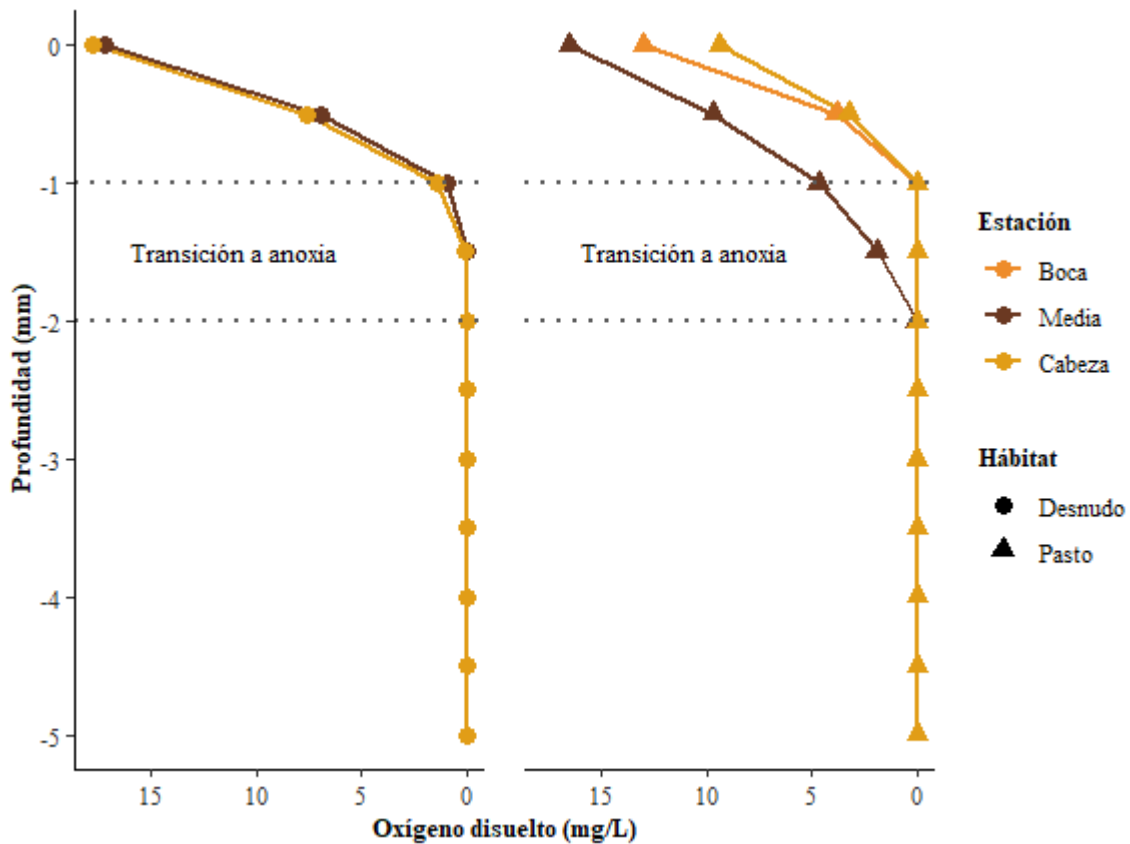


Figura 3 | Perfiles verticales de la concentración de oxígeno disuelto (mg L⁻¹) en las muestras sedimentarias con (derecha) y sin (izquierda) *Zostera marina* del brazo San Quintín.

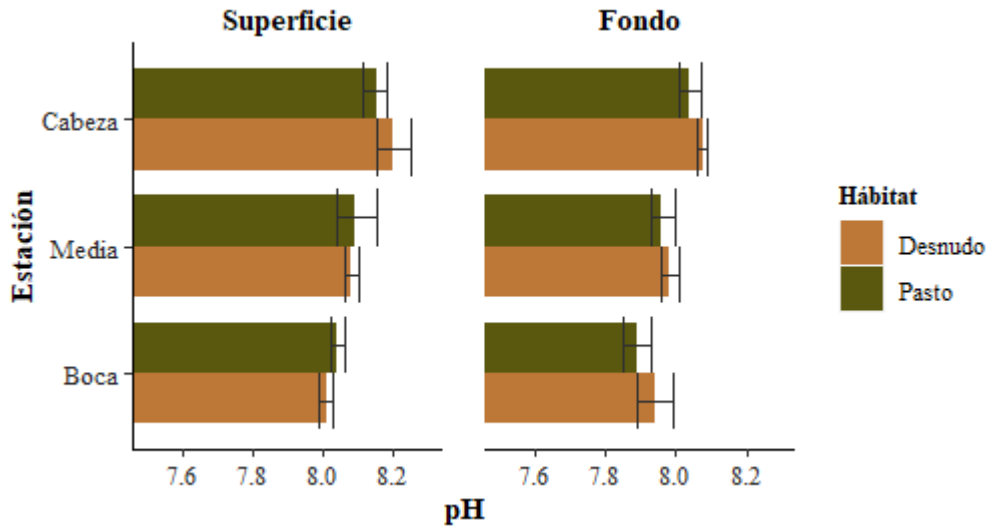


Figura 4 | Distribución de los valores promedio de pH \pm error estándar de la media de muestras de sedimento (superficie: 0-5 cm, fondo: 15-20 cm) analizadas por triplicado.

El porcentaje de arena en las muestras disminuyó de la boca a la cabeza tanto en los sedimentos superficiales (de 62.39% con *Zostera marina* y 90.90% en sedimento desnudo a 29.56 y 23.36%, respectivamente) como en los del fondo (de 70.36% con *Zostera marina* y 82.85% en sedimento desnudo a 21.40 y 37.26%, respectivamente), mientras que el de limo aumentó (Figura 5). El porcentaje de arcilla fue poco relevante y tendió a aumentar de la boca a la cabeza, presentando su valor más alto (0.57%) en la muestra de fondo con *Zostera marina* de la cabeza (Figura 5).

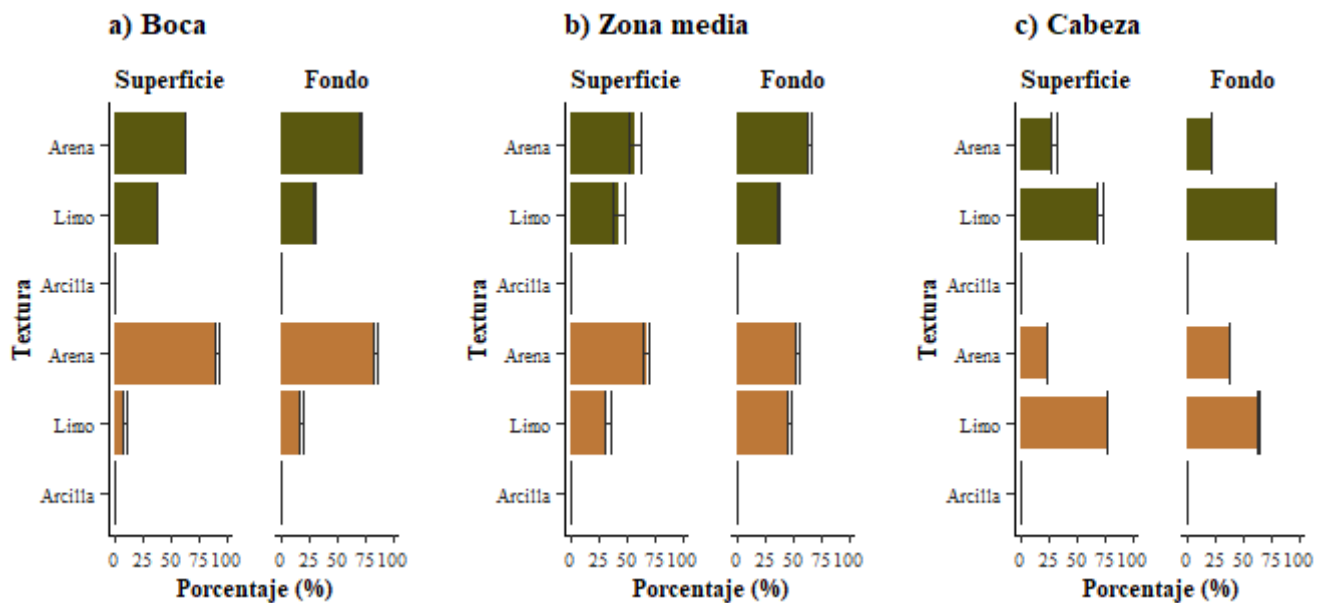


Figura 5 | Porcentajes promedios \pm error estándar de la media de la granulometría en las muestras de sedimento (superficie: 0-5 cm, fondo: 15-20 cm) con (■) y sin (■) *Zostera marina*, analizadas por triplicado en las tres estaciones: a) Boca, b) Zona media y c) Cabeza.

El porcentaje de C orgánico total aumentó de la boca a la cabeza tanto en las muestras superficiales (de 0.67% con *Zostera marina* y 0.31% en sedimento desnudo a 1.45 y 1.03%, respectivamente) como en las de fondo (de 0.23% con *Zostera marina* y 0.14% en sedimento desnudo a 1.17 y 0.58%, respectivamente). El porcentaje de N total tuvo un comportamiento idéntico al del C orgánico total tanto en las muestras superficiales (de 0.07% con *Zostera marina* y 0.04% en sedimento desnudo a 0.16 y 0.10%, respectivamente) como en las de fondo (de 0.03% con *Zostera marina* y 0.02% en sedimento desnudo a 0.11 y 0.06%, respectivamente) (Figura 6).

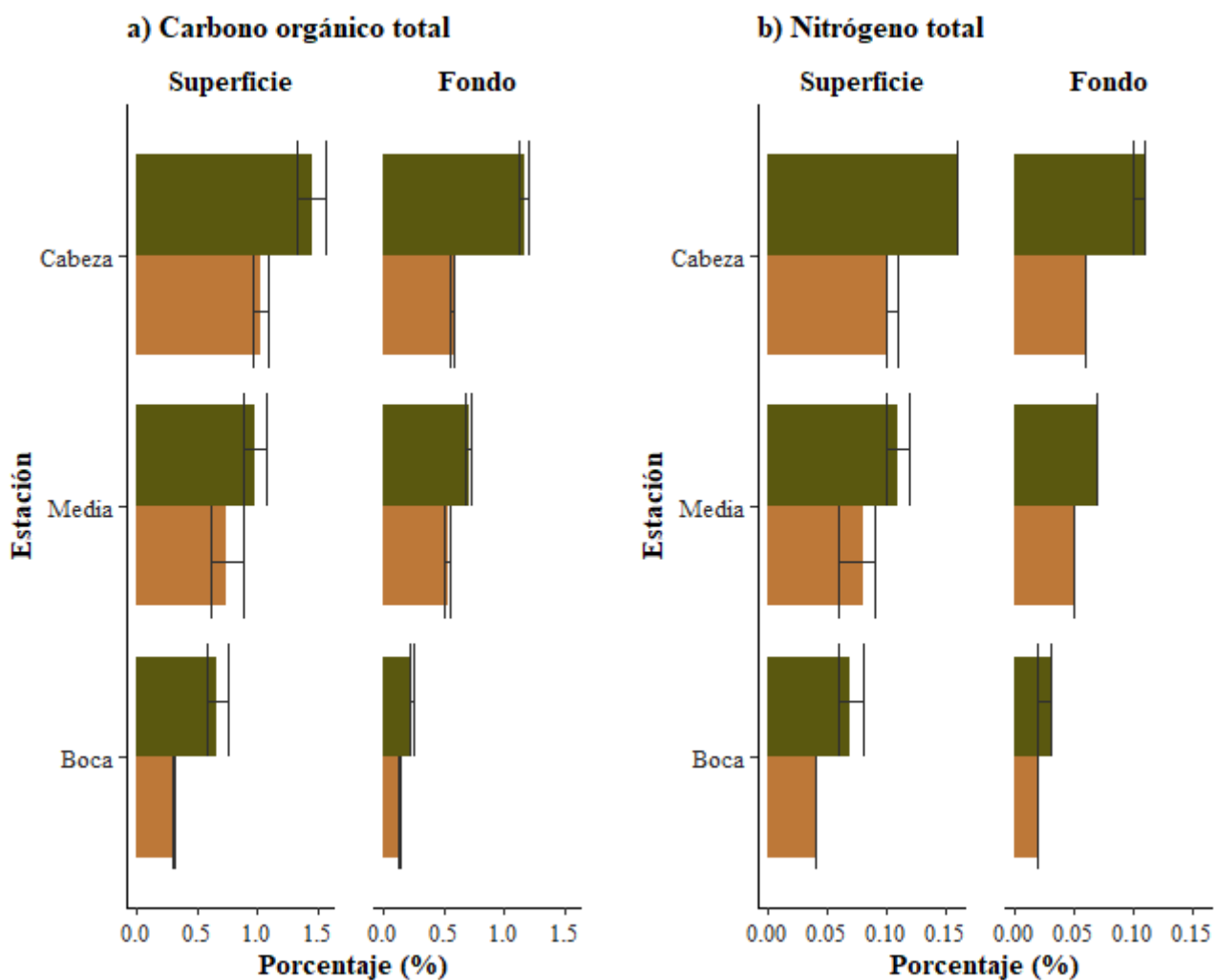


Figura 6 | Porcentaje promedio de a) Carbono orgánico total y b) Nitrógeno total \pm error estándar de la media de muestras de sedimento (superficie: 0-5 cm, fondo: 15-20 cm) con (■) y sin (■) *Zostera marina*, analizadas por triplicado.

De manera general, las concentraciones de materia orgánica lábil fueron más altas en las muestras superficiales que en las de fondo. Particularmente, la materia orgánica lábil aumentó de la boca a la cabeza en las muestras superficiales con *Zostera marina* (de 116.2 a 214.2 $\mu\text{mol C g DS}^{-1}$) y en las de fondo del sedimento desnudo (de 11.6 a 80.2 $\mu\text{mol C g DS}^{-1}$), en el resto de las muestras, tendieron a aumentar hacia la zona media (Superficiales sin *Z. marina*: 135.6 $\mu\text{mol C g DS}^{-1}$; Fondo con *Z. marina*: 68.3 $\mu\text{mol C g DS}^{-1}$) (Figura 7).

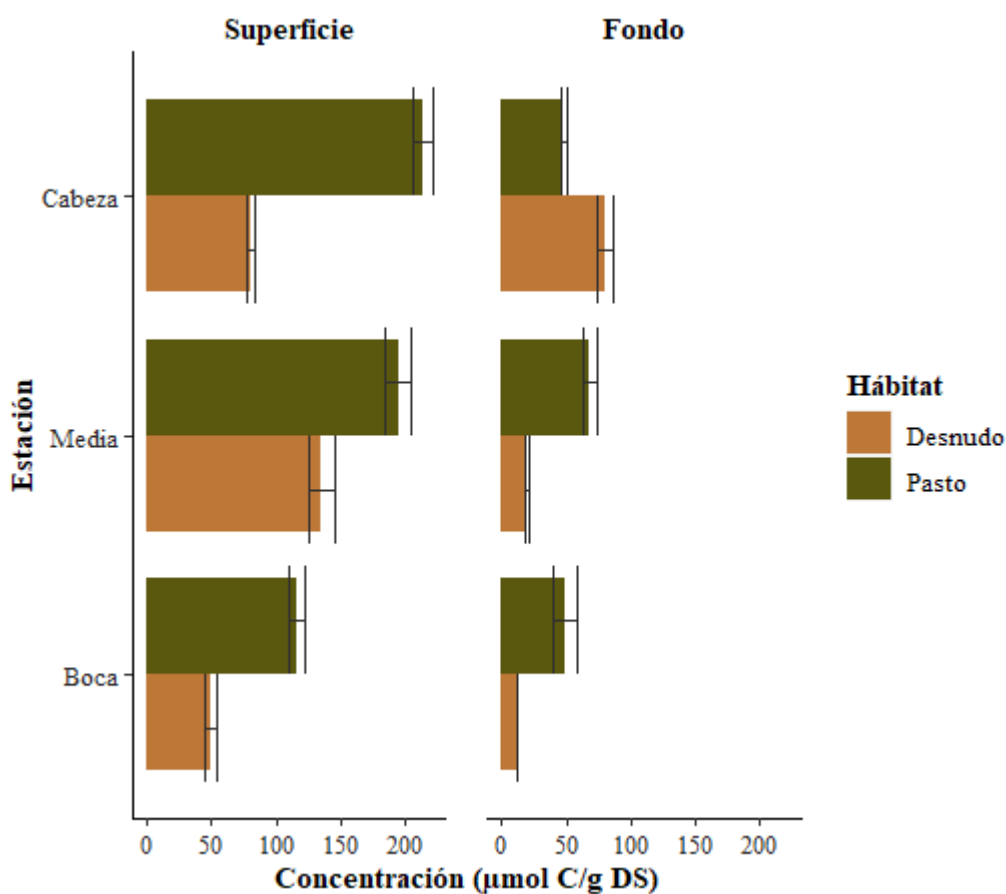


Figura 7 | Concentración promedio de materia orgánica lábil \pm error estándar de la media de muestras de sedimento (superficie: 0-5 cm, fondo: 15-20 cm) analizadas por triplicado.

Como era de esperar, en todas las muestras analizadas las concentraciones de Fe(III) superaron a las de Fe(II). Las concentraciones de Fe(II) fueron más bajas en las muestras superficiales que en las de fondo, encontrándose los valores más altos en la zona media (0.74 mg g⁻¹ con *Zostera marina* y 0.59 mg g⁻¹ desnudo) y los más bajos en la boca (0.09 mg g⁻¹ con *Zostera marina* y 0.16 mg g⁻¹ desnudo). Las concentraciones de Fe(III) fueron más altas en las muestras superficiales de la zona media (10.85 mg g⁻¹ con *Zostera marina* y 9.07 mg g⁻¹ desnudo) y menores en las de fondo de la boca (4.14 mg g⁻¹ con *Zostera marina* y 3.52 mg g⁻¹ desnudo) (Figura 8).

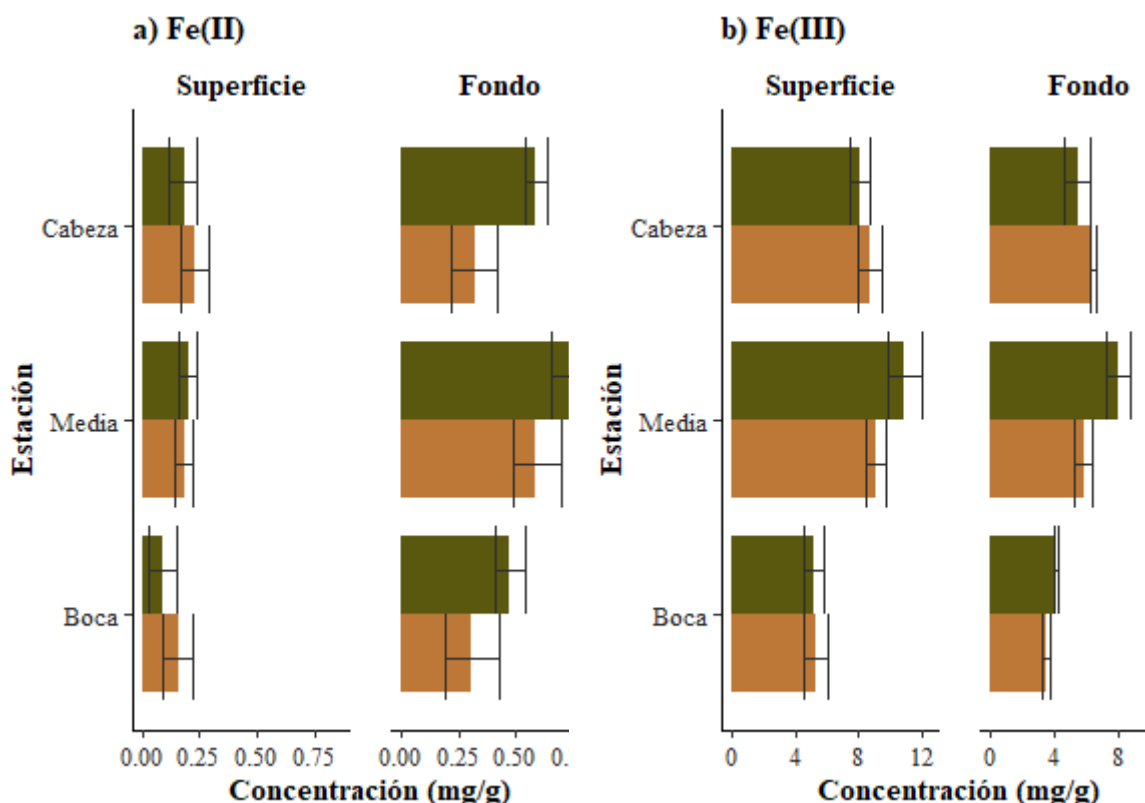


Figura 8 | Concentración promedio de a) Fe(II) y b) Fe(III) ± error estándar de la media de muestras de sedimento (superficie: 0-5 cm, fondo: 15-20 cm) con (■) y sin (■) *Zostera marina*, analizadas por triplicado.

9.2.- Aislamiento, caracterización morfológica y extracción de DNA de las bacterias presentes en las muestras sedimentarias del brazo San Quintín

Se obtuvieron un total de 1611 aislados bacterianos (1068 en medio marino y 543 en medio Braker) que fueron agrupados en 155 morfotipos (81 de medio marino y 74 de medio Braker) por su similitud en los rasgos morfológicos coloniales. Se extrajo el DNA a un representante de estos 155 grupos, de los cuales 130 (74 de medio marino y 56 de medio Braker) presentaron buena calidad para la búsqueda de genes desnitrificantes mediante PCR.

9.3.- Distribución de los aislados desnitrificantes y de sus genes marcadores

De los 130 DNA extraídos, 66 (44 en medio marino y 22 en medio Braker) tuvieron genes marcadores desnitrificantes (*nirS*, *nirK* y/o *nosZ*) y fueron conservados en glicerol al 20%. Estos 66 morfotipos representaron a 1371 bacterias aisladas (85.1% del total de bacterias aisladas).

Los 1371 aislados bacterianos con genes marcadores desnitrificantes se distribuyeron en las muestras sedimentarias del brazo San Quintín de la siguiente manera: La estación con mayor número de bacterias aisladas fue la boca (544 colonias), seguida de la cabeza (485 colonias) y, con menor abundancia, la zona media (342 colonias). Los sedimentos superficiales y con *Zostera marina* presentaron mayor número de bacterias aisladas (934 y 706 colonias, respectivamente) que los de fondo y desnudos (437 y 665 colonias, respectivamente) (Anexo 3).

Las bacterias aisladas con el gen *nirK* fueron las más abundantes (39.1%), seguidas de aquellas con *nosZ* (34.3%) y, por último, las que tuvieron *nirS* (26.6%). Sin embargo, el número de bacterias que solo tuvieron uno de los tres genes desnitrificantes fue mayor para *nosZ* (20.3%), seguidas de aquellas con solo *nirK* (20.1%) y *nirS* (13.1%). De las bacterias con dos pares de genes desnitrificantes fueron más abundantes las que tuvieron *nirK* con *nosZ* (17.9%), mientras que las menos abundantes fueron aquellas que presentaron *nirS* con *nosZ* (5.1%). El porcentaje de bacterias con los tres genes marcadores fue del 10.7% (Figura 9).

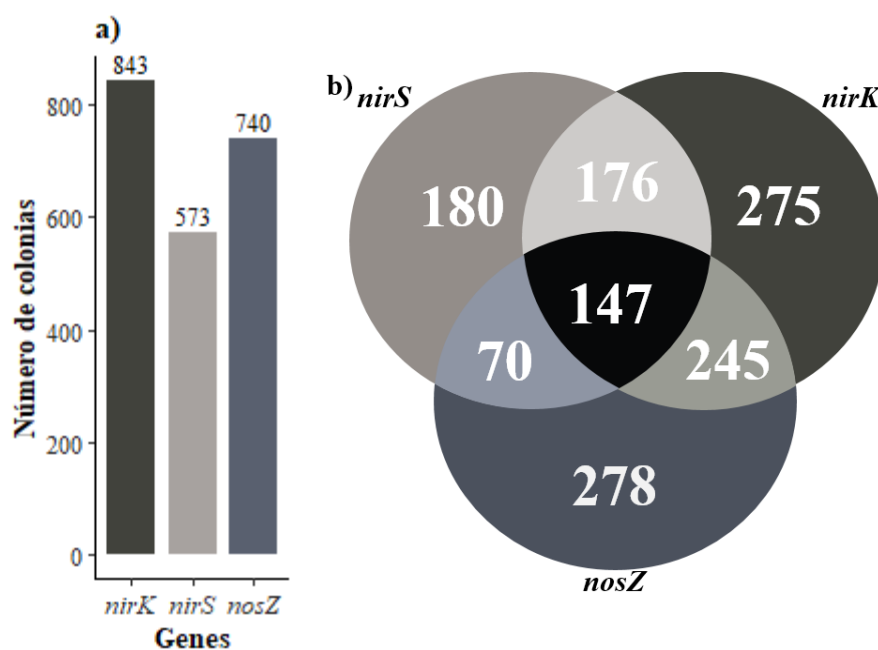


Figura 9 | a) Número de bacterias aisladas con genes desnitrificantes. El número encima de la barra refleja la abundancia registrada. B) Distribución de los tres genes desnitrificantes en las 1371 bacterias aisladas del brazo San Quintín.

El porcentaje de bacterias aisladas con el gen *nirS* fue mayor en la cabeza de la bahía (45.4%) y menor en la zona media (16.9%). En la boca y la cabeza los aislados con el gen *nirS* dominaron en los ambientes desnudos (boca: 69.4%; cabeza: 83.1%), en cambio en la zona media prevalecieron en las áreas con *Zostera marina* (86.6%). En cuanto a la profundidad, en la boca y zona media fue mayor el porcentaje de bacterias aisladas con *nirS* en los sedimentos superficiales (boca: 74.5%; zona media: 94.8%), mientras que en la cabeza fueron más abundantes en el fondo (61.5%) (Figura 10).

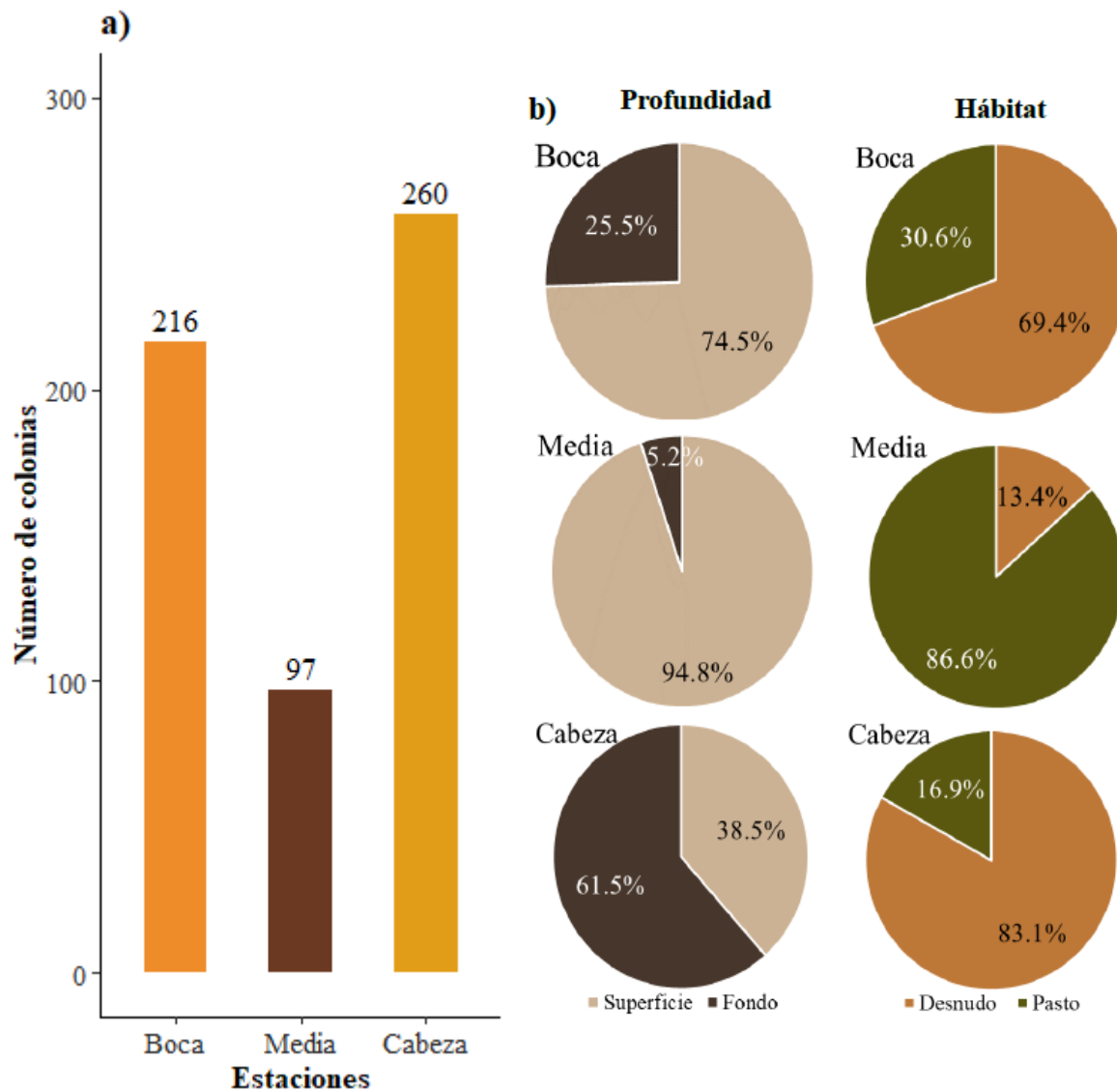


Figura 10 | a) Número de bacterias con gen *nirS* aisladas en cada estación. El número encima de la barra indica la abundancia de bacterias registradas. B) Porcentaje de la abundancia de bacterias con *nirS* por profundidad y hábitat.

La zona con mayor porcentaje de bacterias aisladas con el gen *nirK* fue la boca (44.7%) y la de menor porcentaje fue la zona media (15.2%). Las bacterias con este gen dominaron en el hábitat con *Zostera marina* en la boca (64.2%) y zona media (64.1%), mientras que en la cabeza proliferaron en el sedimento desnudo (71.6%). En las tres zonas de muestreo, las bacterias con *nirK* prevalecieron en el estrato superficial (boca: 74.3%; zona media: 89.1%; cabeza: 60.1%) (Figura 11).

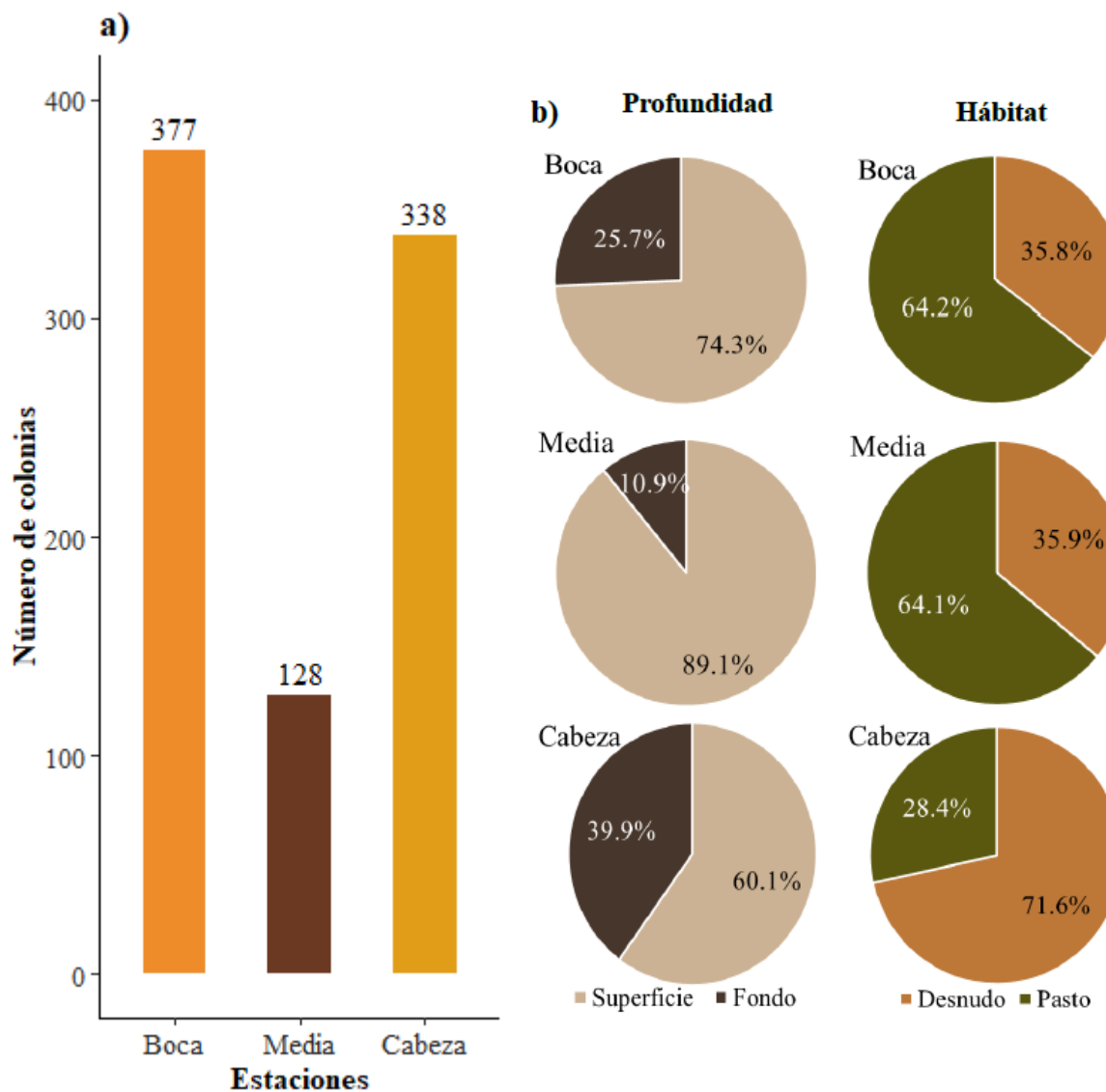


Figura 11 | a) Número de bacterias con gen *nirK* aisladas en cada estación. El número encima de la barra indica la abundancia de bacterias registradas. B) Porcentaje de la abundancia de bacterias con gen *nirK* por profundidad y hábitat.

El porcentaje de bacterias aisladas con el gen *nosZ* fue mayor en la boca (38.4%), seguido de la cabeza (34%) y, por último, en la zona media (27.6%). Estas bacterias fueron mayormente aisladas de lugares con *Zostera marina* y sedimentos superficiales en la boca (*Z. marina*: 69.7%; superficie: 84.9%) y zona media (*Z. marina*: 71.6%; superficie: 73.5%). En contraste, en la cabeza proliferaron en el hábitat desnudo (83.7%) y en el sedimento de fondo (53.6%) (Figura 12).

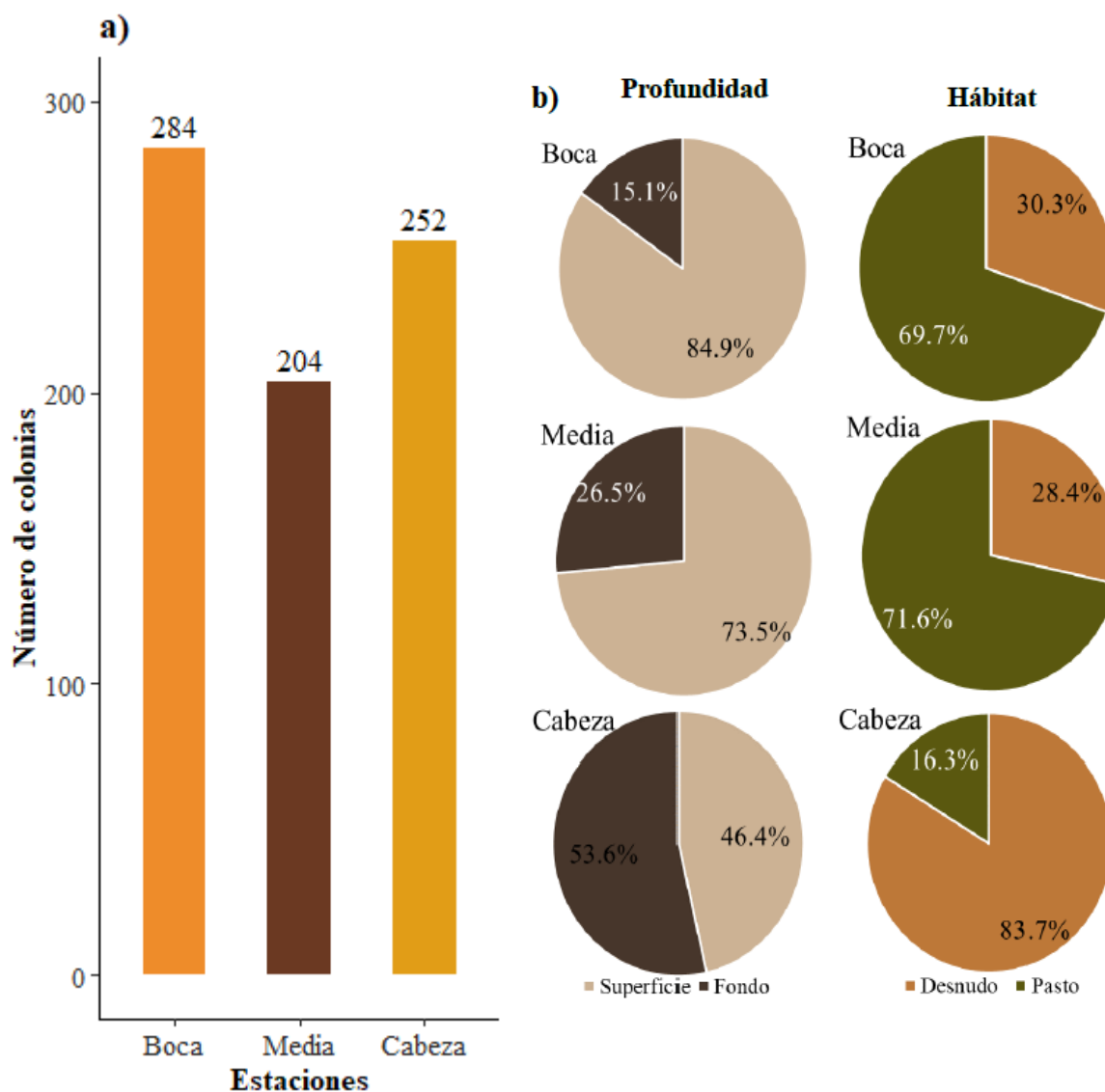


Figura 12 | a) Número de bacterias con gen *nosZ* aisladas en cada estación. El número encima de la barra indica la abundancia de bacterias registradas. B) Porcentaje de la abundancia de bacterias con gen *nosZ* por profundidad y hábitat.

9.4.- Taxonomía, filogenia y distribución de las especies con genes marcadores desnitrificantes

Se secuenció el *16S rRNA* al DNA de los 66 aislados representantes con genes marcadores desnitrificantes (4 secuencias presentaron contaminación y fueron descartadas para los análisis filogenéticos). Las secuencias de buena calidad (62 representantes pertenecientes a 1338 bacterias aisladas), se clasificaron en 4 clases: γ -Proteobacteria (82.4% del total de bacterias aisladas), α -Proteobacteria (7.9% del total de bacterias aisladas), Bacilli (5.7% del total de bacterias aisladas) y Actinobacteria (4.0% del total de bacterias aisladas), distribuidas en 7 familias, 11 géneros y 23 especies (más 2 especies sin clasificar, dando un total de 25 especies con genes desnitrificantes) (Anexo 4).

Los 11 géneros encontrados en las bacterias aisladas por orden decreciente de abundancia fueron: *Psychrobacter* (986 aislados con 37 representantes), *Pseudomonas* (117 aislados con 2 representantes), *Paracoccus* (106 aislados con 6 representantes), *Micrococcus* (47 aislados con 1 representante), *Planomicrobium* (36 aislados con 3 representantes), *Planococcus* (28 aislados con 3 representantes), *Arthrobacter* (6 aislados con 3 representantes), *Mesobacillus* (5 aislados con 2 representantes), *Bacillus* (4 aislados con 3 representantes), *Brevibacillus* (2 aislados con 1 representante) y *Metabacillus* (1 aislado con 1 representante) (Anexo 4).

De las 25 especies encontradas, las que tuvieron mayor abundancia de aislados desnitrificantes fueron *Psychrobacter piscatorii* (267 aislados con 4 representantes), *Psychrobacter celer* (193 aislados con 11 representantes), *Psychrobacter submarinus* (130 aislados con 3 representantes), *Psychrobacter pacificensis* (124 aislados con 4 representantes) y *Pseudomonas songnenensis* (117 aislados con 2 representantes) (Anexo 4). Las especies con menor abundancia de bacterias aisladas fueron *Arthrobacter enclensis*, *Bacillus alcalophilus*, *Bacillus humi* y *Metabacillus endolithicus*, presentando cada una solo un aislado y, por lo tanto, un representante (Anexo 4).

Las 25 especies desnitrificantes se repartieron de la siguiente manera a lo largo del transecto de muestreo (Anexo 5): 4 especies únicas en la Boca, 7 únicas en la zona media y 1 única en la cabeza; además, la cabeza compartió 2 especies con la boca y 3 con la zona media, mientras que la zona media y la boca compartieron 1 especie, las tres estaciones compartieron 7 especies (Figura 13-a). El sedimento con *Zostera marina* presentó 5 especies únicas y el desnudo 4 únicas, ambos hábitats compartieron 16 especies (Figura 13-b). El sedimento de fondo tuvo 9 especies únicas y el de superficie 6 únicas, compartieron 10 especies (Figura 13-c).

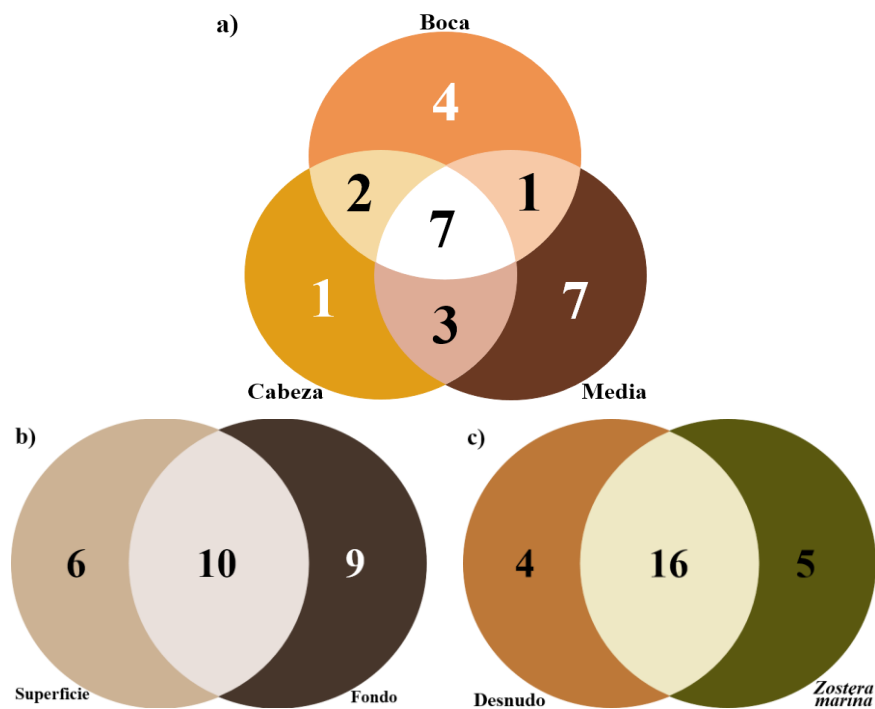


Figura 13 | Diagramas de Venn de la distribución de las 25 especies de bacterias desnitrificantes en: a) estaciones de muestreo, b) profundidad del estrato, c) hábitat de la muestra.

La abundancia de 1321 aislados pertenecientes a 17 especies que estuvieron presentes en más de una muestra (de los 1338 aislados representados por 25 especies clasificadas) tuvo una distribución diferente para cada especie en el transecto (Figura 14). De las γ -Proteobacterias, *Psychrobacter submarinus* se aisló con mayor frecuencia del sedimento superficial con y sin *Zostera marina* de la cabeza, *Psychrobacter* sp. Del sedimento superficial con *Zostera marina* de la zona media, *Psychrobacter piscatorii* del sedimento superficial desnudo de la cabeza, *Psychrobacter pacificensis* y *Psychrobacter celer* del sedimento superficial desnudo de la boca, *Psychrobacter nivimaris* del sedimento superficial con *Zostera marina* de la boca, *Psychrobacter marincola* del sedimento superficial con y sin *Zostera marina* de la zona media, *Psychrobacter alimentarius* de los sedimentos superficiales con *Zostera marina* de la zona media y la cabeza, y *Pseudomonas songnenensis* del sedimento de fondo desnudo de la cabeza. La única representante de α -Proteobacteria, *Paracoccus marcusii*, abundó en el sedimento de fondo desnudo de la cabeza. De Bacilli, *Planomicrobium okeanokoites* dominó en el sedimento de fondo con *Zostera marina* de la zona media, mientras que *Planococcus maritimus* abundó en el sedimento superficial con *Zostera marina* y en el de fondo desnudo de la boca. Por último, dentro de Actinobacteria, *Micrococcus endophyticus* dominó en el sedimento superficial con *Zostera marina* de la zona media, mientras que *Arthrobacter* sp. Solo se presentó en el sedimento de fondo con y sin *Zostera marina* de la boca.

Cabe mencionar que las especies *Psychrobacter glacicola* (7 aislados), *Metabacillus endolithicus* (1 aislado), *Mesobacillus jeotgali* (2 aislados), *Bacillus humi* (1 aislado), *Bacillus aquimaris* (2 aislados), *Bacillus alcalophilus* (1 aislado), *Arthrobacter tumbae* (2 aislados) y *Arthrobacter enclensis* (1 aislado) fueron descartadas de la Figura 14 por presentarse solo en una muestra.

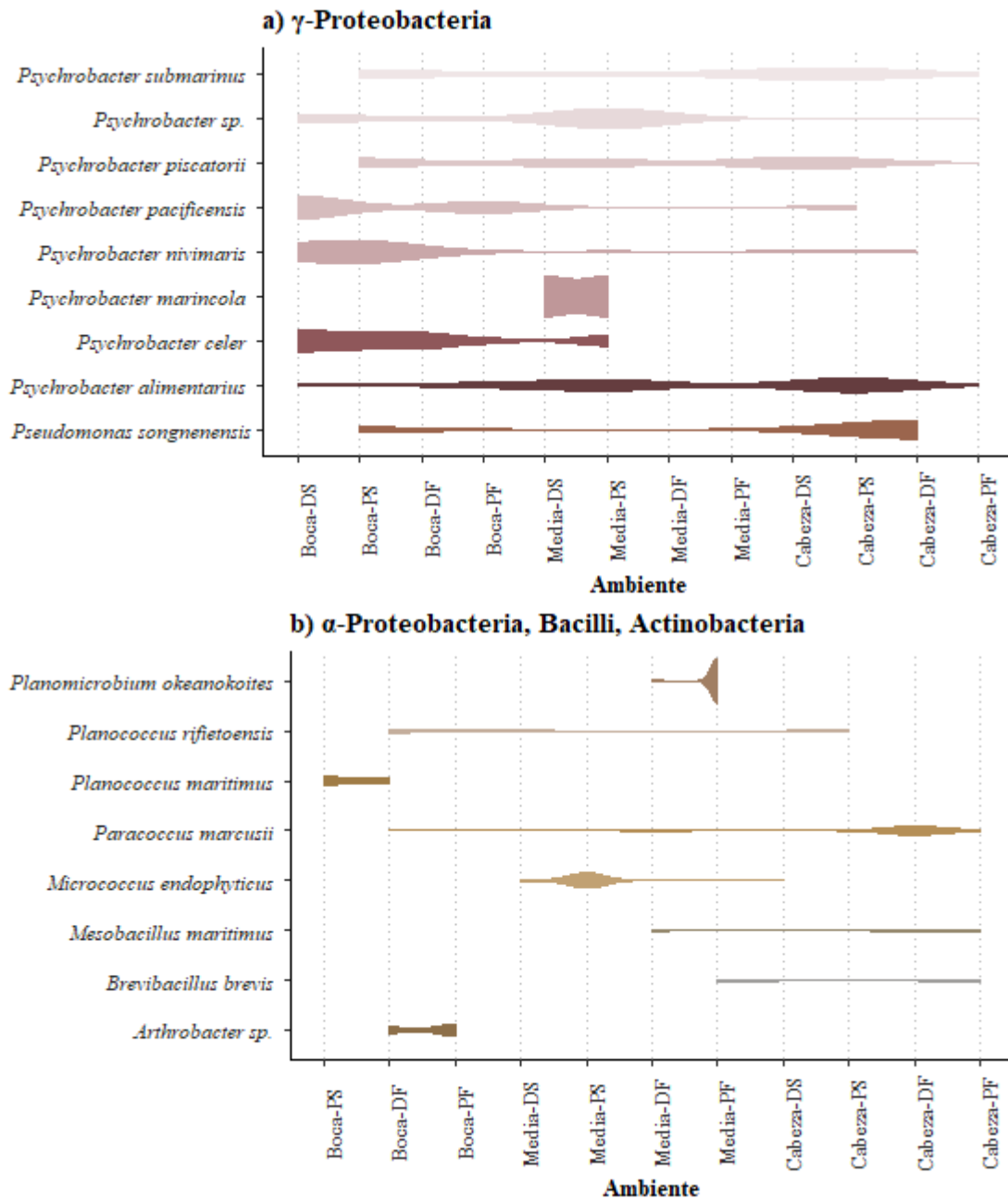


Figura 14 | Distribución de la abundancia de los aislados representados por 17 de las 25 especies clasificadas en los diferentes ambientes evaluados en el brazo San Quintín. Las especies se dividieron en las clases a) γ -Proteobacteria y b) α -Proteobacteria, Bacilli y Actinobacteria. **P/D:** Con *Zostera marina* / Desnudo; **S/F:** Superficie (0-5 cm) / Fondo (15-20 cm).

En 12 de las 25 especies desnitrificantes identificadas hubo representantes pertenecientes a la misma especie con diferentes rasgos morfológicos (Anexo 6 y 7). Las diferencias más evidentes se observaron en 8 de estas 12 especies: *Paracoccus marcusii* tuvo 3 representantes que presentaron coloración anaranjada, 2 de color crema y 1 de color café claro; *Planomicrobium okeanoikoites* tuvo 2 representantes que presentaron coloración anaranjada y 1 de color blanco; *Psychrobacter alimentarius* tuvo 2 representantes de color anaranjado y 2 de color crema; *Psychrobacter celer* tuvo 7 representantes de color crema, 2 de color blanco, 1 amarillo y 1 anaranjado; *Psychrobacter nivimaris* tuvo 2 representantes de color crema y 1 blanco; *Psychrobacter piscatorii* tuvo 1 representante de color blanco, 1 amarillo pastel, 1 crema y 1 incoloro; *Psychrobacter submarinus* tuvo 2 representantes de color crema y 1 de color blanco; y *Psychrobacter* sp. Tuvo 3 representantes de color crema y 2 de color blanco.

Así mismo, en 10 de las 25 especies identificadas hubo representantes pertenecientes a la misma especie con distintos genes marcadores (Figura 15): *Paracoccus marcusii* tuvo 2 representantes con el gen *nirK*, 1 con *nirS*, 1 con *nosZ*, 1 con *nirK* y *nosZ* y 1 con los tres genes marcadores; *Pseudomonas songnenensis* tuvo 1 representante con los genes *nirS* y *nosZ* y 1 con los tres genes marcadores; *Psychrobacter submarinus* tuvo 1 representante con los genes *nirK* y *nirS*, 1 con *nirK* y 1 con *nosZ*; *Psychrobacter marincola* tuvo 1 representante con el gen *nosZ* y 1 con *nirK* y *nosZ*; *Psychrobacter alimentarius* tuvo 2 representantes con el gen *nosZ*, 1 con *nirK* y 1 con *nirK* y *nirS*; *Psychrobacter pacificensis* tuvo 2 representantes con el gen *nosZ*, 1 con *nirK*, 1 con *nirK* y *nirS* y 1 con *nirS* y *nosZ*; *Psychrobacter piscatorii* tuvo 1 representante con el gen *nirK*, 1 con *nirK* y *nirS*, 1 con *nirK* y *nosZ* y 1 con los tres genes marcadores; *Psychrobacter nivimaris* tuvo 2 representantes con los genes *nirK* y *nosZ* y 1 con *nirK*; *Psychrobacter celer* tuvo 7 representantes con los genes *nirK* y *nosZ*, 2 con *nirS* y *nosZ*, 1 con *nirS* y 1 con *nirK* y *nirS* y; *Psychrobacter* sp. Tuvo 3 representantes con el gen *nosZ*, 1 con *nirK* y *nirS* y 1 con *nirK* y *nosZ*.

Por otra parte, solo hubo dos especies identificadas con representantes que presentaron los mismos genes a pesar de ser aislados de ambientes distintos: *Planococcus maritimus* tuvo 2 representantes con el gen *nirS* y *Planomicrobium okeanoikoites* tuvo 3 representantes con el gen *nosZ* (Figura 15).

Por último, hubo 13 especies identificadas que contaron con solo 1 representante (Figura 15): *Brevibacillus brevis* con *nosZ*, *Bacillus alcalophilus* con *nirS*, *Bacillus aquimaris* con *nirS*, *Bacillus humi* con *nosZ*, *Metabacillus endolithicus* con *nirS*, *Mesobacillus jeotgali* con *nosZ*, *Mesobacillus maritimus* con *nosZ*, *Planococcus rifietoensis* con *nirS*, *Arthrobacter tumbae* con *nosZ*, *Arthrobacter enclensis* con *nosZ*, *Arthrobacter* sp. con *nirK*, *Micrococcus endophyticus* con *nirS* y *Psychrobacter glacincola* con *nosZ*.

bootstrap

- 0.54
- 0.66
- 0.77
- 0.89
- 1

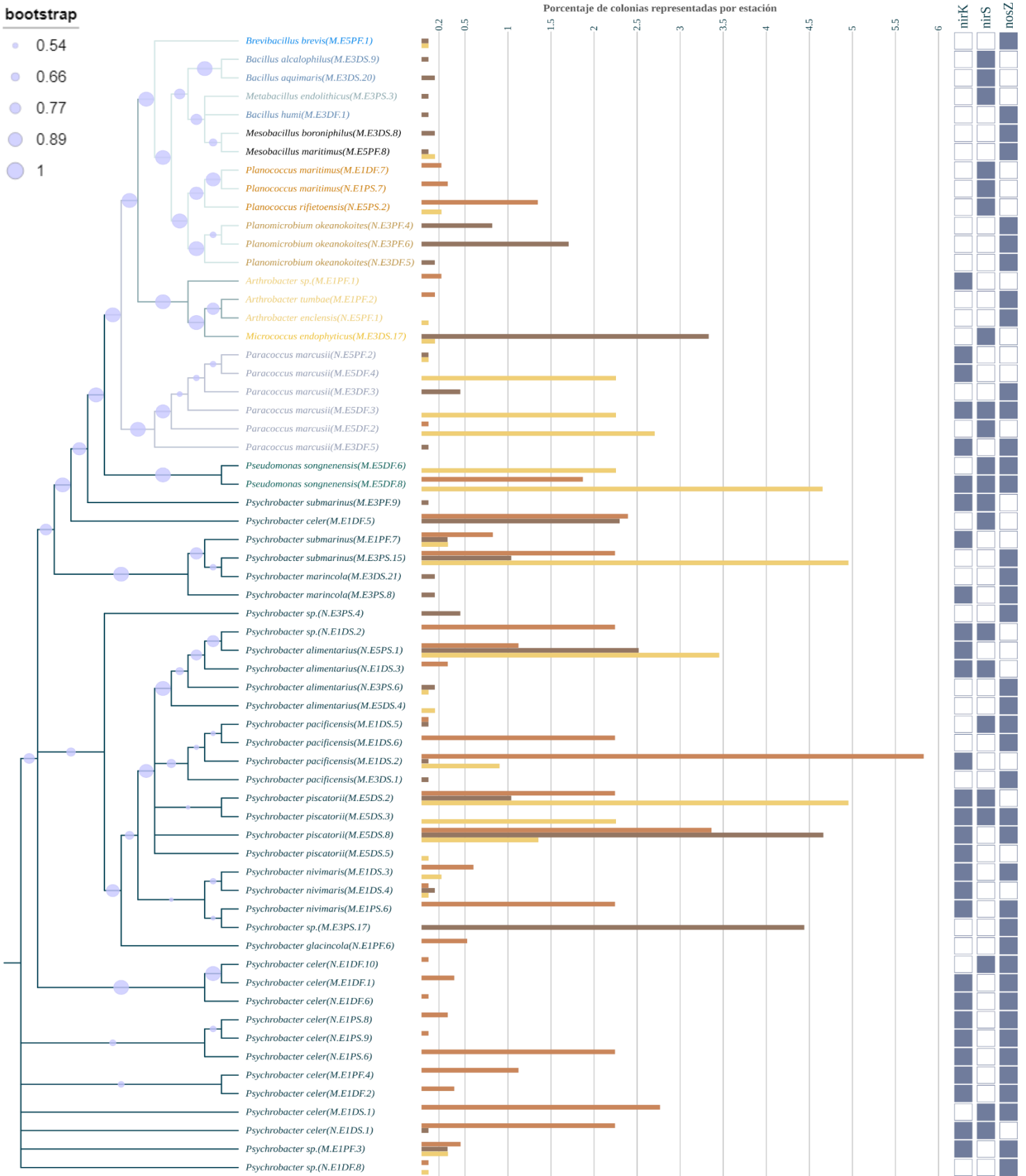


Figura 15 | Árbol filogenético de las secuencias de *16S rRNA* de los representantes bacterianos desnitrificantes aislados en sedimentos del brazo San Quintín. El valor del *bootstrap* se muestra en círculos azules en los nodos. El color de los nombres representa los géneros encontrados y el color de las ramas a la clase correspondiente: γ -Proteobacteria (—), α -Proteobacteria (—), Bacilli (—) y Actinobacteria (—). En paréntesis se indica el medio de cultivo de aislamiento: Marino (M) o nutritivo (N). La gráfica de barras a la derecha del árbol presenta la abundancia relativa de los aislados obtenidos de cada representante en cada estación: boca (■), zona media (■) y cabeza (■). En el sistema binario se muestra la presencia (■) o ausencia (□) de los genes *nirK*, *nirS* y *nosZ*.

En ocasiones, la presencia de determinados genes estuvo ligada con la presencia de rasgos morfológicos notorios (Anexo 6; Figura 15). Por ejemplo, en los representantes de *Paracoccus marcusii* se formaron 3 grupos en función del color del aislado: los de color anaranjado tuvieron 3 representantes en total, dos de ellos presentaron el gen *nirK* (N.E5PF.2 y M.E5DF.4) y el otro *nosZ* (M.E3DF.3), mientras que el representante de color café claro (M.E5DF.3) se distinguió por tener los 3 genes marcadores. Los 4 representantes de *Psychrobacter piscatorii* tuvieron colores y genes diferentes: Blanco (M.E5DS.2) con *nirK* y *nirS*, incoloro (M.E5DS.3) con los tres genes, amarillo pastel (M.E5DS.5) con *nirK* y crema (M.E5DS.8) con *nirK* y *nosZ*. Los representantes de *Psychrobacter celer* se dividieron en 4 grupos en función del color del aislado: 5 de los 7 representantes de color crema tuvieron *nirK* y *nosZ* (N.E1DF.6, M.E1DF.1, M.E1DF.2, M.E1PF.4 y N.E1PS.8), mientras que los 2 representantes restantes presentaron *nirS* y *nosZ* (N.E1DF.10 y M.E1DS.1); 1 de los representantes de color blanco tuvo los genes *nirK* y *nirS* (N.E1DS.1) y el otro *nirK* y *nosZ* (N.E1PS.6); el representante amarillo (N.E1PS.9) tuvo *nirK* y *nosZ* y el representante de color anaranjado (M.E1DF.5) tuvo *nirS*.

9.5.- Diversidad α de los aislados bacterianos con genes marcadores desnitrificantes

El índice de Simpson muestra que hubo baja dominancia de los aislados bacterianos en los ambientes evaluados, ya que sus valores estuvieron en un rango de entre 0.83 y 0.88 (Tabla 6). Así mismo, el índice de Shannon-Wiener indica que hubo una alta diversidad de los aislados bacterianos desnitrificantes en los ambientes evaluados, ya que sus valores fueron cercanos al máximo valor teórico de diversidad (H_{max}), hecho que también se observa en los valores de uniformidad, los cuales oscilaron entre 0.72 y 0.78 (E; Tabla 6).

El índice de Chao1 muestra que los ambientes con mayor riqueza de bacterias aisladas con genes desnitrificantes fueron la zona media (Chao1= 28.2), el estrato del fondo (Chao1= 31) y el sedimento desnudo (Chao1= 30.1) (Tabla 6). Los valores de este índice fueron congruentes con el número de especies contadas por muestra (riqueza específica; Tabla 6).

Tabla 6 | Índices de diversidad α : Riqueza específica (número de especies presentes por muestra), Chao1, Simpson y Shannon-Wiener calculados a partir de las abundancias de los aislados bacterianos con genes desnitrificantes por ambiente estudiado.

Ambiente	Riqueza específica	Chao1	Simpson	Shannon-Wiener	H _{Max}	E
Boca	14	14.5	0.833	2.067	2.639	0.783
Media	20	28.2	0.856	2.171	2.996	0.725
Cabeza	15	17.3	0.831	1.957	2.708	0.723
Superficie	17	18	0.854	2.169	2.833	0.765
Fondo	22	31	0.858	2.259	3.091	0.731
Desnudo	24	30.1	0.878	2.310	3.178	0.727
Pasto	21	21.4	0.882	2.355	3.045	0.774

H_{Max}: Máximo valor teórico del índice de Shannon-Wiener; E: Uniformidad

9.6.- Diversidad β y relación entre la distribución de los aislados bacterianas con genes marcadores desnitrificantes y las propiedades fisicoquímicas de las muestras

En el mapa de calor de la distribución de la abundancia de especies bacterianas desnitrificantes (filas) aisladas de 12 muestras (columnas) se pueden observar dos grupos principales conformados por: 1) Todas las muestras de fondo, con excepción de la proveniente del sedimento sin pasto de la cabeza, agrupadas por presentar las menores abundancias de bacterias aisladas y por coincidir con la ausencia de *Pseudomonas songnenensis*, *Micrococcus endophyticus*, *Psychrobacter marincola*, *Bacillus aquimaris*, *Mesobacillus jeotgali*, *Metabacillus endolithicus* y *Bacillus alcalophilus*; 2) las muestras de superficie de dos ambientes contrastantes, boca con *Zostera marina* y cabeza desnuda, donde dominaron dos especies muy abundantes: *Psychrobacter piscatorii* (75 y 81 aislados, respectivamente) y *Psychrobacter submarinus* (30 y 32 aislados, respectivamente). Por otra parte, el sedimento de fondo desnudo de la cabeza fue el más alejado en el cladograma debido a la dominancia de *Pseudomonas songnenensis* (90 aislados) y *Paracoccus marcussi* (90 aislados) (Figura 16-a), que representaron el 96.3% del total de aislados obtenidos de este ambiente (187 aislados con 5 especies).

Además, hubo cuatro grupos en la distribución de las 25 especies clasificadas (filas): 1) *Psychrobacter celer* y *Psychrobacter pacificensis*, que tuvieron una alta abundancia de aislados en el sedimento superficial desnudo de la boca (60 y 73 aislados, respectivamente); 2) *Pseudomonas songnenensis* y *Paracoccus marcussi*, que tuvieron una alta abundancia de aislados en el sedimento de fondo desnudo de la cabeza (90 aislados cada uno); 3) *Psychrobacter* sp. Y *Micrococcus endophyticus*, que tuvieron una alta abundancia de aislados en el sedimento superficial con *Zostera marina* de la zona media (66 y 42 aislados, respectivamente); y 4) el resto de especies, que tuvieron una baja distribución en los ambientes evaluados (Figura 16-a).

En la matriz de correlación de las abundancias de aislados bacterianos y las variables fisicoquímicas se puede observar que el porcentaje de arcilla fue la única variable que tuvo una correlación significativamente negativa ($p\text{-value} \leq 0.05$) con *Psychrobacter celer*, debido a que en la boca es donde hubo menos porcentaje de arcilla y más abundó dicha especie bacteriana (Figura 16-b).

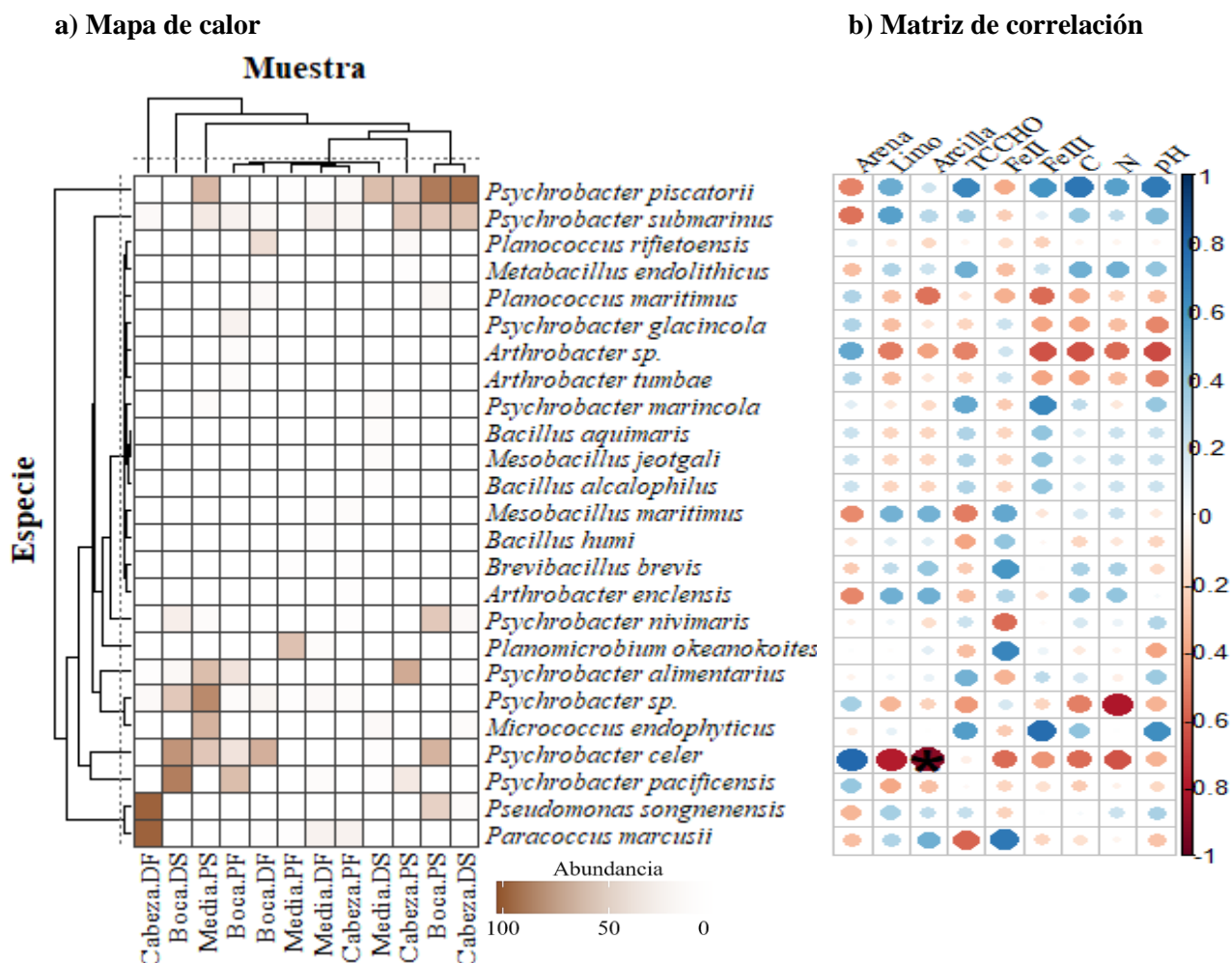


Figura 16 | a) Mapa de calor y b) Matriz de correlación de Spearman realizados a partir de las abundancias de especies y datos fisicoquímicos de los sedimentos. P/D: Con *Zostera marina* / Desnudo; S/F: Superficie (0-5 cm) / Fondo (15-20 cm); TCCHO: Materia orgánica lábil; C: Carbono orgánico total; N: Nitrógeno total. *= Datos significativos ($p\text{-value} \leq 0.05$)

En el gráfico de NMDS se pueden distinguir tres grupos de muestras en función de la abundancia de los aislados desnitrificantes (Figura 17, Anexo 9): El primer grupo se conformó por muestras superficiales (0-5 cm), excepto la del sedimento desnudo de la boca, tuvo una ligera relación positiva con el pH y estuvo asociado con una alta abundancia de los aislados de las especies *Metabacillus endolithicus*, *Psychrobacter alimentarius*, *Psychrobacter nivimaris* y *Psychrobacter submarinus*. El segundo grupo estuvo conformado por muestras de fondo (15-20 cm) de las estaciones media y

cabeza, tuvo una fuerte relación positiva con la textura arcillosa y se asoció principalmente con la abundancia de los aislados de las especies *Psychrobacter celer*, *Psychrobacter* sp., *Pseudomonas songnenensis*, *Planococcus maritimus* y *Planococcus rifietoensis*. Por último, el tercer grupo estuvo formado por las muestras de la boca (excepto la de superficie con *Zostera marina*), se relacionó positivamente con la textura arenosa y negativamente con los contenidos de C y N total y estuvo ligeramente asociado con la abundancia de los aislados pertenecientes a las especies *Arthrobacter enclensis*, *Brevibacillus brevis* y *Planomicrobium okeanokoites*. Cabe mencionar que las especies *Bacillus alcalophilus*, *Bacillus aquimaris* y *Mesobacillus jeotgali* se encontraron alejados estos tres grupos.

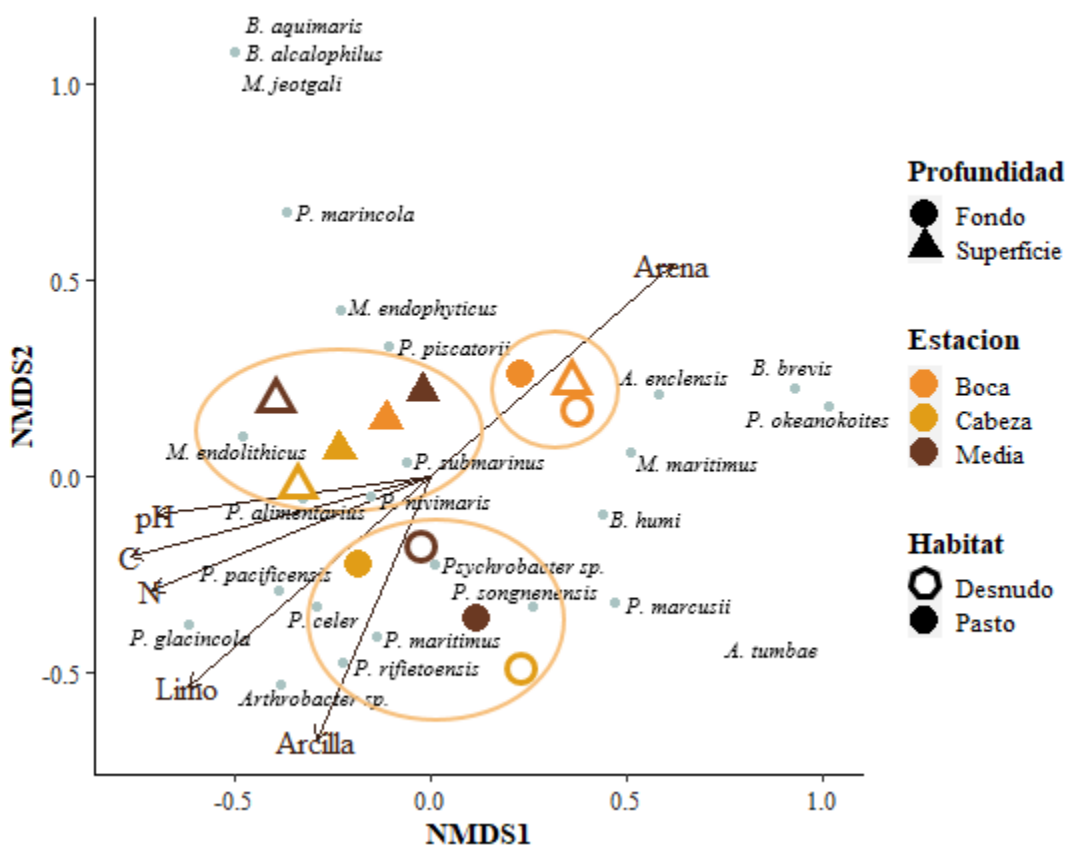


Figura 17 | Escalamiento multidimensional no métrico (NMDS, por sus siglas en inglés) de la distribución de las muestras en función de la abundancia de aislados de las especies bacterianas clasificadas y su relación con los vectores ambientales significativos (p-value ≤ 0.05). Nivel de estrés (Bray-Curtis): 0.069. C: C orgánico total; N: N total.

9.7.- Verificación de actividad desnitrificante en los aislados bacterianos con genes *nirK*, *nirS* y/o *nosZ*

Se comprobó la actividad desnitrificante en condiciones aerobias en 7 especies bacterianas aisladas del brazo San Quintín (Tabla 7): *Psychrobacter piscatorii* (1 representante con genes *nirK/nirS* y *nosZ* activos), *Psychrobacter celer* (4 representantes con gen *nirK* activo y 1 con *nirS* activo), *Pseudomonas songnenensis* (1 representante con genes *nirK/nirS* activo(s) y 1 con *nirK/nirS* y *nosZ* activos), *Paracoccus marcusii* (2 representantes con gen *nirK* activo, 1 con *nirS* activo y 1 con *nirK/nirS* y *nosZ* activos), *Psychrobacter alimentarius* (1 representante con genes *nirK/nirS* activo(s)), *Planococcus rifietaensis* (1 representante con gen *nirS* activo) y *Planococcus maritimus* (1 representante con gen *nirK* activo y 1 con *nirK/nirS* activo). Así mismo, en 2 representantes sin identificar por mala calidad en la secuencia obtenida, se pudo comprobar la actividad del gen *nirK* (M.E5DS.1) y *nirS* (N.E3DF.3).

Tabla 7 | Características de los aislados representantes cuya actividad de los genes desnitrificantes identificados por PCR pudo ser comprobada mediante la prueba colorimétrica modificada de Norris & Ribbons (1972).

Especie	Representante	n	Morfología	Genes encontrados por PCR			Gen comprobado
				<i>nirK</i>	<i>nirS</i>	<i>nosZ</i>	
<i>Psychrobacter celer</i>	N.E1PS.6	30	Blanco Achatado	+	—	+	<i>nirK</i>
	N.E1PS.8	4	Crema Protuberante	+	—	+	<i>nirK</i>
	N.E1PS.9	1	Amarillo Achatado	+	—	+	<i>nirK</i>
	N.E1DF.6	1	Crema Achatada	+	—	+	<i>nirK</i>
	N.E1DF.10	1	Crema Elevado	—	+	+	<i>nirS</i>
<i>Paracoccus marcusii</i>	M.E3DF.5	1	Crema Achatada	+	—	+	<i>nirK</i>
	M.E5DF.2	37	Crema Elevado	—	+	—	<i>nirS</i>
	M.E5DF.3	30	Café claro Achatada	+	+	+	<i>nirK / nirS y nosZ</i>
	M.E5DF.4	30	Anaranjado Achatada	+	—	—	<i>nirK</i>
<i>Planococcus maritimus</i>	M.E1DF.7	3	Anaranjado Elevado	—	+	—	<i>nirS</i>
	N.E1PS.7	4	Anaranjado Achatado	—	+	—	<i>nirS</i>
<i>Planococcus rifietaensis</i>	N.E5PS.2	3	Anaranjado Elevado	—	+	—	<i>nirS</i>
<i>Pseudomonas songnenensis</i>	M.E5DF.6	30	Anaranjado Elevado	—	+	+	<i>nirS y nosZ</i>
	M.E5DF.8	87	Anaranjado Elevado	+	+	+	<i>nirK / nirS y nosZ</i>
<i>Psychrobacter piscatorii</i>	M.E5DS.3	30	Incoloro Achatado	+	+	+	<i>nirK / nirS y nosZ</i>

<i>Psychrobacter alimentarius</i>	N.E1DS.3	4	Anaranjado Achatada	+	+	-	<i>nirK / nirS</i>
Sin identificar	M.E5DS.1	30	Blanca Achatada	+	-	-	<i>nirK</i>
Sin identificar	N.E3DF.3	1	Rojo pastel Achatado	-	+	-	<i>nirS</i>

n: Abundancia de aislados; Morfología: Color y elevación.

Al contrastar nuestros resultados con la base de datos NCBI, encontramos que, de las 23 especies con genes desnitrificantes clasificadas (2 descartadas por clasificarse solo hasta nivel de género), 18 presentaron genoma en el NCBI, de las cuales solo 3 contaron con el registro de alguno de los genes marcadores: *Mesobacillus jeotgali* (*nosZ*), *Mesobacillus maritimus* (*nosZ*) y *Pseudomonas songnenensis* (*nirK* y *nosZ*) (Tabla 8). En *Mesobacillus jeotgali* y *Mesobacillus maritimus* los resultados de este estudio coincidieron con lo encontrado en el NCBI; sin embargo, en este trabajo se reportó 1 representante de *Pseudomonas songnenensis* con *nirS* mientras que en su genoma no aparece reportado (Tabla 8).

Tabla 8 | Registro de genes *nirS*, *nirK* y/o *nosZ* en especies bacterianas con genomas completos en el NCBI.

Especie	Genes encontrados en este estudio			Genoma disponible	Genes presentes en el genoma	ID proteína
	<i>nirK</i>	<i>nirS</i>	<i>nosZ</i>			
<i>Arthrobacter tumbae</i>			X	SI		
<i>Micrococcus endophyticus</i>		X		SI		
<i>Arthrobacter enclensis</i>			X	SI		
<i>Bacillus alcalophilus</i>		X		NO		
<i>Bacillus aquimaris</i>		X		NO		
<i>Bacillus humi</i>			X	NO		
<i>Brevibacillus brevis</i>			X	SI		
<i>Psychrobacter celer</i>	X	X	X	NO		
<i>Psychrobacter submarinus</i>	X	X		SI		
<i>Mesobacillus jeotgali</i>			X	SI	<i>nosZ</i>	WP_102264655.1
<i>Mesobacillus maritimus</i>			X	SI	<i>nosZ</i>	WP_251428094.1
<i>Metabacillus endolithicus</i>		X		SI		
<i>Paracoccus marcusii</i>	X	X	X	SI		
<i>Planococcus maritimus</i>		X		SI		
<i>Planococcus rifietoensis</i>		X		SI		
<i>Planomicrobium okeanoikoites</i>			X	SI		
<i>Pseudomonas songnenensis</i>	X	X	X	SI	<i>nirK</i> y <i>nosZ</i>	<i>nosZ</i> : WP_015275732.1 <i>nirK</i> : WP_239060843.1
<i>Psychrobacter nivimaris</i>	X		X	SI		
<i>Psychrobacter pacificensis</i>	X	X	X	NO		
<i>Psychrobacter marincola</i>	X		X	SI		
<i>Psychrobacter piscatorii</i>	X	X	X	SI		
<i>Psychrobacter alimentarius</i>	X	X	X	SI		
<i>Psychrobacter glacincola</i>			X	SI		

X. Discusión

Los sedimentos de estuarios, como los de la bahía de San Quintín son ambientes propicios para el desarrollo de bacterias desnitrificantes (Damashek y Francis 2017). Además, la proliferación de *Zostera marina* y el estado somero de esta bahía promueven grandes aportes de materia orgánica para las bacterias desnitrificantes en estos sedimentos (Wilkerson et al. 2006, Eyre et al. 2016). Asimismo, las altas concentraciones de hierro que puede haber en algunas bahías, como en la de San Quintín, pueden estimular la actividad desnitrificante de bacterias con *nirS* (Zumft 1997). Por último, a lo largo del brazo San Quintín se producen fuertes gradientes fisicoquímicos que pueden influir en la distribución de las bacterias desnitrificantes (Ribas-Ribas et al. 2011). Por lo tanto, esta zona de estudio es ideal para la investigación de la influencia que tienen las variables ambientales en la distribución de bacterias aerobias desnitrificantes en sedimentos costeros.

10.1.- Comportamiento de las variables fisicoquímicas en el brazo San Quintín

Los sedimentos del brazo San Quintín fueron anóxicos, estos resultados son congruentes con la dominancia de procesos bentónicos en la bahía (Ibarra-Obondo et al., 2004) que podrían estar consumiendo el O_2 disuelto por encima de los sedimentos. Los valores de pH sedimentario encontrados en el brazo San Quintín fueron alcalinos (de 7.9 a 8.2) y coinciden con lo reportado anteriormente por Ribas-Ribas et al. (2011). Estos elevados valores de pH pueden deberse a que los sedimentos de la zona están conformados por compuestos de basaltos alcalinos (Luhr et al., 1995).

Los valores de temperatura, salinidad y O_2 disuelto en la columna de agua, así como las concentraciones de C orgánico total y N total en el sedimento, incrementaron de la boca a la cabeza. Este aumento podría explicarse por el tiempo de retención del agua en el brazo, ya que en los estuarios inversos de tipo lagunar costero incrementa de la boca a la cabeza (Pritchard, 1952; Potter et al., 2010; Canu et al., 2016). La granulometría del brazo San Quintín también pudo haber estado influenciada por el tiempo de retención del agua, teniendo en cuenta que la zona de estudio es un cuerpo de agua somero (profundidad media de 2 m; INEGI, 2021) y que el tiempo promedio de permanencia del agua en la cabeza del brazo es de ~16 días y en la boca de ~1 día (Ribas-Ribas et al., 2011). Por lo tanto, cabría esperar mayores tasas de sedimentación de materia orgánica en la cabeza que, al acumularse en el sedimento, podrían propiciar el cambio de una textura arenosa en la boca a una limo-arcillosa en la cabeza (Calderón-Aguilera et al., 1992; Daesslé et al., 2009).

Las altas concentraciones de hierro encontradas pueden deberse a que en la zona de estudio predomina el material piroclástico y productos derivados de la erosión de rocas graníticas del batolito peninsular

(Naranjo et al., 2017). Los valores más altos de Fe(II) y Fe(III) se dieron en la zona media, por lo que es muy probable que las descargas esporádicas del arroyo San Simón al brazo San Quintín representen una fuente de hierro alterna a través del transporte de material terrígeno (Navarro et al., 2006).

10.2.- Distribución de bacterias con genes desnitrificantes aisladas de los sedimentos del brazo San Quintín

En la última década se ha logrado aislar bacterias desnitrificantes aerobias en diferentes sistemas marinos (Zheng et al., 2011; Li et al., 2017; Chen et al., 2020; Zhang et al., 2020), excepto en estuarios inversos. Por tanto, este trabajo es el primero en aislar, caracterizar morfológica y filogenéticamente, y comprobar la actividad potencial desnitrificante en condiciones aerobias de bacterias portadoras de genes *nirK*, *nirS* y/o *nosZ* en muestras de sedimentos de la Bahía de San Quintín y, hasta donde se sabe, en estuarios de tipo lagunar costero.

De los 1611 aislados obtenidos en estos sedimentos, el 85.1% presentaron genes *nirK*, *nirS* y/o *nosZ* (1371 aislados). Por lo tanto, se logró aislar una gran cantidad de bacterias desnitrificantes en condiciones aerobias, indicando que las condiciones ambientales de los sedimentos del brazo San Quintín parecen favorecer el desarrollo de bacterias desnitrificantes aerobias.

Se observó un alto porcentaje de bacterias aisladas con genes marcadores desnitrificantes en los sedimentos de la boca y la cabeza (39.7% y 35.4% del total de bacterias aisladas, respectivamente). Se ha demostrado actividad desnitrificante aerobia en sedimentos costeros permeables (Gao et al., 2010; Marchant et al., 2017). Por lo tanto, la alta permeabilidad de los sedimentos arenosos en la boca y la llegada de nutrientes por las surgencias permanentes (Camacho-Ibar et al., 2007; Canu et al., 2016), intensificadas por una fase de “La Niña” atípica en la época de muestreo (Cheng et al., 2022), pudieron fomentar un mayor desarrollo de bacterias desnitrificantes aerobias en esta zona. Por otro lado, las mayores concentraciones de C orgánico en los sedimentos de la cabeza, debido a su contenido limoso y al mayor tiempo de confinamiento del agua (Camacho-Ibar et al., 2003; Ribas-Ribas et al., 2011), pudieron promover también una alta abundancia de bacterias desnitrificantes aerobias en esta zona de la bahía.

Por profundidad y hábitat, el número de aislados fue mayor en los sedimentos superficiales y con pasto marino, posiblemente debido a la difusión de nutrientes y O₂ de la columna de agua a los sedimentos superficiales (Ribas-Ribas et al., 2011; Hoffman et al., 2019), y sus mayores contenidos de materia orgánica con respecto a los estratos del fondo, principalmente en los sedimentos con *Zostera marina*, ya que el recambio foliar incrementa la disponibilidad de materia orgánica con respecto a los sedimentos sin pastos (Eyre et al., 2016).

El gen *nirS* fue el menos abundante en estos sedimentos a pesar de la afinidad de la enzima *cd1* de *nirS* con el Fe (Zumft 1997) y a las elevadas concentraciones de este metal en la bahía de San Quintín (Navarro et al. 2006, Daesslé et al. 2009), por lo tanto pudo haber una posible subestimación de la abundancia de bacterias portadoras de *nirS* debido a la técnica de aislamiento. De hecho, se ha reportado la dominancia de *nirS* sobre otros genes desnitrificantes en estuarios usando diferentes técnicas, por ejemplo, mediante librerías de clonas (Abell et al., 2010), PCR cuantitativa (Jung et al., 2011; Wang et al., 2014; Lee & Francis, 2017; Zhu et al., 2018) o secuenciación masiva (Ming et al., 2021).

10.3.- Taxonomía y filogenia de las especies con genes marcadores desnitrificantes

Las clases con mayor número de bacterias aisladas en el brazo San Quintín fueron γ -Proteobacteria (1103 aislados con 39 representantes, que equivalen al 82.4% del total de bacterias aisladas) y α -Proteobacteria (106 aislados con 6 representantes, que equivalen al 7.9% del total de bacterias aisladas), coincidiendo con algunos trabajos de revisión que indican que la mayor abundancia de bacterias desnitrificantes se encuentra en estas clases (Sousa & Bhosle, 2011; Jones et al., 2013; Damashek & Francis, 2018; Shan et al., 2021). Las otras dos clases encontradas fueron Bacilli (76 aislados con 13 representantes, que equivalen al 5.7% del total de bacterias aisladas) y Actinobacteria (53 aislados con 4 representantes, que equivalen al 4% del total de bacterias aisladas). La clase Bacilli se ha propuesto como un bioindicador de desnitrificación en los sedimentos del estuario del río Amarillo (Li et al., 2022), mientras que desnitrificantes pertenecientes a la clase Actinobacteria se ha encontrado en los sedimentos de la bahía de Hangzhou (Zhu et al., 2018) y en la columna de agua del humedal estuarino del río Fuhe (Sun et al., 2021).

Los tres principales géneros por número de bacterias aisladas fueron *Psychrobacter* (γ -Proteobacteria, 986 aislados con 37 representantes, que equivalen al 73.7% del total de bacterias aisladas), *Pseudomonas* (γ -Proteobacteria, 117 aislados con 2 representantes, que equivalen al 8.7% del total de bacterias aisladas) y *Paracoccus* (α -Proteobacteria, 106 aislados con 6 representantes, que equivalen al 7.9% del total de bacterias aisladas). El género *Psychrobacter* se ha relacionado con eventos de desnitrificación en diferentes tipos de ambientes, por ejemplo, en sedimentos de la bahía de Hangzhou (Zhu et al., 2018), en la columna de agua del humedal estuarino del río Fuhe (Sun et al., 2021) y en muestras de lago, agua de deshielo, mar y hielo glaciar de la Antártida (Cabezas et al., 2022). Además, estudios en su genoma revelan afinidad por la ruta de desnitrificación aeróbica (Lasek et al. 2017) y se ha demostrado esta actividad en varios aislados de este género (Zheng et al., 2011).

Pseudomonas también ha sido vinculada con la desnitrificación en diferentes ecosistemas, como en sedimentos del estuario eutrófico Liaohe (Ming et al., 2021), del estuario del río Colne (Nogales et al., 2002), de la bahía de Hangzhou (Zhu et al., 2018), de la costa mediterránea de Francia (Bonin et al., 1994), de la columna de agua del humedal estuarino del río Fuhe (Sun et al., 2021) y en muestras de agua y hielo glaciar de la Antártida (Cabezas et al., 2022). Del mismo modo, se ha comprobado la ruta de desnitrificación aeróbica en aislados de este género (Wittorf et al. 2018; Chen et al., 2020). Por último, *Paracoccus* se ha asociado con el proceso de desnitrificación en sedimentos de los estuarios Arthur Kill y Chesapeake (Song et al., 2000) y del río Pearl (Zhang et al., 2023). Además, también se ha comprobado la desnitrificante aeróbica en varios aislados de *Paracoccus* (Lu et al., 2019; Zhang et al., 2020). De hecho, *Pseudomonas* y *Paracoccus* son considerados los géneros bacterianos desnitrificantes más frecuentemente aislados en sedimentos (Sousa & Bhosle, 2011).

Hubo representantes pertenecientes a la misma especie bacteriana con diferentes rasgos morfológicos y distintos genes desnitrificantes. Al relacionar el fenotipo y genotipo observado en el estudio, se pudo distinguir dos coincidencias entre las especies *Paracoccus marcusii*, *Psychrobacter piscatorii* y *Psychrobacter celer*; estas fueron que los aislados de color anaranjado presentaban solo 1 de los 3 genes marcadores estudiados y que los aislados de color crema tendían a mostrar el gen *nosZ* junto con uno de los dos genes codificadores de las nitrito reductasas (*nirK* o *nirS*). Sin embargo, al extrapolar estas coincidencias con el resto de las relaciones encontradas de tipo rasgo morfológico – gen(es) presente(s), no se distinguió un patrón claro, por lo que, se concluyó que los rasgos morfológicos no son un buen indicativo del genotipo bacteriano.

Es importante señalar que en este trabajo se aislaron bacterias que portaron simultáneamente genes *nirK* y *nirS* pertenecientes a las especies *Pseudomonas songnenensis* (M.E5DF.8), *Psychrobacter* sp. (N.E1DS.2), *Psychrobacter alimentarius* (N.E1DS.3), *Psychrobacter piscatorii* (M.E5DS.2) y *Psychrobacter celer* (N.E1DS.1). Estos resultados parecen contradecir la idea tradicional de que estos genes son mutuamente excluyentes en los genomas de microorganismos desnitrificantes (Coyne et al., 1989; Zumft, 1997; Jones et al., 2008; Devol, 2015). Sin embargo, dichas observaciones se suman a las de coocurrencia *nirS-nirK* en alineamientos de genomas provenientes del NCBI (Graf et al., 2014), en cultivos anaerobios y microaerobios de *Bradyrhizobium oligotrophicum* S58 (Sánchez & Minamisawa, 2018) y en cultivos aeróbicos de *Pseudomonas stutzeri* (Wittorf et al., 2018). Por lo tanto, se necesita profundizar en la búsqueda de bacterias con el complejo *nirS-nirK* en sus genomas, así como en el estudio de su fisiología y metabolismo.

10.4.- Diversidad α y β y distribución de las especies con genes marcadores desnitrificantes

La diversidad de las bacterias desnitrificantes aisladas en esta bahía fue menor que la encontrada en otros sedimentos marinos. Sin embargo, esto puede ser consecuencia de la técnica de estudio, pues a diferencia de la PCR cuantitativa empleada en la bahía de Laizhou (Wang et al., 2014) y en el estuario Yangtze (Zheng et al., 2015), o la secuenciación masiva utilizada en los estuarios de Jiaozhou (Liu et al., 2020) y Liaohe (Ming et al., 2021), el aislamiento en agar sesga la abundancia real de bacterias en los ambientes (Schloss & Handelsman, 2004; Harwani, 2013).

La baja dominancia (Simpson: 0.83-0.88) y elevada uniformidad (E: 0.72-0.78) observada en los aislados obtenidos puede ser consecuencia de la constante entrada de nutrientes mediante la corriente de California, al estado somero de la bahía y a la elevada abundancia de *Zostera marina* (Canu et al., 2016; Hernández-López et al., 2017), que favorecerían la proliferación de bacterias desnitrificantes. Así mismo, estas condiciones podrían promover, a su vez, la cooperación entre bacterias, algo especialmente importante para procesos modulares como la desnitrificación (Zumft, 1997; Damashek & Francis, 2018) y facilitar el intercambio genético a través de mecanismos como *quorum sensing* (Miller & Bassler, 2001), trayendo consigo mayor diversidad.

Además, mediante diferentes análisis (Diagramas de Venn, gráficas de violín, mapa de calor y NMDS) se comprobó que la distribución de las bacterias aisladas con genes marcadores desnitrificantes en las muestras sedimentarias provenientes de los diferentes ambientes evaluados en el brazo San Quintín fue heterogénea, correspondiendo con la alta diversidad observada en los índices de diversidad α . Este hecho también coincide con la casi nula correlación entre los parámetros fisicoquímicos y las abundancias de especies desnitrificantes aisladas que se explica más adelante; por tanto, al no haber una clara variable que favorezca la proliferación de una especie determinada en las muestras, no tendrían por qué presentarse casos de dominancia.

10.5.- Relación entre la distribución de los aislados bacterianos con genes marcadores desnitrificantes y las propiedades fisicoquímicas de las muestras

Al comparar las abundancias de las especies con los parámetros fisicoquímicos, solo se observó una correlación significativa negativa ($p\text{-value} \leq 0.05$) entre la abundancia de *Psychrobacter celer* y el porcentaje de arcilla, lo que pudo deberse a que *Psychrobacter celer* fue la segunda especie con mayor número de aislados, pero su distribución estuvo prácticamente confinada a las muestras obtenidas de la boca, lugar en donde se registraron los porcentajes más bajos de arcilla.

Sin embargo, al relacionar la abundancia de las bacterias aisladas por muestras con los parámetros fisicoquímicos, se encontró que dichas abundancias estaban condicionadas principalmente por la concentración de C orgánico total y N total, la composición granulométrica, y el pH. Estos resultados fueron similares a los reportados mediante la técnica de PCR cuantitativa en sedimentos de estuarios de China: La concentración de C orgánico total influyó en la composición de las comunidades bacterianas con genes desnitrificantes en Laizhou (Wang et al., 2014); las concentraciones de diferentes formas de N se relacionaron positivamente con las abundancias de bacterias con genes desnitrificantes en Liaohe (Ming et al., 2021), Laizhou (Wang et al., 2014; Zhang et al., 2014) y Hangzhou (Zhu et al., 2018); el tipo de granulometría reguló la composición de bacterias desnitrificantes en Liaohe (Ming et al., 2021) y Laizhou (Wang et al., 2014).

10.6.- Verificación de la actividad desnitrificante en los representantes bacterianos con genes desnitrificantes

Es importante recordar que la desnitrificación es un proceso modular, es decir, hay muchos desnitrificantes que solo poseen vías parciales con algunos genes faltantes, llegando incluso a presentar solo una de las enzimas vinculadas a este metabolismo (Zumft, 1997; Damashek & Francis, 2018), lo que dificulta observar la reducción completa de NO_3^- a N_2 en monocultivos. Sin embargo, los resultados obtenidos fueron muy interesantes, pues se logró confirmar la reducción de NO_3^- en condiciones aerobias en 4 especies (*Psychrobacter alimentarius*, *Psychrobacter celer*, *Planococcus maritimus* y *Planococcus rifietoensis*) en las que no se había reportado previamente dicha actividad y en 2 aislados sin identificar (M.E5DS.1 y N.E3DF.3), además de una desnitrificación completa en 3 especies (*Psychrobacter piscatorii*, *Pseudomonas songnenensis* y *Paracoccus marcusii*; Tabla 8).

La comprobación de la actividad desnitrificante en tres especies de *Psychrobacter* apoya la propuesta, basada en estudios genómicos, de que este género puede realizar desnitrificación aeróbica (Lasek et al., 2017). Este hecho también podría explicar porque en nuestros aislados dominó *Psychrobacter*, ya que nuestras condiciones de cultivo, al igual que la prueba de reducción de NO_3^- y NO_2^- , fueron aeróbicas.

La actividad desnitrificante aerobia observada en *Pseudomonas songnenensis* y *Paracoccus marcusii* podría seguir una ruta de desnitrificación completa (con producción de N_2 y no de N_2O), ya que se ha descrito la presencia del gen *nosZ* en ambos géneros (Jones et al., 2013). Así mismo, se tiene el antecedente de que el genoma de *Pseudomonas songnenensis* contiene los genes *nirK* y *nosZ* (NCBI: NZ_RFFN01000004.1; Peng & Liu, 2018) y de que los aislados asociados a *Pseudomonas* pueden llevar a cabo la desnitrificación aeróbica (Wittorf et al., 2018; Chen et al., 2020). Además, ciertos

aislados del género *Paracoccus* también se han asociado con eventos de desnitrificación aeróbica (Lu et al., 2019; Zhang et al., 2020).

Las otras dos especies en las que se pudo comprobar una actividad desnitrificante aeróbica pertenecen a *Planococcus* (*P. rifietoensis* y *P. maritimus*), un género que no ha sido asociado con esta ruta metabólica, sin embargo, se sabe que su clase (Bacilli) puede llevar a cabo la desnitrificación anaeróbica (Li et al., 2022) y aeróbica (Yang et al., 2020).

Por lo tanto, en los sedimentos del brazo San Quintín hay una alta abundancia de bacterias con genes desnitrificantes, de las cuales en al menos siete especies se pudo comprobar su capacidad para llevar a cabo la desnitrificación aerobia. Ya que el sistema modular de la desnitrificación facilita la interacción entre bacterias, posiblemente éstas hayan obtenido los genes desnitrificantes mediante transferencia horizontal a través de mecanismos como el *quorum sensing* (Miller y Bassler, 2001; Qiao et al., 2021).

10.7.- Perspectivas y sugerencias

Los resultados obtenidos en este estudio no abarcan todas las posibles bacterias desnitrificantes presentes en el brazo San Quintín, pues se estima que solo se puede cultivar alrededor del 1% de las bacterias que están presentes en un determinado ambiente (Staley & Konopka, 1985; Schloss & Handelsman, 2004; Harwani, 2013). Por lo tanto, existe un posible sesgo en los resultados reportados en este trabajo; sin embargo, es un buen primer paso hacia el entendimiento de los microorganismos involucrados en la desnitrificación en la bahía de San Quintín y en las lagunas costeras en general. Para un estudio detallado de la distribución realista de microorganismos desnitrificantes se recomienda realizar análisis de abundancia de genes por PCR cuantitativa o por secuenciación masiva (p. ej. Metagenómica shotgun). Se sugiere, además, el estudio y la comparación con el brazo Bahía Falsa para poder conocer el impacto que tienen las presiones antropogénicas (cultivo de ostiones) en la desnitrificación sedimentaria. También se aconseja realizar la prueba colorimétrica de Norris & Ribbons (1972) en un caldo de cultivo suplementado con nitrito de potasio para una mejor verificación de la actividad desnitrificante aerobia en aislados bacterianos. Finalmente, sería interesante realizar estudios *in situ* y *ex situ* de las emisiones de N_2 y N_2O en la bahía, con el fin de determinar si ésta representa un sumidero o un emisor de N_2O , observar cuáles son las variables que condicionan dicha respuesta y, en caso de ser un sumidero, recrear lo aprendido en biotecnologías que nos ayuden a combatir el cambio climático.

XI. Conclusiones

- 1) Los parámetros fisicoquímicos del brazo San Quintín están fuertemente influenciados por la hidrodinámica de la bahía. Se observó una textura arenosa y menor concentración de nutrientes en la boca y una textura limo-arcillosa y mayor concentración de nutrientes en la cabeza.
- 2) La mayor abundancia relativa de bacterias desnitrificantes aerobias aisladas del brazo San Quintín se obtuvo de la boca y la cabeza, de los estratos superficiales (0-5 cm), y de sedimentos con *Zostera marina*.
- 3) Se identificaron 155 morfotipos de colonias bacterianas en 1611 aislados bacterianos obtenidos de las muestras analizadas, de los cuales 66 representantes (1371 aislados) amplificaron los genes *nirK*, *nirS* y/o *nosZ*.
- 4) La abundancia de los genes desnitrificantes en las bacterias aisladas siguió el siguiente patrón: *nosZ* > *nirK* > *nirS*. Sin embargo, en función de las altas concentraciones de hierro en la zona de estudio y debido a la técnica usada durante el aislamiento, podría haber una subestimación en la abundancia de bacterias con genes *nirS*.
- 5) En orden decreciente de aislados, las clases de bacterias encontradas en este estudio fueron: γ -Proteobacteria (82.4% de bacterias aisladas), α -Proteobacteria (7.9%), Bacilli (5.7%) y Actinobacteria (4%). Este patrón coincide con las abundancias generales de bacterias desnitrificantes observadas en sistemas marinos. El género dominante fue *Psychrobacter*, lo cual resulta interesante ya que existen pocos trabajos que lo relacionen con la desnitrificación.
- 6) Las bacterias desnitrificantes aerobias aisladas de las muestras sedimentarias del brazo San Quintín tuvieron una baja dominancia y una distribución heterogénea, condiciones que reflejan una alta diversidad.
- 7) Las abundancias de las bacterias aisladas estuvieron relacionadas principalmente con las concentraciones de C orgánico y N total, la composición granulométrica y el pH.
- 8) Se comprobó la reducción de NO_3^- en condiciones aerobias en *Psychrobacter alimentarius*, *Psychrobacter celer*, *Planococcus maritimus* y *Planococcus rifietoensis*, así como una desnitrificación completa en *Psychrobacter piscatorii*, *Pseudomonas songnenensis* y *Paracoccus marcusii*.
- 9) Se reportó la presencia simultánea de los genes *nirK* y *nirS* en *Psychrobacter* sp., *Psychrobacter alimentarius*, *Psychrobacter celer*, *Psychrobacter piscatorii* y *Pseudomonas songnenensis*. Estos resultados contradicen la idea tradicional de que estos genes son mutuamente excluyentes y apoyan a los escasos trabajos que sugieren la presencia de ambos genes en un mismo genoma.

XII. Referencias

- Abell, G. C., Reville, 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. <https://doi.org/10.1038/ismej.2009.105>
- Aguirre-Muñoz, A., Buddemeier, R. W., Camacho-Ibar, V., Carriquiry, J. D., Ibarra-Obando, S. E., Massey, B. W., ... & Wulff, F. (2001). Sustainability of coastal resource use in San Quintin, Mexico. *AMBIO: A Journal of the Human Environment*, 30(3), 142-149. <https://doi.org/10.1579/0044-7447-30.3.142>
- Altschul, S.F., Gish, W., Miller, W., Myers, E.W. & Lipman, D.J. (1990) Basic local alignment search tool. *Journal of Molecular Biology*, 215, 403-410. [https://doi.org/10.1016/s0022-2836\(05\)80360-2](https://doi.org/10.1016/s0022-2836(05)80360-2)
- Aoki, L. R., & McGlathery, K. J. (2018). Restoration enhances denitrification and DNRA in subsurface sediments of *Zostera marina* seagrass meadows. *Marine Ecology Progress Series*, 602, 87-102. <https://doi.org/10.3354/meps12678>
- Barnes, R. S. K. (1989). The coastal lagoons of Britain: an overview and conservation appraisal. *Biological Conservation*, 49(4), 295-313. [https://doi.org/10.1016/0006-3207\(89\)90049-9](https://doi.org/10.1016/0006-3207(89)90049-9)
- Bonin, P., Ranaivoson, E. R., Raymond, N., Chalamet, A., & Bertrand, J. C. (1994). Evidence for denitrification in marine sediment highly contaminated by petroleum products. *Marine Pollution Bulletin*, 28(2), 89-95. [https://doi.org/10.1016/0025-326X\(94\)90544-4](https://doi.org/10.1016/0025-326X(94)90544-4)
- 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. <https://doi.org/10.1128/AEM.64.10.3769-3775.1998>
- Cabello-Pasini, A., Muñoz-Salazar, R., & Ward, D. H. (2004). Biochemical characterization of the eelgrass *Zostera marina* at its southern distribution limit in the North Pacific. *Ciencias Marinas*, 30(1ª), 21-34. <http://dx.doi.org/10.7773/cm.v30i1.123>
- Cabezas, A., Azziz, G., Bovio-Winkler, P., Fuentes, L., Braga, L., Wenzel, J., ... & Etchebehere, C. (2022). Ubiquity and Diversity of Cold Adapted Denitrifying Bacteria Isolated From Diverse Antarctic Ecosystems. *Frontiers in Microbiology*, 13. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2022.827228>
- Camacho-Ibar, V. F., Carriquiry, J. D., & Smith, S. V. (2003). Non-conservative P and N fluxes and net ecosystem production in San Quintin Bay, Mexico. *Estuaries*, 26(5), 1220-1237. <https://doi.org/10.1007/BF02803626>
- Camacho-Ibar, V. F., Hernández-Ayón, J. M., Santamaría-del-Angel, E., Daesslé-Heuser, L. W., & Zertuche-González, J. A. (2007). Relación de las surgencias con los stocks de carbono en bahía San Quintín, una laguna costera del NW de México. Carbono en ecosistemas acuáticos de México. SEMARNAT, INECC, CICESE, 355-370.
- Canu, D. M., Aveytua-Alcázar, L., Camacho-Ibar, V. F., Querin, S., & Solidoro, C. (2016). Hydrodynamic properties of San Quintin Bay, Baja California: merging models and observations. *Marine Pollution Bulletin*, 108(1-2), 203-214. <https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2016.04.030>
- Chao, A. (1984). Nonparametric estimation of the number of classes in a population. *Scandinavian Journal of Statistics*, 265-270. <https://www.jstor.org/stable/4615964>
- Checkley Jr, D. M., & Barth, J. A. (2009). Patterns and processes in the California Current System. *Progress in Oceanography*, 83(1-4), 49-64. <https://doi.org/10.1016/j.pocean.2009.07.028>
- Chen, Z., Jiang, Y., Chang, Z., Wang, J., Song, X., Huang, Z., ... & Li, J. (2020). Denitrification characteristics and pathways of a facultative anaerobic denitrifying strain, *Pseudomonas denitrificans* G1. *Journal of bioscience and bioengineering*, 129(6), 715-722. <https://doi.org/10.1016/j.jbiosc.2019.12.011>
- Cheng, L., Abraham, J., Trenberth, K. E., Fasullo, J., Boyer, T., Mann, M. E., ... & Reagan, J. (2022). Another record: ocean warming continues through 2021 despite La Niña conditions. *Advances in Atmospheric Sciences*, 39(3), 373-385. <https://doi.org/10.1007/s00376-022-1461-3>

- Ciccarelli, F. D., Doerks, T., Von Mering, C., Creevey, C. J., Snel, B., & Bork, P. (2006). Toward automatic reconstruction of a highly resolved tree of life. *Science*, 311(5765), 1283-1287. <https://doi.org/10.1126/science.1123061>
- Cole, J. R., Wang, Q., Fish, J. A., Chai, B., McGarrell, D. M., Sun, Y & Tiedje, J. M. (2014). Ribosomal Database Project: Data and tools for high throughput rRNA analysis. *Nucleic Acids Research*, 42. <https://doi.org/10.1093/nar/gkt1244>
- Cornwell, J. C., Kemp, W. M., & Kana, T. M. (1999). Denitrification in coastal ecosystems: methods, environmental controls, and ecosystem level controls, a review. *Aquatic Ecology*, 33, 41-54. <https://doi.org/10.1023/A:1009921414151>
- Coyne, M. S., Arunakumari, A., Averill, B. A., & Tiedje, J. (1989). Immunological identification and distribution of dissimilatory heme cd1 and nonheme copper nitrite reductases in denitrifying bacteria. *Applied and Environmental Microbiology*, 55(11), 2924-2931. <https://doi.org/10.1128/aem.55.11.2924-2931.1989>
- Daesslé, L. W., Rendón-Márquez, G., Camacho-Ibar, V. F., Gutiérrez-Galindo, E. A., Shumilin, E., & Ortiz-Campos, E. (2009). Geochemistry of modern sediments from San Quintín coastal lagoon, Baja California: Implication for provenance. *Revista Mexicana de Ciencias Geológicas*, 26(1), 117-132.
- Damashek, J., & Francis, C. A. (2018). Microbial nitrogen cycling in estuaries: from genes to ecosystem processes. *Estuaries and Coasts*, 41(3), 626-660. <https://doi.org/10.1007/s12237-017-0306-2>
- Devol, A. (2015). Denitrification, Anammox, and N₂ Production in Marine Sediments. *Annual Review of Marine Science*, 7, 403-423. <https://doi.org/10.1146/annurev-marine-010213-135040>
- Einsle, O., & Kroneck, P. (2004). Structural basis of denitrification. *Biological Chemistry*, 385, 875-883. <https://doi.org/10.1515/BC.2004.115>
- Eyre, B. D., Maher, D. T., & Sanders, C. (2016). The contribution of denitrification and burial to the nitrogen budgets of three geomorphically distinct Australian estuaries: Importance of seagrass habitats. *Limnology and Oceanography*, 61(3), 1144-1156. <https://doi.org/10.1002/lno.10280>
- Gao, H., Schreiber, F., Collins, G., Jensen, M. M., Kostka, J. E., Lavik, G., ... & Kuypers, M. M. (2010). Aerobic denitrification in permeable Wadden Sea sediments. *The ISME journal*, 4(3), 417-426. <https://doi.org/10.1038/ismej.2009.127>
- García, E. (2004). Modificaciones al sistema de clasificación climática de Köppen. *Universidad Nacional Autónoma de México*. <http://www.publicaciones.ig.unam.mx/index.php/ig/catalog/view/83/82/251-1>
- García, M., Ramirez, I., Verlaan, M., & Castillo, J. (2015). Application of a three-dimensional hydrodynamic model for San Quintin Bay, BC, Mexico. Validation and calibration using OpenDA. *Journal of Computational and Applied Mathematics*, 273, 428-437. <https://doi.org/10.1016/j.cam.2014.05.003>
- García-Esquivel, Z., González-Gómez, M. A., Ley-Lou, F., & Mejía-Trejo, A. (2004). Oyster culture potential in the west arm of San Quintín Bay: current biomass and preliminary estimate of the carrying capacity. *Ciencias Marinas*, 3^a(1^a), 61-74.
- García-Montiel, D. C., Melillo, J. M., Steudler, P. A., Cerri, C. C., & Piccolo, M. C. (2003). Carbon limitations to nitrous oxide emissions in a humid tropical forest of the Brazilian Amazon. *Biology and Fertility of Soils*, 38(5), 267-272. <https://doi.org/10.1007/s00374-003-0637-y>
- Gihring, T., Canion, A., Riggs, A., Huettel, M., & Kostka, J. (2010). Denitrification in shallow, sublittoral Gulf of Mexico permeable sediments. *Limnology and Oceanography*, 55(1), 43-54. <https://doi.org/10.4319/lno.2010.55.1.0043>
- Graf, D., Jones, C. & Hallin, S. (2014). Intergenomic comparisons highlight modularity of the denitrification pathway and underpin the importance of community structure for N₂O emissions. *PLOS ONE*. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0114118>
- Gruber, N., & Galloway, J. N. (2008). An Earth-system perspective of the global nitrogen cycle. *Nature*, 451(7176), 293-296. <https://doi.org/10.1038/nature06592>

- Gu, Z. (2016). ComplexHeatmap: Making Complex Heatmaps. R package 56ersión 2.8.0. Disponible en: <https://github.com/jokergoo/ComplexHeatmap>
- Guzmán, I. (2018). *Diversidad y actividad enzimática de bacterias heterótrofas cultivables del pacífico tropical mexicano*. Universidad Nacional Autónoma de México.
- Hall, T. (1999). Bioedit: a user-friendly biological sequence alignment editor a56ersión56sis program f56ersiónows 95/98nt. *Oxford University Press. Nucleic Acids Symposium*, 41, 95-98.
- Hallin, S., & Lindgren, P. E. (1999). PCR detection of genes encoding nitrite reductase in denitrifying bacteria. *Applied and Environmental Microbiology*, 65(4), 1652-1657. <https://doi.org/10.1128/AEM.65.4.1652-1657.1999>
- Hellemann, D., Tallberg, P., Bartl, I., Voss, M., & Hietanen, S. (2017). Denitrification in an oligotrophic estuary: a delayed sink for riverine nitrate. *Marine Ecology Progress Series*, 583, 63-80. <https://doi.org/10.3354/meps12359>
- Harwani, D. (2013). The great plate count anomaly and the unculturable bacteria. *Microbiology*, 2(9), 350-1.
- Hernández-Ayón, J. M., Galindo-Bect, M. S., Camacho-Ibar, V., García-Esquivel, Z., González-Gómez, M. A., & Ley-Lou, F. (2004). Nutrient dynamics in the west arm of San Quintín Bay, Baja California, Mexico, during and after El Niño 1997/1998. *Ciencias Marinas*, 3^a(1^a), 119-132. <http://dx.doi.org/10.7773/cm.v30i1.115>
- Hernández-López, J., Camacho-Ibar, V. F., Macías-Tapia, A., McGlathery, K. J., Daesslé, L. W., & Sandoval-Gil, J. M. (2017). Benthic nitrogen fixation in *Zostera marina* meadows in an upwelling-influenced coastal lagoon. *Ciencias Marinas*, 43(1), 35-53. <http://dx.doi.org/10.7773/cm.v43i1.2700>
- Herndl, G. J., & Reinthaler, T. (2013). Microbial control of the dark end of the biological pump. *Nature Geoscience*, 6(9), 718-724. <https://doi.org/10.1038/ngeo1921>
- Heylen, K., Vanparys, B., Wittebolle, L., Verstraete, W., Boon, N., & De Vos, P. (2006). Cultivation of denitrifying bacteria: Optimization of isolation conditions and diversity study. *Applied and Environmental Microbiology*, 72(4), 2637-2643. <https://doi.org/10.1128/AEM.72.4.2637-2643.2006>
- Hoffman, D. K., McCarthy, M. J., Newell, S. E., Gardner, W. S., Niewinski, D. N., Gao, J., & Mutchler, T. R. (2019). Relative contributions of DNRA and denitrification to nitrate reduction in *Thalassia testudinum* seagrass beds in coastal Florida (USA). *Estuaries and Coasts*, 42(4), 1001-1014. <https://doi.org/10.1007/s12237-019-00540-2>
- Ibarra-Obando, S. E., Smith, S. V., Poumian-Tapia, M., Camacho-Ibar, V., Carriquiry, J. D., & Montes-Hugo, M. (2004). Benthic metabolism in San Quintin Bay, Baja California, Mexico. *Marine Ecology Progress Series*, 283, 99-112. 10.3354/meps283099
- Jahnke, R. A., Emerson, S. R., & Murray, J. W. (1982). A model of oxygen reduction, denitrification, and organic matter mineralization in marine sediments. *Limnology and Oceanography*, 27(4), 610-623. <https://doi.org/10.4319/lo.1982.27.4.0610>
- Jones, C. M., Graf, D. R., Bru, D., Philippot, L., & Hallin, S. (2013). The unaccounted yet abundant nitrous oxide-reducing microbial community: a potential nitrous oxide sink. *ISME Journal*, 7, 417-426. <https://doi.org/10.1038/ismej.2012.125>
- Jones, D. L., & Willett, V. B. (2006). Experimental evaluation of methods to quantify dissolved organic nitrogen (DON) and dissolved organic carbon (DOC) in soil. *Soil Biology and Biochemistry*, 38(5), 991-999. <https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2005.08.012>
- Jung, J., Yeom, J., Kim, J., Han, J., Lim, H. S., Park, H., ... & Park, W. (2011). Change in gene abundance in the nitrogen biogeochemical cycle with temperature and nitrogen addition in Antarctic soils. *Research in Microbiology*, 162(10), 1018-1026. <https://doi.org/10.1016/j.resmic.2011.07.007>
- Kennish, M. J., & Paerl, H. W. (2010). Coastal lagoons. *Coastal lagoons: critical habitat of environmental change*, eds. Kennish, MJ, Paerl, HW, 117, 140-143.

- Kessler, A. J., Roberts, K. L., Bissett, A., & Cook, P. L. (2018). Biogeochemical controls on the relative importance of denitrification and dissimilatory nitrate reduction to ammonium in estuaries. *Global Biogeochemical Cycles*, 32(7), 1045-1057. <https://doi.org/10.1029/2018GB005908>
- Kim, M., Jeong, S. Y., Yoon, S. J., Cho, S. J., Kim, Y. H., Kim, M. J., ... & Lee, S. J. (2008). Aerobic denitrification of *Pseudomonas putida* AD-21 at different C/N ratios. *Journal of bioscience and bioengineering*, 106(5), 498-502. <https://doi.org/10.1263/jbb.106.498>
- Kjerfve, B. (1994). Chapter 1 Coastal Lagoons. *Elsevier Oceanography Series*, 60, 1-8. [https://doi.org/10.1016/S0422-9894\(08\)70006-0](https://doi.org/10.1016/S0422-9894(08)70006-0)
- Kobayashi, M., Matsuo, Y., Takimoto, A., Suzuki, S., Maruo, F., & Shoun, H. (1996). Denitrification, a novel type of respiratory metabolism in fungal mitochondrion. *Journal of Biological Chemistry*, 271(27), 16263-16267. <https://doi.org/10.1074/jbc.271.27.16263>
- Lane, D. J., Pace, B., Olsen, G. J., Stahl, D. A., Sogin, M. L., & Pace, N. R. (1985). Rapid determination of 16S ribosomal RNA sequences for phylogenetic analyses. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 82(20), 6955-6959. <https://doi.org/10.1073/pnas.82.20.6955>
- Lasek, R., Dziewit, L., Ciok, A., Decewicz, P., Romaniuk, K., Jedrys, Z., ... & Bartosik, D. (2017). Genome content, metabolic pathways and biotechnological potential of the psychrophilic Arctic bacterium *Psychrobacter* sp. DAB_AL43B, a source and a host of novel *Psychrobacter*-specific vectors. *Journal of Biotechnology*, 263, 64-74. <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2017.09.011>
- Lassey, K., & Harvey, M. (2007). Nitrous oxide: the serious side of laughing gas. *Water Atmos*, 15(2), 10-11.
- Lee, J. A., & Francis, C. A. (2017). Spatiotemporal characterization of San Francisco Bay denitrifying communities: a comparison of *nirK* and *nirS* diversity and abundance. *Microbial Ecology*, 73, 271-284. <https://doi.org/10.1007/s00248-016-0865-y>
- Li, M., Wei, G., Liu, J., Wang, X., Hou, L., & Gao, Z. (2022). Effects of nitrate exposure on nitrate reduction processes in the wetland sediments from the Yellow River estuary. *Estuaries and Coasts*, 1-16. <https://doi.org/10.1007/s12237-021-00966-7>
- Li, Y., Wang, Y., Fu, L., Gao, Y., Zhao, H., & Zhou, W. (2017). Aerobic-heterotrophic nitrogen removal through nitrate reduction and ammonium assimilation by marine bacterium *Vibrio* sp. Y1-5. *Bioresource technology*, 230, 103-111. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2017.01.049>
- Liu, X., Wu, J., Hong, Y., Jiao, L., Li, Y., Wang, L., ... & Chang, X. (2020). Nitrogen loss by *nirS*-type denitrifying bacterial communities in eutrophic coastal sediments. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 150, 104955. <https://doi.org/10.1016/j.ibiod.2020.104955>
- Lovely, D. R., & Phillips, E. J. (1987). Rapid assay for microbially reducible ferric iron in aquatic sediments. *Applied and Environmental Microbiology*, 53(7), 1536-1540. <https://doi.org/10.1128/aem.53.7.1536-1540.1987>
- Lu, Z., Gan, L., Lin, J., & Chen, Z. (2019). Aerobic denitrification by *Paracoccus* sp. YF1 in the presence of Cu (II). *Science of the Total Environment*, 658, 80-86. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2018.12.225>
- Magurran, A. E. (1988). Ecological diversity and its measurement. *Princeton University Press*.
- Marchant, H. K., Ahmerkamp, S., Lavik, G., Tegetmeyer, H. E., Graf, J., Klatt, J. M., ... & Kuypers, M. M. (2017). Denitrifying community in coastal sediments performs aerobic and anaerobic respiration simultaneously. *The ISME journal*, 11(8), 1799-1812. <https://doi.org/10.1038/ismej.2017.51>
- Meling-López, A. E., & Ibarra-Obando, S. E. (1999). Annual life cycles of two *Zostera marina* L. populations in the Gulf of California: contrasts in seasonality and reproductive effort. *Aquatic Botany*, 65(1-4), 59-69. [https://doi.org/10.1016/S0304-3770\(99\)00031-5](https://doi.org/10.1016/S0304-3770(99)00031-5)
- Michotey, V., Mejean, V., & Bonin, P. (2000). Comparison of methods for quantification of cytochrome cd 1-denitrifying bacteria in environmental marine samples. *Applied and Environmental Microbiology*, 66(4), 1564-1571. <https://doi.org/10.1128/AEM.66.4.1564-1571.2000>

- Miller, M. B., & Bassler, B. L. (2001). Quorum sensing in bacteria. *Annual Reviews in Microbiology*, 55(1), 165-199. <https://doi.org/10.1146/annurev.micro.55.1.165>
- Ming, H., Fan, J., Chen, Q., Su, J., Song, J., Yuan, J., ... & Li, B. (2021). Diversity and abundance of denitrifying bacteria in the sediment of a eutrophic estuary. *Geomicrobiology Journal*, 38(3), 199-209. <https://doi.org/10.1080/01490451.2020.1822959>
- Moore, N. H., & Slinn, D. J. (1984). The physical hydrology of a lagoon system on the Pacific coast of Mexico. *Estuarine, Coastal and Shelf Science*, 19(4), 413-426. [https://doi.org/10.1016/0272-7714\(84\)90094-5](https://doi.org/10.1016/0272-7714(84)90094-5)
- Mosier, A. C., & Francis, C. A. (2010). Denitrifier abundance and activity across the San Francisco Bay estuary. *Environmental Microbiology Reports*, 2(5), 667-676. <https://doi.org/10.1111/j.1758-2229.2010.00156.x>
- Naqvi, S. W. A., Naik, H., Pratihary, A., D'souza, W., Narvekar, P. V., Jayakumar, D. A. & Saino, T. (2006). Coastal versus open-ocean denitrification in the Arabian Sea. *Biogeosciences*, 3(4), 621-633. <https://doi.org/10.5194/bg-3-621-2006>
- Naranjo, A., Canino, S., Bustos, H., Sánchez, A. (2017). Evaluación de la calidad de agua y sedimento, en San Quintín durante época de mareas muertas, abril 2017. *Proyecto: Pacífico Mexicano: Oceanografía Química*.
- Navarro, E., Daesslé, L. W., Camacho-Ibar, V. F., Ortiz-Hernández, M. C., & Gutiérrez-Galindo, E. A. (2006). Geochemistry of Fe, Ti and Al as an indicator of volcanoclastic sedimentation in San Quintín coastal lagoon, Baja California, Mexico. *Ciencias Marinas*, 32(2), 205-217. <https://doi.org/10.7773/cm.v32i21.1067>
- Newton, A., Icely, J., Cristina, S., Brito, A., Cardoso, A., Colijn, F., Riva, S., Gertz, F., Hansen, J., Holmer, M., Ivanova, K., Leppäkoski, E., Canu, D., Mocenni, C., Mudge, S., Murray N., Razinkovas, A. & Zaldívar, J. (2014). An overview of ecological status, vulnerability and future perspectives of European large shallow, semi-enclosed coastal systems, lagoons and transitional waters. *Estuarine, Coastal and Shelf Science*, 140, 95-122. <https://doi.org/10.1016/j.ecss.2013.05.023>
- 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. <https://doi.org/10.1128/AEM.68.10.5017-5025.2002>
- Norris, J.R., & Ribbons, D.W. (1971). *Methods in Microbiology*, Vol. 6, Part A, Academic Press, pp. 13-14.
- Oksanen, J., Blanchet, F.G., Friendly, M., et al. (2021). Vegan: Community Ecology Package (Version 2.6-4) [Software]. R package. <https://CRAN.R-project.org/package=vegan>
- Paerl, H. W., Havens, K. E., Xu, H., Zhu, G., McCarthy, M. J., Newell, S. E., ... & Qin, B. (2020). Mitigating eutrophication and toxic cyanobacterial blooms in large lakes: The evolution of a dual nutrient (N and P) reduction paradigm. *Hydrobiologia*, 847(21), 4359-4375. <https://doi.org/10.1007/s10750-019-04087-y>
- Pajares, S., & Ramos, R. (2019). Processes and microorganisms involved in the marine nitrogen cycle: knowledge and gaps. *Frontiers in Marine Science*, 6, 739. <https://doi.org/10.3389/fmars.2019.00739>
- Pan, Y., She, D., Shi, Z., Cao, T., Xia, Y., & Shan, J. (2023). Salinity and high pH reduce denitrification rates by inhibiting denitrifying gene abundance in a saline-alkali soil. *Scientific Reports*, 13(1), 2155. <https://doi.org/10.1038/s41598-023-29311-7>
- Patureau, D., Zumstein, E., Delgenès, J. P., & Moletta, R. (2000). Aerobic denitrifiers isolated from diverse natural and managed ecosystems. *Microbial ecology*, 39, 145-152. <https://doi.org/10.1007/s002480000009>
- Payne, W. J. (1983). Bacterial denitrification: Asset or defect?. *Bioscience*, 33(5), 319-325. <https://doi.org/10.2307/1309319>
- Phillips, R., Grant, W. S., & McRoy, C. (1983). Reproductive strategies of eelgrass (*Zostera marina* L.). *Aquatic Botany*, 16(1), 1-20. [https://doi.org/10.1016/0304-3770\(83\)90047-5](https://doi.org/10.1016/0304-3770(83)90047-5)
- Pielou, E. C. (1969). *An introduction to mathematical ecology*. New York, USA, Wiley-Inter-science.
- Piña-Ochoa, E., Høglund, S., Geslin, E., Cedhagen, T., Revsbech, N. P., Nielsen, L. P. & Risgaard-Petersen, N. (2010). Widespread occurrence of nitrate storage and denitrification among Foraminifera and Gromiida.

Proceedings of the National Academy of Sciences, 107(3), 1148-1153.
<https://doi.org/10.1073/pnas.0908440107>

- Posit team. (2023). R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. <http://www.posit.co/>
- Potter, I., Chuwen, B., Hoeksema, S. & Elliott, M. (2010). The concept of an estuary: A definition that incorporates systems which can become closed to the ocean and hypersaline. *Estuarine, Coastal and Shelf Science*, 87(3), 497-500. <https://doi.org/10.1016/j.ecss.2010.01.021>
- Pritchard, D.W. (1952). Estuarine hydrography. *Advances in Geophysics*, 1, 243-280. [https://doi.org/10.1016/S0065-2687\(08\)60208-3](https://doi.org/10.1016/S0065-2687(08)60208-3)
- Qiao, W., Wang, L., Luo, Y., & Miao, J. (2021). Outer membrane vesicles mediated horizontal transfer of an aerobic denitrification gene between *Escherichia coli*. *Biodegradation*, 32(4), 435-448. <https://doi.org/10.1007/s10532-021-09945-y>
- 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. <https://doi.org/10.1126/science.1176985>
- Ribas-Ribas, M., Hernández-Ayón, J. M., Camacho-Ibar, V. F., Cabello-Pasini, A., Mejia-Trejo, A., Durazo, R., ... & Siqueiros-Valencia, A. (2011). Effects of upwelling, tides and biological processes on the inorganic carbon system of a coastal lagoon in Baja California. *Estuarine, Coastal and Shelf Science*, 95(4), 367-376. <https://doi.org/10.1016/j.ecss.2011.09.017>
- Sánchez, C., & Minamisawa, K. (2018). Redundant roles of Bradyrhizobium oligotrophicum Cu-type (*NirK*) and cd 1-type (*NirS*) nitrite reductase genes under denitrifying conditions. *FEMS Microbiology Letters*, 365(5), fny015. <https://doi.org/10.1093/femsle/fny015>
- 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. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.1998.tb12979.x>
- Schloss, P. D., & Handelsman, J. (2004). Status of the microbial census. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 68(4), 686-691. <https://doi.org/10.1128/mmr.68.4.686-691.2004>
- Seitzinger, S. P. (1988). Denitrification in freshwater and coastal marine ecosystems: ecological and geochemical significance. *Limnology and Oceanography*, 33(4part2), 702-724. <https://doi.org/10.4319/lo.1988.33.4part2.0702>
- Seitzinger, S. P., & Nixon, S. W. (1985). Eutrophication and the rate of denitrification and N₂O production in coastal marine sediments. *Limnology and Oceanography*, 30(6), 1332-1339. <https://doi.org/10.4319/lo.1985.30.6.1332>
- Seitzinger, S., Harrison, J. A., Böhlke, J. K., Bouwman, A. F., Lowrance, R., Peterson, B. & Drecht, G. V. (2006). Denitrification across landscapes and waterscapes: a synthesis. *Ecological Applications*, 16(6), 2064-2090. [https://doi.org/10.1890/1051-0761\(2006\)016\[2064:DALAWA\]2.0.CO;2](https://doi.org/10.1890/1051-0761(2006)016[2064:DALAWA]2.0.CO;2)
- Shan, J., Sanford, R. A., Chee-Sanford, J., Ooi, S. K., Löffler, F. E., Konstantinidis, K. T., & Yang, W. H. (2021). Beyond denitrification: the role of microbial diversity in controlling nitrous oxide reduction and soil nitrous oxide emissions. *Global Change Biology*, 27(12), 2669-2683. <https://doi.org/10.1111/gcb.15545>
- Smyth, A. R., Thompson, S. P., Siporin, K. N., Gardner, W. S., McCarthy, M. J., & Piehler, M. F. (2013). Assessing nitrogen dynamics throughout the estuarine landscape. *Estuaries and Coasts*, 36(1), 44-55. <https://doi.org/10.1007/s12237-012-9554-3>
- Song, B., Palleroni, N. J., & Häggblom, M. M. (2000). Isolation and characterization of diverse halobenzoate-degrading denitrifying bacteria from soils and sediments. *Applied and Environmental Microbiology*, 66(8), 3446-3453. <https://doi.org/10.1128/AEM.71.4.2036-2045.2005>
- Sorokin, D. Y., Tourova, T. P., Galinski, E. A., Belloch, C., & Tindall, B. J. (2006). Extremely halophilic denitrifying bacteria from hypersaline inland lakes, *Halovibrio denitrificans* sp. nov. and *Halospina*

denitrificans gen. nov., sp. nov., and evidence that the genus name *Halovibrio* Fendrich 1989 with the type species *Halovibrio variabilis* should be associated with DSM 3050. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, 56(2), 379-388. <https://doi.org/10.1099/ijs.0.63964-0>

- Sousa, T. D., & Bhosle, S. (2011). Microbial denitrification and its ecological implications in the marine system. *In Microorganisms in Environmental Management*, 683-700. https://doi.org/10.1007/978-94-007-2229-3_30
- Staley, J. T., & Konopka, A. (1985). Measurement of *in situ* activities of nonphotosynthetic microorganisms in aquatic and terrestrial habitats. *Annual Review of Microbiology*, 39(1), 321-346. <https://doi.org/10.1146/annurev.mi.39.100185.001541>
- Stow, C. A., Walker, J. T., Cardoch, L., Spence, P., & Geron, C. (2005). N₂O emissions from streams in the Neuse River watershed, North Carolina. *Environmental Science & Technology*, 39(18), 6999-7004. <https://doi.org/10.1021/es0500355>
- Sullivan, M. J., Gates, A. J., Appia-Ayme, C., Rowley, G., & Richardson, D. J. (2013). Copper control of bacterial nitrous oxide emission and its impact on vitamin B12-dependent metabolism. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 110(49), 19926-19931. <https://doi.org/10.1073/pnas.1314529110>
- Sun, J., Zhang, P., Liang, J., Cai, Y., Han, Y., Li, M., ... & Li, Y. (2021). Study on water purification effects and microbial community compositions of the estuarine wetland buffer zones during a low-temperature period. *In E3S Web of Conferences* 300. <https://doi.org/10.1051/e3sconf/202130002009>
- Surzycki, S. (2000). *Basic Techniques in Molecular Biology*. Springer Berlin Heidelberg, 1-434
- Suykens, K., Schmidt, S., Delille, B., Harlay, J., Chou, L., De Bodt, C., Fagel, N., & Borges, A. (2011). Benthic remineralization in the northwest European continental margin (northern Bay of Biscay). *Continental Shelf Research*, 31, 644-658. <https://doi.org/10.1016/j.csr.2010.12.017>
- Tamura, K., Stecher, G., & Kumar, S. (2021). MEGA11: molecular evolutionary genetics analysis version 11. *Molecular Biology and Evolution*, 38(7), 3022-3027. <https://doi.org/10.1093/molbev/msab120>
- Throbäck, I. N., Enwall, K., Jarvis, Å., & Hallin, S. (2004). Reassessing PCR primers targeting *nirS*, *nirK* and *nosZ* genes for community surveys of denitrifying bacteria with DGGE. *FEMS Microbiology Ecology*, 49(3), 401-417. <https://doi.org/10.1016/j.femsec.2004.04.011>
- Tyrrell, T. (1999). The relative influences of nitrogen and phosphorus on oceanic primary production. *Nature*, 400(6744), 525-531. <https://doi.org/10.1038/22941>
- Valle-Levinson, A., Gutierrez de Velasco, G., Trasviña, A., Souza, A. J., Durazo, R., & Mehta, A. J. (2009). Residual exchange flows in subtropical estuaries. *Estuaries and Coasts*, 32(1), 54-67. <https://doi.org/10.1007/s12237-008-9112-1>
- Vavrek, M. J. (2011). fossil: palaeoecological and palaeogeographical analysis tools. *Palaeontologia Electronica*, 14(1), 1T. R packa60ersiónion 0.4.0.
- Wang, L., Zheng, B., Nan, B., & Hu, P. (2014). Diversity of bacterial community and detection of *nirS*- and *nirK*-encoding denitrifying bacteria in sandy intertidal sediments along Laizhou Bay of Bohai Sea, China. *Marine Pollution Bulletin*, 88(1-2), 215-223. <https://doi.org/10.1016/j.marpollbul.2014.09.002>
- Watson, E. B., Hinojosa-Corona, A., Krause, J. R., Herguera, J. C., McDonnell, J., Manríquez, K. R. V., ... & Gray, A. B. (2020). Lagoon Biogeochemical Processing is Reflected in Spatial Patterns of Sediment Stable Isotopic Ratios. *Journal of Marine Science and Engineering*, 8(11), 874. <https://doi.org/10.3390/jmse8110874>
- Wei, T & Simko, V. (2021). R package 'corrplot': Visualization of a Correlation Matrix. (Version 0.92), <https://github.com/taiyun/corrplot>
- Wells, N., Maher, D., Erler, D., Hipsey, M., Rosentreter, J. & Eyre, B. (2018). Estuaries as Sources and Sinks of N₂O Across a Land Use Gradient in Subtropical Australia. *Global Biogeochemical Cycles*, 32(5), 877-894. <https://doi.org/10.1029/2017GB005826>

- Wickham, H. (2016). *Ggplot2: Elegant Graphics for Data Analysis*. Springer-Verlag New York. ISBN 978-3-319-24277-4, <https://ggplot2.tidyverse.org>
- Wilkerson, F. P., Lassiter, A. M., Dugdale, R. C., Marchi, A., & Hogue, V. E. (2006). The phytoplankton bloom response to wind events and upwelled nutrients during the CoOP WEST study. *Deep Sea Research Part II: Topical Studies in Oceanography*, 53(25-26), 3023-3048. <https://doi.org/10.1016/j.dsr2.2006.07.007>
- William, R. (2023). *Psych: Procedures for Psychological, Psychometric, and Personality Research*. Northwestern University, Evanston, Illinois. R package version 2.3.3, <https://CRAN.R-project.org/package=psych>
- Wittorf, L., Jones, C. M., Bonilla-Rosso, G., & Hallin, S. (2018). Expression of *nirK* and *nirS* genes in two strains of *Pseudomonas stutzeri* harbouring both types of NO-forming nitrite reductases. *Research in Microbiology*, 169(6), 343-347. <https://doi.org/10.1016/j.resmic.2018.04.010>
- Yang, J., Feng, L., Pi, S., Cui, D., Ma, F., Zhao, H. P., & Li, A. (2020). A critical review of aerobic denitrification: insights into the intracellular electron transfer. *Science of The Total Environment*, 731, 139080. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.139080>
- Yang, T., Xin, Y., Zhang, L., Gu, Z., Li, Y., Ding, Z., & Shi, G. (2020). Characterization on the aerobic denitrification process of *Bacillus* strains. *Biomass and Bioenergy*, 140, 105677. <https://doi.org/10.1016/j.biombioe.2020.105677>
- Zaytsev, O., Cervantes-Duarte, R., Montante, O., & Gallegos-Garcia, A. (2003). Coastal upwelling activity on the Pacific shelf of the Baja California Peninsula. *Journal of oceanography*, 59(4), 489-50. <https://doi.org/10.1023/A:1025544700632>
- Zhang, H., Li, S., Ma, B., Huang, T., Qiu, H., Zhao, Z., ... & Liu, K. (2020). Nitrate removal characteristics and 13C metabolic pathways of aerobic denitrifying bacterium *Paracoccus denitrificans* Z195. *Bioresource technology*, 307, 123230. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2020.123230>
- Zhang, K., Zeng, Q., Jiang, R., Shi, S., Yang, J., Long, L., & Tian, X. (2023). Three Novel Marine Species of *Paracoccus*, *P. aerodenitrificans* sp. nov., *P. sedimicola* sp. nov. and *P. albus* sp. nov., and the Characterization of Their Capability to Perform Heterotrophic Nitrification and Aerobic Denitrification. *Microorganisms*, 11(6), 1532. <https://doi.org/10.3390/microorganisms11061532>
- Zhang, M., Li, A., Yao, Q., Wu, Q., & Zhu, H. (2020). Nitrogen removal characteristics of a versatile heterotrophic nitrifying-aerobic denitrifying bacterium, *Pseudomonas bauzanensis* DN13-1, isolated from deep-sea sediment. *Bioresource Technology*, 305, 122626. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2019.122626>
- Zhang, X., Agogué, H., Dupuy, C., & Gong, J. (2014). Relative Abundance of Ammonia Oxidizers, Denitrifiers, and Anammox Bacteria in Sediments of Hyper-N utrified Estuarine Tidal Flats and in Relation to Environmental Conditions. *CLEAN–Soil, Air, Water*, 42(6), 815-823. <https://doi.org/10.1002/clen.201300013>
- Zhang, X., Ward, B. B., & Sigman, D. M. (2020). Global nitrogen cycle: critical enzymes, organisms, and processes for nitrogen budgets and dynamics. *Chemical reviews*, 120(12), 5308-5351. <https://doi.org/10.1021/acs.chemrev.9b00613>
- Zheng, H., Liu, Y., Sun, G., Gao, X., Zhang, Q., & Liu, Z. (2011). Denitrification characteristics of a marine origin psychrophilic aerobic denitrifying bacterium. *Journal of Environmental Sciences*, 23(11), 1888-1893. [https://doi.org/10.1016/S1001-0742\(10\)60615-8](https://doi.org/10.1016/S1001-0742(10)60615-8)
- Zheng, Y., Hou, L., Liu, M., Gao, J., Yin, G., Li, X., ... & Zhou, J. (2015). Diversity, abundance, and distribution of *nirS*-harboring denitrifiers in intertidal sediments of the Yangtze Estuary. *Microbial Ecology*, 70, 30-40. <https://doi.org/10.1007/s00248-015-0567-x>
- Zhu, W., Wang, C., Sun, F., Zhao, L., Dou, W., Mao, Z., & Wu, W. (2018). Overall bacterial community composition and abundance of nitrifiers and denitrifiers in a typical macrotidal estuary. *Marine Pollution Bulletin*, 126, 540-548. <https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2017.09.062>
- Zumft, W. G. (1997). Cell biology and molecular basis of denitrification. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 61(4), 533-616. <https://doi.org/10.1128/mmlbr.61.4.533-616.1997>

XIII. Anexos

Anexo 1 | Características de los medios de cultivo empleados

1.- Medio nutritivo estándar preparado en agua de mar envejecida (medio marino)

Principios y uso

Medio de cultivo sólido óptimo para pruebas de descripción filogenética y funcional en bacterias desnitrificantes heterótrofas sedimentarias o bénticas. La **peptona de caseína** proporciona nitrógeno, vitaminas, minerales y aminoácidos esenciales para el crecimiento. El **nitrito de potasio** actúa como sustrato y vía de selección en las bacterias cultivadas. El **extracto de carne** representa una fuente alterna de nitrógeno, fósforo y azufre orgánico, mientras que el **extracto de levadura** lo es de vitaminas y aminoácidos. Las **sales marinas** son fuente de oligoelementos. El agar bacteriológico se utiliza como agente gelificante.

Fórmula en g L⁻¹

Peptona de caseína	5	Extracto de levadura	1.5
Nitrito de potasio	0.3	Agar bacteriológico	15
Extracto de carne	1.5	Sales marinas	35

Referencia

Divya, B., Soumya, K. & Nair, S. (2010). *16S rRNA* and enzymatic diversity of culturable bacteria from the sediments of oxygen minimum zone in the Arabian Sea. *Antonie van Leeuwenhoek*, 98, 9–18. <https://doi.org/10.1007/BF01400460>

2.- Medio nutritivo o Braker

Principios y uso

Medio de cultivo sólido óptimo para el análisis de bacterias desnitrificantes sedimentarias o bénticas portadoras de genes *nirK* y *nirS*, así como para su caracterización filogenética y medición de tasas de consumo de nitrito. El **medio marino** proporciona nitrógeno, vitaminas, minerales y aminoácidos esenciales para el crecimiento. El **nitrito de potasio** actúa como sustrato y vía de selección en las bacterias cultivadas. El **extracto de levadura** representa una fuente alterna de vitaminas y aminoácidos.

Fórmula en g L⁻¹

Medio marino	37.35	Extracto de levadura	0.5
Nitrito de potasio	0.51	Agar bacteriológico	15

Referencia

Braker, G., Zhou, J., Wu, L., Devol, A. & Tiedje, J. (2000). Nitrite Reductase Genes (*nirK* y *nirS*) as functional markers to investigate diversity of denitrifying bacteria in Pacific Northwest marine sediment communities. *Applied and Environmental Microbiology*, 66(5), 2096-2104. <https://doi.org/10.1128/AEM.66.5.2096-2104.2000>

Anexo 2 | Prueba de reducción de NO₃⁻ y NO₂⁻ (modificada de Norris & Ribbons, 1972)

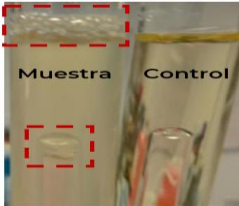



Principio:

En un medio con NO₃⁻ o NO₂⁻ las bacterias presentes que contengan genes de enzimas que catalicen la reducción del NO₃⁻ (p. ej. *napAB* y/o *narGHI*) o NO₂⁻ (p. ej. *nirK*, *nirS*) utilizarán estos sustratos en: a) Asimilación: El NO₃⁻ se reduce a NO₂⁻ y amoníaco, que luego se convierten en aminoácidos y otros compuestos celulares orgánicos nitrogenados; b) Desasimilación (o respiración): El NO₃⁻ o el NO₂⁻ es usado como aceptor terminal de electrones y, en condiciones de baja disponibilidad de oxígeno, son reducidos secuencialmente a NO (por *nirK* / *nirS*), N₂O (por *norB*) y N₂ (por *nosZ*). Los gases N₂O o N₂ son captados por la campana Durham durante el experimento.

Reactivos

<u>Reactivo β:</u>		<u>Reactivo α:</u>	
Ácido sulfanílico	0.4 g	α-naftilamina	0.25 g
Ácido acético 5N	50 mL	Ácido acético 5N	50 mL

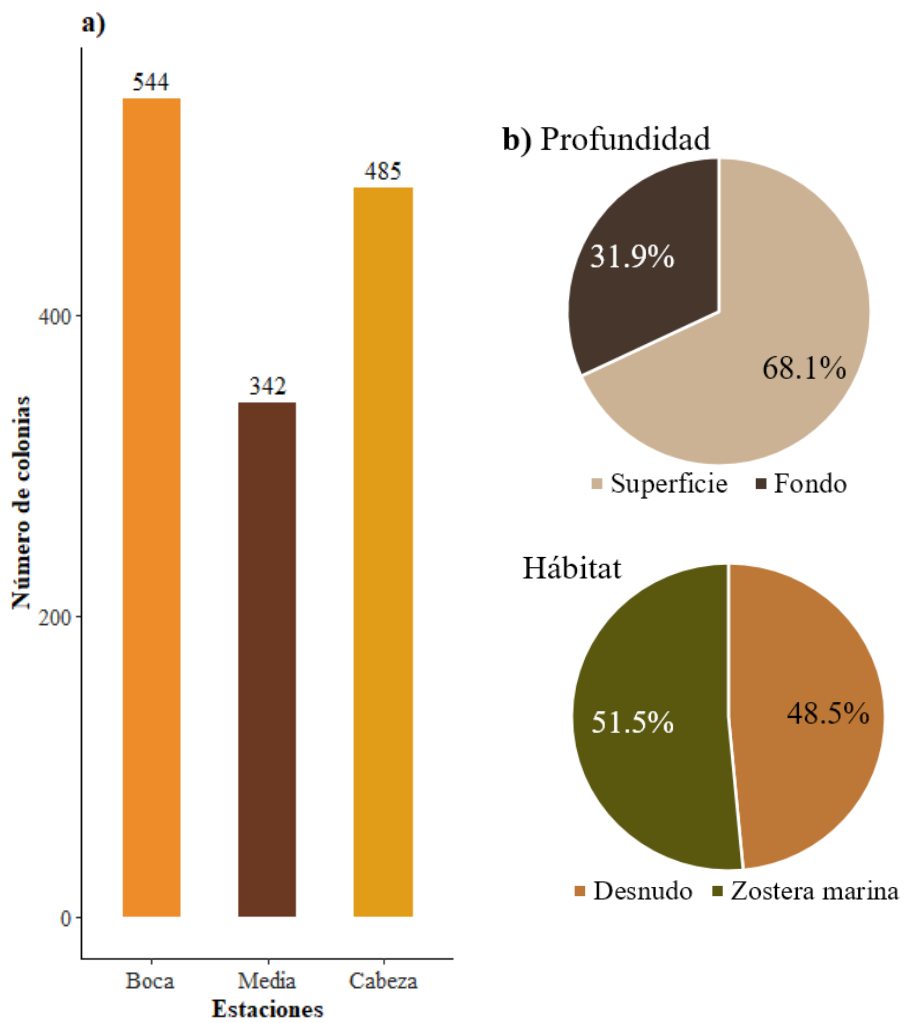
Resultados a obtener durante las diferentes etapas de la prueba

Etapa	A: <i>nasCA</i> / <i>narB</i> D: <i>narGHI</i>; <i>napAB</i>	A: <i>nirAB</i> D: <i>nirK</i> / <i>nirS</i>	D: <i>nosZ</i>	Imagen
Gas en la campana Durham (N ₂ O o N ₂) ⁱ	+	+	+	
Coloración roja tras la adición de reactivos α y β y ausencia de gases en la campana	+	—	—	
Conservación del color del medio tras la adición de reactivos α y β y sin presencia de gases en la campana. Al añadir zinc, coloración roja	—	—	—	
Conservación del color del medio tras la adición de reactivos α y β y sin presencia de gases en la campana. Al añadir zinc, incoloro ⁱⁱ	+	—	—	

+: Presencia / actividad del gen en cuestión; —: Ausencia / inactividad del gen en cuestión; **i**: Desnitrificación por la bacteria evaluada; **ii**: Asimilación de NO₃⁻ o NO₂⁻ por la bacteria evaluada; **A**: Asimilación; **D**: Desasimilación.

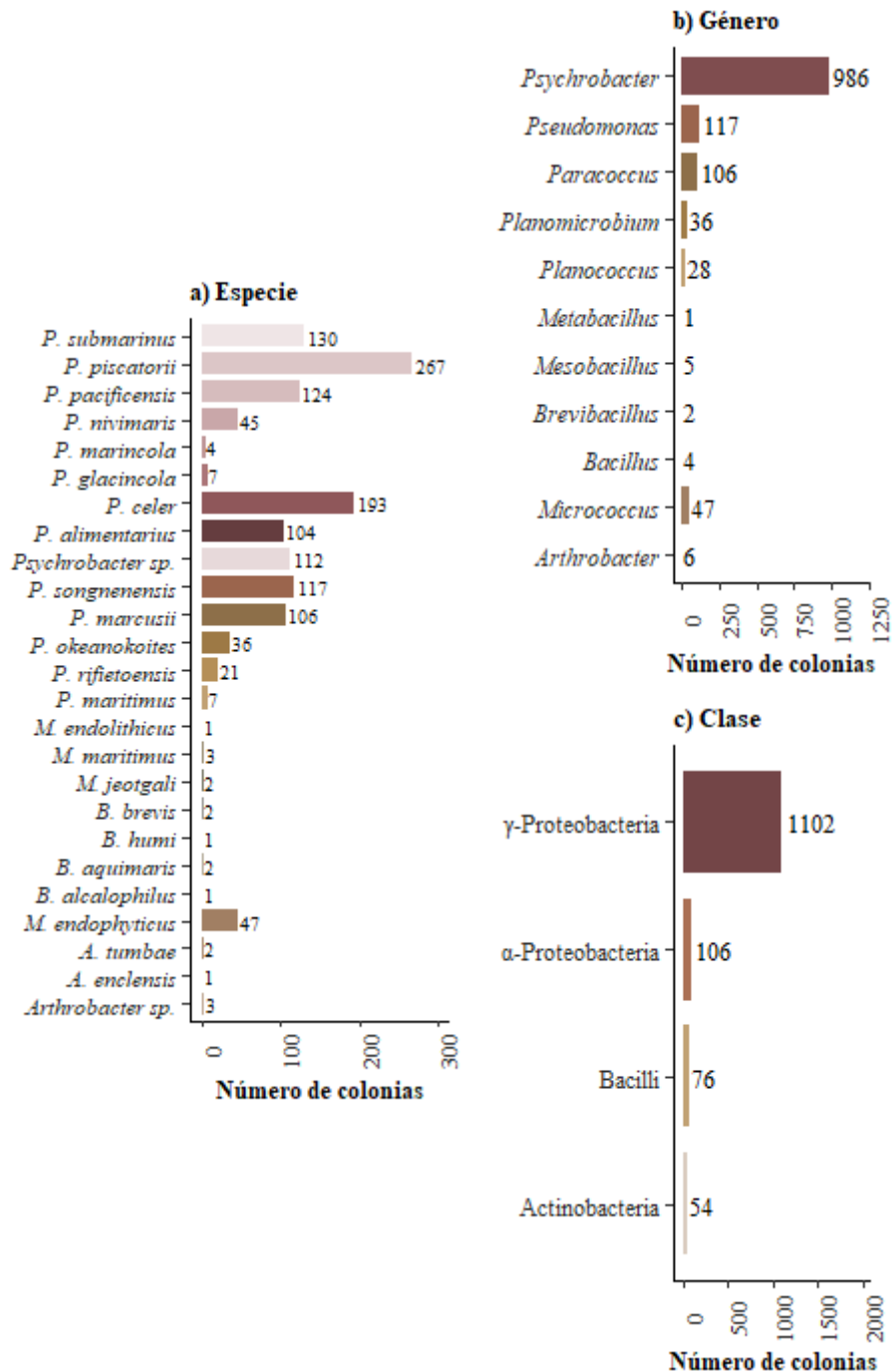
Anexo 3 | Abundancia de colonias bacterianas aisladas

a) Número de colonias bacterianas obtenidas en las estaciones de muestreo en el brazo San Quintín; el número encima de las barras refleja la abundancia registrada. b) Porcentaje de la abundancia de aislados por profundidad y hábitat.



Anexo 4 | Taxonomía de los aislados bacterianos con genes marcadores desnitrificantes

Taxonomía encontrada en RDP y BLAST tras realizar alineaciones con las secuencias de *16S rRNA* obtenidas del DNA de los 66 aislados representantes con genes marcadores desnitrificantes. Se muestra la abundancia de los aislados a nivel de a) especie, b) género y c) clase.



Anexo 5 | Especies bacterianas desnitrificantes únicas y compartidas

Abundancia de especies desnitrificantes aisladas en sedimentos del brazo San Quintín divididas por estación de muestreo, estrato del núcleo y hábitat. Entre paréntesis se indica de donde fueron aislados los representantes.

Especie	Estación			Estrato		Hábitat	
	Boca	Media	Cabeza	Superficie	Fondo	Desnudo	Pasto
<i>Arthrobacter enclensis</i> (N.E5PF.1)	0	0	1	0	1	0	1
<i>Arthrobacter</i> sp. (M.E1PF.1)	3	0	0	0	3	1	2
<i>Arthrobacter tumbae</i> (M.E1PF.2)	2	0	0	0	2	0	2
<i>Bacillus alcalophilus</i> (M.E3DS.9)	0	1	0	1	0	1	0
<i>Bacillus aquimaris</i> (M.E3DS.20)	0	2	0	2	0	2	0
<i>Bacillus humi</i> (M.E3DF.1)	0	1	0	0	1	1	0
<i>Brevibacillus brevis</i> (M.E5PF.1)	0	1	1	0	2	0	2
<i>Mesobacillus boroniphilus</i> (M.E3DS.8)	0	2	0	2	0	2	0
<i>Mesobacillus maritimus</i> (M.E5PF.8)	0	1	2	0	3	1	2
<i>Metabacillus endolithicus</i> (M.E3PS.3)	0	0	1	1	0	0	1
<i>Micrococcus endophyticus</i> (M.E3DS.17)	0	45	2	47	0	5	42
<i>Paracoccus marcusii</i> (N.E5PF.2)	0	1	1	0	2	0	2
<i>Paracoccus marcusii</i> (M.E5DF.4)	0	0	30	0	30	30	0
<i>Paracoccus marcusii</i> (M.E3DF.3)	0	6	0	0	6	6	0
<i>Paracoccus marcusii</i> (M.E5DF.3)	0	0	30	0	30	30	0
<i>Paracoccus marcusii</i> (M.E5DF.2)	1	0	36	0	37	31	6
<i>Paracoccus marcusii</i> (M.E3DF.5)	0	1	0	0	1	1	0
<i>Planococcus maritimus</i> (M.E1DF.7)	3	0	0	0	3	3	0
<i>Planococcus maritimus</i> (N.E1PS.7)	4	0	0	4	0	0	4
<i>Planococcus rifietoensis</i> (N.E5PS.2)	18	0	3	3	18	18	3
<i>Planomicrobium okeanokoites</i> (N.E3PF.4)	0	11	0	0	11	0	11
<i>Planomicrobium okeanokoites</i> (N.E3PF.6)	0	23	0	0	23	0	23
<i>Planomicrobium okeanokoites</i> (N.E3DF.5)	0	2	0	0	2	2	0
<i>Pseudomonas songnenensis</i> (M.E5DF.6)	0	0	30	0	30	30	0
<i>Pseudomonas songnenensis</i> (M.E5DF.8)	25	0	62	27	60	62	25
<i>Psychrobacter alimentarius</i> (N.E5PS.1)	15	34	46	79	16	0	95
<i>Psychrobacter alimentarius</i> (N.E1DS.3)	4	0	0	4	0	4	0
<i>Psychrobacter alimentarius</i> (N.E3PS.6)	0	2	1	3	0	0	3
<i>Psychrobacter alimentarius</i> (M.E5DS.4)	0	0	2	2	0	2	0

<i>Psychrobacter celer</i> (M.E1DF.5)	32	31	0	31	32	32	31
<i>Psychrobacter celer</i> (N.E1DF.10)	1	0	0	0	1	1	0
<i>Psychrobacter celer</i> (M.E1DF.1)	5	0	0	0	5	5	0
<i>Psychrobacter celer</i> (N.E1DF.6)	1	0	0	0	1	1	0
<i>Psychrobacter celer</i> (N.E1PS.8)	4	0	0	4	0	0	4
<i>Psychrobacter celer</i> (N.E1PS.9)	1	0	0	1	0	0	1
<i>Psychrobacter celer</i> (N.E1PS.6)	30	0	0	30	0	0	30
<i>Psychrobacter celer</i> (M.E1PF.4)	15	0	0	0	15	0	15
<i>Psychrobacter celer</i> (M.E1DF.2)	5	0	0	0	5	5	0
<i>Psychrobacter celer</i> (M.E1DS.1)	37	0	0	37	0	30	7
<i>Psychrobacter celer</i> (N.E1DS.1)	30	1	0	31	0	31	0
<i>Psychrobacter glacincola</i> (N.E1PF.6)	7	0	0	0	7	0	7
<i>Psychrobacter marincola</i> (M.E3PS.8)	0	2	0	2	0	0	2
<i>Psychrobacter marincola</i> (M.E3DS.21)	0	2	0	2	0	2	0
<i>Psychrobacter nivimaris</i> (M.E1DS.3)	8	0	3	10	1	11	0
<i>Psychrobacter nivimaris</i> (M.E1DS.4)	1	2	1	4	0	1	3
<i>Psychrobacter nivimaris</i> (M.E1PS.6)	30	0	0	30	0	0	30
<i>Psychrobacter pacificensis</i> (M.E1DS.5)	1	1	0	1	1	2	0
<i>Psychrobacter pacificensis</i> (M.E1DS.6)	30	0	0	30	0	30	0
<i>Psychrobacter pacificensis</i> (M.E1DS.2)	78	1	12	54	37	43	48
<i>Psychrobacter pacificensis</i> (M.E3DS.1)	0	1	0	1	0	1	0
<i>Psychrobacter piscatorii</i> (M.E5DS.2)	30	14	66	104	6	36	74
<i>Psychrobacter piscatorii</i> (M.E5DS.3)	0	0	30	30	0	30	0
<i>Psychrobacter piscatorii</i> (M.E5DS.8)	45	63	18	126	0	51	75
<i>Psychrobacter piscatorii</i> (M.E5DS.5)	0	0	1	1	0	1	0
<i>Psychrobacter</i> sp. (N.E1DS.2)	30	0	0	30	0	30	0
<i>Psychrobacter</i> sp. (M.E1PF.3)	6	4	4	0	14	10	4
<i>Psychrobacter</i> sp. (N.E1DF.8)	1	0	1	0	2	1	1
<i>Psychrobacter</i> sp. (M.E3PS.17)	0	60	0	60	0	0	60
<i>Psychrobacter</i> sp. (N.E3PS.4)	0	6	0	6	0	0	6
<i>Psychrobacter submarinus</i> (M.E3PF.9)	0	1	0	0	1	0	1
<i>Psychrobacter submarinus</i> (M.E3PS.15)	30	14	66	104	6	36	74
<i>Psychrobacter submarinus</i> (M.E1PF.7)	11	4	4	0	19	10	9

M/N: Medio marino / nutritivo; E1/E3/E5: Boca / Zona media / Cabeza; P/D: Zostera marina / Desnudo; S/F: Superficie (0-5 cm) / Fondo (15-20 cm)

Anexo 6 | Diferencias y similitudes morfológicas de los aislados

Diferencias y similitudes observadas en la caracterización morfológica de los aislados desnitrificantes representantes.

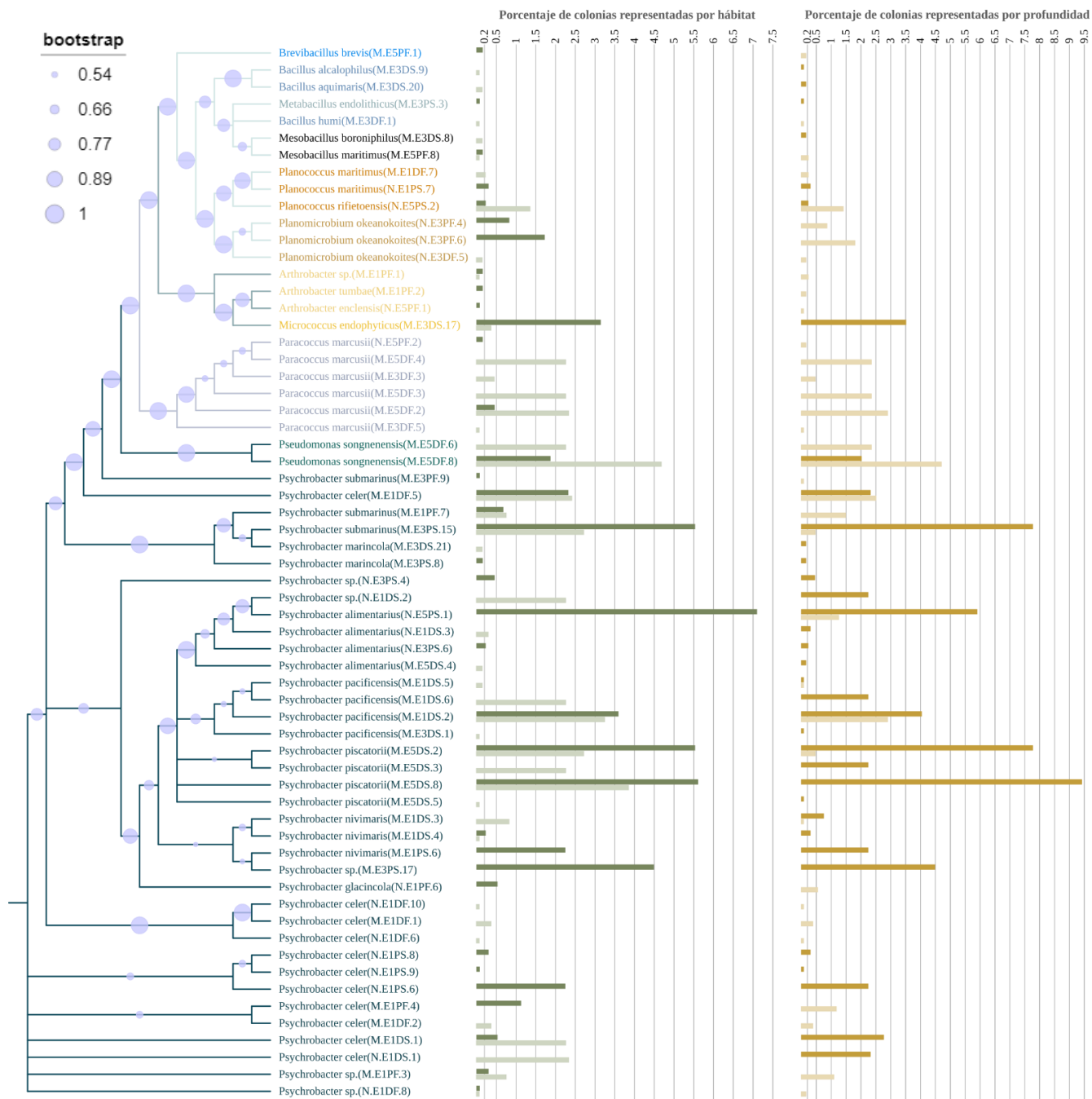
Especie	#Col	Color	Elevación	Forma	Bordes	Estructura	Brillo
<i>Paracoccus marcusii</i> (M.E3DF.3)	6	Anaranjado	Elevado	Circular	Liso	Lisa	Opaco
<i>Paracoccus marcusii</i> (N.E5PF.2)	2	Anaranjado	Convexa	Circular	Liso	Lisa	Opaco
<i>Paracoccus marcusii</i> (M.E5DF.4)	30	Anaranjado	Achatada	Circular	Liso	Lisa	Opaco
<i>Paracoccus marcusii</i> (M.E3DF.5)	1	Crema	Achatada	Circular	Liso	Lisa	Opaco
<i>Paracoccus marcusii</i> (M.E5DF.2)	37	Crema	Elevado	Circular	Liso	Lisa	Opaco
<i>Paracoccus marcusii</i> (M.E5DF.3)	30	Café claro	Achatada	Irregular	Ondulado	Lisa	Opaco
<i>Planococcus maritimus</i> (M.E1DF.7)	3	Anaranjado	Elevado	Irregular	Lobulado	Lisa	Opaco
<i>Planococcus maritimus</i> (N.E1PS.7)	4	Anaranjado	Achatado	Circular	Liso	Lisa	Opaco
<i>Planomicrobium okeanokoites</i> (N.E3PF.4)	11	Anaranjado	Achatada	Irregular	Liso	Lisa	Opaco
<i>Planomicrobium okeanokoites</i> (N.E3PF.6)	23	Anaranjado	Achatada	Circular	Liso	Lisa	Translucido
<i>Planomicrobium okeanokoites</i> (N.E3DF.5)	2	Blanco	Achatada	Circular	Liso	Lisa	Opaco
<i>Pseudomonas songnenensis</i> (M.E5DF.6)	30	Anaranjado	Elevado	Irregular	Ondulado	Lisa	Opaco
<i>Pseudomonas songnenensis</i> (M.E5DF.8)	87	Anaranjado	Elevado	Circular	Liso	Lisa	Opaco
<i>Psychrobacter alimentarius</i> (N.E1DS.3)	4	Anaranjado	Achatada	Irregular	Ondulado	Lisa	Opaco
<i>Psychrobacter alimentarius</i> (M.E5DS.4)	2	Anaranjado	Achatada	Irregular	Ondulado	Lisa	Transparente
<i>Psychrobacter alimentarius</i> (N.E3PS.6)	3	Crema	Achatada	Circular	Ondulado	Lisa	Opaco
<i>Psychrobacter alimentarius</i> (N.E5PS.1)	95	Crema	Elevado	Circular	Liso	Lisa	Opaco
<i>Psychrobacter celer</i> (N.E1DF.6)	1	Crema	Achatada	Circular	Lobulado	Lisa	Translucido
<i>Psychrobacter celer</i> (M.E1DF.1)	5	Crema	Achatada	Rizoide	Liso	Lisa	Translucido
<i>Psychrobacter celer</i> (M.E1DF.2)	5	Crema	Elevado	Circular	Liso	Lisa	Translucido
<i>Psychrobacter celer</i> (N.E1DF.10)	1	Crema	Elevado	Circular	Lobulado	Lisa	Translucido
<i>Psychrobacter celer</i> (M.E1DS.1)	37	Crema	Convexa	Circular	Liso	Lisa	Opaco
<i>Psychrobacter celer</i> (M.E1PF.4)	15	Crema	Cóncava	Circular	Liso	Lisa	Opaco

<i>Psychrobacter celer</i> (N.E1PS.8)	4	Crema	Protuberante	Circular	Liso	Lisa	Opaco
<i>Psychrobacter celer</i> (N.E1DS.1)	37	Blanco	Achatada	Circular	Liso	Lisa	Translucido
<i>Psychrobacter celer</i> (N.E1PS.6)	30	Blanco	Achatado	Puntiforme	Liso	Lisa	Translucido
<i>Psychrobacter celer</i> (N.E1PS.9)	1	Amarillo	Achatado	Circular	Liso	Lisa	Opaco
<i>Psychrobacter celer</i> (M.E1DF.5)	63	Anaranjado	Elevado	Circular	Liso	Lisa	Opaco
<i>Psychrobacter marincola</i> (M.E3PS.8)	2	Anaranjado	Achatada	Irregular	Lobulado	Lisa	Opaco
<i>Psychrobacter marincola</i> (M.E3DS.21)	2	Anaranjado	Achatada	Irregular	Lobulado	Lisa	Translucido
<i>Psychrobacter nivimaris</i> (M.E1DS.3)	11	Crema	Achatada	Irregular	Liso	Lisa	Opaco
<i>Psychrobacter nivimaris</i> (M.E1DS.4)	4	Crema	Achatada	Circular	Ondulado	Lisa	Opaco
<i>Psychrobacter nivimaris</i> (M.E1PS.6)	30	Blanca	Achatada	Puntiforme	Liso	Lisa	Opaco
<i>Psychrobacter pacificensis</i> (M.E1DS.2)	91	Crema	Achatada	Circular	Liso	Lisa	Translucido
<i>Psychrobacter pacificensis</i> (M.E1DS.5)	2	Crema	Achatada	Circular	Liso	Lisa	Opaco
<i>Psychrobacter pacificensis</i> (M.E3DS.1)	1	Crema	Achatada	Rizoide	Filamentoso	Rugosa	Translucido
<i>Psychrobacter pacificensis</i> (M.E1DS.6)	30	Crema	Elevado	Circular	Ondulado	Lisa	Opaco
<i>Psychrobacter piscatorii</i> (M.E5DS.2)	110	Blanca	Achatada	Puntiforme	Liso	Lisa	Translucido
<i>Psychrobacter piscatorii</i> (M.E5DS.3)	30	Incoloro	Achatada	Irregular	Ondulado	Lisa	Transparente
<i>Psychrobacter piscatorii</i> (M.E5DS.5)	1	Amarillo pastel	Achatada	Irregular	Liso	Lisa	Translucido
<i>Psychrobacter piscatorii</i> (M.E5DS.8)	126	Crema	Elevado	Circular	Liso	Lisa	Translucido
<i>Psychrobacter</i> sp. (M.E1PF.3)	14	Crema	Achatada	Circular	Liso	Lisa	Opaco
<i>Psychrobacter</i> sp. (N.E3PS.4)	6	Crema	Achatada	Circular	Filamentoso	Rugosa	Opaco
<i>Psychrobacter</i> sp. (N.E1DF.8)	2	Crema	Elevado	Circular	Liso	Lisa	Opaco
<i>Psychrobacter</i> sp. (M.E3PS.17)	60	Blanca	Elevado	Circular	Liso	Lisa	Opaco
<i>Psychrobacter</i> sp. (N.E1DS.2)	30	Blanco	Achatada	Circular	Liso	Lisa	Opaco
<i>Psychrobacter submarinus</i> (M.E3PF.9)	1	Crema	Achatada	Circular	Lobulado	Lisa	Opaco
<i>Psychrobacter submarinus</i> (M.E1PF.7)	19	Crema	Achatada	Circular	Liso	Lisa	Opaco
<i>Psychrobacter submarinus</i> (M.E3PS.15)	110	Blanca	Achatada	Irregular	Lobulado	Lisa	Translucido

#Col: Número de colonias aisladas del representante en cuestión

Anexo 8 | Árbol filogenético por hábitat y profundidad

Árbol filogenético de las secuencias de *16S rRNA* de los representantes bacterianos desnitrificantes aislados en sedimentos del brazo San Quintín. El valor del bootstrap se muestra en círculos azules en los nodos. El color de los nombres bacterianos denota los diferentes géneros encontrados y el color de las ramas representa la clase correspondiente: γ -Proteobacteria (—), α -Proteobacteria (—), Bacilli (—) y Actinobacteria (—). En paréntesis se indica el medio de cultivo de aislamiento del representante: Marino (M) o nutritivo (N). Las gráficas de barras a la derecha del árbol presentan las abundancias relativas de los aislados obtenidos para cada representante; el color indica la profundidad y el hábitat: Superficie (■), fondo (■), *Zostera marina* (■) y desnudo (■).



Anexo 9 | NMDS

Resultados del análisis estadístico del NMDS para los dos ejes de la ordenación en relación con las variables ambientales.

Variable	NMDS 1	NMDS 2	r²	p-value
Arena	-0.565	-0.825	0.669	0.005*
Limo	0.560	0.828	0.669	0.005*
Arcilla	0.973	0.230	0.537	0.029*
TCCHO	-0.565	0.825	0.336	0.169
Fe(II)	0.998	-0.069	0.400	0.102
Fe(III)	0.021	1.000	0.354	0.163
C_{OT}	0.124	0.992	0.631	0.013*
N_T	0.128	0.992	0.590	0.013*
pH	-0.223	0.975	0.497	0.032*

Número de permutaciones: 999; *: p-value ≤ 0.05 ; TCCHO: Materia orgánica lábil; C_{OT}: Carbono orgánico total; N_T: Nitrógeno total