



Cinvestav

**Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del Instituto
Politécnico Nacional. Unidad Mérida**

Tesis de doctorado

“Diversidad y actividad de microorganismos sulfato-reductores en sedimentos
del noroeste del Golfo de México”

Presenta:

M en C María Fernanda Sánchez Soto Jiménez

Directores:

Dra. Ma. Leopoldina Aguirre Macedo

Dr. José Quinatzin García Maldonado

Mérida, Yucatán agosto de 2022

AGRADECIMIENTOS

Se agradece al Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional unidad Mérida, especialmente al laboratorio de Patología Acuática por permitir el desarrollo de esta investigación durante el programa de Doctorado en Ciencias Marinas. Al CONACyT por la beca otorgada (458740). Esta investigación ha sido financiada por el Fondo Sectorial CONACyT - SENER - Hidrocarburos, proyecto 201441. Esta es una contribución del Consorcio de Investigación del Golfo de México (CIGoM). Reconocemos a PEMEX por promover ante el Fondo, la demanda específica sobre los derrames de hidrocarburos y el medio ambiente. Gracias al Dr. Daniel Pech y la Dra. Flor Árcega por proveer los datos fisicoquímicos utilizados en esta tesis.

Agradecimiento a la Dra. Leopoldina Aguirre Macedo y al Dr. José Q. García Maldonado por la dirección y el apoyo brindado para la realización de este proyecto. Gracias al comité sinodal conformado por la Dra. Rossana Rodríguez, la Dra. Luisa Falcón, el Dr. Emanuel Hernández y el Dr. Víctor Vidal por su valiosa contribución a este proyecto, así como al Dr. David Valdés quien apoyó el desarrollo de la parte experimental. A todo el comité expreso mi gratitud por ser investigadores con un gran sentido humano.

Gracias a todos aquellos quienes apoyaron el logro de este proyecto, en especial al Dr. Daniel Cerqueda, al MC Daniel Morales y la Dra. Rocío Alcántara, así como a mis amigos Sonia Agami, Magda Uribe, Mónica Mora, Caro Martínez, Gabo, Eduardo Ramírez, Román Espinal, Aldrin Chan, Francisco Puc, Abril Gamboa, Daniel Aguirre, Shereen y a mis queridos Mireya Carrillo y el Dr. Eucario D. E. P.

Gracias a mis amados padres, a mi hermana mi alma gemela, y a mi bello hijo André por la fe que tuvieron en mí en este proceso académico. Agradezco a la vida por la fortaleza que me da mi amada familia y la inmensa alegría y amor que se genera a partir de nuestra cercanía... los amo.

“Somos como enanos a los hombros de gigantes. Podemos ver más, y más lejos que ellos, no por la agudeza de nuestra vista ni por la altura de nuestro cuerpo, sino porque somos levantados por su gran altura”.”

Bernardo de Chartres

RESUMEN

Los microorganismos sulfato-reductores (MSR) tienen un papel clave en el ciclo del azufre en los sedimentos marinos mediante la reducción de sulfato y la producción de sulfuro. Degradan hasta el 50% de la materia orgánica que sedimenta en el fondo marino, regulan el pH y las condiciones de hipoxia del entorno, están implicados en la precipitación de metales, y son el principal control biológico de las emisiones de metano del océano a la atmósfera. Sin embargo, a pesar de su relevancia, a la fecha se sabe poco sobre estas comunidades en la región Mexicana del Golfo de México. En este trabajo se analizó la estructura y actividad de la comunidad de MSR en sedimentos de la región de Perdido en el Noroeste del Golfo de México (NOGM). Los análisis bioinformáticos revelaron tres grupos de muestras con respecto al gradiente batimétrico. Las comunidades bacterianas estuvieron dominadas por las clases *Alfa*, *Delta* y *Gamma-Proteobacteria* en todos los sitios, mientras que la clase NC10 estuvo bien representada en los más profundos. Las familias *Desulfobacteraceae*, *Desulfarculaceae* y *Syntrophobacteraceae*, se detectaron por el gen 16S ARNr como potenciales MSR abundantes en sedimentos del margen continental. No obstante, de acuerdo con los análisis de las secuencias *dsrB*, las comunidades de MSR estuvieron predominantemente compuestas por *Desulfovibrionaceae*, *Desulfobacteraceae* y *Peptococcaceae*. Un significativo número de secuencias no asignadas a nivel de familia, pero filogenéticamente relacionadas con *Euryarchaeota*, con grupos ambientales y con los supergrupos *Deltaproteobacteria* y *Nitrospirota*, también se observaron en todos los sitios. El análisis PERMANOVA indicó que los cambios en la estructura de los MSR se relacionaron principalmente con la profundidad del agua, la temperatura, el redox, y el contenido de níquel y cadmio. La α -diversidad y la abundancia de MSR, estimada por la cuantificación del gen *dsrB* por qPCR, disminuyeron en los sitios más profundos, sugiriendo una menor actividad sulfato-reductora a mayor profundidad. Adicionalmente, se evaluó la actividad sulfato-reductora en condiciones de laboratorio. Los resultados indicaron que la mayor tasa de remoción de sulfato se obtuvo de los sitios someros incubados a 37 °C con acetato como sustrato. Este estudio contribuye a la comprensión de la estructura y actividad de MSR, que será de utilidad para posteriores estudios ambientales en esta importante región del Golfo de México.

SUMMARY

Sulfate-reducing microorganisms (SRMs) play a key role in sulfur cycle in marine sediments by reducing sulfate and producing sulfide. They can degrade up to 50% of the organic matter that settles on the ocean floor, can regulate pH and environmental hypoxia conditions, are involved in metal precipitation, and are the main biological control of methane emissions from the ocean to the atmosphere. However, to date little is known about these communities in the Mexican Gulf of Mexico (GoM) region. In this work, we analyzed the structure and activity of the MSR community in sediments from the Perdido region of the northwestern Gulf of Mexico (NWGM). Bioinformatic analyses revealed three groups of samples respect to the bathymetric gradient. Bacterial communities were dominated by members of *Alpha*, *Delta*, and *Gamma-Proteobacteria* at all sites. However, NC10 class was well represented in the deeper sites. The families *Desulfobacteraceae*, *Desulfarculaceae*, and *Syntrophobacteraceae* were detected by 16S rRNA gen as potential SRMs, with significant relative abundances in the continental margin sediments. However, analyses of *dsrB* gene sequences indicated that SRM communities were predominantly composed for *Desulfovibrionaceae*, *Desulfobacteraceae*, and *Peptococcaceae*. An important number of not assigned sequences at family level, but phylogenetically related to *Euryarchaeota*, environmental groups, and *Deltaproteobacteria* and *Nitrospirota* superclusters, were also observed in all samples. PERMANOVA analyses indicated that changes in SRMs structure were mainly related to water depth, temperature, redox, and nickel and cadmium content. The α -diversity and abundance of SRMs, estimated by qPCR of *dsrB* gen, decreased at deep sites, suggesting lower sulfate reduction activity with respect to the water depth. Additionally, the sulfate-reducing activity was evaluated under laboratory conditions. The results indicated that highest sulfate removal rate was obtained for shallow sites incubated at 37 °C with acetate as organic substrate. This study contributes with a better understanding of the distribution, composition, and activity of SRMs, which will be useful for further environmental studies in this important region of the Gulf of Mexico.

ÍNDICE

AGRADECIMIENTOS	1
RESUMEN.....	3
SUMMARY.....	4
ÍNDICE	5
LISTA DE ABREVIATURAS.....	8
LISTA DE FIGURAS	11
LISTA DE TABLAS	12
1. CAPÍTULO I. PLANTEAMIENTO DEL TRABAJO	13
1.1. INTRODUCCIÓN.....	13
1.2. ANTECEDENTES	15
1.2.1. SEDIMENTOS MARINOS COMO HÁBITAT MICROBIANO.....	15
1.2.2. RELEVANCIA DE LOS MICROORGANISMOS EN LOS SEDIMENTOS MARINOS.....	16
1.2.3. MICROORGANISMOS SULFATO REDUCTORES (MSR) EN SEDIMENTOS MARINOS	17
1.2.4. SULFATO REDUCCIÓN DESASIMILATORIA (SRD) EN SEDIMENTOS MARINOS	17
1.2.5. ESTUDIO DE MICROORGANISMOS SULFATO-REDUCTORES EN SEDIMENTOS MARINOS.....	19
1.3. JUSTIFICACIÓN	24
1.4. OBJETIVO GENERAL	25
1.5. OBJETIVOS PARTICULARES.....	25
2. CAPÍTULO II. ANÁLISIS DE LA COMUNIDAD PROCARIOTA CON ÉNFASIS EN LA DETECCIÓN DE POTENCIALES GRUPOS SULFATO REDUCTORES EN SEDIMENTOS DE DIFERENTE PROFUNDIDAD EN EL NOROESTE DEL GOLFO DE MÉXICO	26
2.1. INTRODUCCIÓN.....	26
2.2. OBJETIVO	27
2.3. MATERIALES Y MÉTODOS.....	27
2.3.2. ANÁLISIS FÍSICOQUÍMICO DE LAS MUESTRAS DE SEDIMENTO	29
2.3.3. DETERMINACIÓN DE METALES PESADOS E HIDROCARBUROS EN MUESTRAS DE SEDIMENTO.....	29
2.3.4. ANÁLISIS MOLECULAR CULTIVO-INDEPENDIENTE DE LA COMUNIDAD BACTERIANA	30
2.4. RESULTADOS.....	33
2.4.1. DETERMINACIONES FÍSICOQUÍMICAS PARA DESCRIPCIÓN DE LOS SITIOS DE ESTUDIO	33
2.4.2. ANÁLISIS DE LA ESTRUCTURA DE LAS COMUNIDADES.....	33
2.4.3. COMPOSICIÓN DE LA COMUNIDAD PROCARIOTA.....	34

2.5. DISCUSIÓN	39
2.5.1. COMPOSICIÓN DE LA COMUNIDAD PROCARIOTA EN SEDIMENTOS DEL NOGM.....	39
2.5.2. POTENCIALES GRUPOS SULFATO-REDUCTORES EN LIBRERÍAS DEL GEN 16S ARNR 41	
2.6. CONCLUSIONES.....	43
3. CAPÍTULO III. ANÁLISIS DE LA DIVERSIDAD DE MICROORGANISMOS SULFATO REDUCTORES EN SEDIMENTOS DEL GOLFO DE MÉXICO MEDIANTE SECUENCIACIÓN DEL GEN <i>DSRB</i>	44
3.1. INTRODUCCIÓN.....	44
3.2. OBJETIVO	46
3.3. MATERIAL Y MÉTODOS.....	47
3.3.1. ANÁLISIS DE LA COMUNIDAD DE MICROORGANISMOS SULFATO-REDUCTORES A TRAVÉS DE LA SECUENCIACIÓN MASIVA DEL GEN <i>DSRB</i>	47
3.4. RESULTADOS.....	51
3.4.1 ESTRUCTURA DE LA COMUNIDAD DE MICROORGANISMOS SULFATO-REDUCTORES Y CUANTIFICACIÓN DEL GEN <i>dsrB</i> EN SEDIMENTOS MARINOS.....	51
3.4.2. COMPOSICIÓN DE LAS COMUNIDADES SULFATO-REDUCTORAS.....	53
3.5. DISCUSIÓN	57
3.5.1. COMPOSICIÓN DE MSR EN SEDIMENTOS DEL NOGM.....	57
3.5.2. COMUNIDAD DE MICROORGANISMOS SULFATO-REDUCTORES Y VARIABLES AMBIENTALES	59
3.6. CONCLUSIONES.....	62
4. CAPÍTULO IV. ESTIMULACIÓN DE LA ACTIVIDAD SULFATO-REDUCTORA POR LA TEMPERATURA Y LA ADICIÓN DE SUSTRATOS EN SEDIMENTOS DEL GOLFO DE MÉXICO 63	
4.1. INTRODUCCIÓN.....	63
4.2. OBJETIVO	65
4.3. MATERIALES Y MÉTODOS.....	65
4.3.1. DISEÑO EXPERIMENTAL	65
4.3.2. MÉTODOS ANALÍTICOS	67
4.4. RESULTADOS.....	67
4.4.1. CONSUMO DE SULFATO EN EXPERIMENTOS DE INCUBACIÓN	67
4.4.2. ANÁLISIS FACTORIAL PARA EVALUAR DE LA REMOCIÓN DE SULFATO	70
4.5. DISCUSIÓN	71
4.5.1. ACTIVIDAD SULFATO-REDUCTORA Y TEMPERATURA	71
4.5.2. ACTIVIDAD SULFATO-REDUCTORA Y FUENTES DE CARBONO	73
4.6. CONCLUSIONES.....	75

5.	CAPÍTULO V. DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES GENERALES.....	76
5.1.	PERSPECTIVAS	80
6.	REFERENCIAS	83
7.	ANEXOS.....	102

LISTA DE ABREVIATURAS

16S ARNr: gen que codifica para la unidad menor del ribosoma procariota

Ac: acetato

AF: arenas finas

AM: arenas medias

AMF: arenas muy finas

ANOVA: análisis de la varianza

Apr o Aps: adenililsulfato reductasa

ASR: arqueas sulfato-reductoras

ASV: variantes de secuencias de amplicones

BOS: bacterias oxidantes de sulfuro

BSR: bacterias sulfato-reductoras

Cd: cadmio

CO: carbono orgánico

CO₂: dióxido de carbono

Ctrl: control (sin fuente de carbono extra) en el experimento de incubación de sedimentos

DCM: diclorometano

DE: desviación estándar

DQO: demanda química de oxígeno

Dsr: enzima (bi)sulfito reductasa desasimilatoria

dsrAB: gen codificante de la enzima DsrAB

DsrAB: subunidades A y B de la enzima (bi)sulfito reductasa desasimilatoria

e.g.: *exempli gratia* (por ejemplo)

Fe³⁺: hierro

FeS₂: pirita

Fig.: figura

g: gramo

GC-FID: cromatografía de gases con un detector de ionización de llama

GM: Golfo de México

H₂: hidrógeno

HC: hidrocarburo(s)

HCl: ácido clorhídrico

HCT: hidrocarburos totales

HNO₃: ácido nítrico

HSO₃⁻: bisulfito

i.e.: *id est* (tal como)

ICP-MS: (inductively coupled plasma-mass spectrometry) plasma acoplado inductivamente al espectrómetro de masas para detectar iones

K₂Cr₂O₇: dicromato de potasio

LEfSe: análisis discriminante lineal Effect Size

M: (molar) número de moles de soluto por cada litro de solución

m: metros

mg: miligramo

min.: minuto

ml l⁻¹: mililitro por litro

mm: milímetro

Mn⁴⁺: manganeso

MO: materia orgánica

MSR: microorganismos sulfato-reductores (incluye bacterias y arqueas)

mV: milivolts

N: (normal) número de equivalentes de soluto contenidos en 1 litro solución

n=: número de muestras

N₂: nitrógeno

NaOH: hidróxido de sodio

NGS: (next generation sequencing techniques) tecnologías de secuenciación masiva de nueva generación

Ni: níquel

nm: nanómetros. Unidad de longitud de onda

nmol: nanomol

NO_3^- : nitrato

NOGM: noroeste del Golfo de México

O_2 : oxígeno

OD: oxígeno disuelto

OTUs: (operational taxonomic units) unidades taxonómicas operativas

OxC: organismos oxidadores completos que degradan acetato hasta CO_2

OxI: organismos oxidadores incompletos que degradan parcialmente los sustratos orgánicos a acetato

pb: pares de bases

Pb: plomo

PCoA: (principal coordinates analysis) análisis de coordenadas principales

PERMANOVA: análisis de varianza permutacional

pH: potencial de hidrógeno para medir el grado de alcalinidad o acidez de una solución

Pr: propionato

PSU: (practical salinity units) unidades prácticas de salinidad

qPCR: (quantitative chain reaction) reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa

s: segundo

S^{2-} : sulfuro

Sat: ATP sulfurilasa o adenilil transferasa

SO_3^{2-} : sulfito

SO_4^{2-} : sulfato

soxAB: gen que codifica las subunidades A y B de la enzima responsable de la oxidación del tiosulfato ($\text{S}_2\text{O}_3^{2-}$) a azufre elemental (S^0)

SRD: sulfato-reducción desasimilatoria

TRS: tasa de remoción de sulfato

V: vanadio

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Reacciones fundamentales de la ruta metabólica de la reducción desasimilatoria de sulfato.....	18
Figura 2. Área de estudio y sitios de colecta de muestras de sedimento.....	28
Figura 3. a) Dendrograma mostrando el agrupamiento de las muestras de acuerdo con el análisis de la matriz de distancias UniFraq.. ..	34
Figura 4. Abundancias relativas de fila procariotas en sedimentos de la región mexicana del NOGM.....	35
Figura 5. Abundancias relativas de clases procariotas en sedimentos de la región mexicana del NOGM. Se muestran las clases con abundancias >1%, el resto se agrupan en la categoría de otros.	36
Figura 6. Abundancias relativas de familias procariotas en sedimentos de la región mexicana del NOGM.....	36
Figura 7. Mapa indicando los sitios de colecta de las muestras de sedimento con las que se realizó el análisis molecular de la comunidad de MSR por secuenciación Illumina del gen <i>dsrB</i>	47
Figura 8. Análisis PCoA de la estructura de la comunidad de MSR. Agrupamiento de muestras de acuerdo con la matriz de disimilitud Bray-Curtis	52
Figura 9. Comparación de estimadores ecológicos y del número de copias del gen <i>dsrB</i> entre muestras.....	52
Figura 10. Composición de fila sulfato-reductores con base en secuencias del gen <i>dsrB</i>	53
Figura 11. Composición de familias sulfato-reductoras. Análisis basado en secuencias del gen <i>dsrB</i>	53
Figura 12. Composición de géneros sulfato-reductores. Análisis basado en secuencias del gen <i>dsrB</i>	54
Figura 13. Filogenia de amplicones del gen <i>dsrB</i> . El árbol filogenético se calculó utilizando el software RAxML con el modelo GTRGAMMAIX.....	56
Figura 14. Abundancias diferenciales de géneros de microorganismos sulfato-reductores (MSR).....	56

Figura 15. Sitios de colecta de muestras de sedimento incubados	66
Figura 16. Cambios en la concentración de sulfato en sedimentos de sitios someros.	68
Figura 17. Concentración de sulfato en microcosmos durante los experimentos de incubación de sedimentos de sitios profundos.....	70
Figura 18. Análisis de diseño factorial.....	71

LISTA DE TABLAS

Tabla 1. Potencial metabolismo y función en el ecosistema de las familias bacterianas más abundantes.....	37
Tabla 2. ASVs potenciales grupos sulfato-reductores a nivel de familia. Grupos de muestras de acuerdo con el análisis de la matriz de distancias.	38
Tabla 3. Tasa de remoción de sulfato (TRS) en sedimentos de sitios someros y profundos por tratamiento.....	69

1. CAPÍTULO I. PLANTEAMIENTO DEL TRABAJO

1.1. INTRODUCCIÓN

Los microorganismos sulfato-reductores (MSR) son bacterias y arqueas capaces de utilizar sulfato (SO_4^{2-}) u otros compuestos oxidados de azufre como aceptores terminales de electrones. Los MSR son los responsables de degradar alrededor del 50% de la materia orgánica (MO) que alcanza los sedimentos marinos y de generar anualmente el 96% de los 300 millones de toneladas de sulfuro presentes en sedimentos y aguas asociadas. Gracias a esto, los MSR están implicados en la circulación de nutrientes y del carbono orgánico en el océano. También en la regulación del contenido de oxígeno (O_2) en el océano y la atmósfera, ya que el O_2 es controlado, en última instancia, por la oxidación del sulfuro fijado en los sedimentos, principalmente en forma de pirita (FeS_2). En consecuencia, los MSR tienen un papel central en los ciclos del azufre, del carbono, los metales y del O_2 en nuestro planeta (Rickard et al. 2017).

Se ha observado una amplia distribución de los MSR en el ecosistema marino, especialmente en las zonas anóxicas de los sedimentos ricos en sulfato (Rabus et al. 2015). Los resultados del estudio global de los MSR han mostrado una clara tendencia entre sedimentos del margen continental y sedimentos abisales. Los márgenes continentales, que suelen recibir los mayores aportes de MO lábil, suelen presentar las tasas de sulfato-reducción más altas ($1.5 \text{ nmol cm}^{-3} \text{ día}^{-1}$), aproximadamente dos veces más que en los sitios del océano profundo (Canfield 1991; Parkes and Sass 2007; Bowles et al. 2014). Dentro del perfil vertical de la columna de sedimento, las mayores tasas de reducción de sulfato se han observado en los primeros centímetros, donde la mayor abundancia de MSR coincide con la disponibilidad de MO lábil (Bagwell et al. 2009; Orsi et al. 2016; Jochum et al. 2017).

Algunos estudios han evaluado simultáneamente la actividad, abundancia y composición de las comunidades sulfato-reductoras en sedimentos marinos, indicando que el desarrollo de estos organismos puede ser afectado por múltiples factores (Ravenschlag et al. 2000; Chin et al. 2008; Holmkvist et al. 2011; Quillet et al. 2012; Jochum et al. 2017). La cantidad de MO

lábil, la profundidad y la temperatura, la presencia de contaminantes (e.g., hidrocarburos o metales pesados), así como las características deposicionales y otras variables fisicoquímicas específicas de cada sitio, explican los cambios en la actividad y la estructura de la comunidad sedimentaria de MSR.

En cuanto a su diversidad, se ha indicado que los MSR son un grupo metabólicamente y filogenéticamente versátil. La mayoría de los MSR marinos se han relacionado con organismos de la clase *Deltaproteobacteria* (Leloup et al. 2007, 2009; Quillet et al. 2012; Colin et al. 2013; Frank et al. 2013; Zhang et al. 2017). Otros grupos frecuentemente reportados en sedimentos marinos se relacionan con MSR Gram-positivos formadores de esporas del género *Desulfotomaculum*, con bacterias termófilas del género *Thermodesulfovibrio* y con arqueas termófilas del grupo *Archaeoglobus* (Dhillon et al. 2003; Li et al. 2017a). También se han aislado y caracterizado MSR marinos de los géneros *Desulfovibrio*, *Desulfobulbus*, *Desulfosarcina*, *Desulfococcus*, *Desulfotomaculum*, *Desulfophila*, *Desulfotalea*, *Desulfoglaeba*, *Desulfacinum* y *Archaeoglobus*. Sin embargo, se ha indicado que la mayoría pertenecen a grupos no cultivados que se relacionan solo lejanamente con los MSR cultivados (Leloup et al. 2007; Quillet et al. 2012; Zhang et al. 2016; Jørgensen et al. 2019).

El estudio de los MSR a partir de una amplia colección de muestras representativas de distintas condiciones ambientales, ha permitido revisar el conocimiento global que se tiene sobre la comunidad de MSR (Quillet et al. 2012; Zhang et al. 2016, 2017; Vigneron et al. 2018), revelando que se sabe poco sobre ellas. Se desconoce en gran medida su abundancia, la composición de sus comunidades y la naturaleza de su variación de un entorno a otro. Debido a lo anterior, en este trabajo se analizó la estructura y actividad de la comunidad de MSR en sedimentos de la región de Perdido en el noroeste del Golfo de México (NOGM), una región donde no hay información suficiente sobre los MSR y que alberga importantes yacimientos de petróleo.

1.2. ANTECEDENTES

1.2.1. SEDIMENTOS MARINOS COMO HÁBITAT MICROBIANO

Los sedimentos marinos son el ecosistema continuo más grande y el mayor reservorio de carbono orgánico del planeta (Snelgrove et al. 1997; Burdige 2007; Parkes and Sass 2007; Orcutt et al. 2011). Éstos ofrecen una extensa y heterogénea matriz de superficies sólidas con complejos sustratos orgánicos e inorgánicos para el crecimiento de organismos procariotas, quienes superan en abundancia y diversidad a las comunidades presentes en el agua de mar y los suelos (Jørgensen and Boetius 2007; Zinger et al. 2011; Kallmeyer et al. 2012; Parkes et al. 2014; Hoshino et al. 2020). Los sedimentos marinos son entornos heterogéneos donde se forman distintos microhábitat, ocurre la división de recursos y se crean diferentes ambientes que impulsan la diversificación y conformación de las comunidades procariotas (Torsvik et al. 2002; Orcutt et al. 2011; Fike et al. 2015).

Una variedad de sustratos disponibles en los sedimentos marinos sirve como fuente de carbono y energía para las comunidades procariotas. Dichos sustratos son oxidados mediante una compleja secuencia de procesos respiratorios y fermentativos, determinada en gran parte, por el rendimiento energético de los aceptores de electrones disponibles. Los aceptores de electrones con mayor rendimiento energético, tales como el oxígeno (O_2), el nitrato (NO_3^-), el manganeso (Mn^{4+}) y el hierro (Fe^{3+}), son consumidos cerca de la superficie del sedimento, seguidos por la reducción del sulfato (SO_4^{2-}) y la metanogénesis (Jørgensen and Revsbech 1989; Wasmund et al. 2017; Jørgensen et al. 2019).

El metabolismo microbiano se ha medido a partir de la concentración de los aceptores y donadores de electrones en el sedimento (Orcutt et al. 2010a). El uso de microelectrodos también ha permitido determinar dónde ocurren los procesos microbianos (Ley et al. 2006). Se ha observado que en los sedimentos del margen continental el O_2 suele estar disponible en los primeros milímetros donde es consumido por los organismos aerobios. Por debajo de esta fina capa oxigenada los sedimentos son un extenso ambiente anóxico, donde se ha observado que la reducción de sulfato es el metabolismo dominante en los procesos de degradación

anaerobia de la MO (Finke et al. 2007; Fike et al. 2015; Komada et al. 2016). Por el contrario, en los sedimentos abisales que subyacen las aguas oligotróficas del océano se ha observado que el O₂ suele estar disponible a mayor profundidad dentro del sedimento debido a las bajas tasas de sedimentación y de degradación de la MO (Rowe et al. 2008; Fischer et al. 2009; Orsi 2018). En estos sedimentos oxigenados el bajo aporte de MO restringe significativamente las tasas de reducción microbiana de sulfato (Parkes and Sass 2007).

1.2.2. RELEVANCIA DE LOS MICROORGANISMOS EN LOS SEDIMENTOS MARINOS

Toda la cadena trófica del océano depende de la circulación de nutrientes y MO entre las aguas superficiales y los sedimentos (Bolhuis and Cretoiu 2016). En el ecosistema sedimentario los procariotas son los grandes catalizadores biológicos para la degradación del carbono orgánico y quienes controlan en gran medida el reciclaje de nutrientes (Newton et al. 2013; Orsi 2018). Gracias a la relación entre las poblaciones microbianas que conforman comunidades es que los sedimentos son entornos eficientes para la degradación de la MO (Sassen et al. 1993; Hamilton and Hamilton 1997; Wasmund et al. 2017).

Varias de las reacciones de oxidorreducción (redox) implicadas en la transformación cíclica de los elementos, también dependen del metabolismo procariota. Estos organismos aceleran dichos procesos hasta 10²⁰ veces en relación con la velocidad de las reacciones abióticas (Jørgensen 2006). Por ejemplo, la reducción fisicoquímica del sulfato (SO₄²⁻) es extremadamente lenta a temperaturas inferiores a los 150°C, incluso durante periodos de tiempo geológicamente significativos (Rickard and Luther 2007). Los MSR facilitan la reducción sulfato a sulfuro incluso por debajo de los 0 °C (Knoblauch et al. 1999). Se ha estimado que la reducción microbiana de sulfato puede mineralizar más de la mitad del carbono orgánico en los sedimentos marinos, lo que indica la importancia de los MSR, tanto en el ciclo del azufre como del carbono (Rabus et al. 2006).

1.2.3. MICROORGANISMOS SULFATO REDUCTORES (MSR) EN SEDIMENTOS MARINOS

El sulfato es el oxidante más abundante en el océano. Esto ha hecho que los MSR se encuentren entre los organismos más abundantes de la Tierra (Jørgensen and Kasten 2006; Rickard et al. 2017). Los MSR son bacterias y arqueas anaerobias con la capacidad de utilizar sulfato (SO_4^{2-}) u otros compuestos oxidados de azufre (e.g., sulfito, tiosulfato) como aceptores terminales de electrones para la oxidación de compuestos orgánicos e hidrógeno (H_2). Esto indica que la reducción de sulfato a sulfuro (S^{2-}) se acopla al metabolismo energético, y que el sulfuro, producto de la reducción del sulfato, se libera al ambiente como producto final de desecho. A este conjunto de reacciones se le denomina sulfato-reducción desasimilatoria (SRD). A diferencia de la SRD, en la reducción de sulfato asimilatoria (SRA) el sulfuro es utilizado para la síntesis de biomoléculas (Jørgensen 1982; Labrenz et al. 2000; Hines 2003; Pallud and Van Cappellen 2006; Rabus et al. 2006, 2015; Muyzer and Stams 2008).

1.2.4. SULFATO REDUCCIÓN DESASIMILATORIA (SRD) EN SEDIMENTOS MARINOS

La SRD es uno de los metabolismos microbianos más antiguos del planeta y uno de los más relevantes en el océano moderno (Canfield and Raiswell 1999; Lens and Kuenen 2001). La SRD es el principal mecanismo para remover SO_4^{2-} del agua de mar a los sedimentos, y por la cual se produce casi todo el sulfuro del planeta con la concomitante degradación promedio anual de hasta el 29% del carbono orgánico transportado al lecho marino (Jørgensen and Kasten 2006; Bowles et al. 2014; Fike et al. 2015; Wasmund et al. 2017; Jørgensen et al. 2019).

Los MSR que viven a través de la SRD poseen el conjunto enzimático necesario para obtener energía de la respiración de sulfato. Sin embargo, antes de que la célula pueda obtener energía del sulfato, primero necesita invertir energía para transportar esta molécula al citoplasma y

convertirla en una forma químicamente reactiva (Hamilton and Hamilton 1997; Fike et al. 2015).

1.2.4.1. ENZIMAS PRINCIPALES DE LA SULFATO-REDUCCIÓN DESASIMILATORIA

La SRD conlleva la reducción intracelular de ocho electrones en la reducción de sulfato (SO_4^{2-}) a sulfito (SO_3^{2-}) y posteriormente en la reducción de SO_3^{2-} a sulfuro (S^{2-}) como producto final de desecho (Qian et al. 2019). Estas reacciones involucran cuatro enzimas principales: la ATP sulfurilasa conocida también como adenilil transferasa (Sat), la pirofosfatasa, la adenililsulfato reductasa (Apr o Aps) y la (bi)sulfito reductasa desasimilatoria (Dsr) (Fig. 1).

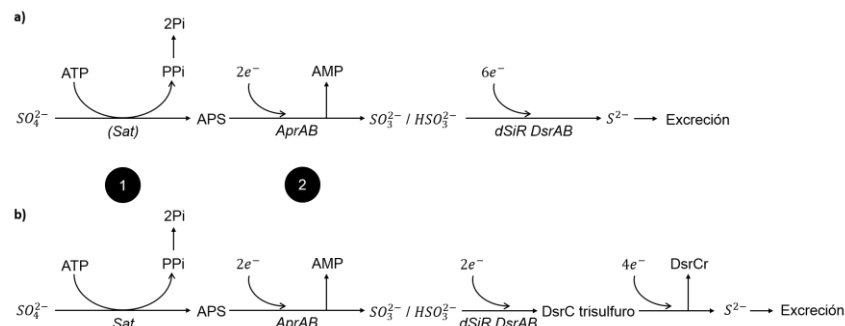


Figura 1. Reacciones fundamentales de la ruta metabólica de la reducción desasimilatoria de sulfato. El sulfato (SO_4^{2-}) es activado por la adenilil transferasa o ATP sulfurilasa (sat) a adenosin 5'-fosfosulfato (APS) (1), reducción del APS por la APS reductasa (AprAB) (2), reducción directa de (bi)sulfito ($\text{SO}_3^{2-} / \text{HSO}_3^{2-}$) a sulfuro (S^{2-}) con el consumo de seis electrones catalizado por la enzima sulfito reductasa desasimilatoria (dSiR DsrAB) (a); reducción de $\text{SO}_3^{2-} / \text{HSO}_3^{2-}$ a DsrC trisulfuro por el complejo enzimático DsrAB/DsrC, última reducción del DsrC trisulfuro a sulfuro y DsrCr reducido por el complejo DsrMKJOP asociado a la membrana (b). Modificado de Qian et al. 2019.

La SRD inicia cuando la enzima Sat, con ayuda de una pirofosfatasa, cataliza la activación del sulfato con ATP para formar adenosin-5'-fosfosulfato (o adenililsulfato) (APS) más pirofosfato (PPI). El APS, el verdadero aceptor de electrones es convertido a sulfito (SO_3^-) o bisulfito (HSO_3^-) por la Apr con el consumo de dos electrones (e^-) y la liberación de adenosin

monofosfato (AMP). Finalmente, el (bi)sulfito es reducido a sulfuro por la Dsr (subunidad A y B) el cual interactúa con una pequeña proteína DsrC en la reducción directa de seis electrones o por una secuencia de reacciones irreversibles con la formación de tritionato y tiosulfato como intermediarios (Fig. 1a y 1b) (Cypionka 1994; Oliveira et al. 2008; Bradley et al. 2011; Venceslau et al. 2014; Rabus et al. 2015; Santos et al. 2015).

Las enzimas DsrAB y los genes que las codifican (los genes *dsrAB*) tienen un alto nivel de conservación entre las arqueas y bacterias sulfato-reductoras (MSR). Por lo tanto, los genes *dsrAB* se han considerado marcadores moleculares adecuados para analizar la estructura de la comunidad, abundancia, actividad e historia evolutiva de los MSR (Odom and Peck 1984; Dahl et al. 1993; Wagner et al. 1998, 2005; Blazejak and Schippers 2011).

1.2.5. ESTUDIO DE MICROORGANISMOS SULFATO-REDUCTORES EN SEDIMENTOS MARINOS

Gran parte del conocimiento que se tiene sobre los MSR en la naturaleza se ha obtenido mediante el análisis del conjunto de genes (genomas) microbianos muestreados directamente de su hábitat (Dhillon et al. 2003; Wooley et al. 2010; Kimes et al. 2013; Narihiro and Kamagata 2017; Vigneron et al. 2018). El análisis de secuencias del gen 16S ARNr, que codifica la subunidad pequeña del ribosoma en procariotas, ha proporcionado un marco general para analizar la diversidad de los MSR (Castro et al. 2000; Rabus et al. 2015). Sin embargo, se ha observado que el gen 16S ARNr no refleja necesariamente un vínculo con el metabolismo sulfato-reductor y su uso para inferir este metabolismo es un tanto arriesgado en particular con los linajes nuevos sin representantes cultivados y fenotipos conocidos (Devereux et al. 1989; Dhillon et al. 2003; Lückner et al. 2007).

La (bi)sulfito reductasa desasimilatoria (DsrAB) es una enzima clave para los MSR ya que está implicada en la reducción de sulfito a sulfuro. El uso de los genes *dsrAB* que codifican las enzimas DsrAB ha brindado un enfoque más robusto para la detección e identificación de

los microorganismos con el potencial genético para reducir sulfito a sulfuro, durante la reducción de sulfato y otros compuestos oxidados de azufre (Karkhoff-Schweizer et al. 1995). Aunque el análisis de secuencias de los genes 16S ARNr y *dsrAB* ha mostrado resultados congruentes, la filogenia construida con secuencias de los genes *dsrAB* ha revelado una mayor diversidad de MSR de la que se ha detectado con el gen 16S ARNr (Wagner et al. 1998; Dhillon et al. 2003; Müller et al. 2015).

La mayoría de los MSR pertenecen a la clase *Deltaproteobacteria*, seguidos por las bacterias sulfato-reductoras (BSR) Grampositivas de la clase *Clostridia* (géneros *Desulfotomaculum*, *Desulfosporosinus* y *Desulfosporomusa*), las BSR de los filos *Actinobacteria* y *Caldiserica*, y tres linajes bacterianos termófilos: *Nitrospirota* (género *Thermodesulfovibrio*), *Thermodesulfobacteria* (género *Thermodesulfobacterium*) y *Thermodesulfobiaceae* (género *Thermodesulfobium*). Por parte de las arqueas sulfato-reductoras se ha señalado su afiliación con *Euryarchaeota* (género *Archaeoglobus*) y *Crenarchaeota* (géneros *Thermocladium* y *Caldirvirga*) (Muyzer and Stams 2008; Müller et al. 2015). Estudios recientes han mostrado la capacidad genética para la reducción desasimilatoria de sulfato en otros genomas microbianos sugiriendo una mayor diversidad de grupos asociados con este proceso (Anantharaman et al. 2018).

1.2.5.1. TÉCNICAS INDEPENDIENTES DE CULTIVO PARA EL ESTUDIO DE LOS MSR

Las tecnologías de secuenciación masiva de nueva generación (NGS por sus siglas en inglés) han impulsado un importante avance en los estudios de genómica ambiental, logrando una profunda exploración de las comunidades microbianas en varias muestras a la vez (Kráková et al. 2016; Lindh et al. 2017). Estas tecnologías han sido una poderosa herramienta en el estudio ecológico de los MSR marinos al implementarlas con los genes *dsrAB* como marcadores-diagnóstico (Pelikan et al. 2016; Vigneron et al. 2018).

El análisis filogenético de secuencias *dsrAB* integrando grupos taxonómicos conocidos, ha permitido conformar un sistema de clasificación más robusto, taxonómica y filogenéticamente para analizar la diversidad ambiental *dsrAB*. La filogenia de secuencias *dsrAB* ha permitido identificar múltiples niveles filogenéticos, que van desde familias de enzimas de tipo reductor u oxidante de origen bacteriano y arqueano, grupos ambientales, linajes a nivel de familia sin representantes cultivados, hasta el nivel de especie (Müller et al. 2015). El enfoque filogenético para el análisis de la comunidad de MSR marinos ha revelado una riqueza dominada por secuencias *dsrAB* nuevas que representan una diversidad fundamentalmente inexplorada (Dhillon et al. 2003; Fukuba et al. 2003; Kaneko et al. 2007; Leloup et al. 2009; Guan et al. 2015; Jochum et al. 2017; Marshall et al. 2019; Sánchez-Soto et al. 2020).

El análisis cuantitativo de genes como *dsrAB*, *aprBA* y 16S ARNr por qPCR se ha aplicado para determinar la abundancia de MSR en sedimentos costeros, ventilas hidrotermales, reservorios de petróleo y en sedimentos naturalmente ricos en hidrocarburos o contaminados por actividades antropogénicas (Leloup et al. 2007; Agrawal and Lal 2009; Bagwell et al. 2009; Quillet et al. 2012; Frank et al. 2013; He et al. 2015; Jochum et al. 2017; Li et al. 2017a; Tian et al. 2017; Zhang et al. 2017). En estos ambientes se ha encontrado una mayor abundancia de MSR cerca de la superficie del sedimento donde también se han determinado las mayores tasas sulfato-reductoras. Además, se ha observado una relación de la abundancia de MSR con la disponibilidad y tipo de sustratos orgánicos, la profundidad del sedimento, el carbono orgánico total, el nitrógeno orgánico disuelto y la concentración de contaminantes, sugiriendo que la abundancia y actividad de los MSR responde a la heterogeneidad fisicoquímica de cada sitio.

El estudio de la comunidad de MSR por técnicas independientes de cultivo, combinado con la evaluación de su metabolismo en condiciones de laboratorio, ha sido relevante para elucidar el modo en que los MSR responden ante las condiciones cambiantes del entorno, para entender el papel de estos microorganismos en los ciclos del carbono y del azufre, así como para identificar los factores que influyen estos procesos en el océano u otros entornos.

1.2.5.2. EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD SULFATO-REDUCTORA

El metabolismo sulfato-reductor se ha investigado con respecto a los donadores de energía y fuentes de carbono ya que estos tienen una influencia fundamental sobre los procesos biogeoquímicos, el metabolismo y la estructura de las comunidades microbianas (Rabus et al. 2015; Roussel et al. 2015; Komada et al. 2016). Los sustratos utilizados por los MSR marinos se han explorado principalmente midiendo el consumo de sustratos utilizando compuestos marcados, y determinando la acumulación de éstos después de inhibir la reducción de sulfato (Sørensen et al. 1981; Elsgaard et al. 1994; Wellsbury and Parkes 1995; Fukui et al. 1997; Finke et al. 2007; Orcutt et al. 2008; Bonch-osmolovskaya et al. 2011; Frank et al. 2013; Glombitza et al. 2015, 2019; Larowe et al. 2015; Beulig et al. 2017; Jochum et al. 2017). Con base en esto, se ha demostrado que el acetato y el propionato son los principales donadores de electrones para la reducción microbiana de sulfato en sedimentos marinos en costas, ventilas hidrotermales y emanaciones de hidrocarburos del subsuelo. Dado que estas investigaciones se han realizado en ambientes ricos en compuestos orgánicos, se sabe poco sobre el metabolismo sulfato-reductor en sedimentos oligótrofos, los cuales cubren la mayor parte del lecho marino (Durbin 2009).

En condiciones experimentales se han utilizado acetato y propionato como donadores de electrones para estimular la reducción de sulfato (Abildgaard et al. 2004). Han resultado sustratos ideales para favorecer la actividad de diferentes tipos fisiológicos de MSR, tales como los oxidadores incompletos (OxI), que degradan parcialmente los sustratos orgánicos a acetato, y los oxidadores completos (OxC) que mineralizan principalmente acetato a CO₂ (Liamleam and Annachatre 2007). Los MSR de ambos grupos suelen coexistir en el ambiente, aunque algunos estudios han reportado una dominancia de los OxC en sedimentos marinos (Ravenschlag et al. 2000; Beulig et al. 2017).

Es sabido que los MSR en la naturaleza se distribuyen en diferentes condiciones de temperatura, la cual puede variar en el ambiente marino por cambios estacionales, latitudinales y de profundidad, o bien, por la presencia de infiltraciones hidrotermales y la perforación del

suelo marino (Elsgaard et al. 1994; Al-raei et al. 2009; Robador et al. 2016; Tian et al. 2017). En sedimentos costeros se ha observado que las tasas del metabolismo sulfato-reductor responden a los cambios de temperatura estacionales, sugiriendo una estrecha relación del metabolismo de los MSR y la temperatura del ambiente (Moeslund et al. 1994).

Experimentos sobre la temperatura óptima de crecimiento y respiración de los MSR en sitios de diferente latitud, han indicado la presencia de MSR predominantemente psicrófilos en sitios permanentemente fríos (<4 °C), mientras que en sitios con temperaturas más cálidas predominan los MSR mesófilos y psicrotolerantes, indicando que la temperatura actúa como un factor importante para la selección de los MSR (Sawicka et al. 2012; Robador et al. 2016). La presencia de MSR en sitios con temperaturas que no corresponden a su rango de crecimiento, como MSR termófilos en sedimentos permanentemente fríos, ha sugerido la influencia de procesos de dispersión sobre la biogeografía microbiana marina (Müller et al. 2014).

Los trabajos que han evaluado la respuesta del metabolismo sulfato-reductor a la temperatura han ayudado a conocer las temperaturas cardinales para el crecimiento y actividad de los MSR, y han contribuido al entendimiento de su origen y dispersión en el océano. Sin embargo, aún son insuficientes para revelar los patrones de distribución de la diversidad de MSR sedimentarios en gran parte del océano.

1.3. JUSTIFICACIÓN

El Cinturón Plegado Perdido es una región recientemente considerada para la extracción de petróleo en aguas nacionales, debido a su potencial como reservorio de hidrocarburos (Fiduk et al. 1999). Los derrames accidentales de petróleo durante las operaciones de extracción pueden alterar las condiciones ambientales en esta región y, por consiguiente, la estructura de las comunidades microbianas. Aunque las comunidades microbianas han sido poco exploradas en esta región, el estudio de los microorganismos se ha propuesto como una vía confiable para monitorear las condiciones ambientales en zonas marinas potencialmente impactadas por la presencia de contaminantes como los hidrocarburos (Ramírez et al. 2019).

Estudios recientes sobre el análisis de las comunidades procariotas en sedimentos del NOGM han revelado cambios en su estructura relacionados con la profundidad del agua, la temperatura, el redox, el oxígeno, el azufre, el porcentaje de arcillas y el contenido de metales (Sánchez-Soto Jiménez et al. 2018; Ramírez et al. 2019; Raggi et al. 2020). En sedimentos de la plataforma continental se han detectado las mayores abundancias de potenciales MSR, los cuales se han asociado con la degradación anaerobia de compuestos orgánicos e hidrocarburos. No obstante, la falta de información en las bases de datos ha limitado la asignación taxonómica de una importante fracción de la comunidad procariota, por lo que se conoce poco sobre su composición y potencial función en el ambiente.

Los MSR son un componente central en el ciclo del azufre en los sedimentos marinos por su capacidad de reducir sulfato con la concomitante producción de sulfuro. Además, están implicados en la regulación del pH y del oxígeno disponible en el ambiente, la precipitación de metales y la degradación de hidrocarburos (Knittel et al. 2009; Orcutt et al. 2010; Gallagher et al, 2012). Dada su relevancia en el ambiente marino y la falta de conocimiento de las comunidades sulfato-reductoras en sedimentos del NOGM se plantearon algunas cuestiones que se abordarán en esta tesis que ayudarán a responder ¿cuál es la composición de las comunidades sulfato-reductoras en sedimentos del NOGM?, ¿cómo se distribuyen espacialmente en el gradiente batimétrico?, ¿cuáles variables ambientales explican

estadísticamente la estructura y actividad de MSR? y ¿cuáles son las condiciones de incubación que estimulan la actividad sulfato-reductora?

1.4. OBJETIVO GENERAL

Determinar la composición, distribución y actividad de la comunidad sulfato-reductora en sedimentos del NOGM, en paralelo a la caracterización de las variables ambientales de la región, identificando su asociación estadística con los cambios en la estructura y actividad de la comunidad sulfato-reductora.

1.5. OBJETIVOS PARTICULARES

- Analizar la estructura de la comunidad procariota con énfasis en la detección de potenciales grupos sulfato-reductores en sedimentos del NOGM, a través de la secuenciación masiva del gen 16S ARNr.
- Caracterizar las comunidades sulfato-reductoras en el NOGM a través de la secuenciación del gen *dsrB* y explorar su asociación estadística con las variables ambientales de la región.
- Evaluar la actividad sulfato-reductora en reactores batch con diferentes temperaturas (4 °C y 37 °C) y sustratos (acetato y propionato).

2. CAPÍTULO II. ANÁLISIS DE LA COMUNIDAD PROCARIOTA CON ÉNFASIS EN LA DETECCIÓN DE POTENCIALES GRUPOS SULFATO REDUCTORES EN SEDIMENTOS DE DIFERENTE PROFUNDIDAD EN EL NOROESTE DEL GOLFO DE MÉXICO

2.1. INTRODUCCIÓN

El estudio de las comunidades procariotas en el NOGM es reciente por lo que aún son pocos los estudios disponibles sobre estos microorganismos en el ambiente (Sánchez-Soto Jiménez et al. 2018; Ramírez et al. 2019; Raggi et al. 2020). La mayoría de los estudios se han desarrollado en la región norte de la cuenca, enfocándose en el estudio de la composición y actividad de los microorganismos en ambientes asociados a infiltraciones naturales de HC, en zonas deficientes de oxígeno y en zonas afectadas por el derrame masivo de HC durante la explosión de la plataforma petrolera Deep Water Horizon (Mills et al. 2005; Li et al. 2007; Orcutt et al. 2011; Kimes et al. 2013; Devereux et al. 2015; Mason et al. 2016; Shin et al. 2019). Dichas investigaciones han proporcionado información sobre la composición de las comunidades microbianas mediante el análisis de secuencias del gen 16S ARNr, observando abundantes organismos relacionados con el ciclo del azufre como los MSR. Los MSR reportados en estos ambientes (*Desulfobulbaceae*, *Desulfobacteraceae*, *Desulfarculales*, *Syntrophobacteraceae* y *Firmicutes*) se han relacionado con la degradación de compuestos orgánicos, la oxidación de HC y la producción de sulfuro. Por lo tanto, se ha reconocido la relevancia de los MSR en los ciclos del carbono y del azufre en estos ambientes (Martinez et al. 2006; Lloyd et al. 2010; Orcutt et al. 2010, 2017; Kleindienst et al. 2012, 2015; Devereux et al. 2015; Shin et al. 2019).

En el NOGM se han realizado estudios metagenómicos para analizar la estructura y composición de la comunidad procariota, así como el potencial metabólico de sus poblaciones en sedimentos superficiales (Sánchez-Soto Jiménez et al. 2018; Ramírez et al. 2019; Raggi et al. 2020). El análisis de estas comunidades respecto al gradiente batimétrico ha revelado algunos potenciales grupos sulfato-reductores abundantes, especialmente en sedimentos de la plataforma continental, donde las condiciones redox sugieren ambientes predominantemente

anóxicos (Sánchez-Soto Jiménez et al. 2018; Ramírez et al. 2019). El análisis taxonómico y la búsqueda de genes implicados en procesos anaerobios han indicado la presencia de MSR relacionados con la degradación de HC (Raggi et al. 2020). En conjunto estos estudios han señalado una distribución de MSR en sedimentos someros del NOGM que pueden ser relevantes en la dinámica de los HC y su potencial función para los procesos de biorremediación de sedimentos contaminados por petróleo. A pesar de la importancia de los MSR en el océano aún es insuficiente la información disponible sobre sus comunidades sobre todo en ambientes profundos del NOGM. Por lo tanto, en este capítulo se planteó describir la composición y distribución de grupos potencialmente sulfato-reductores en sedimentos de diferente profundidad por secuenciación Illumina del gen 16S ARNr.

2.2. OBJETIVO

- Analizar la estructura de la comunidad procariota con énfasis en la detección de potenciales grupos sulfato-reductores en sedimentos del NOGM, a través de la secuenciación masiva del gen 16S ARNr.

2.3. MATERIALES Y MÉTODOS

2.3.1. OBTENCIÓN DE MUESTRAS DE SEDIMENTO

Durante la campaña oceanográfica Perdido-03 realizada en mayo de 2017 se colectaron 27 muestras de sedimento de 27 sitios dispuestos en 4 transectos (A, B, C y D) perpendiculares a la línea de costa (Fig. 2). Los sitios de muestreo se localizaron en un rango de profundidad de la columna de agua entre los 44 y los 3548 m. Las muestras de sedimento se colectaron con un nucleador de caja tipo Hessler-Sandia II. Inmediatamente después de la colecta, se midieron el pH y el potencial redox directamente del sedimento con sensores específicos

Extech pH 100 y RE300 (Massachusetts, EE. UU.), respectivamente. Posteriormente se tomó una submuestra de los primeros 10 cm de la capa del sedimento con jeringas estériles sin punta y, se conservaron a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ hasta la extracción de ADN en el laboratorio. Otra submuestra de 400 g de sedimento se tomó para determinar carbono orgánico (CO), materia orgánica (MO) y tamaño de arenas y se conservó a $-4\text{ }^{\circ}\text{C}$ en bolsas de plástico hasta su análisis en el laboratorio. También se tomaron 100 g de sedimento para el análisis de metales pesados; esta muestra se almacenó en bolsas de plástico lavadas previamente con una solución 1N de ácido nítrico (HNO_3) (Sigma-Aldrich grado puro) y agua desionizada. Para determinar la concentración total de hidrocarburos (HCT), se tomaron 100 g de sedimento los cuales se almacenaron en recipientes de vidrio previamente lavados por separado con hexano (pureza 99.9%) y acetona (pureza 99.6%) de grado cromatográfico Sigma-Aldrich. Las muestras para la determinación de metales e hidrocarburos se mantuvieron a $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ hasta su análisis.

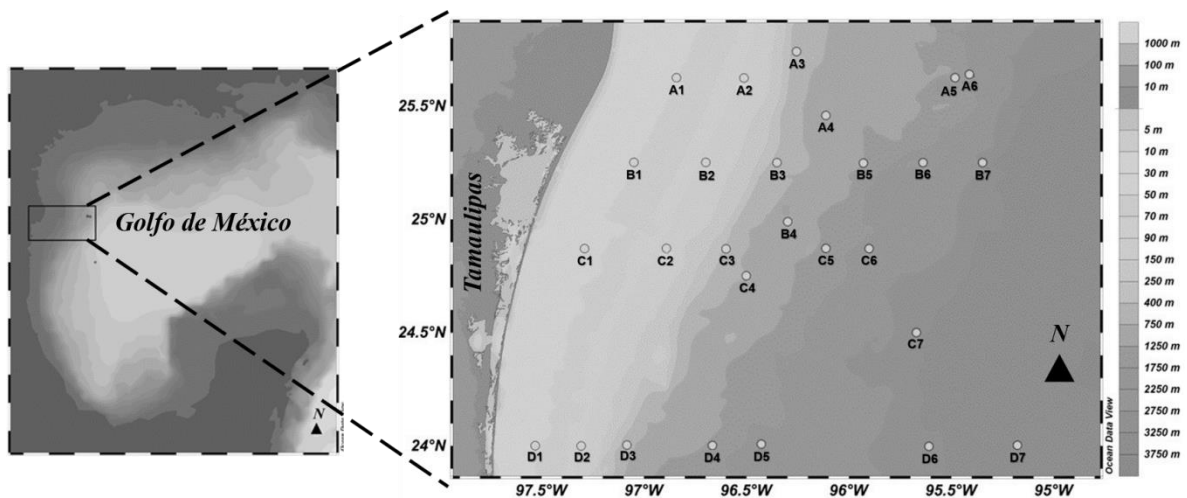


Figura 2. Área de estudio y sitios de colecta de muestras de sedimento. Los sitios de muestreo se determinaron a lo largo de 4 transectos (A-D) perpendiculares a la costa de Tamaulipas, localizados de los 25.62° a los 24° de latitud norte y de los -95.41° a los -95.18° de longitud oeste.

2.3.2. ANÁLISIS FÍSICOQUÍMICO DE LAS MUESTRAS DE SEDIMENTO

Los porcentajes de CO y MO se determinaron de acuerdo con el método de titulación propuesta por Walkley-Black (Walkley and Black 1934) utilizando dicromato de potasio ($K_2Cr_2O_7$) para eliminar los carbonatos por acidificación con ácido clorhídrico (HCl) 0,1N y titulación reversa con hidróxido de sodio (NaOH) 0,3M. La estructura de arenas se obtuvo mediante el peso de los granos retenidos en mallas de diferente tamaño (2 mm, 500 μ m, 250 μ m, 125 μ m, 63 μ m) y se compararon con la clasificación del tamaño de grano propuesta por Wentworth (Wentworth 1992). La temperatura ($^{\circ}$ C), la salinidad (PSU) y la concentración de oxígeno disuelto (OD l^{-1}) del fondo de la columna de agua se registraron *in situ* utilizando un CTD Seabird 9 plus[®]. La termoclina y la oxiclina se detectaron aproximadamente a los 50 m de profundidad de la columna de agua.

2.3.3. DETERMINACIÓN DE METALES PESADOS E HIDROCARBUROS EN MUESTRAS DE SEDIMENTO

La concentración de metales pesados se obtuvo siguiendo las técnicas de Loring y Rantala (Loring and Rantala 1992) y Arcega-Cabrera et al. (Arcega-Cabrera et al. 2014). Las muestras de sedimento se liofilizaron utilizando un liofilizador (LABCONCO FreeZone 2.5) para una digestión ácida asistida por microondas (CEM MARS 6) a partir de 0,5 g de muestra colocados en un contenedor de teflón con 9 ml de HNO_3 (EMSURE ACS 60%), 3 ml de HF (EMSURE suprapur) y 1 ml de HCl (EMSURE suprapur). La cuantificación de la concentración de metales (Cd, Ni, V y Pb) se realizó utilizando un ICP-MS (Mod. ICAP Q Thermo Scientific) con los iones V51, Ni60, Cd112 y Pb208. Para el análisis de calidad se utilizó un SRM 2702 (NIST). Los porcentajes de recuperación y el límite de detección (mg / g) fueron: V51 88% y 0,0043 mg / g, Ni60 96% y 0,0001 mg / g, para Cd112 86% y 0,0039 mg / g y Pb208 80% y 0,2066 mg / g.

Para el análisis de hidrocarburos (HC), las muestras de sedimento liofilizado se tamizaron a través de una malla de 0,5 mm y se colocaron en un extractor de disolvente presurizado ASE

350 Dionex Thermo a 1500 psi usando DCM (diclorometano grado GC). La elución de HC se realizó con hexano TEDIA (15 ml) grado GC y para la segunda fracción se utilizó una proporción 50/50 v/v de hexano TEDIA grado GC y DCM (15 ml). Las muestras se agregaron con una solución subrogada de HC aromáticos policíclicos deuterados (1-3 dimetil-2 nitrobenzono; acenafteno d10, fenantreno d10, pireno d10, trifenilfosfato, criseno d10 y perileno d10 de UltraScientific). Además, se utilizó o-terfenilo (Supelco) como estándar. Los compuestos se analizaron mediante cromatografía de gases con un detector de ionización de llama (GC-FID Agilent-7890A) y con un espectrómetro de masas (GC-MS Perkin Elmer-Claruss 500). Las condiciones cromatográficas fueron las siguientes: el GC-FID y GC-MS tuvieron una temperatura de inyector y de horno de 290 °C y 50 °C, respectivamente, una columna tipo fenilmetilsiloxano al 5% (30 x 0,25 x 25) y gas portador de nitrógeno UHP. La temperatura del detector y la rampa para GC-FID fueron de 300 °C y 6 °C / min, respectivamente, y para el GC-MS fueron 180 °C y 25 °C / min-160 °C y 8 °C / 290 °C, respectivamente.

2.3.4. ANÁLISIS MOLECULAR CULTIVO-INDEPENDIENTE DE LA COMUNIDAD BACTERIANA

2.3.4.1. EXTRACCIÓN DE ADN AMBIENTAL

Las 27 muestras de sedimento (Fig. 2) se descongelaron y centrifugaron durante 1 minuto a 10,000x g para descartar el agua remanente y extraer el ADN de las células microbianas sedimentadas. El ADN total se extrajo de 1 g de cada muestra de sedimento utilizando el kit de extracción DNeasy PowerSoil (QIAGEN, Gilden, Alemania) siguiendo el protocolo del fabricante. La integridad del ADN extraído se comprobó mediante electroforesis horizontal en gel de agarosa al 1%. El ADN extraído de todas las muestras se almacenó a -20 °C hasta su procesamiento para la secuenciación del gen 16S ARNr.

2.3.4.2. SECUENCIACIÓN ILLUMINA DE AMPLICONES DEL GEN 16S ARNr DE MUESTRAS AMBIENTALES

A partir del ADN extraído se prepararon amplicones del gen 16S ARNr con los adaptadores de código para su secuenciación por Illumina siguiendo el protocolo de PCR de dos pasos. En la primera PCR, se amplificaron aproximadamente 550 pb de la región V3 – V4 del gen 16S ARNr con el par de primers 16SF/16SR (Klindworth et al. 2013). El programa de la primera PCR se realizó con una desnaturalización inicial a 95 °C por 3 min, seguida de 25 ciclos incluyendo las fases de desnaturalización por 30 s a 95 °C, alineamiento por 30 s a 55 °C y elongación por 30 s a 72 °C, con una extensión final a 72 °C por 5 min. Cada mezcla de reacción de PCR (20 µL) incluyó 1 µL de cada primer (0.5 mM), 10 µL de 2x usion High-Fidelity MasterMix (Thermo Scientific, EE. UU.) y 2 µL de ADN (~ 10 ng / µL). En la segunda PCR, se unieron los índices durante ocho ciclos utilizando los reactivos Nextera XT Index Kit. Los amplicones indexados se purificaron y diluyeron individualmente en Tris 10 mM (pH 8.5) y se combinaron a una concentración equimolar de 9 pM. La secuenciación de extremos pareados se realizó en plataforma MiSeq (Illumina, San Diego, CA, USA) con un kit de reactivos MiSeq V2 de 150 ciclos. La secuenciación se realizó en el laboratorio de Patología Acuática del CINVESTAV-Mérida, Yucatán.

La amplificación del gen 16S ARNr por PCR se realizó en un termociclador marca Veriti (Applied Biosystems Veriti ABI Inc., Foster City, CA, USA). Los productos obtenidos de las amplificaciones se purificaron con tecnología de perlas AMPure XP. El tamaño de los amplicones se verificó en un sistema QIAxcel Advanced (QIAGEN, Hilden, Alemania) y la concentración se cuantificó por fluorometría en un equipo Qubit 3.0 (Life Technology, Shah Alam, Selangor, Malaysia). Estos procesos se realizaron en el laboratorio de Patología Acuática del CINVESTAV-Mérida, Yucatán.

2.3.4.3. ANÁLISIS BIOINFORMÁTICOS

Las lecturas pareadas Illumina del gen 16S ARNr en archivos fastq demultiplexados se procesaron con el pipeline de QIIME (2017.11) (Caporaso et al. 2010). La corrección de errores y eliminación de ruido para resolver las variantes de secuencias de amplicones ASVs (Amplicon Sequence Variants) se realizaron con el paquete DADA2, removiendo las secuencias quimera con el método “consensus” (Callahan et al. 2016). La asignación taxonómica de las ASVs representativas se realizó con V-SEARCH (Rognes et al. 2016) utilizando la base de datos de referencia de SILVA (v.132). Las ASVs se alinearon con el algoritmo Maff (Kato and Standley 2013) y se construyó un árbol filogenético utilizando el algoritmo FastTree (Price et al. 2009) el cual se utilizó para el análisis de distancias UniFrac sin ponderar (Lozupone et al. 2006).

Las muestras fueron normalizadas a una profundidad de secuenciación de 11500 lecturas con la paquetería “normalr” (versión 3.3.3). La clasificación y la tabla de ASVs se exportaron al ambiente R (versión 3.6.0) para realizar los análisis de diversidad (índice de diversidad de Shannon, H') y los análisis estadísticos con las paqueterías phyloseq (McMurdie and Holmes 2013) y vegan (Oksanen 2013). La paquetería ggplot2 (Wickham 2010) se utilizó para generar los gráficos. Con el objetivo de agrupar las comunidades microbianas con base en su similitud se realizó un análisis jerárquico de agrupamiento aglomerativo con la matriz de distancias UniFrac utilizando el método Ward de varianza mínima utilizando el comando `hclust(dist(x)^2, method="ward")` (Murtagh 2014). Para definir el número óptimo de grupos se utilizó la herramienta elbow.

El análisis estadístico de las variables fisicoquímicas se realizó con el programa Infostat (versión 2016). Se obtuvieron los parámetros estadísticos de los datos de las variables fisicoquímicas y se realizó un análisis de varianza ($p < 0.05$) para revelar diferencias ambientales en la región de estudio. Se realizó un análisis de varianza paramétrico sobre las variables con distribución normal y un análisis no paramétrico Kruskal-Wallis para el resto.

2.4. RESULTADOS

2.4.1. DETERMINACIONES FÍSICOQUÍMICAS PARA DESCRIPCIÓN DE LOS SITIOS DE ESTUDIO

Los sedimentos colectados presentaron valores de pH de 7.01 a 7.71 (7.29 ± 0.17) y presentaron un potencial redox entre -169.6 y 264.7 mV (55.21 ± 176.3). La mayoría de los valores electronegativos del potencial redox se obtuvieron de sedimentos colectados a menos de 1000 m de profundidad de la columna de agua, excepto las muestras A1 (195.8 mV) y A2 (50.53 mV) colectadas a 50.4 y 97.6 m (Anexo 1). El contenido de CO y MO fue menor al 2% en todas las muestras de sedimento, indicando poco material orgánico en la región de estudio. Los porcentajes de AM ($38.44 \pm 16.03\%$), AF ($48 \pm 13.73\%$) y AMF ($13.56 \pm 7.56\%$) no mostraron un patrón de distribución definido con respecto a la profundidad. Esto también se observó en las concentraciones de metales pesados e HCT los cuales mostraron los siguientes valores: Ni 23.6 ± 6.1 mg / kg, Cd 0.21 ± 0.1 mg / kg, V 77.8 ± 13.21 mg / kg, Pb 24.46 ± 5.1 mg / kg y HCT 10.48 ± 4.63 mg / kg (Anexo 1). En la columna de agua se determinaron la temperatura y la concentración de OD del fondo, los cuales variaron de 26.8 °C a 2.7 °C (10.6 ± 8.7 °C) y 2.4 y 4.66 ml L⁻¹ (3.81 ± 0.88), respectivamente (Anexo 1). La saturación de oxígeno en la columna de agua indicó condiciones óxicas (> 2 ml l⁻¹) desde la superficie hasta el agua de fondo, así como la presencia de la oxiclina alrededor de los 50 m de profundidad.

2.4.2. ANÁLISIS DE LA ESTRUCTURA DE LAS COMUNIDADES

El análisis jerárquico de agrupamiento de la matriz de distancias UniFraq reveló tres grupos conformados por las muestras que presentaron una mayor similitud entre sus comunidades (Fig. 3; Anexo 3). El grupo I se formó por la mayoría de las muestras colectadas en el margen continental (A1, A2, B1, B2, C4, C5, D1 y D2), dentro del rango de profundidad de agua de 47 a 1280 m. El grupo II (A3, B3, B7, C1, C2 y D3) se formó por muestras colectadas entre los 44 y los 2676.8 m, y el grupo III (A4-A6, B4-B6, C3, C6 y C7 y D4-D6) por la mayoría

de las muestras de sitios profundos colectadas entre los 473.4 y los 3548 m (Fig. 3b). El número de ASVs varió entre 368 y 1566 y del índice de diversidad de Shannon varió entre 5.2 y 6.9 en todas las muestras. Sin embargo, el grupo II presentó el promedio más alto de ASVs, seguido por los grupos I y III (Anexo 4).

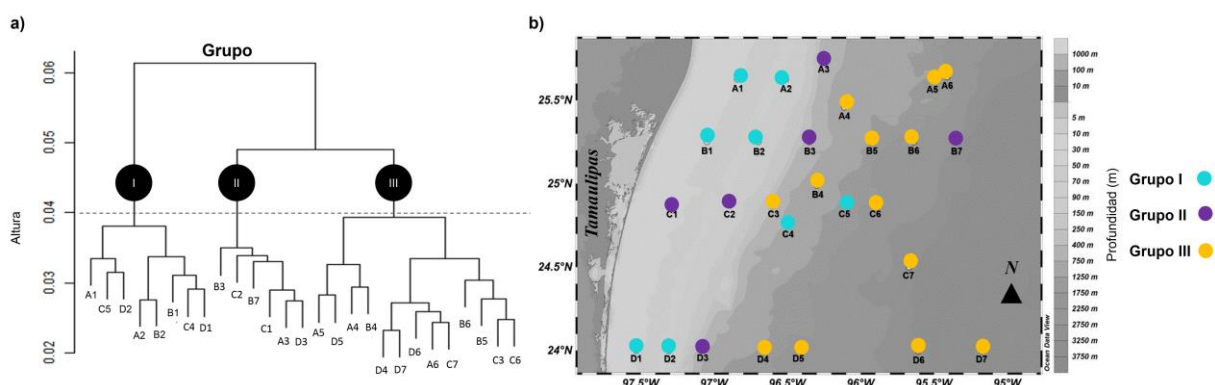


Figura 3. a) Dendrograma mostrando el agrupamiento de las muestras de acuerdo con el análisis de la matriz de distancias UniFraq. El análisis está basado en secuencias del gen 16S ARNr. **b)** Sitios de colecta de las muestras de sedimento. Los colores indican el agrupamiento de las muestras.

2.4.3. COMPOSICIÓN DE LA COMUNIDAD PROCARIOTA

Los fila más abundantes en todas las muestras de sedimento fueron *Planctomycetes*, *Acidobacteria*, *Actinobacteria*, *Bacteroidetes*, *Chloroflexi*, *Gemmatimonadetes* y *Proteobacteria*, éste último predominó en todos los sedimentos (Fig. 4). Otros grupos como *Crenarchaeota*, *Euryarchaeota*, *Latescibacteria*, *Nitrospirota* (antes *Nitrospirae* o *Nitrospira*) y *Spirochaetes* fueron más abundantes en los grupos I y II, mientras que *Rokubacteria* y *Thaumarchaeota* presentaron mayor abundancia en el grupo III (Fig. 4).

Las comunidades bacterianas estuvieron dominadas por miembros de las clases *Alfa-*, *Delta-* y *Gammaproteobacteria* en todos los sitios. Esta amplia distribución también se observó con *Acidimicobia*, *Gemmatimonadetes*, *Latescibacteria*, *Phycisphaerae* aunque en menor proporción. Miembros de las clases *Anaerolineae* y *Barthyarchaeia*, estuvieron bien

representadas en los grupos I y II, mientras que la clase NC10 lo fue en las muestras de mayor profundidad (Fig. 5).

A nivel taxonómico de familia, *Woeseiaceae*, *Thermoanaerobaculaceae*, *Pirellulaceae* y *Latescibacteraceae* fueron abundantes en todos los sedimentos analizados, mientras que los grupos I y II tuvieron mayores abundancias de grupos anaerobios como *Syntrophobacteraceae*, *Desulfobacteraceae*, *Desulfarculaceae* y *Anaerolinaceae*, y el grupo III presentó una mayor proporción de aerobios y anaerobios facultativos como *Kiloniellaceae*, *Phycisphaeraceae*, *bacteriap25*, *Gemmatimonadaceae* (Fig. 6; Tabla 1).

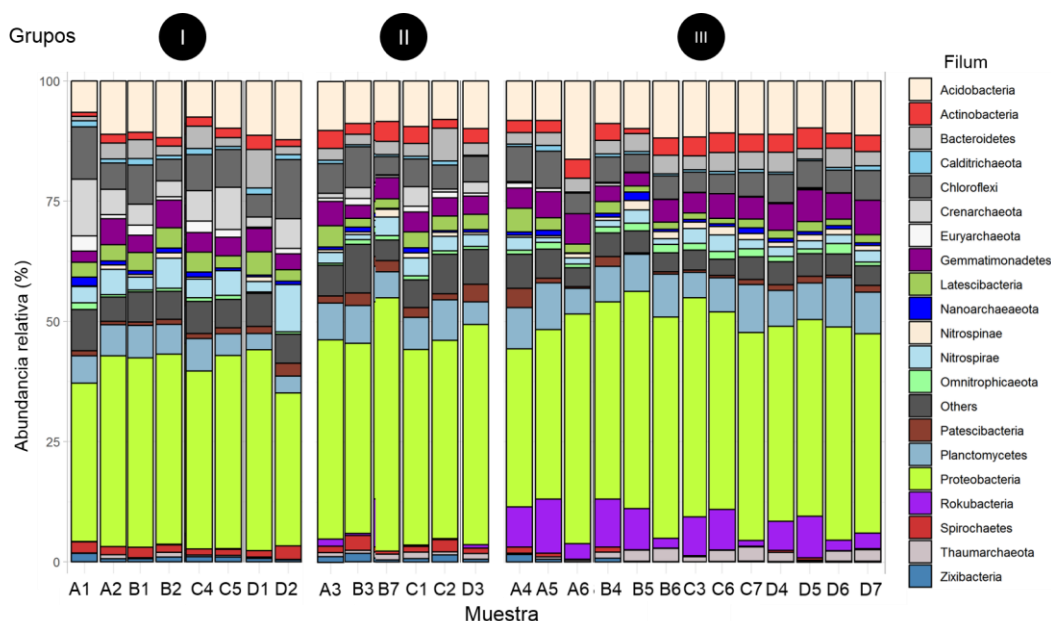


Figura 4. Abundancias relativas de fila procariotas en sedimentos de la región mexicana del NOGM. Se muestran los fila con abundancias >1%, el resto se agrupan en la categoría de otros. Los círculos en negro indican el agrupamiento de las muestras de acuerdo con el análisis de la estructura de las comunidades basado en secuencias del gen 16S ARNr.

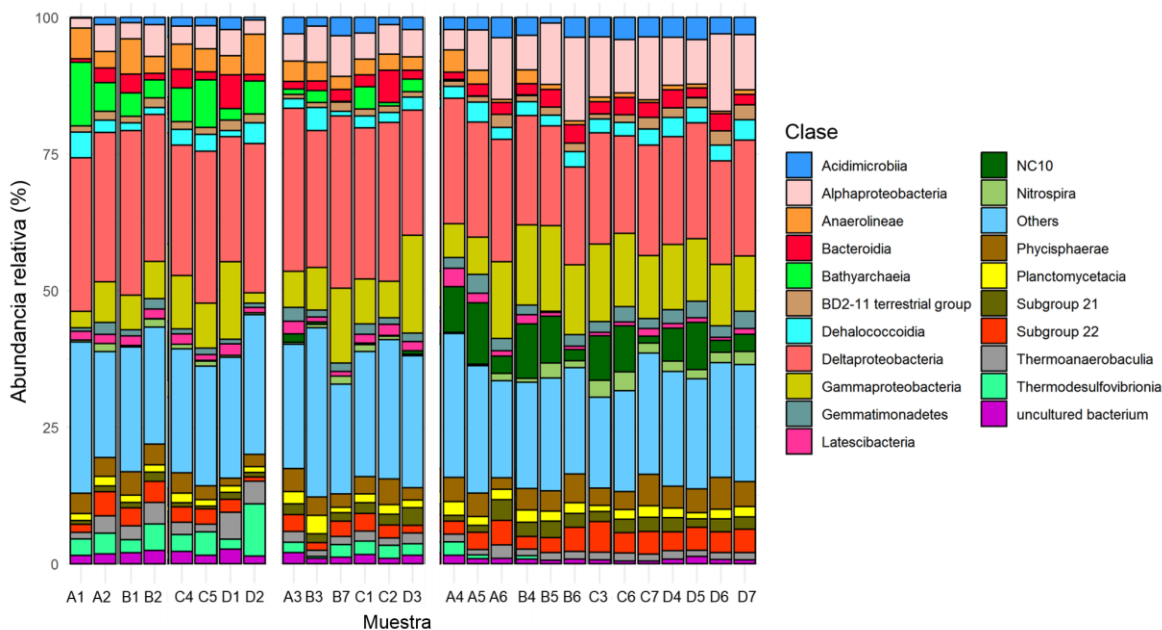


Figura 5. Abundancias relativas de clases procariotas en sedimentos de la región mexicana del NOGM. Se muestran las clases con abundancias >1%, el resto se agrupan en la categoría de otros.

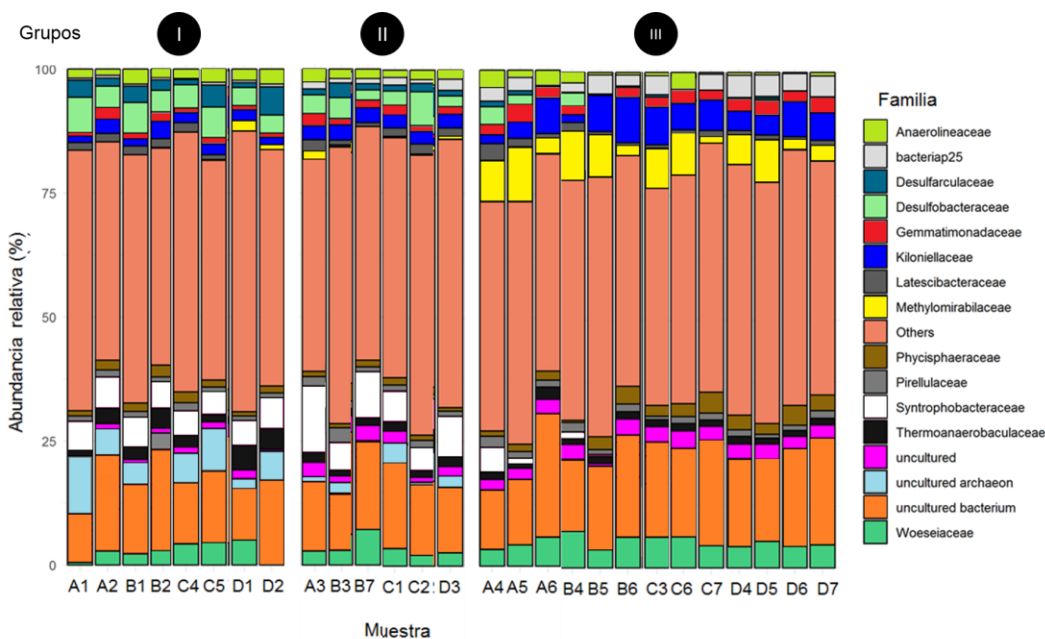


Figura 6. Abundancias relativas de familias procariotas en sedimentos de la región mexicana del NOGM. Diversidad taxonómica a nivel de familia. Se muestran las familias con abundancias >1%, el resto se agrupan en la categoría de otros.

Tabla 1. Potencial metabolismo y función en el ecosistema de las familias bacterianas más abundantes en librerías 16S

Familia (Filum)	Totales	ASVs observados por grupo			Características metabólicas reportadas
		I	II	III	
<i>Woeseiaceae (Proteobacteria-Gamaproteobacteria)</i>	183	62	56	101	Aerobio / Anaerobio facultativo. Oxida azufre y sulfito. Implicado en el ciclo del azufre (Du 2016; Dyzkma 2018)
<i>Thermoanaerobaculaceae (Acidobacteria)</i>	464	182	123	182	Anaerobio. Degrada azúcares, ácidos orgánicos y restos de proteínas, reduce hierro y manganeso (Dedysch and Yilmaz 2018)
<i>Pirellulaceae (Planctomycetes)</i>	456	126	134	204	Aerobio. Remueve desechos metabólicos con la oxidación de amonio a nitrito. Microorganismos implicados en el ciclo del nitrógeno (Lawler et al. 2016)
<i>Latescibacteraceae (Latescibacteria)</i>	402	160	116	141	Anaerobio / fermentativo. Degrada polisacáridos y glicoproteínas de las paredes celulares de algas, así como polímeros extracelulares (Youssef et al. 2015)
<i>Syntrophobacteraceae (Proteobacteria-Deltaproteobacteria)</i>	74	50	33	15	Anaerobio. Autótrofo, heterótrofo y fermentativo. Reduce sulfato y reduce o dismuta otros compuestos de azufre. Oxida completa e incompletamente diversos de compuestos orgánicos. Implicados en el ciclo del azufre (Kuever et al. 2015)
<i>Desulfobacteraceae (Proteobacteria-Deltaproteobacteria)</i>	363	170	169	55	Anaerobio. Reduce sulfato. Asociación sintrófica con ANME 1 y 2. Implicados en el ciclo del azufre (Parkes and Sass 2007; Jochum et al. 2017)
<i>Desulfarculaceae (Proteobacteria-Deltaproteobacteria)</i>	229	103	92	44	Anaerobio. Crecimiento heterótrofo y autótrofo. Reduce sulfato. Implicado en el ciclo del azufre (Sun et al. 2010)
<i>Anaerolineaceae (Chloroflexi)</i>	206	99	79	61	Anaerobio. Degrada productos de la fermentación (Yamada et al. 2006; Nunoura et al. 2013)
<i>Kiloniellaceae (Proteobacteria-Alfaproteobacteria)</i>	89	45	39	50	Anaerobio facultativo. Capaz de crecer con nitrato como último aceptor de electrones. Implicado en el ciclo del nitrógeno en entornos anóxicos (Cleary et al. 2016)
<i>Methylomirabilaceae (Rokubacteria - NC10)</i>	23	4	8	16	Anaerobio. Oxidación anaerobia de metano con nitrito. Implicados en el ciclo del nitrógeno y control de emisiones de metano (Kimes et al. 2013; Li et al. 2020)
<i>Phycisphaeraceae (Planctomycetes)</i>	263	69	67	150	Anaerobio facultativo / fermentativo. Degrada azúcares complejos y productos de fermentación. Implicado en los ciclos del nitrógeno y azufre (Fukunaga and Kurahashi 2009)
<i>bacteriap25 (Proteobacteria)</i>	374	55	93	246	Aerobio estricto del orden <i>Myxococcales (Deltaproteobacteria)</i> . Degrada hidrocarburos (Stevens and Ulloa 2008)
<i>Gemmatimonadaceae (Gemmatimonadetes)</i>	286	92	83	144	Aerobio. Remueve fósforo. Utiliza múltiples fuentes de carbono. Implicado en el ciclo del fósforo (Zhang et al. 2003)

2.4.3.1. POTENCIALES GRUPOS SULFATO-REDUCTORES EN LIBRERÍAS 16S ARNr

Se identificaron 12 familias potencialmente sulfato-reductoras (Tabla 2). De estas familias, 10 pertenecieron a la clase *Deltaproteobacteria* las cuales conformaron el ~98% de los ASVs relacionados con la diversidad de potenciales MSR, seguidos por *Peptococcaceae* del filum *Firmicutes* y *Thermodesulfobivibrionaceae* del filum *Nitrospirota*. Éstos representaron el 1.3 y 0.8%, respectivamente de los ASVs relacionados con potenciales MSR (Tabla 2). Familias con miembros sulfato-reductores tales como *Syntrophobacteraceae*, *Desulfobacteraceae*, *Desulfarculaceae* fueron grupos abundantes en la comunidad microbiana total y se distribuyeron principalmente en los sedimentos del grupo I y II (Fig. 6).

Tabla 2. Potenciales grupos sulfato-reductores en librerías 16S. Número de ASVs en todas las muestras y divididos en los grupos determinados por el análisis de similitud de la estructura de las comunidades

Familia	Género	Totales	Grupo I	Grupo II	Grupo III	Referencia
<i>Desulfobacteraceae</i>	Sva0081	101	58	44	16	(Dykma et al. 2018)
	<i>Desulfatirhabdium</i>	3	3	0	0	(Balk et al. 2008)
	<i>Desulfobacter</i>	4	3	1	0	(Rabus et al. 1996)
	<i>Desulfobacterium</i>	1	0	1	0	(Rabus et al. 2002)
	<i>Desulfococcus</i>	1	0	1	0	(Fernández-Cadena et al. 2020)
	<i>Desulfoconvexum</i>	2	0	2	1	(Könneke et al. 2013)
	<i>Desulfofaba</i>	1	1	0	0	(Zhou et al. 2021)
	<i>Desulfofrigus</i>	4	2	2	0	(Kraft et al. 2013)
	<i>Desulfonema</i>	7	2	4	3	(Schnaars et al. 2021)
	<i>Desulfosalsimonas</i>	1	0	1	0	(Kjeldsen et al. 2010)
	<i>Desulfosarcina</i>	3	0	3	0	(Zhou et al. 2021)
	SEEP-SRB1	90	45	39	17	(Orcutt et al. 2010b)
<i>Desulfarculaceae</i>	* <i>Desulfatiglans</i>	174	88	71	24	(Jochum et al. 2018a)
<i>Desulfobulbaceae</i>	<i>Desulfobulbus</i>	7	4	3	1	(Kremer and Hansen 1988a)
	<i>Desulfocapsa</i>	4	1	2	0	(Finster et al. 2013)
	<i>Desulfotalea</i>	2	0	2	0	(Rabus et al. 2004)
	MSBL7	4	1	3	0	(Deja-Sikora et al. 2019)
	SEEP-SRB4	2	1	0	1	(Orcutt et al. 2010b)
<i>Syntrophobacteraceae</i>	No cultivados	74	50	33	15	(Kuever et al, 2015)

<i>Desulfovibrionaceae</i>	<i>Desulfovibrio</i>	47	14	12	22	(Deja-Sikora et al. 2019)
	<i>Halodesulfovibrio</i>	2	1	1	0	(Shivani et al. 2017)
<i>Syntrophaceae</i>	<i>Desulfobacca</i>	9	7	1	1	(Zhou et al., 2021)
	<i>Desulfomonile</i>	7	1	3	3	(Sun et al. 2001)
	<i>Syntrophus</i>	1	0	0	1	(Walker et al. 2020)
<i>Desulfuromonadaceae</i>	<i>Desulfuromonas</i>	16	7	6	4	(Giudici-Ortoni et al. 2003)
<i>Desulfomicrobiaceae</i>	<i>Desulfomicrobium</i>	3	0	0	3	(Dias et al. 2008)
<i>Desulfonatronaceae</i>	<i>Desulfonatrum</i>	1	1	0	0	(Zhilina et al. 2005)
<i>Desulfohalobiaceae</i>	<i>Desulfovermiculus</i>	4	2	1	1	(An et al. 2017)
<i>Thermodesulfovibrionaceae</i>	<i>Thermodesulfovibrio</i>	12	10	2	0	(Sekiguchi et al. 2008)
<i>Peptococcaceae</i>	<i>Desulfotomaculum</i>	2	2	0	0	(de Rezende et al.2017)

*El género *Desulfatiglans* se clasifica en la familia *Desulfarculaceae* en la base de datos de referencia de SILVA, mientras que en la taxonomía del NCBI y RDP pertenece a la familia *Desulfobacteraceae*.

2.5. DISCUSIÓN

2.5.1. COMPOSICIÓN DE LA COMUNIDAD PROCARIOTA EN SEDIMENTOS DEL NOGM

Las comunidades procariotas se componen por un número relativamente pequeño de taxones residentes caracterizados por tener una cantidad elevada y relativamente estable de secuencias (Huse et al. 2010). En el presente estudio dichos taxones fueron integrados por *Proteobacteria*, *Planctomycetes*, *Acidobacteria*, *Actinobacteria*, *Bacteroidetes*, *Chloroflexi* y *Gemmatimonadetes*, *Euryarchaeota* y *Crenarchaeota* (Fig. 4). Estos fila han sido reportados previamente en sitios someros y profundos en la región de estudio y parecen estar distribuidos globalmente en sedimentos marinos (Wu et al. 2011; Bienhold et al. 2016; Covarrubias 2016; Cúcio et al. 2016; Yang et al. 2016; Sánchez-Soto Jiménez et al. 2018). Los fila observados en altas abundancias en la región de estudio (Fig. 4) pueden estar vinculados al mantenimiento de las principales funciones biogeoquímicas en sedimentos por lo que es importante monitorear su dinámica (Gobet et al. 2012).

El agrupamiento de las muestras con base en la similitud de la estructura de la comunidad (Fig. 3a) permitió explorar el patrón de distribución de grupos relacionados con diferentes procesos (Tabla 1). En las muestras del grupo III, representando los sitios más profundos en

este estudio (Fig. 6), *Gemmatimonadaceae* sugirió la presencia de bacterias aerobias capaces de remover fósforo, *Nitrosopumilaceae* (filum *Thaumarchaeota*) de arqueas aerobias oxidantes de amonio (nitrificantes) y los fila *Kiloniellaceae* y *Methylomirabilaceae*, la presencia de bacterias desnitrificantes (Fig. 6; Tabla 1), éste último con la capacidad de oxidar metano con nitrito (Valentine 2011). Estas observaciones sugieren la distribución de microorganismos con estilos de vida preferentemente aerobios y anaerobios facultativos en los sitios más profundos con condiciones predominantemente óxicas (Anexo 2), lo cual concuerda con estudios previos (Sánchez-Soto Jiménez et al. 2018; Raggi et al. 2020). La abundancia de estos grupos señaló una diversidad de microorganismos potencialmente involucrados con la dinámica del fósforo, con el balance entre la pérdida y la fijación de nitrógeno y con el control de las emisiones de metano del océano a la atmósfera en sitios profundos.

Se ha indicado que la composición de la comunidad en sedimentos marinos suele variar más que las funciones microbianas (Gobet et al. 2012). En el presente estudio se observó que en las muestras de los grupos I y II, representando los sitios de menor profundidad (Fig. 7), *Euryarchaeota*, *Crenarchaeota Nitrospirota* y *Spirochaeta*, constituyeron la diversidad de microorganismos potencialmente implicados en el metabolismo del azufre, del nitrógeno y de los hidrocarburos (Fig. 4 y Tabla 1). Arqueas del filum *Euryarchaeota* han sido relacionadas con la oxidación anaerobia de metano (OAM) utilizando sulfato como aceptor de electrones en ambientes marinos (Knittel and Boetius 2009; Chen et al. 2019; Laso-Pérez et al. 2019; Wang et al. 2020). Arqueas y bacterias marinas desnitrificantes se han relacionado con los fila *Crenarchaeota* y *Nitrospirota* (i.e., género *Nitrospira*), respectivamente (Francis et al. 2005; Sorokin et al. 2012; Umezawa et al. 2020), mientras que los espiroquetos marinos se han señalado como fijadores de nitrógeno asociados a invertebrados marinos (Cleary et al. 2016; Lawler et al. 2016; Matsuyama et al. 2017).

2.5.2. POTENCIALES GRUPOS SULFATO-REDUCTORES EN LIBRERÍAS DEL GEN 16S ARNr

La sulfato-reducción es uno de los procesos anaerobios clave en sedimentos anóxicos del margen continental (Jørgensen et al. 2019). En este estudio la mayor abundancia de grupos potencialmente sulfato-reductores se presentó en los sitios de menor profundidad, los cuales presentaron el menor potencial redox (Anexo 2) indicando ambientes predominantemente anóxicos. Esta condición puede resultar de las mayores tasas de respiración, propias de los sedimentos del margen continental (Jørgensen and Revsbech 1989; Valdes and Real 2004; Orsi 2018), pudiendo favorecer el desarrollo de microorganismos anaerobios como los MSR en estos ambientes.

Syntrophobacteraceae, *Desulfobacteraceae* y *Desulfarculaceae* encontrados en alta abundancia en la región de estudio (Fig. 6), suelen reportarse en los sedimentos marinos anóxicos (Raggi et al. 2020). Organismos de la familia *Syntrophobacteraceae* han presentado un metabolismo muy versátil que les permite llevar un estilo de vida sulfato-reductor, utilizar otros aceptores de electrones inorgánicos e incluso crecer por fermentación (Kuever et al. 2015). Por su parte *Desulfobacteraceae* y *Desulfarculaceae*, con el mayor número de ASVs distintos dentro de los grupos sulfato-reductores (Tabla 2), se han descrito como relevantes en la producción de sulfuro mediante la degradación de acetato en sedimentos marinos (Rabus et al. 2006). También se les ha relacionado con la degradación de hidrocarburos y se les ha detectado en ambientes pobres en MO (Lloyd et al. 2010; Orcutt et al. 2011; Stauffert et al. 2015; Cúcio et al. 2016; Shin et al. 2019). Las *Desulfarculaceae* pueden crecer autotróficamente (Sun et al. 2010), lo cual puede ser una característica que les permite sobrevivir en sedimentos pobres en MO, una condición observada en los sedimentos del NOGM (Sánchez-Soto Jiménez et al. 2018). Por su parte, *Desulfobacteraceae* puede asociarse en sintrofía con arqueas metanógenas (Parkes and Sass 2007; Jochum et al. 2017) como los reportados en este estudio (e.g., *Euryarchaeota*) (Fig. 4).

Los resultados de esta investigación mostraron una diversidad de potenciales MSR poco abundantes (raros), tales como *Desulfobulbaceae*, *Syntrophaceae*, *Desulfuromonadaceae*,

Desulfohalobiaceae y *Peptococcaceae*. Estos grupos han sido reportados en sedimentos del Golfo de México basados en el análisis de secuencias del gen 16S ARNr (Orcutt et al. 2010a). Recientes avances en el análisis de la diversidad de los grupos raros han señalado su importancia en la transferencia de genes, el flujo de carbono y la degradación de contaminantes (Gobet et al. 2012; Kleindienst et al. 2015; Pester et al. 2015; Pascoal et al. 2020). Con base en lo señalado en otros reportes, es posible que los potenciales MSR observados en el presente estudio estén vinculados con múltiples procesos como el mantenimiento de las condiciones anóxicas en los sedimentos por las cable-bacterias de la familia *Desulfobulbaceae* (Gittel et al. 2008; Trojan et al. 2020), la reducción de hierro y manganeso por *Desulfuromonadaceae* (Handley et al. 2012; Reese et al. 2013), la degradación de ácidos grasos y alcanos de cadena larga con formación de metano por parte de *Syntrophaceae* (Orcutt et al. 2010a; Cheng et al. 2013), la metilación de mercurio por MSR de la familia *Desulfohalobiaceae* (Gilmour et al. 2013) y la dinámica de metales, como el Cd por parte de los *Peptococcaceae* (Fortin et al. 1994; Visser et al. 2013). Sin embargo, es necesario realizar más estudios sobre la función de MSR en estos ambientes para examinar los organismos poco abundantes en condiciones específicas en el laboratorio y con ello explorar su relevancia ecológica en el ambiente marino y potencial uso biotecnológico.

Si bien, los potenciales grupos de MSR presentaron mayores abundancias relativas en sedimentos de menor profundidad (Fig. 6), los resultados de este estudio mostraron su distribución en todo el gradiente batimétrico analizado (Tabla 2). Algunos de ellos como *Desulfobacteraceae*, *Desulfarculaceae*, *Desulfobulbaceae*, *Syntrophobacteraceae* y *Desulfovirbionaceae* presentaron un importante número de ASVs distintos en todos los sitios (Tabla 2). La diversidad dentro de los grupos de bacterias y arqueas se ha analizado anteriormente en el medio marino (Durbin and Teske 2010; Gaboyer et al. 2017; Jochum et al. 2018b). Su extensa distribución en el ambiente marino se ha relacionado con su capacidad para crecer en una amplia gama de condiciones ambientales, la cual se ha vinculado con la coexistencia de poblaciones estrechamente relacionadas, pero con diferencias genéticas que les permite adaptarse a condiciones o nichos distintos. Por lo tanto, es posible que la diversidad

molecular dentro de los grupos sulfato-reductores detectados en este estudio indique la existencia de organismos relacionados, pero ecológicamente diferentes capaces de desarrollarse en sedimentos marinos a diferente profundidad de agua en el NOGM y otras regiones geográficas.

2.6. CONCLUSIONES

El análisis de la estructura de la comunidad reveló la separación de las muestras en tres grupos. Esto permitió explorar la distribución de algunos taxones en el área de estudio y detectar diferencias ambientales en cuanto a la profundidad de agua, la temperatura, el potencial redox y el contenido de metales (Anexo 2). Los fila más abundantes en todas los sitios fueron *Planctomycetes*, *Acidobacteria*, *Actinobacteria*, *Bacteroidetes*, *Chloroflexi*, *Gemmatimonadetes* y *Proteobacteria*, siendo las *Alfa*, *Delta* y *Gammaproteobacteria* los grupos dominantes. En los sedimentos predominantemente óxicos más alejados de la costa se observó una mayor abundancia de grupos potencialmente aerobios y anaerobios facultativos tales como *Kiloniellaceae*, *Phycisphaeraceae*, *bacteriap25*, *Gemmatimonadaceae*, mientras que los sedimentos anóxicos de la plataforma y del talud continental se observó gran abundancia de potenciales grupos anaerobios como *Anaerolinaceae* y sulfato-reductores como *Syntrophobacteraceae*, *Desulfobacteraceae* y *Desulfarculaceae*. *Syntrophobacteraceae*, *Desulfobacteraceae*, *Desulfarculaceae*, *Desulfobulbaceae* y *Desulfovibrionaceae* fueron las familias sulfato-reductoras que presentaron mayor riqueza posiblemente favorecidos por las condiciones ambientales preferentemente anóxicas de estos ambientes. El presente estudio es el primero en explorar con mayor detalle la composición y distribución de MSR en el área de estudio, en especial en sitios del mar profundo.

3. CAPÍTULO III. ANÁLISIS DE LA DIVERSIDAD DE MICROORGANISMOS SULFATO REDUCTORES EN SEDIMENTOS DEL GOLFO DE MÉXICO MEDIANTE SECUENCIACIÓN DEL GEN *dsrB*

3.1. INTRODUCCIÓN

La reducción biológica de sulfato (SO_4^{2-}) es un paso esencial en los ciclos del azufre y del carbono, particularmente en sedimentos marinos donde el SO_4^{2-} es el principal oxidante de los procesos metabólicos anaerobios (Labrenz et al. 2000; Pallud and Van Cappellen 2006; Muyzer and Stams 2008). Este metabolismo está mediado por los MSR quienes dominan los pasos anaerobios en los procesos de mineralización de la MO en sedimentos ricos en SO_4^{2-} , oxidando tanta materia orgánica a CO_2 como los microorganismos aerobios (Jørgensen 1982; Jørgensen et al. 2019). Este grupo funcional especializado constituye un grupo filogenética y fisiológicamente diverso de bacterias y arqueas anaerobias que utilizan principalmente sulfato (SO_4^{2-}) como aceptor terminal de electrones para oxidar varios substratos orgánicos o hidrógeno, en una vía desasimilatoria que da como resultado sulfuro (S^{2-}) como producto final (Rabus et al. 2015).

Las enzimas (bi) sulfito reductasas desasimilatorias (enzimas *DsrAB*) catalizan la transformación de sulfito a sulfuro, el último paso en la sulfato-reducción desasimilatoria (SRD). Estas enzimas, y los genes *dsrAB* que las codifican, se conservan en todos los MSR y se distribuyen en seis fila bacterianos (*Proteobacteria*, la mayoría dentro de la clase *Deltaproteobacteria*, *Nitrospirota*, *Firmicutes*, *Actinobacteria*, *Caldiserica*, *Thermodesulfobacteria*) y tres arqueanos (*Euryarchaeota*, *Crenarchaeota* y *Aigarchaeota*) (Muyzer and Stams 2008; Müller et al. 2015; Rabus et al. 2015). Sin embargo, recientemente se ha descubierto la capacidad genética para la reducción de sulfato / sulfito en otros genomas microbianos, ampliando con ello el número de fila microbianos asociados con este proceso. Por ejemplo, *Chloroflexi* (e.g., *Dehalococcoidia*), *Verrucomicrobia*, *Candidatus Rokubacteria*, *Candidatus Hydrothermarchaeota* y *Euryarchaeota* (e.g., *Diaforarchaea*) también contienen los genes *dsrAB* (Anantharaman et al. 2018; Colman et al. 2020; Vuillemin et al. 2020). La distribución taxonómica de los genes *dsrAB* puede reflejar diferentes estilos

de vida microbianos y metabolismos versátiles para sobrevivir en diferentes condiciones ambientales (Plugge et al. 2011).

La caracterización de MSR ambientales a través de los análisis basados en secuencias 16S ha sido compleja ya que estos microorganismos pertenecen a diferentes y distantes linajes, y a menudo se han relacionado con microorganismos no sulfato-reductores (Wagner et al. 2005; Lücker et al. 2007). En su lugar, los análisis comparativos de las secuencias de amplicones de genes que codifican para la enzima sulfito reductasa desasimilatoria (*dsrAB*) han sido más precisos para este propósito (Wagner et al. 2005). Estos genes, altamente conservados y organizados en un operón de copia única, codifican las subunidades α y β de la enzima que cataliza la transformación de sulfito (SO_3^{2-}) a sulfuro, el último paso en la SRD, y, por lo tanto, están presentes en todos los MSR (Klein et al. 2001; Larsen et al. 2001; Wagner et al. 2005). Por estas razones, los genes *dsrAB* se han utilizado con frecuencia para caracterizar las comunidades sulfato-reductoras, inferir su historia evolutiva y cuantificar MSR en diferentes entornos (Pérez-Jiménez et al. 2001; Kaneko et al. 2007; Muyzer and Stams 2008; Bagwell et al. 2009; Watanabe et al. 2016; Zhang et al. 2016; Jochum et al. 2017; Li et al. 2017b). La combinación de la secuenciación masiva con la PCR cuantitativa (qPCR) de los genes *dsrAB* ha proporcionado información más completa sobre la abundancia y composición de MSR en ambientes marinos (Zhang et al. 2017). Además, este enfoque ha sido identificado como un poderoso medio para el análisis comparativo de las comunidades sulfato-reductoras (Zhang et al. 2017).

En el Golfo de México (GM) un importante conjunto de datos geoquímicos e isotópicos que derivan de proyectos de exploración del mar profundo, como el Deep-Sea Drilling Project, dio los primeros indicios de la importancia de la reducción de sulfato (RS) en sedimentos marinos (Anderson et al. 1983). Asimismo, se observaron las variables que controlan este proceso como el contenido orgánico, la profundidad del agua y las tasas de sedimentación (Canfield 1991). Tras el reconocimiento de la RS como uno de los procesos microbianos dominantes en los sedimentos marinos asociados principalmente a ambientes de filtraciones del subsuelo (Aharon and Fu 2000; Joye et al. 2004), varios estudios investigaron la

correspondiente diversidad microbiana en dichos sitios (Lanoil et al. 2001; Mills et al. 2005; Orcutt et al. 2010^a). Los resultados de estos estudios indicaron que los MSR están involucrados en la degradación de los hidrocarburos (HC) simples, sugiriendo que la MO lábil parece ser un factor importante para la diversidad y actividad de los MSR en sedimentos marinos. Tras la explosión de la plataforma Deepwater Horizon (DWH) en el 2010, estudios de laboratorio demostraron que los MSR dentro de las *Deltaproteobacteria* están involucrados en la degradación anaerobia de HC en sedimentos contaminados con petróleo (Beazley et al. 2012; Yang et al. 2016; Shin et al. 2019).

A través de análisis moleculares basados en PCR se ha reconocido la importancia de los MSR en ambientes sedimentarios contaminados con petróleo, particularmente en el norte del Golfo de México (Bagwell et al. 2009; Nunoura et al. 2009; Lloyd et al. 2010; Beazley et al. 2012). Sin embargo, se necesita más información sobre la diversidad, distribución y los factores ambientales relacionados con los MSR en otros ambientes. Por lo tanto, el objetivo de este capítulo fue caracterizar las comunidades de MSR en sedimentos oligotróficos del NOGM distribuidos desde la plataforma continental hacia la zona abisal en términos de las variables geoquímicas potencialmente relacionadas con la abundancia y composición de los MSR.

3.2. OBJETIVO

- Caracterizar las comunidades sulfato-reductoras en el NOGM a través de la secuenciación del gen *dsrB* y explorar su asociación estadística con las variables ambientales de la región.

3.3. MATERIAL Y MÉTODOS

El análisis de la comunidad sulfato-reductora de este capítulo derivó de 23 (Fig. 7) de las 27 muestras de sedimento indicadas en el capítulo anterior (Fig. 2), y en el que se describen a detalle los métodos de colecta y procesamiento para las determinaciones fisicoquímicas de los sedimentos. Estas 23 muestras de sedimento provinieron de 23 sitios situados a lo largo de 4 transectos (A, B, C y D) perpendiculares a la línea de costa, abarcando el rango de 44 a 3548 m de profundidad de agua (Fig. 7). Dichas muestras presentaron una calidad suficiente en los amplicones obtenidos del gen *dsrB* para su secuenciación por Illumina.

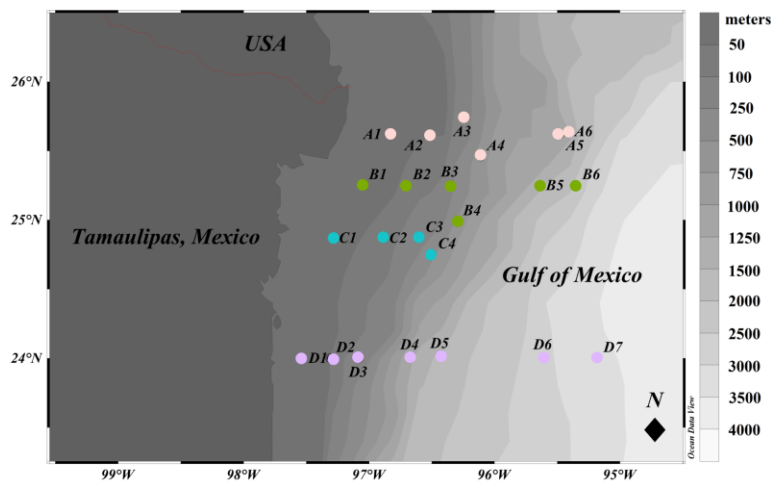


Figura 7. Mapa indicando los sitios de colecta de las muestras de sedimento con las que se realizó el análisis molecular de la comunidad de MSR por secuenciación Illumina del gen *dsrB*. Los sitios de colecta se localizaron de los 25.62° a los 24° de latitud norte y de los -95.41° a los -95.18° de longitud oeste.

3.3.1. ANÁLISIS DE LA COMUNIDAD DE MICROORGANISMOS SULFATO-REDUCTORES A TRAVÉS DE LA SECUENCIACIÓN MASIVA DEL GEN *dsrB*

Se prepararon los amplicones del gen *dsrB* con los adaptadores para su secuenciación por Illumina siguiendo el protocolo de dos PCR. En la primera PCR, se amplificaron aproximadamente 350 pb del gen *dsrB* con el par de primers DSR1762F1 / DSR2107R1 (Pelikan et al. 2016) utilizando el siguiente programa: desnaturalización inicial a 95 °C por 3

min, seguida de 35 ciclos con una desnaturalización por 30 s a 95 °C, un alineamiento en modo "touchdown" por 30 s donde la temperatura disminuyó de 60 °C a 50 °C (1 °C por ciclo durante los primeros 10 ciclos), una elongación por 30 s a 72 °C, y una extensión final a 72 °C por 5 min. Cada mezcla de reacción de PCR (20 µL) incluyó 1 µL de DMSO (5%), 1 µL de cada primer (0.5 mM), 10 µL de 2x Phusion High-Fidelity MasterMix (Thermo Scientific, EE. UU.) y 2 µL de ADN (~ 10 ng / µL). En la segunda PCR, se unieron los índices en ocho ciclos utilizando el Nextera XT Index Kit. Los amplicones indexados se purificaron y diluyeron como se indicó en el capítulo anterior para los amplicones del gen 16S ARNr. La secuenciación de extremos pareados se realizó en plataforma MiSeq (Illumina, San Diego, CA, USA) con un kit de reactivos V3 (2x250 ciclos).

3.3.1.1. CUANTIFICACIÓN DEL GEN *dsrB* POR qPCR

La cuantificación de las copias del gen *dsrB* se realizó mediante qPCR utilizando el par de primers DSRp2060F/DSR4R recomendado por He y colaboradores (He et al. 2015), por el método SYBR Green. Estos primers se seleccionaron debido al amplio rango de detección de MSR (Geets et al. 2006), como se ha mostrado en estudios anteriores (He et al. 2015; Zhang et al. 2017). Las condiciones de qPCR incluyeron una desnaturalización inicial de 94 °C por 15 min, 40 ciclos de 30 s a 94 °C, 20 s a 60 °C y 30 s a 72 °C. Cada reacción de 12.5 µL contuvo 0.5 µL de cada primer (0.4 mM), 6.5 µL de reactivos Quantinova SYBR Green PCR Kit (Qiagen, Hilden, Alemania) y un 1 µL de ADN (concentración normalizada a 1 ng µL⁻¹ ADN). La adquisición de datos se realizó en el paso de extensión y la especificidad de amplificación se verificó por el análisis de la curva de fusión (de 72–98 °C manteniéndose 1 °C por 5 s) y por visualización en gel de agarosa al 1%. La curva estándar se obtuvo a partir de la dilución en serie de un plásmido portador del gen *dsrB*, con un rango lineal del gen *dsrB* de 10 a 10⁷ copias por µL⁻¹ de ADN, y una eficiencia del 101% R²= 0.99.

3.3.1.2. ANÁLISIS BIOINFORMÁTICOS DE LAS LIBRERÍAS DEL GEN *dsrB*

Las lecturas pareadas (2x250) de Illumina se procesaron con QIIME2 (versión 2019.10) (Bolyen et al. 2019). Después de una inspección manual, las lecturas forward y reverse se cortaron en la posición 25 en 5' terminal y se truncaron en la posición 240 y 160 en el extremo 3', respectivamente. Las ASVs se identificaron con paquetería DADA2 removiendo las quimeras con el método "consensus". Las secuencias representativas de ASVs se analizaron con el paquete DIAMOND (Buchfink et al. 2014) utilizando su algoritmo blastx para comparar los ASVs con la base de datos de proteínas RefSeq del NCBI con los argumentos *e-value* < 0.0003 y "--sensitive". La salida DIAMOND se importó al programa MEGAN6 (Huson et al. 2016).

Con el objetivo de identificar y anotar los ASVs que codificaron correctamente para la subunidad beta de la proteína sulfito reductasa desasimilatoria (EC 1.8.99.3), se asignó el archivo de salida MEGAN a las categorías de anotación metabólica de SEED a través del archivo de mapeo "acc2seed" con un porcentaje mínimo de identidad = 50 y los demás parámetros de LCA por defecto. Se eliminaron los ASVs que no se anotaron como esta proteína. Los ASVs filtrados se asignaron taxonómicamente utilizando el clasificador LCA de MEGAN6, utilizando la clasificación taxonómica del NCBI (con el archivo de mapeo "prot_acc2tax") con los parámetros para el LCA: puntuación mínima (min score): 50; máximo esperado (max expected): 3.0E-4; porcentaje mínimo de identidad (min percent identity): 50; porcentaje superior (top percent): 60; porcentaje de cobertura (percent to cover): 60 con el modo de lectura "alignedBases". La clasificación se filtró, eliminando los niveles taxonómicos con un porcentaje de ruta del taxón <50%, o marcándolo como un nivel "ambiguo" por un asterisco.

La clasificación y la tabla de abundancias de ASVs se exportaron al ambiente R (versión 3.6.0) para realizar los análisis de diversidad y estadísticos con las paqueterías phyloseq (McMurdie and Holmes 2013) y vegan (Oksanen 2013). Se utilizó ggplot2 (Wickham 2010) para las visualizaciones gráficas. Se calculó el índice de diversidad alfa de Shannon. Se calculó un análisis de coordenadas principales (PCoA) con la matriz de distancias de Bray-Curtis. Para

identificar el número óptimo de grupos de muestras, se realizó un análisis estadístico de *gap* en el método de ordinación con los paquetes de agrupamiento, usando la función *clusGap* en modo “*pam1*” y 1000 remuestreos. La significancia estadística del agrupamiento en el PCoA y las variables asociadas se probaron con un análisis PERMANOVA a un valor $p < 0.05$ utilizando los datos ambientales del capítulo II (Anexo 1). Se llevó a cabo un análisis discriminante lineal Effect Size (LEfSe) (Paulson et al. 2013) para identificar los ASVs con abundancia diferencial significativa entre los grupos. El análisis de correlación de Spearman entre la diversidad alfa, la abundancia del gen *dsrB* y las variables ambientales se calculó en R.

Con el fin de obtener información sobre la relación filogenética de las secuencias *dsrB* sin asignación taxonómica a nivel de familia, se llevó a cabo un análisis filogenético. Brevemente, 3950 ASVs no asignadas a nivel taxonómico de familia se agruparon en unidades taxonómicas operativas (OTUs) con un 90% de similitud utilizando el algoritmo V-SEARCH (Rognes et al. 2016), lo que resultó en 1178 OTUs. Se realizó una alineación con las secuencias de referencia de 1292 *dsrB* (Pelikan et al. 2016) y todos los OTUs a consultar con el algoritmo de Mafft (Kato and Standley 2013). La alineación se recortó con el algoritmo GBLOCKS (Talavera and Castresana 2007). Se utilizó el software ModelTest-NG (Darriba et al. 2020) para seleccionar el modelo evolutivo de la alineación. El árbol filogenético se calculó utilizando el software RAxML (Darriba et al. 2020), utilizando el modelo “GTRGAMMAIX” seleccionado por ModelTest. El árbol filogenético resultante contuvo 1292 nodos de la base de datos de referencia y 1178 nodos de los OTUs consultados. El árbol filogenético (Fig. 15) fue editado por la herramienta en línea i-TOL (<http://itol.embl.de/>) (Letunik and Bork 2007). Los datos de las secuencias sin procesar se depositaron en el NCBI con el número de acceso Bioproject PRJNA626626.

3.4. RESULTADOS

3.4.1 ESTRUCTURA DE LA COMUNIDAD DE MICROORGANISMOS SULFATO-REDUCTORES Y CUANTIFICACIÓN DEL GEN *dsrB* EN SEDIMENTOS MARINOS

Los cambios en la estructura de la comunidad de MSR se visualizaron con el método de ordenación PCoA sobre la matriz de disimilitud Bray-Curtis (Fig. 8). La ordenación PCoA y la prueba PERMANOVA revelaron tres grupos de muestras significativamente distintos ($R^2 = 0.28$, $F_{2, 23} = 3.86$, $p = 0.001$). Estos grupos fueron: grupo I (A1, A2, B1, B2g, C1, C2, D1 y D2) conformado por sedimentos colectados entre 44 y 107 m de profundidad de agua; grupo II (A3, B3, B5, B6, C3, C4 y D3) conformado por sedimentos colectados entre 372.5 y 2676.8 m; y el grupo III (A4-A6, B4 y D4-D7) conformado por sedimentos colectados entre 1000 a 3548 m (Anexo 1). El grupo III, representando los sedimentos de mayor profundidad, presentó el menor número de ASVs e índice de Shannon en relación con las muestras de los grupos I y II. En cuanto a la abundancia de MSR determinada por el análisis qPCR del gen *dsrB*, la mayor abundancia se presentó en el grupo I, seguido por los grupos II y III (Figura 9).

De acuerdo con el análisis PERMANOVA, las diferencias en la estructura de la comunidad de MSR se relacionaron significativamente ($p < 0.05$) con la temperatura ($F_{1, 23} = 4.15$, $R^2 = 0.2$), la profundidad del agua ($F_{1, 23} = 2.7$, $R^2 = 0.11$), el Ni ($F_{1, 23} = 2.3$, $R^2 = 0.1$), el redox ($F_{1, 23} = 2.2$, $R^2 = 0.1$) y el Cd ($F_{1, 23} = 2.1$, $R^2 = 0.1$). De acuerdo con el análisis de correlación, el número de ASVs, el índice de diversidad de Shannon y el número de copias del gen *dsrB* disminuyeron con el aumento de la profundidad, del potencial redox y del contenido de Ni y Cd con un valor de $p < 0.05$ (Anexo 5).

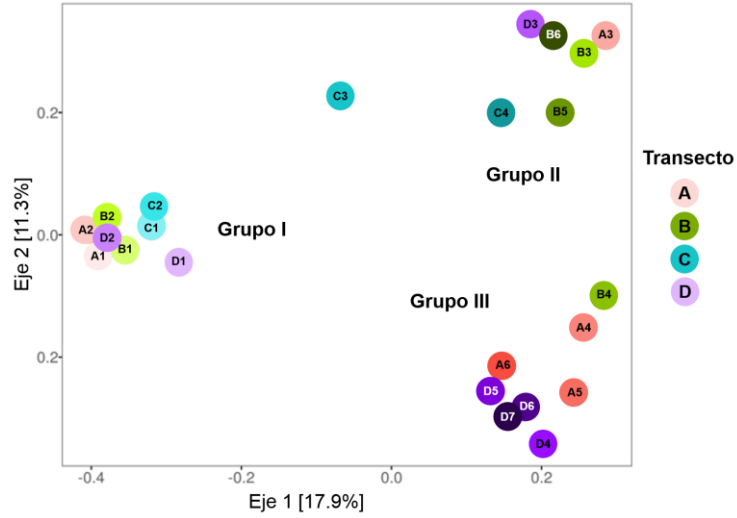


Figura 8. Análisis PCoA de la estructura de la comunidad de MSR. Agrupamiento de muestras de acuerdo con la matriz de disimilitud Bray-Curtis. Grupo I, muestras de sedimento colectadas entre 44 y 107 m de profundidad de agua; Grupo II, muestras de sedimento colectadas entre 372.5 y 2676.8 m de profundidad de agua; Grupo III, muestras de sedimento colectadas entre 1000 y 3548 m de profundidad de agua. La saturación de color en los círculos va de acuerdo con la profundidad de las muestras en cada transecto. Los tonos más claros representan sitios poco profundos, mientras que los tonos más oscuros indican sitios profundos

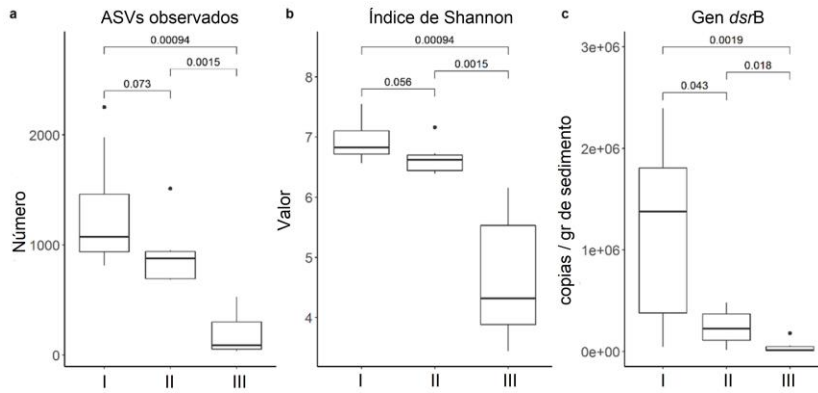


Figura 9. Comparación de estimadores ecológicos y del número de copias del gen *dsrB* entre muestras. Grupos determinados por el análisis de la estructura de la comunidad sulfato-reductora a partir de secuencias *dsrB*. Los valores de p se presentan en la parte superior de cada diagrama de cajas y bigotes. Diferencia significativa $p < 0.05$.

3.4.2. COMPOSICIÓN DE LAS COMUNIDADES SULFATO-REDUCTORAS

A nivel taxonómico de filum se detectaron 4 taxones relacionados con la comunidad sulfato-reductora, siendo *Proteobacteria* y *Firmicutes* los taxa dominantes en todas las muestras de sedimento. *Actinobacteria*, *Chlorobi* y *Thermodesulfobacteria* también se detectaron en todas las profundidades, aunque en menor proporción (Fig. 10). A nivel de familia las comunidades fueron compuestas predominantemente por *Peptococcaceae*, *Desulfovibrionaceae* y *Desulfobacteraceae* (Fig. 11). Sin embargo, a este nivel taxonómico $\approx 30\%$ de los ASVs correspondieron a secuencias no asignadas (Fig. 11). De los géneros identificados, *Desulfotomaculum* y *Desulfosporosinus* de la familia *Peptococcaceae*, así como *Desulfovibrio* de la familia *Desulfovibrionaceae* se detectaron en todas las profundidades (Fig. 12).

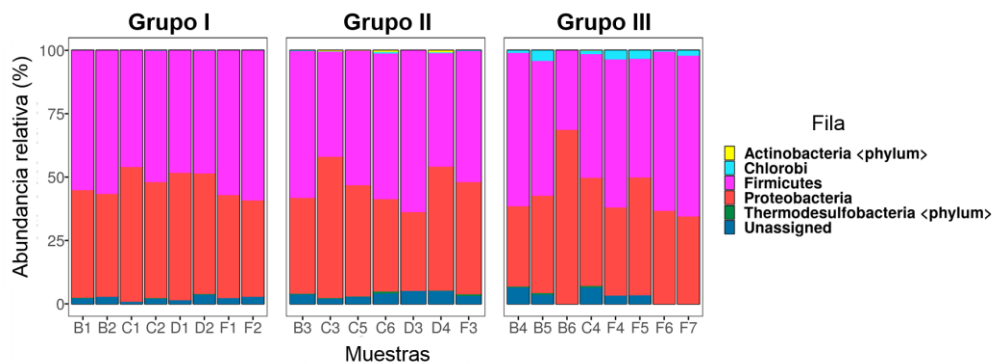


Figura 10. Composición de fila sulfato-reductores con base en secuencias del gen *dsrB*.

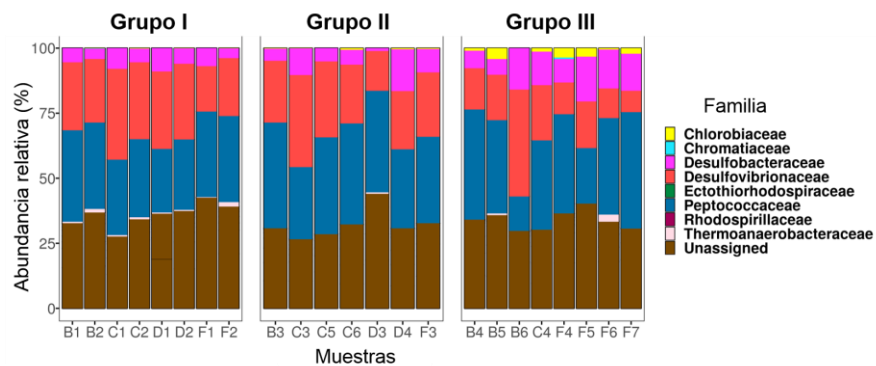


Figura 11. Composición de familias sulfato-reductoras. Análisis basado en secuencias del gen *dsrB*.

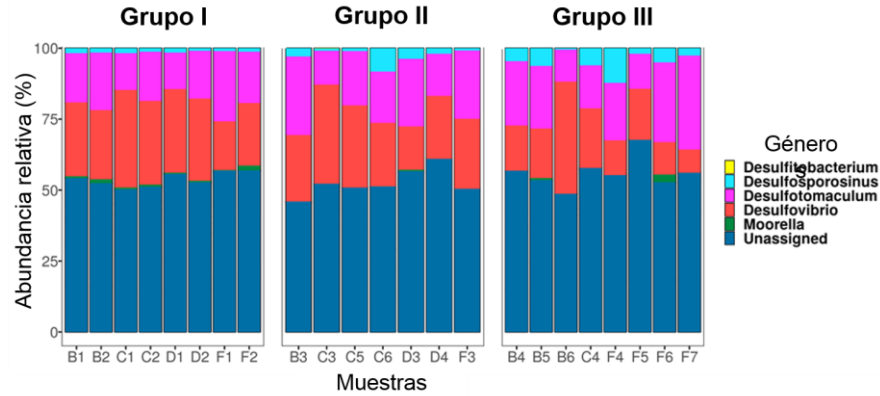


Figura 12. Composición de géneros sulfato-reductores. Análisis basado en secuencias del gen *dsrB*.

El análisis filogenético de las secuencias *dsrB* sin asignación taxonómica a nivel de familia (Fig. 13) indicó su relación con el súpercluster *Deltaproteobacteria* (253 OTUs), el súpercluster *Nitrospirota* (238 OTUs) y con secuencias del filum arqueano *Euryarchaeota* (12 OTUs) (Fig. 13). Sin embargo, la mayoría de estas secuencias (556 OTUs) se relacionaron con grupos ambientales, incluido el grupo ambiental 1 y varios otros indicados como secuencias *dsrAB* tipo bacteriano reductor sensu lato (Fig. 13).

DsrAB tipo arqueano reductor

DsrAB tipo bacteriano reductor

DsrAB tipo bacteriano oxidativo

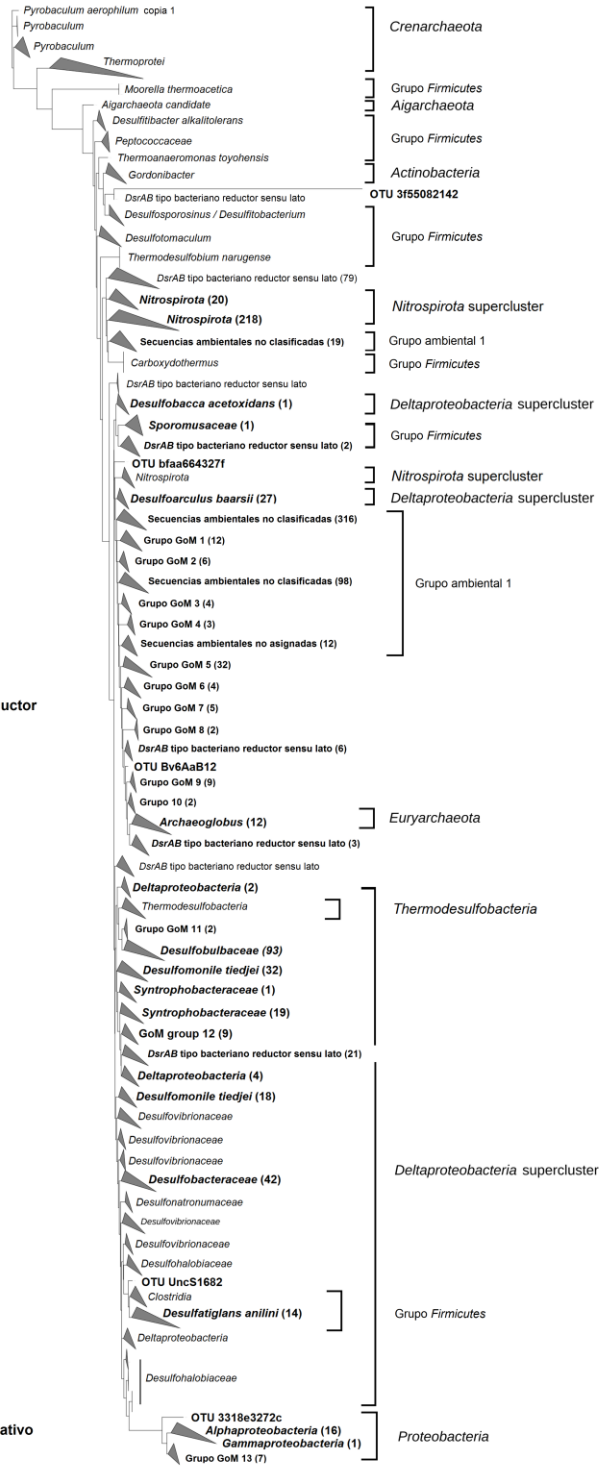


Figura 13. Filogenia de amplicones del gen *dsrB*. El árbol filogenético se calculó utilizando el software RAxML con el modelo GTRGAMMAIX. 1292 secuencias de la base de datos de referencia y 1178 secuencias de los OTUs generados en el presente trabajo. Los nodos se colapsaron manualmente. Los grupos con secuencias *dsrB* obtenidas en el estudio actual se indican en negrita mostrando el número de OTUs entre paréntesis. La imagen se generó utilizando en la plataforma interactiva Tree of Life iTOL (iTOL; <http://itol.embl.de/>)

El análisis de abundancias diferenciales en la comunidad reveló taxones sulfato-reductores cuyas abundancias relativas difirieron estadísticamente ($p < 0.05$) entre los grupos I, II y III (Fig.14). *Desulfovibrio*, *Desulfotomaculum*, *Morella* y otros ASVs con puntuaciones bajas de similitud (<50%); es decir, con una asignación ambigua a nivel de género (Fig. 14), se vincularon con los cambios de la comunidad entre las muestras de los grupos I, II y III. Secuencias del género *Desulfovibrio* y *Desulfotomaculum* tuvieron una mayor representación en las muestras de los grupos I y II en comparación con las muestras del grupo III (Fig.14).

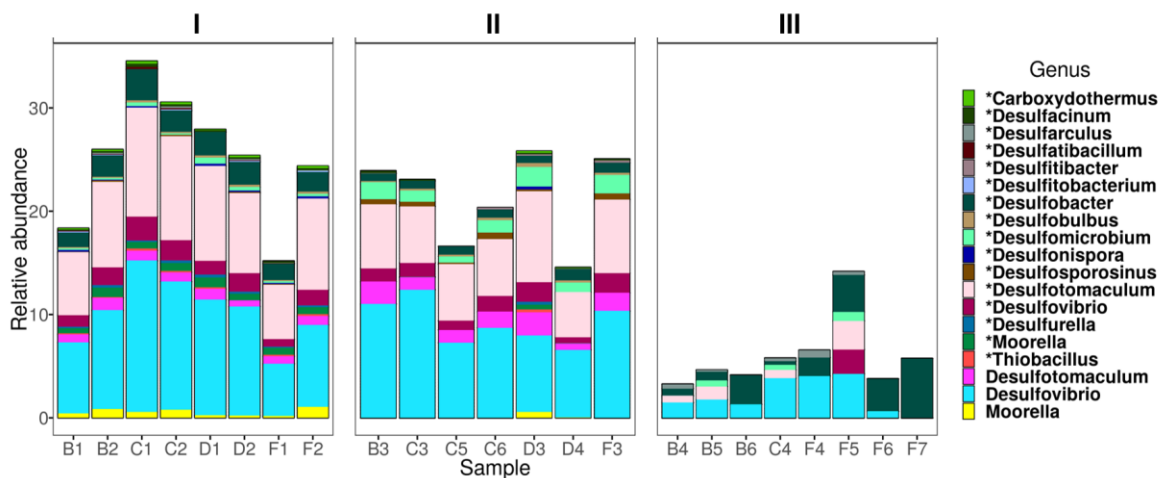


Figura 14. Abundancias diferenciales de géneros de microorganismos sulfato-reductores (MSR). Análisis estadístico de ASVs con abundancias diferenciales realizado con algoritmo LEfSe. Muestras agrupadas en tres grupos diferentes de acuerdo con el análisis de la disimilitud de la comunidad. El asterisco indica los ASVs con asignación taxonómica ambigua (<50% de similitud).

3.5. DISCUSIÓN

3.5.1. COMPOSICIÓN DE MSR EN SEDIMENTOS DEL NOGM

La comunidad de MSR en todas las muestras de sedimento fueron predominantemente compuestas por *Desulfovibrio* de la clase *Deltaproteobacteria* y por *Desulfotomaculum* del filum *Firmicutes* (Figs. 10 y 12). Estos géneros han sido reportados previamente en sedimentos someros y profundos ricos en hidrocarburos (HC) en el Golfo de México por lo que se les ha vinculado con la degradación de estos compuestos (Mills et al. 2003; Li et al. 2007; Kimes et al. 2013; Devereux et al. 2015; Vigneron et al. 2017; Chakraborty et al. 2018). La amplia distribución de *Desulfovibrio* y *Desulfotomaculum* en sedimentos de diferente profundidad en el Golfo de México puede explicarse por su versatilidad fisiológica y metabólica (Devereux et al. 1989; Slobodkin and Slobodkina 2019) y por la circulación de las masas de agua (influida predominante por los remolinos anticiclónicos de la Corriente de Lazo) que afecta la distribución de variables ambientales (e.g., materia orgánica, O₂) y organismos (Perez-Mendoza et al. 2003; Chakraborty et al. 2018; Meza-Padilla et al. 2019).

Las diferencias en la estructura de las comunidades sulfato-reductoras se relacionaron con *Desulfovibrio*, *Desulfotomaculum* y diferentes grupos de las *Deltaproteobacteria* (Fig.14). El análisis filogenético de secuencias *dsrB* sin asignación taxonómica al rango taxonómico de familia (Fig. 13) sugirió la relación de varias secuencias generadas en este trabajo, con linajes de las *Deltaproteobacteria* que incluyen MSR oxidadores completos (*Desulfoarculus baarsi*, *Desulfatiglans anilini* y *Desulfomonile tiedjei*) e incompletos (e.g., *Desulfobulbaceae*) (Leloup et al. 2009; Sun et al. 2010; Jochum et al. 2018b). Estos grupos suelen utilizar sulfato como aceptor de electrones, aunque algunos tienen la capacidad de reducir otros compuestos de azufre y de obtener energía a través de otros mecanismos distintos a la reducción de sulfato (e.g., dismutación) (Mohn and Tiedje 1992; Jørgensen et al. 2019). No obstante, estos atributos ecofisiológicos, como la oxidación de sustratos orgánicos, las preferencias en el uso de sustratos o los mecanismos de conservación de energía, no se evaluaron en el presente trabajo y deben explorarse en estudios posteriores.

En este estudio también se detectaron secuencias *dsrB* relacionadas con *Nitrospirota* (antes *Nitrospirae* o *Nitrospira*) (Umezawa et al. 2020) y *Euryarchaeota* (Fig. 13). El linaje *Nitrospirota* está formado por secuencias de miembros cultivados de *Thermodesulfovibrio*, mientras que las arqueas sulfato-reductoras de *Euryarchaeota* solo incluye secuencias ambientales de *Archaeoglobus*. *Thermodesulfovibrio* y *Archaeoglobus* representan los grupos termófilos de bacterias y arqueas sulfato-reductoras, respectivamente. El análisis de secuencias *DsrAB* en *Thermodesulfovibrio* y *Archaeoglobus* ha sugerido la adquisición de genes *dsrAB* mediante transferencia lateral a partir de un organismo de las *Deltaproteobacteria* (Klein et al. 2001; Müller et al. 2015). A pesar de llevar un estilo de vida termófilo (Dhillon et al. 2003; Mori et al. 2008; Frank et al. 2013, 2016), *Thermodesulfovibrio*, *Archaeoglobus* y otros MSR termófilos, han sido detectados en ambientes marinos no termales (Blazejak and Schippers 2011; Rezende et al. 2013; Müller et al. 2014; Zhang et al. 2017) como fue el caso en este trabajo.

El análisis filogenético de las secuencias *dsrB* no asignadas también permitió la detección de grupos ambientales conformados solo por OTUs obtenidos en este estudio (grupos GoM del 1 al 13; Fig. 13). Estos grupos pueden representar linajes ambientales del Golfo de México cuyos miembros aún no han sido cultivados o que no han sido reconocidos como poseedores de genes *dsrAB*, lo que sugiere una diversidad aún inexplorada de microorganismos que contienen estos genes en la región de estudio, como se ha reportado para otras localidades (Müller et al. 2015). Müller et al. (2015) recomiendan utilizar un umbral conservador del 90% de identidad de las secuencias *dsrAB*, ya que dos organismos con un 90% de identidad *dsrAB* suelen corresponder a un 99% de identidad del 16S y probablemente se trate de dos especies diferentes. Por lo tanto, para que los OTUs de este trabajo puedan ser considerados como linajes *dsrAB* nuevos del Golfo de México es necesario realizar más estudios que ayuden a resolver la identidad de los MSR basados en la filogenia de genes *dsrAB* con criterios conservadores de identidad.

Además, en este estudio se observaron secuencias relacionadas con bacterias oxidantes de sulfuro (BOS) formando un linaje ramificado claramente separado de los MRS (grupo GoM

13; Fig. 13). Este grupo puede representar filotipos bacterianos del Golfo de México que oxidan compuestos de azufre con genes *dsrAB* en su genoma. En estudios previos también se han detectado genes *dsrAB* en BOS, utilizando primers para la amplificación de secuencias *dsrAB* de tipo reductor bacteriano (Müller et al. 2015). Otros genes como los *aprBA* y *soxAB* han servido como marcadores moleculares alternativos para el análisis de la comunidad de MSR y BOS, ya que estos genes codifican enzimas involucradas en la sulfato-reducción y en la oxidación de compuestos de azufre (Meyer and Kuever 2007; Haruta et al. 2013; Tian et al. 2017). Por lo tanto, la descripción de la diversidad de MSR y BOS en el NOGM podría abordarse en estudios adicionales evaluando otros genes funcionales como marcadores moleculares.

3.5.2. COMUNIDAD DE MICROORGANISMOS SULFATO-REDUCTORES Y VARIABLES AMBIENTALES

En todos los sitios de muestreo las concentraciones de OD ($>2 \text{ mg L}^{-1}$; Anexo 1) indicaron condiciones óxicas en el fondo de la columna de agua (Kim and Min 2013), lo cual coincide con lo reportado anteriormente para el NOGM (Soto and Vázquez-Botello 2013; Ramírez et al. 2019). La concentración de oxígeno en el agua de fondo puede afectar la bioquímica de los sedimentos (Middelburg and Levin 2009) y la distribución y supervivencia de los MSR (Ramsing et al. 1993; Colin et al. 2016). Sin embargo, en el presente estudio la concentración de OD no se asoció con el cambio en las comunidades de MSR. Esto puede sugerir la presencia de MSR (e.g., *Desulfobacteraceae* o *Desulfovibrionaceae*) que pueden sobrevivir a la exposición de oxígeno en los sedimentos superficiales (Ramsing et al. 1993; Krekeler et al. 1998; Bade et al. 2000; Cypionka 2000; Sass et al. 2002; Ramel et al. 2013).

A pesar de las condiciones óxicas en el fondo de la columna de agua, sedimentos de los grupos I y II con $<1000 \text{ m}$ de profundidad, presentaron valores redox electronegativos sugiriendo condiciones ambientales anóxicas (Anexo 1), lo cual es típico de los sedimentos del margen continental debido a los procesos respiratorios de la propia comunidad bacteriana, o de otros

organismos que agotan el oxígeno disponible (Jørgensen 1982; Wieringa et al. 2000; Lukawska-Matuszewska and Kielczewska 2016). Los sedimentos de los grupos I y II presentaron la mayor riqueza y diversidad de MSR, incluso en aquellos con un redox electropositivo (Fig. 9; Anexo 1). El redox electropositivo en estos sitios sugirió condiciones óxicas posiblemente originadas por la perturbación del sedimento, a causa del movimiento de las masas de agua o de la fauna bentónica, permitiendo con esto la difusión del oxígeno de la columna de agua a la capa superficial sedimentaria (Eggleton and Thomas 2004; Cravo-Laureau and Duran 2014). Una alta riqueza y diversidad en sedimentos posiblemente oxigenados puede apoyar la idea de la presencia de MSR capaces de adaptarse a la exposición de oxígeno, incluso se ha mencionado que una breve exposición de oxígeno podría ser benéfica para los microorganismos anaerobios en sedimentos marinos (Aller 1994).

Los sedimentos profundos (≥ 1000 m) presentaron condiciones oxidantes (Anexo 1) que pueden atribuirse a las tasas de consumo de O_2 extremadamente bajas que caracterizan estos ambientes (Fischer et al. 2009). En general la diversidad y abundancia de MSR disminuyeron al aumentar la profundidad (Anexo 5). Sin embargo, *Desulfovibrio* y *Desulfotomaculum* persistieron en los sedimentos de sitios profundos, y *Desulfosporosinus*, *Desulfobacteraceae* y *Chlorobi* incluso aumentaron su abundancia relativa (Figs. 10, 11 y 12). En trabajos previos se ha reportado que *Desulfovibrio*, *Desulfotomaculum* y *Desulfosporosinus* pueden crecer de forma quimiolitótrofa con hidrógeno más sulfato, e incluso utilizar otros aceptores de electrones como el O_2 . Por su parte *Desulfotomaculum* y *Desulfosporosinus* pueden sobrevivir bajo las condiciones del ambiente profundo (Bade et al. 2000; Cypionka 2000; Fichtel et al. 2008; Gittel et al. 2008; Anantharaman et al. 2018), es decir, con bajas temperaturas, alta presión hidrostática, escasa disponibilidad de fuentes de carbono lábiles y bajas tasas sedimentarias (Parkes and Sass 2007). Bacterias de *Desulfobacteraceae* son O_2 -tolerantes abundantes en sedimentos marinos superficiales (Kaneko et al. 2007; Colin et al. 2016; Jochum et al. 2017) y microorganismos afiliados con *Chlorobi* han sido relacionados con la oxidación aerobia de compuestos de azufre (e.g., sulfuro) para la fijación de nitrógeno (Vuillemin et al. 2018). Estas características metabólicas y fisiológicas pueden explicar la

detección de estos grupos en sitios profundos oxigenados. La presencia, tanto de MSR como de BOS, puede ser indicativo de los procesos redox involucrados en las transformaciones cíclicas de los compuestos de azufre en ambientes óxicos.

Si bien se detectaron secuencias *dsrB* relacionadas con MSR termófilos del género *Desulfotomaculum* (Fig. 12), la temperatura *in situ* de los sitios de estudio (Anexo 1) no correspondió al rango que permite el crecimiento de estos organismos (> 50 °C) (Isaksen et al. 1994; Fichtel et al. 2008; Gittel et al. 2008; Rezende et al. 2013; Müller et al. 2014). Otros estudios han reportado la presencia de endosporas termófilas de *Desulfotomaculum* en sedimentos marinos del norte del Golfo de México (Chakraborty et al. 2018). Esto permite sugerir que, como endosporas, a menudo consideradas metabólicamente inertes (Lennon and Jones 2011), miembros del género *Desulfotomaculum* podrían encontrarse en un estado inactivo de tal forma que no contribuirían con la reducción de sulfato en los sitios estudiados. Por otra parte, también es razonable considerar que las secuencias relacionadas con este género representen filotipos no termófilos y puedan desarrollarse bajo las temperaturas que dominan en el NOGM, lo que podría evaluarse en estudios posteriores.

Los cambios en la estructura de los MSR también se correlacionaron con el contenido de Ni y Cd en el sedimento (Anexo 5). Los metales pesados pueden afectar la composición y actividad de los MSR (Cabrera et al. 2006; Islamud-Din et al. 2014; Hussain and Qazi 2016). Se ha reportado que el Cd puede inhibir el crecimiento microbiano, e incluso causar la muerte celular a concentraciones de 0.1 mg / kg (Khan et al. 2019). Sin embargo, los MSR han mostrado diferentes respuestas a los metales pesado por lo que algunos pueden desarrollarse con éxito en entornos contaminados con metales (Quillet et al. 2012; Islamud-Din et al. 2014; Ni et al. 2015). En el presente estudio las concentraciones de Cd fueron >0.1 mg / kg (Anexo 1). Datos experimentales han indicado que especies de *Desulfovibrio*, *Desulfomicrobium* y *Desulfotomaculum* presentan tolerancia y resistencia a los metales. La producción de proteínas específicas de unión al Ni en *Desulfotomaculum* puede representar un mecanismo de desintoxicación, mientras que la acumulación intracelular de Cd en *Desulfovibrio* sugiere la presencia de mecanismos de unión y/o transporte intracelular de Cd permitiendo resistir la

toxicidad de los metales (Fortin et al. 1994; Naz et al. 2005). Se sabe que *Desulfovibrio* y miembros de las *Desulfobacteraceae* poseen hidrogenasas periplásmicas que contienen Ni (Caffrey et al. 2007; Dyksma et al. 2017), en estos casos el Ni podría ser utilizado como un micronutriente. En el presente trabajo *Desulfovibrio*, *Desulfomicrobium* y *Desulfotomaculum* fueron abundantes en los sedimentos profundos donde se determinó el mayor contenido de Ni y Cd (Anexo 2). Por lo tanto, es posible que los MSR detectados en estos ambientes contribuyan con la resiliencia y estabilidad de las comunidades microbianas sedimentarias que experimentan contaminación por metales pesados en la región de estudio.

3.6. CONCLUSIONES

En este capítulo se determinó la estructura de los MSR en sedimentos del NOGM mediante la secuenciación del gen *dsrB*. Las comunidades de MSR fueron predominantemente compuestas por *Proteobacteria* (*Desulfovibrio* y *Desulfobacteraceae*) y *Firmicutes* (*Desulfotomaculum*) en todos los sitios. Aunque, también se detectaron los filas *Actinobacteria*, *Thermodesulfobacteria* y *Chlorobi*. Secuencias *dsrB* sin asignación taxonómica se relacionaron con *Euryarchaeota*, con grupos ambientales previamente reportados, así como con los supergrupos *Deltaproteobacteria* y *Nitrospirota*. También se detectaron linajes ambientales conformados exclusivamente por secuencias *dsrB* obtenidas en este estudio. El análisis PERMANOVA indicó que la profundidad del agua, la temperatura, el redox y el contenido de Ni y Cd se asociaron con los cambios en la estructura de la comunidad de MSR. La alfa-diversidad y la abundancia de los MSR disminuyeron con la profundidad. La disminución de la abundancia con el aumento de la profundidad sugirió una menor actividad sulfato-reductora en los sitios más profundos. Este estudio contribuyó a la comprensión de la distribución y composición de los microorganismos que poseen el gen *dsrB* en su genoma, y que pueden favorecer la resistencia y estabilidad de las comunidades microbianas en sedimentos que pueden presentar contaminación por metales en el NOGM, una región de gran interés para la obtención de petróleo.

4. CAPÍTULO IV. ESTIMULACIÓN DE LA ACTIVIDAD SULFATO-REDUCTORA POR LA TEMPERATURA Y LA ADICIÓN DE SUSTRATOS EN SEDIMENTOS DEL GOLFO DE MÉXICO

4.1. INTRODUCCIÓN

Los microorganismos sulfato-reductores (MSR) tienen el papel de contribuir a completar los procesos de degradación de la MO mediante la mineralización de moléculas simples a CO₂ (Hines 2003; Rabus et al. 2013). Además, están implicados en otros procesos fundamentales ya que modulan el pH del entorno, contribuyen a regular las condiciones de hipoxia en la fase sedimento-agua, son fundamentales para la precipitación de metales y conforman el principal control biológico de las emisiones de metano del océano a la atmósfera (Jørgensen and Boetius 2007; Muyzer and Stams 2008; Knittel and Boetius 2009; Orcutt et al. 2010; Egger et al., 2018).

El metabolismo sulfato-reductor es un proceso energéticamente más favorable que la fermentación y la metanogénesis. En entornos anóxicos ricos en sulfato como los sedimentos marinos, los MSR compiten con otros microorganismos por los sustratos comunes (e.g., hidrógeno, formato, acetato, propionato) canalizando un flujo considerable de carbono y electrones hacia la reducción de sulfato (Muyzer and Stams 2008; Liu and Conrad 2014).

Entre estos sustratos comunes, el acetato (Ac) y el propionato (Pr) son de gran interés ya que son los principales productos de la fermentación en ambientes sin oxígeno (Dar et al. 2008; van den Brand et al. 2014). En los sedimentos marinos anóxicos, el Ac y el Pr son cuantitativamente los ácidos grasos volátiles más importantes (Parkes et al. 1993). A pesar de esto, las concentraciones de Ac y Pr en estos ambientes suelen ser bajas debido a que son consumidos principalmente por los MSR (Sørensen et al. 1981; Abildgaard et al. 2004).

Algunos MSR pueden oxidar incompleta o parcialmente propionato, a acetato e hidrógeno, mientras que otros oxidan completamente (mineralizan) el acetato a CO₂. Aunque fisiológicamente distintos, los MSR oxidadores incompletos (OxI) coexisten con los oxidadores completos (OxC) a quienes pueden suministrar acetato, y con ello completar la

degradación de los compuestos orgánicos (Muyzer and Stams 2008; Rabus et al. 2015). OxI afiliados con *Desulfovibrionaceae*, *Syntrophobacteraceae* y *Desulfobulbaceae*, son capaces de utilizar propionato como fuente de electrones, mientras que los OxC afiliados con *Desulfotomaculum*, *Desulfobacteraceae*, *Syntrophaceae* y *Desulfoarcuaceae* utilizan acetato (Rabus et al. 2013). Estos grupos, detectados en sedimentos marinos de diferente profundidad de la columna de agua (Bagwell et al. 2009; Kimes et al. 2013; Devereux et al. 2015; He et al. 2015), sugieren una diversidad de metabolismos y estilos de vida que les permite sobrevivir bajo diferentes condiciones ambientales (Plugge et al. 2011).

Los donadores de electrones y la temperatura se han señalado como las principales fuerzas selectivas de los MSR en la naturaleza (Holmer and Kristensen 1996; Ravenschlag et al. 2000; Joye et al. 2004; Bagwell et al. 2009; Frank et al. 2013; Roussel et al. 2015). Esto se ha evaluado en el laboratorio de forma separada. El efecto de los donadores de electrones se ha evaluado en sedimentos de latitudes árticas y subárticas, demostrando la influencia de los donadores y aceptores de electrones sobre la actividad y composición de los MSR (Parkes et al. 1993; Finke et al. 2007; Glombitza et al. 2015, 2019). Asimismo, la incubación de sedimentos bajo diferentes temperaturas ha demostrado el control que ejerce esta variable sobre la actividad de los MSR marinos mediante la selección de organismos capaces de adaptarse a los cambios de temperatura del ambiente manteniendo la fluidez de la membrana, necesaria para mantener sus funciones biológicas (Sawicka et al. 2012; Fichtel et al. 2015; Robador et al. 2016).

Recientemente un estudio sobre los MSR en sedimentos de diferente profundidad (44-3548 m) en el noroeste del Golfo de México (NOGM), reportó la dominancia de *Desulfovibrio* (de los OxI) y *Desulfotomaculum* (OxC) en todas las profundidades, aunque una importante fracción de la comunidad representó una diversidad de microorganismos de la que se desconoce su taxonomía y potencial función (Sánchez-Soto et al. 2020). En el estudio de Sánchez-Soto et al., (2020) se observó que los cambios en la estructura y actividad de los MSR correlacionaron con la temperatura, la profundidad, el potencial redox y el contenido de metales. No obstante, hasta ahora no hay estudios de laboratorio que hayan evaluado la

influencia de variables específicas sobre la actividad de los MSR en esta región que permitan explorar el potencial fisiológico de los MSR y discutir su importancia en la reducción de sulfato en sedimentos con diferente temperatura y en presencia de diferentes sustratos. Por lo tanto, en este capítulo se propone evaluar la actividad sulfato-reductora bajo diferentes temperaturas (4 °C y 37 °C) y sustratos (acetato y propionato) de sedimentos del NOGM.

4.2. OBJETIVO

- Evaluar la actividad sulfato-reductora en reactores batch con diferentes temperaturas (4 °C y 37 °C) y sustratos (acetato y propionato).

4.3. MATERIALES Y MÉTODOS

4.3.1. DISEÑO EXPERIMENTAL

A partir de los sedimentos colectados durante la campaña Perdido-03 (mayo 2017) se seleccionaron 2 muestras de sedimentos de sitios someros obtenidos a una profundidad de agua de 50.4 y 93 m, y 2 muestras de sedimento de sitios profundos obtenidos a una profundidad de 3254.7 y 3548 m (Fig. 15). Las incubaciones se realizaron en botellas serológicas sacrificables de 120 ml previamente esterilizadas a las que se añadieron 10 g de sedimento y 30 ml de medio de cultivo. El oxígeno de la fase gaseosa en las botellas se sustituyó con N₂ y se sellaron con tapones de caucho y aros de aluminio.

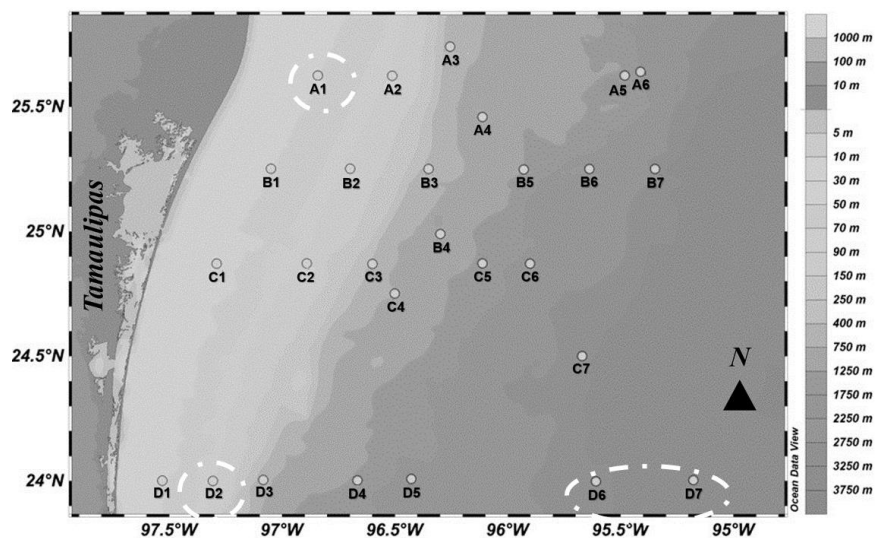


Figura 15. Sitios de colecta de muestras de sedimento en el Noroeste del Golfo de México. Los círculos con líneas discontinuas indican los sedimentos utilizados para evaluar la actividad sulfato-reductor en experimentos de microcosmos.

Las incubaciones se realizaron determinando una demanda química de oxígeno (DQO) de 5 g DQO/L para los sustratos utilizados. Dichas incubaciones iniciaron con una relación DQO/SO_4^{2-} de 0.67. Las incubaciones se realizaron por duplicado a 4 °C y 37 °C, en obscuridad y sin agitación, agregando acetato (Ac) y propionato (Pr) por separado como sustratos. Cada tratamiento incluyó un control al que no se añadió alguna fuente de carbono extra. Para las incubaciones se utilizó medio basal marino (L^{-1} de agua) añadiendo 1 g de NH_4Cl , 0.044 mg de K_2HPO_4 , 0.028 g de $FeSO_4 \cdot 7H_2O$, en agua marina artificial (L^{-1} de agua destilada) preparada con 22.19 g de $NaCl$, 19.22 g de $MgSO_4^{2-} \cdot 7H_2O$, 1.5 g de KCl y 12.9 g de $CaCl_2$ (modificado de (Xu et al. 2011)). También se añadieron 3 ml de solución con oligoelementos (en $mg L^{-1}$: 2000 mg de $FeCl_2 \cdot 4H_2O$, 785 mg de $MnCl_2 \cdot 4H_2O$, 50 mg de $ZnCl_2$, 50 mg de H_3BO_3 , 50 mg de $(NH_4)Mo_7O_{24} \cdot 4H_2O$, 500 mg de EDTA y 1 ml L^{-1} de HCl al 37%). Por separado se agregaron 7.04 g L^{-1} de acetato de sodio y 4.76 ml de propionato.

4.3.2. MÉTODOS ANALÍTICOS

La concentración de SO_4^{2-} se determinó por el método turbidimétrico en el que los iones de sulfato precipitaron (con cloruro de bario) como sulfato de bario y la turbidez de la solución se analizó con un espectrofotómetro a 420 nm (Kolmert et al. 2000). La cuantificación de sulfato se realizó a los días 5, 10 y 15 en los que se midieron el pH y el potencial redox con sensores específicos. Se realizó un análisis de varianza de una vía utilizando el programa InfoStat (versión 2016) para analizar la posible existencia de diferencias significativas (p -valor <0.05) del consumo (remoción) de sulfato entre los tratamientos, y los datos se graficaron con el programa SigmaPlot (versión 10.0). La velocidad de consumo a los 15 días del experimento se obtuvo con la fórmula $\frac{\Delta[\text{sulfato}]}{\Delta\text{tiempo}}$ expresada en mmol de sulfato día⁻¹. Además, se realizó un análisis de diseño factorial para observar las variables que afectaron positivamente el consumo de sulfato en las incubaciones de laboratorio. Las variables consideradas en el diseño factorial fueron: temperatura de incubación (4 °C y 37 °C), profundidad promedio de los sitios de colecta (sitios someros=50.4 y 93 m; sitios profundos=3254.7 y 3548 m), fuentes de carbono (acetato y propionato), comunidades (someras y profundas), así como los efectos combinados de estos 4 factores sobre la remoción de sulfato ($p < 0.05$). En el análisis factorial se consideró la concentración de sulfato de los duplicados de las incubaciones con Ac y Pr restando la del respectivo control. El análisis factorial y los gráficos se obtuvieron con el software Design Expert® (versión 7.0).

4.4. RESULTADOS

4.4.1. CONSUMO DE SULFATO EN EXPERIMENTOS DE INCUBACIÓN

4.4.1.1. SITIOS SOMEROS

Los sedimentos de sitios someros incubados a 4 °C consumieron un promedio de 11.7 ± 2.4 mM (~15.8%) de sulfato sin mostrar diferencias significativas ($p > 0.05$) entre tratamientos

(Fig. 16a). En las incubaciones a 4 °C el consumo de sulfato solo se observó a los cinco días del experimento (Fig. 16a) manteniéndose sin cambios a los diez y quince días. Por el contrario, cuando los sedimentos de sitios someros se incubaron a 37 °C el sulfato se consumió hasta el final del experimento sin alcanzar la asíntota a los quince días de incubación (Fig. 16b). A los quince días, el consumo de sulfato a 37 °C fue significativamente mayor con acetato alcanzando un consumo final de 29.1 ± 5.7 mM (~39.3%), seguido por el propionato y el control con 18.7 ± 4.7 (~25.2%) y 12.2 ± 1.7 mM (~16.5%), respectivamente.

El análisis de varianza mostró diferencias significativas en la velocidad de consumo de sulfato entre temperaturas ($R^2 = 0.64$, $F_{1,8} = 21.6$, $p = 0.002$) y tratamientos ($R^2 = 0.64$, $F_{2,8} = 6.7$, $p = 0.006$) indicando que, el sulfato se consumió más rápido en los sedimentos de sitios someros incubados a 37 °C con acetato (Tabla 3).

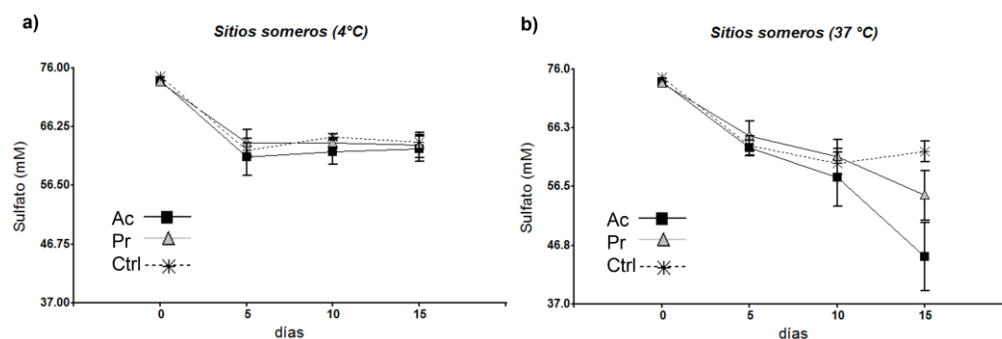


Figura 16. Cambios en la concentración de sulfato en sedimentos de sitios someros. Incubación por duplicado a 4C (a) y 37C (b) con acetato (Ac) y propionato (Pr). Sedimentos control (Ctrl) incubados sin añadir fuente de carbono extra.

El pH aumentó en los todos sedimentos de sitios someros al final del experimento, aunque no se encontró un patrón con respecto a los cambios en la concentración de sulfato. El pH inicial de 6.5 aumentó en promedio a 7.4 ± 0.4 en las incubaciones a 4 °C, y a 7.3 ± 0.3 en las incubaciones a 37 °C. A los 15 días de incubación el potencial redox disminuyó en promedio a -41.3 ± 22.3 a 4 °C, y -34.4 ± 19.4 a 37 °C.

Tabla 3. Velocidad de consumo de sulfato en sedimentos de sitios someros y profundos incubados bajo diferentes condiciones. Incubaciones a 4 y 37 °C con Acetato, Ac y propionato, Pr. Sedimentos control, Ctrl, sin fuente de carbono añadida. Promedio \pm desviación estándar de las incubaciones realizadas por duplicado. Velocidad de consumo de sulfato en mmol día⁻¹.

Tratamiento	Sitios someros		Sitios profundos	
	4 °C	37 °C	4 °C	37 °C
Ac	0.76 \pm 0.14	1.94 \pm 0.38	0.97 \pm 0.11	0.73 \pm 0.13 _b
Pr	0.7 \pm 0.14	1.24 \pm 0.28	0.87 \pm 0.17	0.61 \pm 0.07 _b
Ctrl	0.73 \pm 0.08	0.82 \pm 0.11	1 \pm 0.17	0.76 \pm 0.16 _b

4.4.1.2. SITIOS PROFUNDOS

Los sedimentos de sitios profundos incubados a 4 °C no presentaron diferencias significativas ($p < 0.05$) en el consumo de sulfato entre los controles y los microcosmos enriquecidos con acetato y propionato (Figs. 17a). El consumo de sulfato en las incubaciones a 37 °C tampoco mostró diferencias significativas entre los tratamientos (Fig. 17b). Sin embargo, el análisis de varianza indicó que, al final del experimento (día quince) el consumo de sulfato fue significativamente ($R^2 = 0.6$, $F_{1,24} = 24.94$, $p = 0.0001$) mayor a 4 °C, alcanzando la remoción de 14.2 ± 1.6 mM de sulfato (19.2%) a los quince días, mientras que a 37 °C la remoción de sulfato fue de 10.5 ± 2 mM (14.2%).

El análisis de varianza mostró diferencias significativas en la velocidad de consumo de sulfato solo entre temperaturas ($R^2 = 0.6$, $F_{1,8} = 7.75$, $p = 0.03$) indicando que el sulfato se consumió más rápido en los sedimentos de sitios profundos incubados a 4 °C (Tabla 3).

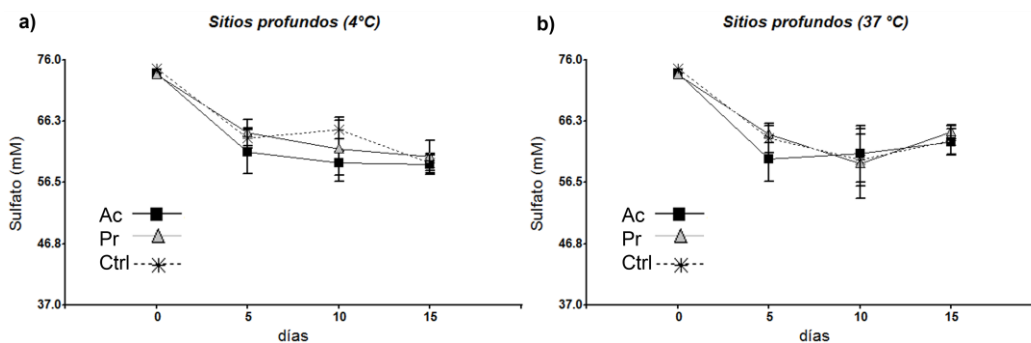


Figura 17. Concentración de sulfato en microcosmos durante los experimentos de incubación de sedimentos de sitios profundos. Incubación por duplicado a 4 (a) y 37 °C (b) con acetato (Ac) y propionato (Pr) individualmente como fuentes de carbono y energía. Sedimentos control (Ctrl) incubados sin añadir fuente de carbono extra.

El pH aumentó en todos los sedimentos profundos al final del experimento, aunque no se encontró un patrón relacionado con el cambio en la concentración de sulfato. El pH inicial de 6.5 aumentó en promedio a 6.8 ± 0.1 en las incubaciones a 4 °C, y 6.9 ± 0.1 en las incubaciones a 37 °C. A los 15 días de incubación el potencial redox disminuyó en promedio a -7.5 ± 2.1 a 4 °C, y a -13 ± 5.3 a 37 °C.

4.4.2. ANÁLISIS FACTORIAL PARA EVALUAR DE LA REMOCIÓN DE SULFATO

El análisis factorial indicó que el consumo de sulfato a los 5 días fue significativamente ($p < 0.05$) mayor con la adición de sustratos, tanto en sedimentos de sitios someros como profundos, sin embargo, el acetato fue el que tuvo mayor incidencia sobre la remoción de sulfato en ese tiempo (Fig. 18a). A los 10 días de incubación la remoción de sulfato fue estimulada significativamente ($p < 0.05$) a 4 °C (Fig. 18b). Al final del experimento (quince días) se encontró que la incubación de sedimentos de sitios someros a 37 °C con acetato fueron las condiciones que más estimularon la remoción de sulfato (Fig. 18c, d y e).

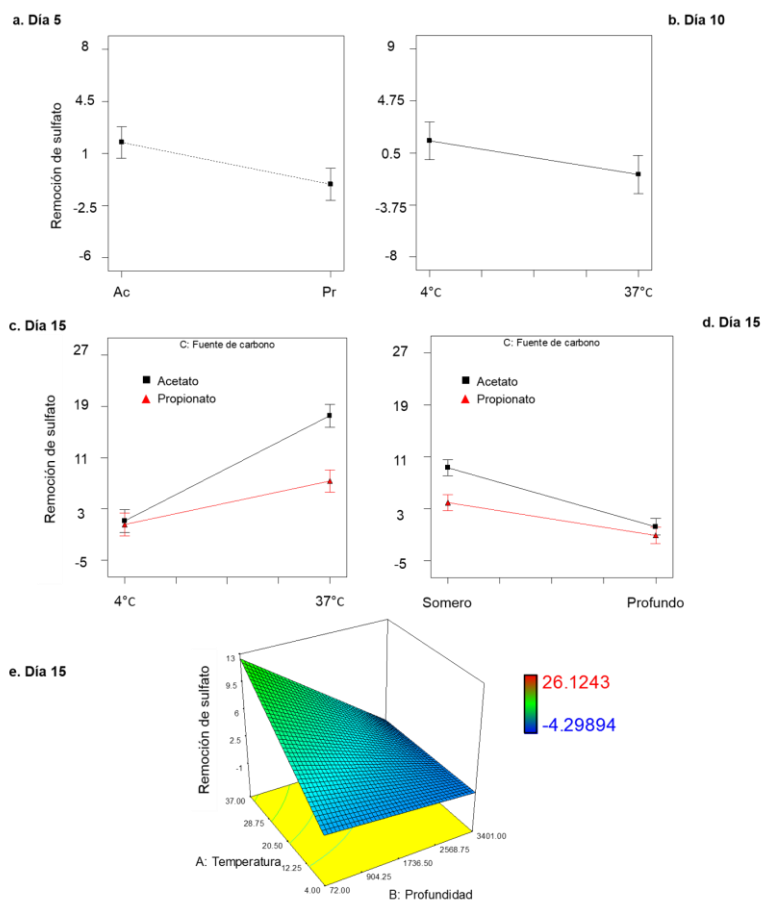


Figura 18. Diseño factorial. Efecto de la temperatura (4 y 37 °C), la profundidad del sitio de colecta (sitios someros 50.4 y 93 m; sitios profundos 3254 y 3548 m), los donadores de electrones (acetato (Ac) y propionato (Pr)) y tipo de muestra (sitios someros y profundos). Sedimentos incubados por duplicado. Valor de significancia $p < 0.05$.

4.5. DISCUSIÓN

4.5.1. ACTIVIDAD SULFATO-REDUCTORA Y TEMPERATURA

Los resultados del presente capítulo mostraron que, en los sedimentos de sitios someros la actividad sulfato-reductora a 37 °C incrementó significativamente y se mantuvo hasta el final del experimento (Figs. 16b, 18e) en relación con la incubación a 4 °C (Fig. 16a), mientras que en los sedimentos de sitios profundos la actividad sulfato-reductora permaneció hasta el final

de la incubación a 4 °C (Fig. 17a). En otros estudios, la actividad sulfato-reductora observada en sedimentos marinos de diferente latitud y profundidad han sugerido que el régimen de la temperatura selecciona las poblaciones microbianas mejor adaptadas a su entorno (Sawicka et al. 2012). La incubación de sedimentos permanentemente cálidos (26-30 °C) de la plataforma continental en latitudes tropicales ha corroborado la dominancia de MSR mesófilos en estos ambientes con una actividad óptima cercana a la temperatura de su ambiente (Robador et al. 2016). De acuerdo con esto, es factible plantear que, en los sedimentos de sitios someros utilizados en este capítulo, con una temperatura promedio *in situ* de 22.7 °C (Anexo 1), puedan predominar los MSR adaptados a temperaturas cálidas (i.e., MSR mesófilos), mientras que, en los sedimentos de sitios profundos, con una temperatura promedio de 4.8 °C, pueden predominar los MSR adaptados a bajas temperaturas (i.e., psicrófilos y psicotolerantes). De tal manera que las incubaciones a 37 °C favorecieron la remoción de sulfato en los sedimentos de sitios someros y las incubaciones a 4 °C favorecieron la remoción de sulfato en los sedimentos de sitios profundos.

Las velocidades de consumo de sulfato obtenidas en este capítulo pueden no ser representativas de las del ambiente natural. Sin embargo, los resultados sugieren la presencia de MSR capaces de remover sulfato en un amplio rango de temperatura en los sedimentos utilizados (Tabla 3). La remoción de sulfato en sedimentos de sitios profundos incubados a 37 °C (Fig. 17b) puede sugerir la presencia de MSR mesófilos en estos ambientes. La incubación de sedimentos marinos de latitudes templadas ha mostrado la presencia de MSR con adaptaciones a temperaturas muy diferentes, tales como los MSR psicrófilos y mesófilos con tasas respiratorias óptimas a 19 °C y entre los 30 y 35 °C, respectivamente (Isaksen and Jørgensen 1996). Esto ha señalado que la actividad sulfato-reductora en sedimentos marinos debe interpretarse como la combinación de las tasas respiratorias de muchas poblaciones diferentes (Robador et al. 2016). Las fluctuaciones estacionales de la temperatura (Sawicka et al. 2012) y el transporte pasivo por el movimiento de las masas de agua cercanas al fondo (Schauer et al. 2010) se han propuesto como una explicación para formación de comunidades sulfato-reductoras con características de temperatura mixta. En el NOGM los remolinos

anticiclónicos de la Corriente de Lazo pueden afectar el flujo profundo, y con ello, influir sobre la dispersión de organismos (Meza-Padilla et al. 2019). Este proceso podría contribuir al transporte de MSR mesófilos provenientes de ambientes someros hacia sedimentos de sitios profundos, y con ello, explicar la actividad sulfato-reductora en las incubaciones a 37°C en dichos sedimentos (Fig. 17b). Este planteamiento se ha comprobado en otros estudios (Sawicka et al. 2012).

4.5.2. ACTIVIDAD SULFATO-REDUCTORA Y FUENTES DE CARBONO

Si bien, al inicio de las incubaciones enriquecidas con Ac y Pr la relación DQO/SO₄²⁻ (0.68) fue la misma, los sedimentos enriquecidos con Ac presentaron una mayor actividad sulfato-reductora en relación con el Pr (Tabla 3; Figs. 18a, c y d). En otros estudios se ha evaluado la importancia de sustratos individuales sobre la sulfato-reducción en sedimentos de los fiordos del Ártico mostrando que hasta el 40% de la reducción de sulfato puede corresponder al acetato y solo el 8% al propionato, con tasas sulfato-reductoras de 14 nmol cm⁻³ d⁻¹ para el acetato y 1.6 nmol cm⁻² d⁻¹ para el propionato (Finke et al. 2007; Glombitza et al. 2015). En el presente estudio, la mayor actividad sulfato-reductora con acetato sugiere que, en relación con el Pr, el Ac puede ser el principal sustrato para la reducción de sulfato en los sedimentos estudiados (Fukui et al. 1997), posiblemente por una mayor abundancia de MSR OxC (e.g., *Desulfotomaculum*, *Desulfoarculus*, *Desulfatiglans*) en estos ambientes como se ha reportado para otros sedimentos marinos (Ravenschlag et al. 2000; Beulig et al. 2017). El análisis de la composición de las comunidades sulfato-reductoras de las incubaciones de laboratorio podría ayudar a soportar este argumento; sin embargo, en este estudio no se llevó a cabo.

En el ambiente marino, el acetato es un intermediario clave en la degradación de la MO y es uno de los principales sustratos para el crecimiento de los MSR (Oude et al. 1998). La acumulación de compuestos orgánicos en el ambiente provocaría problemas de eutrofización no deseados. Por lo tanto, los MSR oxidadores de acetato, los OxC, representan un mecanismo

importante para regular la concentración de sustratos orgánicos en el entorno (Sørensen et al. 1981; Glombitza et al. 2015). Además, dado que los MSR de oxidadores de acetato son más difíciles de cultivar que los MSR de oxidación incompleta (OxI), y que son más sensibles a las condiciones de cultivo (Koschorreck et al. 2004), los resultados de este estudio pueden ser relevantes para el conocimiento de los factores que estimulan la remoción de sulfato en reactores batch enriquecidos con acetato.

Por otra parte, la menor remoción de sulfato con Pr puede atribuirse a que la oxidación de propionato, a acetato e H_2 , es una reacción poco favorable energéticamente (Müller et al. 2010). Un aumento en la relación Pr/SO_4^{2-} en sedimentos incubados podría estimular la reducción de sulfato para la oxidación de Pr (Ghigliazza et al. 2000), lo que podría evaluarse en estudios posteriores para optimizar el metabolismo sulfato-reductor con donadores de electrones específicos. Otra explicación viable de la menor actividad sulfato-reductora en las incubaciones con Pr del presente estudio (Figs. 18a, c y d) puede relacionarse con la composición de la comunidad microbiana. La oxidación de propionato a acetato e H_2 puede acoplarse directamente a la reducción del sulfato o acoplarse sintróficamente a microorganismos H_2 -dependientes (Liu and Conrad 2014). En este último caso los microorganismos que mantienen una baja concentración de H_2 (e.g., MSR y metanógenos) facilitan la oxidación del Pr por sulfato-reducción (Harmsen et al. 1998; Müller et al. 2010). También se ha reportado que el consumo de Pr puede ser dominado por organismos de fermentación secundaria (Glombitza et al. 2019). Considerando lo anterior, es posible que las condiciones de incubación utilizadas inhibieran a los microorganismos que actúan como socios de los MSR sintróficos oxidantes de propionato, o bien, que la fermentación secundaria sea el proceso principal en la degradación de Pr en los sedimentos analizados y no el metabolismo sulfato-reductor.

Como se mencionó antes, la oxidación del Pr puede acoplarse directamente a la reducción del sulfato. De acuerdo con esto es probable que, la reducción de sulfato con Pr en los sedimentos de sitios someros (Fig. 18d), se deba a una mayor abundancia de MSR oxidadores de Pr, como *Desulfobulbus*, *Desulforhopalus*, *Desulfofaba* (Kremer and Hansen 1988b; Harmsen et al.

1998; Abildgaard et al. 2004), los cuales se han reportado en sedimentos de la plataforma continental (Liu et al. 2003; Ramírez et al. 2019). Esta premisa podría probarse en estudios futuros con el análisis de la composición de las comunidades microbianas en los sedimentos incubados. Esto daría información valiosa sobre los grupos fisiológicos de los MSR (e.g., oxidadores completos, oxidadores incompletos e hidrogenótrofos) en estos ambientes poco explorados.

Finalmente, la actividad en los sedimentos no enriquecidos pudo ser estimulada por el exceso de sulfato en el medio (2.6 veces mayor que en el agua marina) (Choi and Rim 1991; Parkes et al. 1993). Con base en los datos experimentales, la remoción de sulfato en los sedimentos control señalaron la existencia de microorganismos capaces de remover sulfato en sedimentos bajo condiciones mesófilas y psicrófilas en sedimentos con bajo contenido orgánico (<2%) como los sedimentos utilizados en este estudio (Anexo 1).

4.6. CONCLUSIONES

Los datos experimentales de este capítulo mostraron actividad sulfato-reductora en todos los sedimentos incubados a 4 °C y 37 °C con y sin la adición de sustratos. Esta última condición corroboró actividad sulfato-reductora en sedimentos que se caracterizan por presentar bajo contenido orgánico, situados en sitios profundos y con bajas temperaturas. Los resultados del análisis factorial además mostraron que la incubación de sedimentos de sitios someros a 37 °C con acetato fueron las condiciones que más estimularon el metabolismo sulfato-reductor en sedimentos que no habían sido explorados previamente. Dicho hallazgo sugiere una mayor contribución del acetato sobre la actividad sulfato-reductora en los sedimentos de sitios someros, por lo que se espera una mayor abundancia de MSR mesófilos oxidadores completos en los ambientes de menor profundidad. Los resultados de este capítulo pueden contribuir al conocimiento del diseño de sistemas que favorezcan el metabolismo sulfato-reductor en sedimentos marinos con fines biotecnológicos.

5. CAPÍTULO V. DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES GENERALES

- La reciente caracterización de las comunidades procariotas en la región mexicana en el NOGM se ha realizado mediante el análisis de secuencias del gen 16S ARNr (Sánchez-Soto et al. 2017; Ramírez et al. 2019; Raggi et al. 2020). Esto ha permitido reconocer una mayor abundancia de potenciales grupos sulfato-reductores en sedimentos del margen continental de dicha región, tales como *Desulfobacteraceae* (géneros *Sva0081*, *Desulfatiglans* y *Desulfococcus*), *Syntrophobacteraceae*, *Desulfobulbaceae* (género *Desulfobulbus*), *Desulfarculales* y *Desulfuromonadales* (Sánchez-Soto et al. 2017; Ramírez et al. 2019).
- En el presente estudio se logró describir con mayor detalle la composición de este grupo microbiano mediante la secuenciación del gen 16S, ya que además se detectaron otros grupos reconocidos como sulfato-reductores tales como las familias *Desulfovibrionaceae*, *Thermodesulfovibrionaceae*, *Desulfomicrobiaceae*, *Desulfonatronaceae*, *Desulfohalobiaceae* y *Peptococcaceae*, así como la presencia de 30 géneros (Tabla 2), en su mayoría reportados por primera vez para la región de estudio. Asimismo, por el gen *dsrB* se reconoció la presencia de MSR relacionados con los géneros *Archaeoglobus*, *Desulfosporosinus*, *Desulfitobacterium* y *Sporomusaceae* (Figs. 11, 12 y 13).
- El análisis de amplicones 16S fue un método exploratorio adecuado para el análisis de la composición de comunidades procariotas ya que sigue siendo el marcador estándar para la identificación taxonómica microbiana (Choi et al., 2016). La desventaja de este marcador molecular es que no refleja necesariamente un vínculo con el metabolismo sulfato-reductor (Devereux et al., 1989; Dhillon et al., 2003; Lücker et al., 2007). En consecuencia, el análisis y la descripción de la composición de MSR basado en secuencias 16S depende de la información taxonómica disponible en la base de referencia utilizada y se limita a los taxones caracterizados previamente como sulfato-reductores. Por lo tanto, el estudio de la composición de MSR mediante el gen 16S excluirá aquellos taxones que se desconozcan como sulfato-reductores y deberá realizarse preferentemente a rangos

taxonómicos bajos (familia, género o especie) para evitar, en lo posible, que se incluyan taxones no sulfato-reductores.

- Contrario al gen ribosomal, el gen *dsrB* permitió la detección directa de filotipos que tienen el potencial genético para la reducción de sulfato (Müller et al. 2015). Además, este gen fue más sensible para captar la riqueza (número de ASVs distintos) de MSR en las muestras analizadas. El número de ASVs distintos de ciertos taxones sulfato-reductores fue notablemente mayor en las librerías *dsrB*, incluso de los poco abundantes en las librerías 16S. Por ejemplo, *Desulfovibrionaceae* tuvo 69 ASVs del gen 16S y 2236 ASVs del gen *dsrB*, *Peptococcaceae* 8 ASVs del gen 16S y 4782 ASVs del gen *dsrB*. Estos resultados sugieren que el gen *dsrB* es más adecuado para estudiar la riqueza de los MSR y analizar la beta-diversidad con un soporte estadístico como se realizó en este estudio (Fig. 8). Sin embargo, el gen *dsrB* fue menos eficiente para resolver la identidad taxonómica de secuencias al rango taxonómico de género en comparación con el gen 16S (Tabla 2; Figs. 12 y 13), aunque ~70% de las secuencias *dsrB* se asignaron taxonómicamente al rango de familia (Fig. 11), y la mayoría del 30% restante presentó una relación filogenética con grupos sulfato-reductores (Fig. 13). Dado que el gen 16S fue más eficiente para la asignación a rangos taxonómicos más bajos, y que el gen *dsrB* fue más sensible para detectar directamente MSR, ambos marcadores se proponen como complementarios para lograr un análisis más completo y robusto de la composición y distribución ambiental de MSR.
- Es sabido que la asignación taxonómica es un factor central del análisis de la comunidad microbiana. Por esta razón la selección de la base de datos también es fundamental para el análisis posterior de la composición de la comunidad (Choi et al., 2016). En este estudio la abundancia de *Desulfarculaceae* en los sedimentos analizados no fue clara. *Desulfarculaceae* fue un taxon abundante en las librerías 16S (Fig. 6), principalmente debido a las secuencias relacionadas con el género *Desulfatiglans* (Tabla 2). De acuerdo con la taxonomía de Silva (utilizada en este trabajo para la asignación taxonómica de secuencias 16S) este género pertenece a la familia *Desulfarculaceae*, mientras que el NCBI lo clasifica en la familia *Desulfobacteraceae*. La alta abundancia de

Desulfobacteraceae se observó también en las librerías *dsrB*, pero las secuencias relacionadas con *Desulfarculaceae* se infirieron mediante el análisis filogenético de las secuencias *dsrB* (Figs. 11 y 13) y no fue posible rastrear su abundancia en las muestras analizadas. La familia *Syntrophobacteraceae* también fue un grupo abundante en las librerías 16S, especialmente en sedimentos de los sitios más someros (Fig. 6), mientras que su presencia en las librerías *dsrB* se infirió sólo a través del análisis filogenético (Fig. 13). Dado que se utilizaron diferentes marcadores y diferentes bases de datos de referencia para la asignación taxonómica, la interpretación de la composición de la comunidad de taxones sulfato-reductores (e.g., *Desulfarculaceae* y *Syntrophobacteraceae*) debe hacerse con cautela considerando que no es necesariamente comparable la composición inferida con los genes 16S y *dsrAB*.

- Los resultados de los análisis de las secuencias 16S y *dsrB* fueron similares en cuanto a la disminución de la riqueza y abundancia de MSR con el aumento de la profundidad del agua (Figs. 6 y 9; Anexo 5) en los sitios analizados. Esto señala que el gen 16S es un marcador confiable para explorar los patrones generales de distribución de los MSR. Sin embargo, la cuantificación del gen *dsrB* es la que revela la abundancia “absoluta” de MSR en el entorno, permitiendo sugerir dónde se lleva a cabo una mayor actividad sulfato-reductora, ya que la abundancia del gen *dsrB* es directamente proporcional a la actividad de los MSR (Bagwell et al 2009). Mientras que los resultados de esta tesis ayudaron al estudio de las comunidades de MSR y su actividad en sedimentos superficiales del NOGM, aún falta por explorar cómo cambian las comunidades y la actividad de MSR en las zonas geoquímicas de la columna del sedimento, considerando que estos microorganismos y la reducción de sulfato se ha observado en el subsuelo marino (Parkes and Sass 2007).
- MRS con altas abundancias en sedimentos ricos en hidrocarburos en el Golfo de México se han relacionado con la degradación anaerobia de estos compuestos (Orcutt et al. 2010a; Kleindienst et al. 2012; Kimes et al. 2013; Raggi 2020). En este estudio el análisis de librerías 16S sugirió la presencia de potenciales taxones sulfato-reductores reconocidos por su capacidad para reducir metales (e.g., *Desulfovibrio*, *Desulfotomaculum*,

Desulfuromonadaceae, *Syntrophaceae*, *Desulfomicrobium*)) (Tabla 2), mientras que el análisis de secuencias *dsrB* reveló que el Ni ($F_{1,23} = 2,3$, $R^2 = 0,1$) y el Cd ($F_{1,23} = 2,1$, $R^2 = 0,1$) se relacionaron con los cambios en la estructura de la comunidad de MSR (Fig. 8) afectando negativamente su riqueza, diversidad y abundancia (Anexo 5). Estos resultados permiten plantear la presencia de MSR relevantes en el secuestro de metales en sedimentos del NOGM (Anexos 2 y 5; Fig. 11). Por lo tanto, en estudios posteriores podría evaluarse el potencial de los MSR para remover metales en sedimentos del Golfo de México y los mecanismos que les permiten habitar en sitios potencialmente contaminados por estos elementos.

- En el laboratorio se observó que la actividad sulfato-reductora en sedimentos de sitios someros colectados a <200 m de profundidad, fue mayor a 37 °C, mientras que en sedimentos de sitios profundos colectados a >3000 m de profundidad, fue mayor a 4 °C (Fig. 19). Los análisis de la estructura de las comunidades basados en secuencias *dsrB* revelaron diferencias en la estructura de la comunidad de MSR en sedimentos de sitios someros y profundos, señalando una mayor riqueza, diversidad y abundancia de MSR en los sitios someros asociadas a las mayores temperaturas *in situ* (Figs. 8, 9 y 14; Anexo 5). Esto apoya la idea de la presencia de poblaciones sulfato-reductoras distintas adaptadas a las temperaturas de su ambiente natural. Es decir, es posible que haya una mayor abundancia de MSR mesófilos en los sedimentos de la plataforma continental y psicrófilos y psicrotolerantes en los sedimentos de sitios profundos, como resultado de las temperaturas que rigen naturalmente los sitios de estudiados. Sin embargo, es necesario conocer las temperaturas óptimas de crecimiento para llegar a dicha conclusión, así como analizar la composición de MSR en los experimentos de incubación.
- El estímulo de la actividad sulfato-reductora con la adición de acetato en las incubaciones experimentales puede deberse a la mayor abundancia de MSR OxC (i.e., *Desulfobacteraceae*, *Desulfarculaceae*, *Desulfotomaculum*, *Syntrophaceae* y *Thermoanaerobacteraceae*) detectados mediante la secuenciación de los genes *dsrB* y 16S ARNr (Tabla 2; Figs. 11 y 12). Por lo tanto, los MSR OxC pueden ser clave para

dirigir un flujo considerable de carbono y electrones hacia la reducción de sulfato en sedimentos del NOGM.

- De forma comparativa, los sedimentos de sitios someros presentaron una mayor tasa de remoción de sulfato en las incubaciones experimentales en comparación con los sedimentos de sitios profundos (Tabla 3). Es posible que la mayor abundancia inicial de MSR, determinada por la cuantificación del gen *dsrB* en las muestras ambientales (Fig. 9), pueda relacionarse con este resultado. Sin embargo, es importante considerar que las condiciones de incubación en términos de la presión hidrostática pudieron ser menos favorables para la fisiología de los MSR de los sedimentos de sitios profundos, ya que se encuentran en sitios con más de 3000 m de profundidad de agua equivalentes a 300 atmósferas de presión, y este fue un factor que no se controló en los experimentos.

5.1. PERSPECTIVAS

Los resultados presentados en esta tesis conforman un avance en el conocimiento de la comunidad de MSR, comprendiendo más a detalle su distribución en el gradiente batimétrico, las variables ambientales asociadas con los cambios en su composición, riqueza, diversidad abundancia y potencial actividad. Adicionalmente, se exploró por primera vez las condiciones de incubación que estimulan la actividad sulfato-reductora en sedimentos del NOGM. Sin embargo, es necesario continuar su estudio vinculando enfoques biológico-moleculares, con los procesos biogeoquímicos y fisiológicos para comprender plenamente su diversidad, sus nichos ecológicos, su importancia ecológica y su potencial uso biotecnológico.

En este estudio el análisis de secuencias *dsrB* no fue suficiente para establecer la afiliación taxonómica detallada de una fracción de OTUs con grupos sulfato-reductores conocidos (e.g., *Syntrophobacteraceae*, *Desulfatiglans*, *Desulfobacca* y *Desulfomonile*) (Fig. 13), por lo que serán necesarias nuevas investigaciones para definir mejor la taxonomía y la fisiología de estos microorganismos. Dichas investigaciones también podrán incluir el estudio de la

diversidad de arqueas sulfato-reductoras mediante primers más adecuados para detectar la diversidad de estos procariontes en el ambiente y establecer su relación filogenética con los grupos arqueanos conocidos. Los análisis moleculares basados en genes *dsrAB* (codificantes de las subunidades A y B de la enzima (bi)sulfito reductasa desasimilatoria) pueden continuar para demostrar la existencia de miembros de nuevos linajes filogenéticos que no se relacionaron con los MSR previamente conocidos y que pueden dominar en la microbiota de los sedimentos marinos. Esto puede revelar la existencia de MSR clave en los sedimentos marinos que puedan ser utilizados como bioindicadores de cambios ambientales.

Además de evaluar los cambios en la estructura de la comunidad de MSR entre las diferentes muestras (Fig. 8), se pueden aplicar análisis de redes complejas para determinar la coocurrencia entre diferentes taxones y la correlación entre éstos mediante la construcción de matrices de correlación (e.g., Spearman). Estos análisis pueden ayudar a comprender las relaciones (positivas y negativas) entre diversos taxones y la conformación de las comunidades microbianas en el entorno conforme a los cambios fisicoquímicos del ambiente.

El Cinturón Plegado Perdido en el NOGM es una región recientemente considerada para la extracción de petróleo en territorio nacional, debido a su potencial como reservorio de hidrocarburos (Fiduk et al. 1999). Las actividades relacionadas con la extracción industrial de petróleo representan un potencial riesgo de contaminación para el ambiente y se ha reconocido que parte de los hidrocarburos sedimentan en el lecho marino (Shin et al. 2019). Por esto, es importante evaluar el potencial de degradación de petróleo bajo condiciones sulfato-reductoras. Esto podrá realizarse mediante la contaminación artificial de sedimentos utilizando consorcios sulfato-reductores obtenidos del NOGM, con los que se podrán conocer los MSR involucrados en la oxidación de hidrocarburos, los cambios en las comunidades sulfato-reductoras debido a la presencia de hidrocarburos, así como las posibles interacciones en la comunidad y analizar los metabolitos derivados de los procesos de degradación de petróleo. Además, se podrán buscar las condiciones ambientales que optimicen la degradación de hidrocarburos con fines biotecnológicos.

En esta tesis se detectó la presencia de taxones sulfato-reductores relacionados con diferentes procesos. Por lo tanto, se pueden desarrollar otras líneas de investigación que contribuyan al conocimiento de los MSR y su relevancia para mantener las funciones de ecosistema marino, sus potenciales usos como bioindicadores de cambios ambientales y sus posibles usos biotecnológicos. Tales líneas de investigación pueden dirigirse a:

- Investigar el potencial de los MSR para utilizar metales como nutrientes o como aceptores terminales de electrones durante la obtención de energía. Además, de evaluar su relevancia para la deposición de metales en el lecho marino durante la oxidación de compuestos orgánicos e inorgánicos.
- Analizar la composición de potenciales cable-bacterias sulfato-reductoras en sedimentos marinos y su capacidad para fungir como sistemas bioelectroquímicos que ayuden a la degradación de compuestos orgánicos como los hidrocarburos.
- Determinar la contribución de los sedimentos del NOGM a las tasas globales de sulfato-reducción y producción de sulfuro, así como evaluar la importancia de la oxidación anaerobia de metano (OAM) acoplada a la reducción de sulfato como factor de regulación del contenido de gases de efecto invernadero en estos ambientes.
- Caracterizar la comunidad de MSR involucrada en la degradación de contaminantes emergentes como fármacos, antibióticos, hormonas, plásticos, pesticidas organoclorados, éteres de polibromodifenilos, químicos de higiene personal, entre otros que pongan en riesgo la función del ecosistema, la biodiversidad y la salud humana.

6. REFERENCIAS

- Abildgaard L, Ramsing NB, Finster K (2004) Characterization of the marine propionate-degrading, sulfate-reducing bacterium *Desulfobaba fastidiosa* sp. nov. and reclassification of *Desulfomusa hansenii* as *Desulfobaba hansenii* comb. nov. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 54:393–399. <https://doi.org/10.1099/ijs.0.02820-0>
- Agrawal A, Lal B (2009) Rapid detection and quantification of bisulfite reductase genes in oil field samples using real-time PCR. *FEMS Microbiol Ecol* 69:301–312. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6941.2009.00714.x>
- Aharon P, Fu B (2000) Microbial sulfate reduction rates and sulphur and oxygen isotope fractionation at oil and gas seeps in deepwater Gulf of Mexico. *Geochimica Cosmochimica Acta* 64:233–246. [https://doi.org/doi.org/10.1016/S0016-7037\(99\)00292-6](https://doi.org/doi.org/10.1016/S0016-7037(99)00292-6)
- Aller RC (1994) Bioturbation and remineralization of sedimentary organic matter: effects of redox oscillation. *Chemical Geology* 114:331–345. [https://doi.org/10.1016/0009-2541\(94\)90062-0](https://doi.org/10.1016/0009-2541(94)90062-0)
- Al-raei AM, Bosselmann K, Böttcher ME, Hespeneide B (2009) Seasonal dynamics of microbial sulfate reduction in temperate intertidal surface sediments: controls by temperature and organic matter. *Oceanic Dynamics* 59:351–370. <https://doi.org/10.1007/s10236-009-0186-5>
- An BA, Shen Y, Voordouw G (2017) Control of sulfide production in high salinity Bakken shale oil reservoirs by halophilic bacteria reducing nitrate to nitrite. *Frontiers in Microbiology* 8:. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.01164>
- Anantharaman K, Hausmann B, Jungbluth SP, et al (2018) Expanded diversity of microbial groups that shape the dissimilatory sulfur cycle. *ISME Journal* 12:1715–1728. <https://doi.org/10.1038/s41396-018-0078-0>
- Anderson RK, Scalan RS, Parker PL, Behrens EW (1983) Seep oil and gas in Gulf of Mexico slope sediment. *Science* (1979) 222:619–621. <https://doi.org/10.1126/science.222.4624.619>
- Arcega-Cabrera F, Velázquez-Tavera N, Fargher L, et al (2014) Fecal sterols, seasonal variability, and probable sources along the ring of cenotes, Yucatan, Mexico. *Journal of Contaminant Hydrology* 168:41–49. <https://doi.org/10.1016/j.jconhyd.2014.08.007>
- Bade K, Manz W, Szewzyk U (2000) Behavior of sulfate reducing bacteria under oligotrophic conditions and oxygen stress in particle-free systems related to drinking water. *FEMS Microbiology Ecology* 32:215–223. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6941.2000.tb00714.x>
- Bagwell CE, Formolo M, Ye Q, et al (2009) Direct analysis of sulfate reducing bacterial communities in gas hydrate-impacted marine sediments by PCR-DGGE. *Journal of Basic Microbiology* 49:87–92. <https://doi.org/10.1002/jobm.200800278>
- Balk M, Altinbaş M, Rijpstra WIC, et al (2008) *Desulfatirhabdium butyrativorans* gen. nov., sp. nov., a butyrate-oxidizing, sulfate-reducing bacterium isolated from an anaerobic bioreactor. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 58:110–115. <https://doi.org/10.1099/ijs.0.65396-0>
- Beazley MJ, Martinez RJ, Rajan S, et al (2012) Microbial community analysis of a coastal salt marsh affected by the DWH oil spill. *PLoS ONE* 7:e41305. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0041305>

- Beulig F, Røy H, Glombitza C, Jørgensen BB (2017) Control on rate and pathway of anaerobic organic carbon degradation in the seabed. *Proc Natl Acad Sci U S A* 115:367–372. <https://doi.org/10.1073/pnas.1715789115>
- Bienhold C, Zinger L, Boetius A, Ramette A (2016) Diversity and Biogeography of Bathyal and Abyssal Seafloor Bacteria. *PLoS ONE* 1–20. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0148016>
- Blazejak A, Schippers A (2011) Real-time PCR quantification and diversity analysis of the functional genes *aprA* and *dsrA* of sulfate-reducing prokaryotes in marine sediments of the Peru continental margin and the Black Sea. *Frontiers in Microbiology* 2:1–11. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2011.00253>
- Bolhuis H, Cretoiu MS (2016) What is so Special About Marine Microorganisms? Introduction to the Marine Microbiome — From Diversity to Biotechnological Potential. In: *The Marine Microbiome*
- Bolyen E, Rideout JR, Dillon MR, et al (2019) Reproducible, interactive, scalable and extensible microbiome data science using QIIME 2. *Nature Biotechnology* 37:848–857. <https://doi.org/10.1038/s41587-019-0209-9>
- Bonch-osmolovskaya EA, Perevalova AA, Kolganova T V, et al (2011) Activity and distribution of thermophilic prokaryotes in hydrothermal fluid, sulfidic structures, and sheaths of alvinoids (East Pacific Rise, 13 ° N). *Applied and Environmental Microbiology* 77:2803–2806
- Bowles MW, Mogollón JM, Kasten S, et al (2014) Global rates of marine sulfate reduction and implications for sub-sea-floor metabolic activities. *Science* (1979) 344:889–891. <https://doi.org/10.1126/science.1249213>
- Bradley AS, Leavitt WD, Johnston DT (2011) Revisiting the dissimilatory sulfate reduction pathway. *Geobiology* 9:446–457. <https://doi.org/10.1111/j.1472-4669.2011.00292.x>
- Buchfink B, Xie C, Huson DH (2014) Fast and sensitive protein alignment using DIAMOND. *Nature Methods* 12:59–60. <https://doi.org/10.1038/nmeth.3176>
- Burdige DJ (2007) Preservation of organic matter in marine sediments: Controls, mechanisms, and an imbalance in sediment organic carbon budgets? *Chemical Reviews* 107:467–485. <https://doi.org/10.1021/cr050347q>
- Caffrey SM, Park HS, Voordouw JK, et al (2007) Function of periplasmic hydrogenases in the sulfate-reducing bacterium *Desulfovibrio vulgaris hildenborough*. *Journal of Bacteriology* 189:6159–6167. <https://doi.org/10.1128/JB.00747-07>
- Callahan BJ, McMurdie PJ, Rosen MJ, et al (2016) DADA2: High-resolution sample inference from Illumina amplicon data. *Nature Methods* 13:581–583. <https://doi.org/10.1038/nmeth.3869>
- Canfield DE (1991) Sulfate reduction in deep-sea sediments. *American Journal of Science* 291:177–188. <https://doi.org/10.2475/ajs.291.2.177>
- Canfield DE, Des Marais DJ (1991) Aerobic Sulfate Reduction in Microbial Mats. *Science* (1979) 251:1471–1473
- Canfield DE, Raiswell R (1999) The evolution of the sulfur cycle. *American Journal of Science* 299:697–723. <https://doi.org/10.2475/ajs.299.7-9.697>
- Caporaso JG, Kuczynski J, Stombaugh J, et al (2010) correspondence QIIME allows analysis of high-throughput community sequencing data Intensity normalization improves color calling in SOLiD sequencing. *Nature Publishing Group* 7:335–336. <https://doi.org/10.1038/nmeth0510-335>
- Castro HF, Williams NH, Ogram A (2000) Phylogeny of sulfate-reducing bacteria. *FEMS Microbiology Ecology* 31:1–9

- Chakraborty A, Ellefson E, Li C, et al (2018) Thermophilic endospores associated with migrated thermogenic hydrocarbons in deep Gulf of Mexico marine sediments. *ISME Journal* 12:1895–1906. <https://doi.org/10.1038/s41396-018-0108-y>
- Chen J, McIlroy SE, Archana A, et al (2019) A pollution gradient contributes to the taxonomic, functional, and resistome diversity of microbial communities in marine sediments. *microbiom* 7:1–12
- Cheng L, He Q, Ding C, et al (2013) Novel bacterial groups dominate in a thermophilic methanogenic hexadecane-degrading consortium. *FEMS Microbiol Ecol* 85:568–77. <https://doi.org/10.1111/1574-6941.12141>
- Chin K-J, Sharma ML, Russell LA, et al (2008) Quantifying expression of a dissimilatory (bi) sulfite reductase gene in petroleum-contaminated marine harbor sediments. *Microbial Ecology* 55:489–499. <https://doi.org/10.1007/s00248-007-9294-2>
- Choi E, Rim JM (1991) Competition and inhibition of sulfate reducers and methane producers in anaerobic treatment. *Water Science and Technology* 23:1259–1264
- Cleary DFR, Becking LE, Polónia ARM, et al (2016) Jellyfish-associated bacterial communities and bacterioplankton in Indonesian Marine lakes. *FEMS Microbiology Ecology* 92:. <https://doi.org/10.1093/femsec/fiw064>
- Colin Y, Goñi-Urriza M, Caumette P, Guyoneaud R (2013) Combination of high throughput cultivation and *dsr A* sequencing for assessment of sulfate-reducing bacteria diversity in sediments. *FEMS Microbiology Ecology* 83:26–37. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6941.2012.01452.x>
- Colin Y, Goñi-Urriza M, Gassie C, et al (2016) Distribution of sulfate-reducing communities from estuarine to marine bay waters. *Microbiology of Aquatic Systems* 73:39–49. <https://doi.org/10.1007/s00248-016-0842-5>
- Colman DR, Lindsay MR, Amenabar MJ, et al (2020) Phylogenomic analysis of novel Diaforarchaea is consistent with sulfite but not sulfate reduction in volcanic environments on early Earth. *ISME Journal* 14:1316–1331. <https://doi.org/10.1038/s41396-020-0611-9>
- Covarrubias MB (2016) Caracterización de las comunidades microbianas en sedimentos del Golfo de México, mediante análisis metagenómico
- Cravo-Laureau C, Duran R (2014) Marine coastal sediments microbial hydrocarbon degradation processes: Contribution of experimental ecology in the omics'era. *Frontiers in Microbiology* 5:1–8. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2014.00039>
- Cúcio C, Engelen AH, Costa R, Muyzer G (2016) Rhizosphere microbiomes of European seagrasses are selected by the plant, but are not species specific. *Frontiers in Microbiology* 7:1–15. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.00440>
- Cypionka H (1994) Sulfate transports. In: *Methods in Enzymology*. p 3
- Cypionka H (2000) Oxygen respiration by *Desulfovibrio* species. *Annu Rev Microbiol* 54:827–48. <https://doi.org/DOI:10.1146/annurev.micro.54.1.827>
- Dahl C, Kredich NM, Deutzmann R, Truper HG (1993) Dissimilatory sulphite reductase from *Archaeoglobus fulgidus*: physico-chemical properties of the enzyme and cloning, sequencing and analysis of the reductase genes. *Journal of General Microbiology* 139:1817–1828
- Dar SA, Kleerebezem R, Stams AJM, et al (2008) Competition and coexistence of sulfate-reducing bacteria, acetogens and methanogens in a lab-scale anaerobic bioreactor as affected by changing substrate to sulfate ratio. *Applied Microbiology and Biotechnology* 78:1045–1055. <https://doi.org/10.1007/s00253-008-1391-8>

- Darriba D, Posada D, Kozlov AM, et al (2020) ModelTest-NG: A New and Scalable Tool for the Selection of DNA and Protein Evolutionary Models. *Molecular Biology and Evolution* 37:291–294. <https://doi.org/10.1093/molbev/msz189>
- Dedysh SN and Yilmaz P (2018). Refining the taxonomic structure of the phylum *Acidobacteria*. *International Journal of Systematic Evolutionary Microbiology*. 68:3796–3806. DOI 10.1099/ijsem.0.003062
- de Rezende JR, Kjeldsen KU, Hubert CR, et al Dispersal of thermophilic *Desulfotomaculum* endospores into Baltic Sea sediments over thousands of years
- Deja-Sikora E, Gołębiewski M, Kalwasińska A, et al (2019) Comamonadaceae OTU as a Remnant of an Ancient Microbial Community in Sulfidic Waters. *Microbial Ecology* 78:85–101. <https://doi.org/10.1007/s00248-018-1270-5>
- Devereux R, Delaney M, Widdel F, Stahl DA (1989) Natural relationships among sulfate-reducing Eubacteria. *Journal of Bacteriology* 171:6689–6695. <https://doi.org/DOI:10.1128/jb.171.12.6689-6695.1989>
- Devereux R, Mosher JJ, Vishnivetskaya TA, Brown SD (2015) Changes in northern Gulf of Mexico sediment bacterial and archaeal communities exposed to hypoxia. *Geobiology* 13:478–93. <https://doi.org/10.1111/gbi.12142>
- Dhillon A, Teske A, Dillon J, et al (2003) Molecular characterization of sulfate-reducing bacteria in the Guaymas basin. *Applied and Environmental Microbiology* 69:2765–2772. <https://doi.org/10.1128/AEM.69.5.2765-2772.2003>
- Dias M, Salvado JC, Monperrus M, et al (2008) Characterization of *Desulfomicrobium salsuginis* sp. nov. and *Desulfomicrobium aestuarii* sp. nov., two new sulfate-reducing bacteria isolated from the Adour estuary (French Atlantic coast) with specific mercury methylation potentials. *Systematic and Applied Microbiology* 31:30–37. <https://doi.org/10.1016/j.syapm.2007.09.002>
- Du ZJ, Wang ZJ, Zhao JX, and Chen GJ (2106) *Woeseia oceanigen*. nov., sp. nov., a chemoheterotrophic member of the order *Chromatiales*, and proposal of *Woeseiaceae* fam. nov. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. 66,107–112. 10.1099/ijsem.0.000683
- Durbin A (2009) Microbial diversity of oligotrophic marine sediments
- Durbin AM, Teske A (2010) Sediment-associated microdiversity within the Marine Group I Crenarchaeota. *Environmental Microbiology* 2:693–703. <https://doi.org/10.1111/j.1758-2229.2010.00163.x>
- Dyksma S, Pjevac P, Ovanesov K, Mussman M (2017) Evidence for H₂ consumption by uncultured *Desulfobacterales* in coastal sediments Stefan Dyksma. *Environmental Microbiology* 20:450–461
- Dyksma S, Pjevac P, Ovanesov K, Mussmann M (2018) Evidence for H₂ consumption by uncultured *Desulfobacterales* in coastal sediments. *Environmental Microbiology* 20:450–461. <https://doi.org/10.1111/1462-2920.13880>
- Eggleton J, Thomas K V. (2004) A review of factors affecting the release and bioavailability of contaminants during sediment disturbance events. *Environment International* 30:973–980. <https://doi.org/10.1016/j.envint.2004.03.001>
- Elsgaard L, Isaksen MF, Jørgensen BB, et al (1994) Microbial sulfate reduction in deep-sea sediments at the Guaymas Basin hydrothermal vent area: Influence of temperature and substrates. *Geochimica et Cosmochimica Acta* 58:3335–3343. [https://doi.org/10.1016/0016-7037\(94\)90089-2](https://doi.org/10.1016/0016-7037(94)90089-2)

- Fernández-Cadena JC, Ruíz-Fernández PS, Fernández-Ronquillo TE, et al (2020) Detection of sentinel bacteria in mangrove sediments contaminated with heavy metals. *Marine Pollution Bulletin* 150: <https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2019.110701>
- Fichtel J, Koster J, Rullkötter J, Sass H (2008) High variations in endospore numbers within tidal flat sediments revealed by quantification of dipicolinic acid. *Geomicrobiology Journal* 25:371–380. <https://doi.org/10.1080/01490450802402877>
- Fiduk, JC, Weimer, P, Trudgill, BD et al (1999). The Perdido Fold Belt, Northwestern Deep Gulf of Mexico, Part 2: Seismic Stratigraphy and Petroleum Systems. *AAPG Bulletin*, V. 83, No. 4. P. 578–612. doi:10.1306/00aa9c00-1730-11d7-8645000102c1865d
- Fike DA, Bradley AS, Rose CV (2015) Rethinking the Ancient Sulfur Cycle. *Annual Review of Earth Planetary Science* 43:593–622. <https://doi.org/10.1146/annurev-earth-060313-054802>
- Finke N, Vandieken V, Jørgensen BB (2007) Acetate, lactate, propionate, and isobutyrate as electron donors for iron and sulfate reduction in Arctic marine sediments, Svalbard. *FEMS Microbiology Ecology* 59:10–22. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6941.2006.00214.x>
- Finster KW, Kjeldsen KU, Kube M, et al (2013) Complete genome sequence of *Desulfocapsa sulfexigens*, a marine deltaproteobacterium specialized in disproportionating inorganic sulfur compounds. *Standards in Genomic Sciences* 8:58–68. <https://doi.org/10.4056/sigs.3777412>
- Fischer JP, Ferdelman TG, D'Hondt S, et al (2009) Oxygen penetration deep into the sediment of the south pacific gyre. *Biogeosciences* 6:1467–1478. <https://doi.org/10.5194/bg-6-1467-2009>
- Fortin D, Southam G, Beveridge TJ (1994) Nickel sulfide, iron-nickel sulfide and iron sulfide precipitation by a newly isolated *Desulfotomaculum* species and its relation to nickel resistance. *FEMS Microbiology Ecology* 14:121–132. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6941.1994.tb00099.x>
- Francis C a, Roberts KJ, Beman JM, et al (2005) Ubiquity and diversity of ammonia-oxidizing archaea in water columns and sediments of the ocean. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102:14683–14688
- Frank KL, Rogers DR, Olins HC, et al (2013) Characterizing the distribution and rates of microbial sulfate reduction at Middle Valley hydrothermal vents. *The ISME Journal* 7:1391–1401. <https://doi.org/10.1038/ismej.2013.17>
- Frank YA, Kadnikov V V, Lukina AP, et al (2016) Characterization and Genome Analysis of the First Facultatively Alkaliphilic *Thermodesulfovibrio* Isolated from the Deep Terrestrial Subsurface. *Frontier in Microbiology* 7:1–11. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.02000>
- Fukuba T, Ogawa M, Fujii T, Naganuma T (2003) Phylogenetic Diversity of Dissimilatory Sulfite Reductase Genes from Deep-sea Cold Seep Sediment. *Marine Biotechnology* 5:458–468. <https://doi.org/10.1007/s10126-002-0091-0>
- Fukui M, Suh J, Yonezawa Y, Urushigawa Y (1997) Major substrates for microbial sulfate reduction in the sediments of Ise Bay, Japan. *Ecological Research* 12:201–209
- Fukunaga Y, Kurahashi M, Sakiyama Y, Ohuchi M, Yokota A, and Harayama S (2009) *Phycisphaera mikurensis* gen. nov., sp. nov., isolated from a marine alga, and proposal of *Phycisphaeraceae* fam. nov., *Phycisphaerales* ord. nov. and *Phycisphaerae* classis nov. in the phylum Planctomycetes. *Journal of Genetics Applied Microbiology*. 55, 267-275. DOI: 10.2323/jgam.55.267

- Gaboyer F, Maignien L, Jebbar M, Alain K (2017) Draft Genome Sequence of *Phaeobacter leonis* Type Strain 306, an Alphaproteobacterium Isolated from Mediterranean Sea Sediments. *American Society for Microbiology* 5:4–5
- Gallagher KL, Kading J, Braissant O, Dupraz C, and Visscher PT. 2012. *Geobiology*. 10, 518–530. [http:// 10.1111/j.1472-4669.2012.00342.x](http://10.1111/j.1472-4669.2012.00342.x)
- Geets J, Borremans B, Diels L, et al (2006) DsrB gene-based DGGE for community and diversity surveys of sulfate-reducing bacteria. *Journal of Microbiological Methods* 66:194–205. <https://doi.org/10.1016/j.mimet.2005.11.002>
- Ghigliazza R, Lodi A, Rovatti M (2000) Kinetic and process considerations on biological reduction of soluble and scarcely soluble sulfates. *Resources, Conservation and Recycling* 29:181–194. [https://doi.org/10.1016/S0921-3449\(99\)00055-5](https://doi.org/10.1016/S0921-3449(99)00055-5)
- Gilmour CC, Podar M, Bullock AL, et al (2013) Mercury methylation by novel microorganisms from new environments. *Environmental Science and Technology* 47:11810–11820. <https://doi.org/10.1021/es403075t>
- Gittel A, Mußmann M, Sass H, et al (2008) Identity and abundance of active sulfate-reducing bacteria in deep tidal flat sediments determined by directed cultivation and CARD-FISH analysis. *Environmental Microbiology* 10:2645–2658. <https://doi.org/10.1111/j.1462-2920.2008.01686.x>
- Giudici-Ortoni MT, Makarov AA, Lobachov VM, et al (2003) Conformational properties of multihemic cytochromes c from *Desulfuromonas acetoxidans*
- Glombitza C, Egger M, Røy H, Barker B (2019) Controls on volatile fatty acid concentrations in marine sediments (Baltic Sea). *Geochimica et Cosmochimica Acta* 258:226–241. <https://doi.org/10.1016/j.gca.2019.05.038>
- Glombitza C, Jaussi M, Røy H, et al (2015) Formate, acetate, and propionate as substrates for sulfate reduction in sub-arctic sediments of Southwest Greenland. *Frontier in Microbiology* 6:1–14. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2015.00846>
- Gobet A, Böer SI, Huse SM, et al (2012) Diversity and dynamics of rare and of resident bacterial populations in coastal sands. *ISME J* 6:542–553. <https://doi.org/10.1038/ismej.2011.132>
- Guan Y, Hikmawan T, Antunes A, et al (2015) Diversity of methanogens and sulfate-reducing bacteria in the interfaces of five deep-sea anoxic brines of the Red Sea. *Res Microbiol* 166:688–99. <https://doi.org/10.1016/j.resmic.2015.07.002>
- Hamilton WA, Hamilton WA (1997) Sulfate-reducing bacteria: physiology determines their environmental impact. *Geomicrobiology Journal* 15:19–28. <https://doi.org/10.1080/01490459809378059>
- Handley KM, Wrighton KC, Piceno YM, et al (2012) High-density PhyloChip profiling of stimulated aquifer microbial communities reveals a complex response to acetate amendment. *FEMS Microbiology Ecology* 81:188–204. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6941.2012.01363.x>
- Harmsen HJM, Kuijk BLM Van, Plugge CM, et al (1998) *Syntrophobacter fumaroxidans* sp. nov., a syntrophic propionate-degrading sulfat-reducing bacterium. *International Journal of Systematic Bacteriology* 48:1383–1388
- Haruta S, Yoshida T, Aoi Y, et al (2013) Challenges for complex microbial ecosystems: combination of experimental approaches with mathematical modeling. *Microbes and Environments* 28:285–294. <https://doi.org/DOI 10.1264/jsme2.ME13034>
- He H, Zhen Y, Mi T, et al (2015) Community composition and distribution of sulfate -and sulfite-reducing prokaryotes in sediments from the Changjiang estuary and adjacent East China

- Sea. Estuarine, Coastal and Shelf Science 165:75–85.
<https://doi.org/10.1016/j.ecss.2015.09.005>
- Hines ME (2003) Sediments: Sulfate Reduction in Marine Sediments. In: Encyclopedia of Environmental Microbiology. pp 263–281
- Holmer M, Kristensen E (1996) Seasonality of sulfate reduction and pore water solutes in a marine fish farm sediment: The importance of temperature and sedimentary organic matter. *Biogeochemistry* 32:15–39. <https://doi.org/10.1007/BF00001530>
- Holmkvist L, Ferdelman TG, Barker B (2011) A cryptic sulfur cycle driven by iron in the methane zone of marine sediment (Aarhus Bay, Denmark). *Geochimica et Cosmochimica Acta* 75:3581–3599. <https://doi.org/10.1016/j.gca.2011.03.033>
- Hoshino T, Doi H, Uramoto G-I, et al (2020) Global diversity of microbial communities in marine sediment. *PNAS* 117:27587–27597. <https://doi.org/10.1073/pnas.1919139117>
- Huse SM, Welch DM, Morrison HG, Sogin ML (2010) Ironing out the wrinkles in the rare biosphere through improved OTU clustering. *Environmental Microbiology* 12:1889–1898. <https://doi.org/10.1111/j.1462-2920.2010.02193.x>
- Huson DH, Beier S, Flade I, et al (2016) MEGAN community edition - interactive exploration and analysis of large-scale microbiome sequencing data. *PLoS Computational Biology* 12:1–12. <https://doi.org/10.1371/journal.pcbi.1004957>
- Hussain A, Qazi JI (2016) Metals-induced functional stress in sulphate-reducing thermophiles. *3 Biotech* 6:1–8. <https://doi.org/10.1007/s13205-015-0342-1>
- Isaksen FM, Bak F, Jørgensen BB (1994) Thermophilic sulfate-reducing bacteria in cold marine sediment. *FEMS Microbiol Ecol* 14:1–8. <https://doi.org/doi.org/10.1111/j.1574-6941.1994.tb00084.x>
- Isaksen MF, Jørgensen BOB (1996) Adaptation of psychrophilic and psychrotrophic sulfate-reducing bacteria to permanently cold marine environments. *Applied and Environmental Microbiology* 62:408–414
- Islamud-Din, Hesham AE-L, Ahmad A, et al (2014) PCR-DGGE and real-time PCR *dsrB*-based study of the impact of heavy metals on the diversity and abundance of sulfate-reducing bacteria. *Biotechnology and Bioprocess Engineering* 19:703–710. <https://doi.org/10.1007/s12257-014-0324-x>
- Jochum LM, Chen X, Lever MA, et al (2017) Depth distribution and assembly of sulfate-reducing microbial communities in marine sediments of Aarhus Bay. *Applied and Environmental Microbiology* 83:1–15. <https://doi.org/org/10.1128/AEM.01547-17>
- Jochum LM, Schreiber L, Marshall IPG, et al (2018a) Single-cell genomics reveals a diverse metabolic potential of uncultivated *Desulfatiglans*-related *deltaproteobacteria* widely distributed in marine sediment. *Frontiers in Microbiology* 9:. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.02038>
- Jochum LM, Schreiber L, Marshall IPG, et al (2018b) Single-cell genomics reveals a diverse metabolic potential of uncultivated *Desulfatiglans*-related *deltaproteobacteria* widely distributed in marine sediment. *Frontiers in Microbiology* 9:1–16. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.02038>
- Jørgensen BB (2006) Bacteria and marine biogeochemistry
- Jørgensen BB (1982) Mineralization of organic matter in the seabed - the role of sulfate reduction. *Nature* 296:643–645. <https://doi.org/10.1038/296643a0>
- Jørgensen BB, Boetius A (2007) Feast and famine — microbial life in the deep-sea bed. *Nature Reviews Microbiology* 5:770–781. <https://doi.org/10.1038/nrmicro1745>

- Jørgensen BB, Findlay AJ, Pellerin A (2019) The biogeochemical sulfur cycle of marine sediments. *Frontiers in Microbiology* 10:1–27. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.00849>
- Jørgensen BB, Kasten S (2006) Sulfur cycling and methane oxidation. *Marine Geochemistry* 271–309. https://doi.org/10.1007/3-540-32144-6_8
- Jørgensen BB, Revsbech NP (1989) Oxygen uptake, bacterial distribution, and carbon-nitrogen-sulfur cycling in sediments from the Baltic sea - North sea transition. *Ophelia* 31:29–49. <https://doi.org/10.1080/00785326.1989.10430849>
- Jousset A, Bienhold C, Chatzinotas A, et al (2017) Where less may be more: How the rare biosphere pulls ecosystems strings. *ISME Journal* 11:853–862. <https://doi.org/10.1038/ismej.2016.174>
- Joye SB, Boetius A, Orcutt BN, et al (2004) The anaerobic oxidation of methane and sulfate reduction in sediments from Gulf of Mexico cold seeps. *Chemical Geology* 205:219–238. <https://doi.org/10.1016/j.chemgeo.2003.12.019>
- Kallmeyer J, Pockalny R, Adhikari RR, et al (2012) From the Cover: Global distribution of microbial abundance and biomass in subseafloor sediment. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 109:16213–16216. <https://doi.org/10.1073/pnas.1203849109>
- Kaneko R, Hayashi T, Tanahashi M, Naganuma T (2007) Phylogenetic diversity and distribution of dissimilatory sulfite reductase genes from deep-sea sediment cores. *Marine Biotechnology* 9:429–436. <https://doi.org/10.1007/s10126-007-9003-7>
- Karkhoff-Schweizer RR, Huber DPW, Voordouw G (1995) Conservation of the genes for dissimilatory sulfite reductase from *Desulfovibrio vulgaris* and *Archaeoglobus fulgidus* allows their detection by PCR. *Applied and Environmental Microbiology* 61:290–296
- Katoh K, Standley DM (2013) MAFFT multiple sequence alignment software version 7: Improvements in performance and usability. *Molecular Biology and Evolution* 30:772–780. <https://doi.org/10.1093/molbev/mst010>
- Khan S, Hesham AE, Qiao M, et al (2010) Effects of Cd and Pb on soil microbial community structure and activities. *Environmental Science and Pollution Research* 17:288–296. <https://doi.org/10.1007/s11356-009-0134-4>
- Kim IN, Min DH (2013) Temporal variation of summertime denitrification rates in the Texas-Louisiana inner shelf region in the Gulf of Mexico: A modeling approach using the extended OMP analysis. *Continental Shelf Research* 66:49–57. <https://doi.org/10.1016/j.csr.2013.07.005>
- Kimes NE, Callaghan A V, Aktas DF, et al (2013) Metagenomic analysis and metabolite profiling of deep-sea sediments from the Gulf of Mexico following the Deepwater Horizon oil spill. *Frontiers in Microbiology* 4:1–17. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2013.00050>
- Klein M, Friedrich M, Roger AJ, et al (2001) Multiple lateral transfers of dissimilatory sulfite reductase genes between major lineages of sulfate-reducing prokaryotes. *Journal of Bacteriology* 183:6028–6035. <https://doi.org/10.1128/JB.183.20.6028>
- Kleindienst S, Grim S, Sogin M, et al (2015) Diverse, rare microbial taxa responded to the Deepwater Horizon deep-sea hydrocarbon plume. *The ISME Journal* 10:1–16. <https://doi.org/10.1038/ismej.2015.121>
- Kleindienst S, Ramette A, Amann R, Knittel K (2012) Distribution and *in situ* abundance of sulfate-reducing bacteria in diverse marine hydrocarbon seep sediments. *Environmental Microbiology* 14:2689–2710. <https://doi.org/10.1111/j.1462-2920.2012.02832.x>
- Klindworth A, Pruesse E, Schweer T, et al (2013) Evaluation of general 16S ribosomal RNA gene PCR primers for classical and next-generation sequencing-based diversity studies. *Nucleic Acids Research* 41:1–11. <https://doi.org/10.1093/nar/gks808>

- Knittel K, Boetius A (2009) Anaerobic oxidation of methane: Progress with an unknown process. *Annual Review of Microbiology* 63:311–334. <https://doi.org/10.1146/annurev.micro.61.080706.093130>
- Knoblauch C, Sahn K, Jørgensen BB (1999) Psychrophilic sulfate-reducing bacteria isolated from permanently cold Arctic marine sediments: description of *Desulfofrigus oceanense* gen. nov., sp. nov., *Desulfofrigus fragile* sp. nov., *Desulfofaba gelida* gen. nov., sp. nov., *Desulfotalea arctica* sp. nov. *International Journal of Systematic Bacteriology* 48:1631–1643
- Kolmert Å, Wikström P, Hallberg KB (2000) A fast and simple turbidimetric method for the determination of sulfate in sulfate-reducing bacterial cultures. *Journal of Microbiological Methods* 41:179–184. [https://doi.org/10.1016/S0167-7012\(00\)00154-8](https://doi.org/10.1016/S0167-7012(00)00154-8)
- Komada T, Burdige DJ, Li H-L, et al (2016) Organic matter cycling across the sulfate-methane transition zone of the Santa Barbara Basin, California Borderland. *Geochimica et Cosmochimica Acta* 176:259–278. <https://doi.org/10.1016/j.gca.2015.12.022>
- Koschorreck M, Kunze T, Luther G, et al. (2004). Accumulation and inhibitory effects of acetate in a sulphate reducing *in situ* reactor for the treatment of anacidic pit lake. Disponible en: www.researchgate.net
- Könneke M, Kuever J, Galushko A, Jørgensen BB (2013) *Desulfoconvexum algidum* gen. nov., sp. nov., a psychrophilic sulfate-reducing bacterium isolated from a permanently cold marine sediment. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 63:959–964. <https://doi.org/10.1099/ijs.0.043703-0>
- Kraft B, Engelen B, Goldhammer T, et al (2013) *Desulfofrigus* sp. prevails in sulfate-reducing dilution cultures from sediments of the Benguela upwelling area. *FEMS Microbiology Ecology* 84:86–97. <https://doi.org/10.1111/1574-6941.12039>
- Kraková L, Šoltys K, Budiš J, Grivalský T (2016) Investigation of bacterial and archaeal communities: novel protocols using modern sequencing by Illumina MiSeq and traditional DGGE - cloning. *Extremophiles*. <https://doi.org/10.1007/s00792-016-0855-5>
- Krekeler D, Teske A, Cypionka H (1998) Strategies of sulfate-reducing bacteria to escape oxygen stress in a cyanobacterial mat. *FEMS Microbiology Ecology* 25:89–96. [https://doi.org/10.1016/S0168-6496\(97\)00085-8](https://doi.org/10.1016/S0168-6496(97)00085-8)
- Kremer DR, Hansen TA (1988a) Pathway of propionate degradation in *Desulfobulbus propionicus*
- Kremer DR, Hansen TA (1988b) Pathway of propionate degradation in *Desulfobulbus propionicus*. *FEMS Microbiology Letters* 49:273–277. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.1988.tb02729.x>
- Kuever J, Rainey FA, Widdel F (2015) Syntrophobacteraceae fam. nov. . *Bergey's Manual of Systematics of Archaea and Bacteria* 1–2. <https://doi.org/10.1002/9781118960608.fbm00209>
- Labrenz M, Druschel GK, Thomsen-Ebert T, et al (2000) Formation of spharellite (ZnS) deposits in natural biofilms of Sulfate-Reducing Bacteria. *Science* (1979) 290:1744–1747. <https://doi.org/10.1126/science.290.5497.1744>
- Lanoil BD, Sassen R, La Duc MT, et al (2001) Bacteria and archaea physically associated with Gulf of Mexico gas hydrates. *Applied and Environmental Microbiology* 67:5143–5153. <https://doi.org/10.1128/AEM.67.11.5143>
- Larowe DE, Bowers RM, Rappé MS, Jan P (2015) Activity and phylogenetic diversity of sulfate-reducing microorganisms in low-temperature subsurface fluids within the upper oceanic crust. *Frontiers in Microbiology* 5:1–13. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2014.00748>

- Larsen Ø, Lien T, Birkeland N-K (2001) A novel organization of the dissimilatory sulfite reductase operon of *Thermodesulforhabdus norvegica* verified by RT-PCR. *FEMS Microbiology Letters* 203:81–85. <https://doi.org/doi:10.1111/j.1574-6968.2001.tb10824.x>.
- Laso-Pérez, Hahn C, Vliet DM Van, et al (2019) Anaerobic Degradation of Non-Methane Alkanes by “*Candidatus Methanoliparia*” in Hydrocarbon Seeps of the Gulf of Mexico. *American Society for Microbiology* 10:1–20
- Lawler SN, Kellogg CA, France SC, et al (2016) Coral-associated bacterial diversity is conserved across two deep-sea *Anthothela* species. *Frontiers in Microbiology* 7:1–18. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.00458>
- Leloup J, Fossing H, Kohls K, et al (2009) Sulfate-reducing bacteria in marine sediment (Aarhus Bay, Denmark): abundance and diversity related to geochemical zonation. *Environmental Microbiology* 11:1278–1291. <https://doi.org/10.1111/j.1462-2920.2008.01855.x>
- Leloup J, Loy A, Knab NJ, et al (2007) Diversity and abundance of sulfate-reducing microorganisms in the sulfate and methane zones of a marine sediment, Black Sea. *Environmental Microbiology* 9:131–142. <https://doi.org/10.1111/j.1462-2920.2006.01122.x>
- Lennon JT, Jones SE (2011) Microbial seed banks: The ecological and evolutionary implications of dormancy. *Nature Reviews Microbiology* 9:119–130. <https://doi.org/10.1038/nrmicro2504>
- Lens PNL, Kuenen JG (2001) The biological sulfur cycle: Novel opportunities for environmental biotechnology. *Water Science and Technology* 44:57–66. <https://doi.org/10.2166/wst.2001.0464>
- Letunik I, Bork P (2007) Interactive tree of life (iTOL): an online tool for phylogenetic tree display and annotation. *Bioinformatics* 23:127–128. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btl529>
- Ley RE, Harris JK, Wilcox J, et al (2006) Unexpected diversity and complexity of the Guerrero Negro hypersaline microbial mat. *Applied and Environmental Microbiology* 72:3685–3695. <https://doi.org/10.1128/AEM.72.5.3685>
- Li X-X, Liu J-F, Zhou L, et al (2017a) Diversity and composition of sulfate-reducing microbial communities based on genomic DNA and RNA transcription in production water of high temperature and corrosive oil reservoir. *Frontiers in Microbiology* 8:1–17. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.01011>
- Li XX, Yang T, Mbadinga SM, et al (2017b) Responses of microbial community composition to temperature gradient and carbon steel corrosion in production water of petroleum reservoir. *Frontiers in Microbiology* 8:1–12. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.02379>
- Li Y-L, Peacock AD, White DC, et al (2007) Spatial patterns of bacterial signature biomarkers in marine sediments of the Gulf of Mexico. *Chemical Geology* 238:168–179. <https://doi.org/10.1016/j.chemgeo.2006.11.007>
- Li ZL, Bin X, Tan B, and Zhao HP (2020). NC10 bacteria promoted methane oxidation coupled to chlorate reduction. *Biodegradation*. doi.org/10.1007/s10532-020-09912-z
- Liamleam W, Annachhatre AP (2007) Electron donors for biological sulfate reduction. *Biotechnology Advances* 25:452–463. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2007.05.002>
- Lindh M V, Maillot BM, Shulze CN, et al (2017) From the surface to the deep-sea: bacterial distributions across polymetallic nodule fields in the Clarion-Clipperton zone of the Pacific Ocean. *Frontiers in Microbiology* 8:1–12. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.01696>
- Liu P, Conrad R (2014) Major propionate degrading SRB in paddy soil. *Environmental Management* 19:2–31. <https://doi.org/10.1002/acr.22212>

- Liu X, Bagwell CE, Wu L, et al (2003) Molecular diversity of sulfate-reducing bacteria from two different continental margin habitats. *Applied and Environmental Microbiology* 69:6073–6081. <https://doi.org/10.1128/AEM.69.10.6073-6081.2003>
- Lloyd KG, Albert DB, Biddle JF, et al (2010) Spatial structure and activity of sedimentary microbial communities underlying a *Beggiatoa* spp. mat in a Gulf of Mexico hydrocarbon seep. *Plos one* 5:. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0008738>
- Loring DH, Rantala RTT (1992) Manual for the geochemical analyses of marine sediments and suspended particulate matter. *Earth-Science Reviews* 32:235–283. [https://doi.org/doi.org/10.1016/0012-8252\(92\)90001-A](https://doi.org/doi.org/10.1016/0012-8252(92)90001-A)
- Lozupone C, Hamady M, Knight R (2006) UniFrac--an online tool for comparing microbial community diversity in a phylogenetic context. *BMC Bioinformatics* 7:371. <https://doi.org/10.1186/1471-2105-7-371>
- Lücker S, Steger D, Kjeldsen KU, et al (2007) Improved 16S rRNA-targeted probe set for analysis of sulfate-reducing bacteria by fluorescence *in situ* hybridization. *Journal of Microbiological Methods* 69:523–528. <https://doi.org/10.1016/j.mimet.2007.02.009>
- Lukawska-Matuszewska K, Kielczewska J (2016) Effects of near-bottom water oxygen concentration on biogeochemical cycling of C, N and S in sediments of the Gulf of Gdansk (southern Baltic). *Continental Shelf Research* 117:30–42. <https://doi.org/10.1016/j.csr.2016.02.001>
- Marshall IPG, Ren G, Jaussi M, et al (2019) Environmental filtering determines family-level structure of sulfate-reducing microbial communities in subsurface marine sediments. *ISME Journal* 13:1920–1932. <https://doi.org/10.1038/s41396-019-0387-y>
- Martinez RJ, Mills HJ, Story S, Sobecky PA (2006) Prokaryotic diversity and metabolically active microbial populations in sediments from an active mud volcano in the Gulf of Mexico. *Environmental Microbiology* 8:1783–1796. <https://doi.org/10.1111/j.1462-2920.2006.01063.x>
- Hu H, Du H, Ren C, Xu Y (2017) Illuminating anaerobic microbial community and cooccurrence patterns across a quality gradient in Chinese liquor fermentation pit muds. *Applied and Environmental Microbiology* 82:2506–2515. [doi:10.1128/AEM.03409-15](https://doi.org/10.1128/AEM.03409-15).
- Mason OU, Canter E, Gillies LE, et al (2016) Mississippi River plume enriches microbial diversity in the northern Gulf of Mexico. *Frontiers in Microbiology* 7:. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.01048>
- Matsuyama T, Yasuike M, Fujiwara A, et al (2017) A Spirochaete is suggested as the causative agent of Akoya oyster disease by metagenomic analysis. 1–23. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0182280>
- McMurdie PJ, Holmes S (2013) phyloseq: an R package for reproducible interactive analysis and graphics of microbiome census data. *PLoS ONE* 8:1–11. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0061217>
- Meyer B, Kuever J (2007) Molecular analysis of the diversity of sulfate-reducing and sulfur-oxidizing prokaryotes in the environment, using *aprA* as functional marker gene. *Applied and Environmental Microbiology* 73:7664–7679. <https://doi.org/10.1128/AEM.01272-07>
- Meza-Padilla R, Enriquez C, Liu Y, Appendini CM (2019) Ocean circulation in the western Gulf of Mexico using self - organizing maps. *Journal of Geophysical Research: Oceans* 124:1–16. <https://doi.org/10.1029/2018JC014377>
- Middelburg JJ, Levin LA (2009) Coastal hypoxia and sediment biogeochemistry. *Biogeosciences* 6:1273–1293. <https://doi.org/10.5194/bg-6-1273-2009>

- Mills HJ, Hodges C, Wilson K, et al (2003) Microbial diversity in sediments associated with surface-breaching gas hydrate mounds in the Gulf of Mexico. *FEMS Microbiology Ecology* 46:39–52. [https://doi.org/10.1016/S0168-6496\(03\)00191-0](https://doi.org/10.1016/S0168-6496(03)00191-0)
- Mills HJ, Martinez RJ, Story S, et al (2005) Characterization of microbial community structure in Gulf of Mexico gas hydrates: comparative analysis of DNA- and RNA-derived clone libraries. *Appl Environ Microbiol* 71:3235–3247. <https://doi.org/10.1128/AEM.71.6.3235>
- Moeslund L, Thamdrup B, Jørgensen BB (1994) Sulfur and iron cycling in a coastal sediment: Radiotracer studies and seasonal dynamics. *Biochemistry* 27:129–152
- Mohn WW, Tiedje JM (1992) Microbial reductive dehalogenation. *Microbiological Reviews* 56:482–507. <https://doi.org/10.1128/membr.56.3.482-507.1992>
- Mori K, Maruyama A, Urabe T, et al (2008) *Archaeoglobus infectus* sp. nov., a novel thermophilic, chemolithoheterotrophic archaeon isolated from a deep-sea rock collected at Suiyo Seamount, Izu-Bonin Arc, western Pacific Ocean. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 58:810–816. <https://doi.org/10.1099/ij.s.0.65422-0>
- Muck S, De Corte D, Clifford EL, et al (2019) Niche Differentiation of Aerobic and Anaerobic Ammonia Oxidizers in a High Latitude Deep Oxygen Minimum Zone. *Frontiers in Microbiology* 10:. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.02141>
- Müller AL, De Rezende JR, Hubert CRJ, et al (2014) Endospores of thermophilic bacteria as tracers of microbial dispersal by ocean currents. *ISME Journal* 8:1153–1165. <https://doi.org/10.1038/ismej.2013.225>
- Müller AL, Kjeldsen KU, Rattei T, et al (2015) Phylogenetic and environmental diversity of DsrAB-type dissimilatory (bi) sulfite reductases. *ISME J* 9:1152–1165. <https://doi.org/10.1038/ismej.2014.208>
- Müller N, Worm P, Schink B, et al (2010) Syntrophic butyrate and propionate oxidation processes: From genomes to reaction mechanisms. *Environmental Microbiology Reports* 2:489–499. <https://doi.org/10.1111/j.1758-2229.2010.00147.x>
- Murtagh F (2014) Ward ’ s Hierarchical Agglomerative Clustering Method : Which Algorithms Implement Ward ’ s Criterion? *Journal of Clasification* 31:274–295. <https://doi.org/10.1007/s00357->
- Muyzer G, Stams AJM (2008) The ecology and biotechnology of sulphate-reducing bacteria. *Nature* 6:441–454. <https://doi.org/10.1038/nrmicro1892>
- Narihiro T, Kamagata Y (2017) Genomics and metagenomics in microbial ecology: recent advances and challenges. *Microbes Environ* 32:1–4. <https://doi.org/10.1264/jsme2.ME3201rh>
- Naz N, Young HK, Ahmed N, Gadd GM (2005) Cadmium accumulation and DNA homology with metal resistance genes in sulfate-reducing bacteria. *Applied and Environmental Microbiology* 71:4610–4618. <https://doi.org/10.1128/AEM.71.8.4610>
- Newton RJ, Huse SM, Morrison HG, et al (2013) Shifts in the microbial community composition of Gulf Coast beaches following beach oiling. *PLoS ONE* 8:1–13. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0074265>
- Ni C, Rui J, Huang X, et al (2015) High concentrations of bioavailable heavy metals impact freshwater sediment microbial communities. *Annals of Microbiology* 66:1003–1012. <https://doi.org/10.1007/s13213-015-1189-8>
- Nunoura T, Soffientino B, Blazejak A, et al (2009) Subseafloor microbial communities associated with rapid turbidite deposition in the Gulf of Mexico continental slope (IODP Expedition 308). *FEMS Microbiology Ecology* 69:410–424. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6941.2009.00718.x>

- Odom JM, Peck HD (1984) Hydrogenase, electron transfer proteins, and energy coupling in the sulfate-reducing bacteria *Desulfovibrio*. *Annu Rev Microbiol* 38:551–92
- Oksanen J (2013) Multivariate analysis of ecological communities in R: vegan tutorial
- Oliveira TF, Vonnrhein C, Matias M, et al (2008) The crystal structure of *Desulfovibrio vulgaris* dissimilatory sulfite reductase bound to DsrC provides novel insights into the mechanism of sulfate respiration. *The Journal of Biological Chemistry* 283:34141–34149. <https://doi.org/10.1074/jbc.M805643200>
- Orcutt B, Samarkin V, Boetius A, Joye S (2008) On the relationship between methane production and oxidation by anaerobic methanotrophic communities from cold seeps of the Gulf of Mexico. *Environmental Microbiology* 10:1108–1117. <https://doi.org/10.1111/j.1462-2920.2007.01526.x>
- Orcutt BN, Joye SB, Kleindienst S, et al (2010a) Impact of natural oil and higher hydrocarbons on microbial diversity, distribution, and activity in Gulf of Mexico cold-seep sediments. *Deep-Sea Research II* 57:2008–2021. <https://doi.org/10.1016/j.dsr2.2010.05.014>
- Orcutt BN, Joye SB, Kleindienst S, et al (2010b) Impact of natural oil and higher hydrocarbons on microbial diversity, distribution, and activity in Gulf of Mexico cold-seep sediments. *Deep-Sea Research Part II: Topical Studies in Oceanography* 57:2008–2021. <https://doi.org/10.1016/j.dsr2.2010.05.014>
- Orcutt BN, Lapham LL, Delaney J, et al (2017) Microbial response to oil enrichment in Gulf of Mexico sediment measured using a novel long-term benthic lander system. *Elementa Science of the Anthropocene* 5:2–18
- Orcutt BN, Sylvan JB, Knab NJ, Edwards KJ (2011) Microbial ecology of the dark ocean above, at, and below the seafloor. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 75:361–422. <https://doi.org/10.1128/MMBR.00039-10>
- Orsi WD (2018) Ecology and evolution of seafloor and subseafloor microbial communities. *Nature Reviews Microbiology* 16:671–683. <https://doi.org/10.1038/s41579-018-0046-8>
- Orsi WD, Barker Jørgensen B, Biddle JF (2016) Transcriptional analysis of sulfate reducing and chemolithoautotrophic sulfur oxidizing bacteria in the deep subseafloor. *Environmental Microbiology Reports* 8:452–460. <https://doi.org/10.1111/1758-2229.12387>
- Oude E., Luppens S., Marcelis C. et al. (1998). Kinetics of Acetate Oxidation by Two Sulfate Reducers Isolated from Anaerobic Granular Sludge. *Applied and environmental microbiology*. 2301-2303, 64(6). <https://doi.org/10.1128/aem.64.6.2301-2303.1998>.
- Pallud C, Van Cappellen P (2006) Kinetics of microbial sulfate reduction in estuarine sediments. *Geochimica et Cosmochimica Acta* 70:1148–1162 <https://doi.org/10.1016/j.gca.2005.11.002>
- Parkes RJ, Cragg B, Roussel E, et al (2014) A review of prokaryotic populations and processes in sub-seafloor sediments, including biosphere: Geosphere interactions. *Marine Geology* 352:409–425. <https://doi.org/10.1016/j.margeo.2014.02.009>
- Parkes RJ, Dowling NJE, White DC, et al (1993) Characterization of sulphate-reducing bacterial populations within marine and estuarine sediments with different rates of sulphate reduction. *FEMS Microbiology Ecology* 102:235–250. [https://doi.org/10.1016/0378-1097\(93\)90206-H](https://doi.org/10.1016/0378-1097(93)90206-H)
- Parkes RJ, Sass H (2007) The sub-seafloor biosphere and sulphate-reducing prokaryotes: Their presence and significance. In: *Sulphate-Reducing Bacteria: Environmental and Engineered Systems*. pp 329–358

- Pascoal F, Magalhães C, Costa R (2020) The Link Between the Ecology of the Prokaryotic Rare Biosphere and Its Biotechnological Potential. *Frontiers in Microbiology* 11: <https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.00231>
- Paulson JN, Stine OC, Corrada H, Pop M (2013) Robust methods for differential abundance analysis in marker gene surveys. *Nature Methods* 10:1200–1202. <https://doi.org/10.1016/j.physbeh.2017.03.040>
- Pelikan C, Herbold CW, Hausmann B, et al (2016) Diversity analysis of sulfite- and sulfate-reducing microorganisms by multiplex *dsrA* and *dsrB* amplicon sequencing using new primers and mock community-optimized bioinformatics. *Environ Microbiol* 18:2994–3009. <https://doi.org/10.1111/1462-2920.13139>
- Pérez-Jiménez JR, Young LY, Kerkhof LJ (2001) Molecular characterization of sulfate-reducing bacteria in anaerobic hydrocarbon-degrading consortia and pure cultures using the dissimilatory sulfite reductase (*dsrAB*) genes. *FEMS Microbiology Ecology* 35:145–150. [https://doi.org/10.1016/S0168-6496\(00\)00123-9](https://doi.org/10.1016/S0168-6496(00)00123-9)
- Perez-Mendoza AY, Hernandez-Alcantara P, Solis-Weiss V (2003) Bathymetric distribution and diversity of deep water polychaetous annelids in the Sigsbee Basin, northwestern Gulf of Mexico. *Hydrobiologia* 496:361–370. <https://doi.org/10.1023/a:1026133907343>
- Pester M, Bittner N, Deevong P, Wagner M (2015) A “rare biosphere” microorganism contributes to sulfate reduction in a peatland. *ISME Journal* 4:1591–1602. <https://doi.org/10.1038/ismej.2010.75.A>
- Plugge CM, Zhang W, Scholten JCM, Stams AJM (2011) Metabolic flexibility of sulfate-reducing bacteria. *Frontiers in Microbiology* 2:1–8. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2011.00081>
- Price MN, Dehal PS, Arkin AP (2009) Fasttree: Computing large minimum evolution trees with profiles instead of a distance matrix. *Molecular Biology and Evolution* 26:1641–1650. <https://doi.org/10.1093/molbev/msp077>
- Qian Z, Tianwei H, Mackey HR, et al (2019) Recent advances in dissimilatory sulfate reduction: from metabolic study to application. *Water Research* 150:162–181. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2018.11.018>
- Quillet L, Besaury L, Popova M, et al (2012) Abundance, diversity and activity of sulfate-reducing prokaryotes in heavy metal-contaminated sediment from a salt marsh in the Medway Estuary (UK). *Marine Biotechnology* 14:363–381. <https://doi.org/10.1007/s10126-011-9420-5>
- Rabus R, Fukui M, Wilkes H, Widdel F (1996) Degradative Capacities and 16S rRNA-Targeted Whole-Cell Hybridization of Sulfate-Reducing Bacteria in an Anaerobic Enrichment Culture Utilizing Alkylbenzenes from Crude Oil
- Rabus R, Hansen TA, Widdel F (2006) Dissimilatory sulfate- and sulfur-reducing prokaryotes. In: *The Prokaryotes: Prokaryotic Physiology and Biochemistry*. pp 309–404
- Rabus R, Hansen TA, Widdel F (2013) Dissimilatory sulfate- and sulfur-reducing prokaryotes. In: *The Prokaryotes: Prokaryotic Physiology and Biochemistry*. pp 1–662
- Rabus R, Ruepp A, Frickey T, et al (2004) The genome of *Desulfotalea psychrophila*, a sulfate-reducing bacterium from permanently cold Arctic sediments. *Environmental Microbiology* 6:887–902. <https://doi.org/10.1111/j.1462-2920.2004.00665.x>
- Rabus R, Venceslau SS, Wöhlbrand L, et al (2015) A post-genomic view of the ecophysiology, catabolism and biotechnological relevance of sulphate-reducing prokaryotes. In: *Advances in Microbial Physiology*. pp 55–321

- Raggi L, García-Guevara F, Godoy-Lozano EE, et al (2020) Metagenomic profiling and microbial metabolic potential of Perdido Fold Belt (NW) and Campeche Knolls (SE) in the Gulf of Mexico. *Frontiers in Microbiology* 11:1825. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.01825>
- Ramel F, Amrani A, Pieulle L, et al (2013) Membrane-bound oxygen reductases of the anaerobic sulfate-reducing *Desulfovibrio vulgaris* Hildenborough: Roles in oxygen defence and electron link with periplasmic hydrogen oxidation. *Microbiology (United Kingdom)* 159:2663–2673. <https://doi.org/10.1099/mic.0.071282-0>
- Ramírez D, Vega-Alvarado L, Taboada B, et al (2019) Bacterial diversity in surface sediments from the continental shelf and slope of the North West gulf of Mexico and the presence of hydrocarbon degrading bacteria. *Marine Pollution Bulletin* 150:110590. <https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2019.110590>
- Ramsing NB, Kühl M, Jørgensen BB (1993) Distribution of sulfate-reducing bacteria, O₂, and H₂S in photosynthetic biofilms determined by oligonucleotide probes and microelectrodes. *Applied and Environmental Microbiology* 59:3840–3849. <https://doi.org/doi:10.1128/AEM.59.11.3840-3849.1993>
- Ravenschlag K, Sahm K, Knoblauch C, et al (2000) Community structure, cellular rRNA content, and activity of sulfate-reducing bacteria in marine Arctic sediments. *Applied and Environmental Microbiology* 66:3592–3602. <https://doi.org/10.1128/AEM.66.8.3592-3602.2000>
- Reese BK, Mills HJ, Dowd SE, Morse JW (2013) Linking molecular microbial ecology to geochemistry in a coastal hypoxic zone. *Geomicrobiology Journal* 0451:160–172. <https://doi.org/10.1080/01490451.2012.659331>
- Rezende JR, Kjeldsen KU, Hubert CR, et al (2013) Dispersal of thermophilic *Desulfotomaculum* endospores into Baltic Sea sediments over thousands of years. *The ISME Journal* 7:72–84. <https://doi.org/10.1038/ismej.2012.83>
- Rickard D, Luther GW (2007) Chemistry of iron sulfides
- Rickard D, Mussmann M, Steadman JA (2017) Sedimentary sulfides. *Elements* 13:117–122. <https://doi.org/10.2113/gselements.13.2.117>
- Robador A, Müller AL, Sawicka JE, et al (2016) Activity and community structures of sulfate-reducing microorganisms in polar, temperate and tropical marine sediments. *ISME Journal* 10:796–809. <https://doi.org/10.1038/ismej.2015.157>
- Rognes T, Flouri T, Nichols B, et al (2016) VSEARCH: A versatile open source tool for metagenomics. *PeerJ* 2016:1–22. <https://doi.org/10.7717/peerj.2584>
- Roussel EG, Cragg BA, Webster G, et al (2015) Complex coupled metabolic and prokaryotic community responses to increasing temperatures in anaerobic marine sediments: Critical temperatures and substrate changes. *FEMS Microbiology Ecology* 91:1–16. <https://doi.org/10.1093/femsec/fiv084>
- Rowe GT, Elizabeth M, Kaegi C, et al (2013) Sediment community metabolism Associated with Continental Shelf Hypoxia, Northern Gulf of Mexico. *Estuaries* 26:1097–1106
- Rowe GT, Morse J, Nunnally C, Boland GS (2008) Sediment community oxygen consumption in the deep Gulf of Mexico. *Deep-Sea Research Part II* 55:2686–2691. <https://doi.org/10.1016/j.dsr2.2008.07.018>
- Sánchez-Soto Jiménez MaF, Cerqueda-García D, Montero-Muñoz JL, et al (2018) Assessment of the bacterial community structure in shallow and deep sediments of the Perdido Fold Belt region in the Gulf of Mexico. *PeerJ* 6:e5583. <https://doi.org/10.7717/peerj.5583>

- Sánchez-Soto MF, Cerqueda-García D, Alcántara-Hernández RJ, et al (2020) Assessing the Diversity of Benthic Sulfate-Reducing Microorganisms in Northwestern Gulf of Mexico by Illumina Sequencing of *dsrB* Gene. *Microbial Ecology*. <https://doi.org/10.1007/s00248-020-01631-5>
- Santos AA, Venceslau SS, Grein F, et al (2015) A protein trisulfide couples dissimilatory sulfate reduction to energy conservation. *Science* (1979) 350:1541–1545. <https://doi.org/10.1126/science.aad3558>
- Sass AM, Eschemann A, Ku M, et al (2002) Growth and chemosensory behavior of sulfate-reducing bacteria in oxygen-sulfide gradients. *FEMS Microbiology Ecology* 40:47–54. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6941.2002.tb00935.x>
- Sassen R, Roberts HH, Aharon P, et al (1993) Chemosynthetic bacterial mats at cold hydrocarbon seeps, Gulf of Mexico continental slope. *Organic Geochemistry* 20:77–89
- Sawicka JE, Jørgensen BB, Brüchert V (2012) Temperature characteristics of bacterial sulfate reduction in continental shelf and slope sediments. *Biogeosciences* 9:3425–3435. <https://doi.org/10.5194/bg-9-3425-2012>
- Schauer R, Bienhold C, Ramette A, Harder J (2010) Bacterial diversity and biogeography in deep-sea surface sediments of the South Atlantic Ocean. *ISME J* 4:159–170. <https://doi.org/10.1038/ismej.2009.106>
- Schnaars V, Wöhlbrand L, Scheve S, et al (2021) Proteogenomic Insights into the Physiology of Marine, Sulfate-Reducing, Filamentous *Desulfonema limicola* and *Desulfonema magnum*. *Microbial Physiology* 31:36–55. <https://doi.org/10.1159/000513383>
- Sekiguchi Y, Muramatsu M, Imachi H, et al (2008) *Thermodesulfovibrio aggregans* sp. nov. and *Thermodesulfovibrio thiophilus* sp. nov., anaerobic, thermophilic, sulfate-reducing bacteria isolated from thermophilic methanogenic sludge, and emended description of the genus *Thermodesulfovibrio*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 58:2541–2548. <https://doi.org/10.1099/ijs.0.2008/000893-0>
- Shin B, Kim M, Zengler K, et al (2019) Anaerobic degradation of hexadecane and phenanthrene coupled to sulfate reduction by enriched consortia from northern Gulf of Mexico seafloor sediment. *Scientific Reports* 9:1–13. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-36567-x>
- Shivani Y, Subhash Y, Sasikala C, Ramana CHV (2017) *Halodesulfovibrio spirochaetisodalis* gen. nov. sp. nov. and reclassification of four *Desulfovibrio* spp. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 67:87–93. <https://doi.org/10.1099/ijsem.0.001574>
- Slobodkin AI, Slobodkina GB (2019) Diversity of Sulfur-Disproportionating Microorganisms. *Microbiology (Russian Federation)* 88:509–522. <https://doi.org/10.1134/S0026261719050138>
- Snelgrove PVR, Henry Blackburn T, Hutchings PA, et al (1997) The importance of marine sediment biodiversity in ecosystem processes. *Ambio* 26:578–583. <https://doi.org/10.2307/4314672>
- Sørensen J, Christensen D, Jørgensen BB (1981) Volatile fatty acids and hydrogen as substrates for sulfate-reducing bacteria in anaerobic marine sediment. *Appl Environ Microbiol* 42:5–11
- Sorokin DY, Lückner S, Vejmekova D, et al (2012) Nitrification expanded: Discovery, physiology and genomics of a nitrite-oxidizing bacterium from the phylum Chloroflexi. *ISME Journal* 6:2245–2256. <https://doi.org/10.1038/ismej.2012.70>
- Soto LA, Vázquez-Botello A (2013) Legal Issues and Scientific Constraints in the Environmental Assessment of the Deepwater Horizon Oil Spill in Mexico Exclusive Economic Zone (EEZ)

-) in the Gulf of Mexico. *International Journal of Geosciences* 4:39–45. <https://doi.org/DOI:10.4236/ijg.2013.45B007>
- Stauffert M, Cravo-laureau C, Duran R (2015) Dynamic of sulphate-reducing microorganisms in petroleum-contaminated marine sediments inhabited by the polychaete *Hediste diversicolor*. *Environmental sciences of pollu* 22:15273–15284. <https://doi.org/10.1007/s11356-014-3624-y>
- Sun B, Cole JR, Tiedje JM (2001) *Desulfomonile limimaris* sp. nov., an anaerobic dehalogenating bacterium from marine sediments
- Sun H, Spring S, Lapidus A, et al (2010) Complete genome sequence of *Desulfarculus baarsii* type strain (2st14 T). *Standards in Genomic Sciences* 3:276–284. <https://doi.org/10.4056/sigs.1243258>
- Talavera G, Castresana J (2007) Improvement of phylogenies after removing divergent and ambiguously aligned blocks from protein sequence alignments. *Systematic Biology* 56:564–577. <https://doi.org/10.1080/10635150701472164>
- Tian H, Gao P, Chen Z, et al (2017) Compositions and abundances of sulfate-reducing and sulfur-oxidizing microorganisms in water-flooded petroleum reservoirs with different temperatures in China. *Frontiers in Microbiology* 8:1–14. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.00143>
- Torsvik V, Øvreås L, Thingstad TF (2002) Prokaryotic diversity — magnitude, dynamics, and controlling factors. *Science* (1979) 296:1064–6. <https://doi.org/10.1126/science.1071698>
- Trojan D, Schreiber L, Bjerg JT, et al (2020) A taxonomic framework for cable bacteria and proposal of the candidate genera *Electrothrix* and *Electronema*. *Systematic and Applied Microbiology* 39:297–306. <https://doi.org/10.1016/j.syapm.2016.05.006>
- Moreno-Ulloa A, Sicairos V, Tejada-Moral JA, Macias-Contreras M, Díaz F, Guerrero A, Gonzales R, Vazquez R, and Licea-Navarro A (2019). Metabolic and metagenomic profiling of hydrocarbon-degrading microorganisms obtained from the deep biosphere of the Gulf of México. *BioRxiv*. doi: <https://doi.org/10.1101/606806>
- Umezawa K, Kojima H, Kato Y, Fukui M (2020) Disproportionation of inorganic sulfur compounds by a novel autotrophic bacterium belonging to Nitrospirota. *Systematic and Applied Microbiology* 43:126110. <https://doi.org/10.1016/j.syapm.2020.126110>
- Valdes DS, Real E (2004) Nitrogen and phosphorus in water and sediments at Ria Lagartos coastal lagoon, Yucatan, Gulf of Mexico. In: *Indian Journal of Marine Sciences*. pp 338–345
- Valentine DL (2011) Emerging Topics in Marine Methane Biogeochemistry. *Annual Review of Marine Science* 3:147–171. <https://doi.org/10.1146/annurev-marine-120709-142734>
- van den Brand TPH, Roest K, Brdjanovic D, et al (2014) Influence of acetate and propionate on sulphate-reducing bacteria activity. *Journal of Applied Microbiology* 117:1839–1847. <https://doi.org/10.1111/jam.12661>
- Venceslau SS, Stockdreher Y, Dahl C, Pereira IAC (2014) The “bacterial heterodisulfide” DsrC is a key protein in dissimilatory sulfur metabolism. *Biochimica et Biophysica Acta - Bioenergetics* 1837:1148–1164. <https://doi.org/10.1016/j.bbabi.2014.03.007>
- Vigneron A, Alsop EB, Cruaud P, et al (2017) Comparative metagenomics of hydrocarbon and methane seeps of the Gulf of Mexico. *Nature Scientific Reports* 7:1–12. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-16375-5>
- Vigneron A, Cruaud P, Alsop E, et al (2018) Beyond the tip of the iceberg ; a new view of the diversity of sulfite- and sulfate-reducing microorganisms. *The ISME Journal* 12:2096–2099. <https://doi.org/10.1038/s41396-018-0155-4>

- Visser M, Worm P, Muyzer G, et al (2013) Genome analysis of *desulfotomaculum kuznetsovii* strain 17t reveals a physiological similarity with *pelotomaculum thermopropionicum* strain sit. *Standards in Genomic Sciences* 8:69–87. <https://doi.org/10.4056/sigs.3627141>
- Vuillemin A, Horn F, Friese A, et al (2018) Metabolic potential of microbial communities from ferruginous sediments. *Environmental Microbiology* 20:4297–4313. <https://doi.org/10.1111/1462-2920.14343>
- Vuillemin A, Kerrigan Z, D'Hondt S, Orsi WD (2020) Chloroflexi persisting for millions of years in oxic and anoxic deep-sea clay. *bioRxiv* 2020.05.26.116590. <https://doi.org/10.1101/2020.05.26.116590>
- Wagner M, Loy A, Klein M, et al (2005) Functional marker genes for identification of sulfate-reducing prokaryotes. In: *Methods in Enzymology*. pp 469–489
- Wagner M, Roger AJ, Flax JL, et al (1998) Phylogeny of dissimilatory sulfite reductases supports an early origin of sulfate respiration. *Journal of Bacteriology* 180:2975–2982
- Walker DJF, Nevin KP, Holmes DE, et al (2020) Syntrophus conductive pili demonstrate that common hydrogen-donating syntrophs can have a direct electron transfer option. *ISME Journal* 14:837–846. <https://doi.org/10.1038/s41396-019-0575-9>
- Walkley A, Black IA (1934) An examination of the Degtjaeff method for determining soil organic matter, and a proposed modification of the chromatic acid titration method. *Soil Science* 37:29–38. <https://doi.org/doi.org/10.1097/00010694-193401000-00003>
- Wang Y, Wegener G, Ruff SE, Wang F (2020) Methyl / alkyl-coenzyme M reductase-based anaerobic alkane oxidation in archaea. *Environmental Microbiology* 00:00. <https://doi.org/10.1111/1462-2920.15057>
- Wasmund K, Mußmann M, Loy A (2017) The life sulfuric: microbial ecology of sulfur cycling in marine sediments. *Environmental Microbiology Reports* 9:323–344. <https://doi.org/10.1111/1758-2229.12538>
- Watanabe T, Kojima H, Fukui M (2016) Identity of major sulfur-cycle prokaryotes in freshwater lake ecosystems revealed by a comprehensive phylogenetic study of the dissimilatory adenylylsulfate reductase. *Scientific Reports* 6:1–9. <https://doi.org/10.1038/srep36262>
- Wellsbury P, Parkes J (1995) Acetate bioavailability and turnover in an estuarine sediment. *FEMS Microbiology Ecology* 17:85–94
- Wentworth CK (1992) A scale of grade and class terms for clastic sediments. *The Journal of Geology* 30:377–392. <https://doi.org/doi.org/10.1086/622910>
- Wickham H (2010) ggplot2: elegant graphics for data analysis. *Journal of Statistical Software* 35:1–3. <https://doi.org/10.18637/jss.v035.b01>
- Wieringa EB, Overman J, Cypionka H (2000) Detection of abundant sulphate-reducing bacteria in marine oxic sediment layers by a combined cultivation and molecular approach. *Environmental Microbiology* 2:417–427. <https://doi.org/10.1046/j.1462-2920.2000.00123.x>
- Wooley JC, Godzik A, Friedberg I (2010) A Primer on metagenomics. *PLoS Computational Biology* 6:. <https://doi.org/10.1371/journal.pcbi.1000667>
- Wörner S, Pester M (2019) The active sulfate-reducing microbial community in littoral sediment of oligotrophic lake constance. *Frontiers in Microbiology* 10:. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.00247>
- Wu H, Guo Y, Wang G, et al (2011) Composition of bacterial communities in deep-sea sediments from the South China Sea, the Andaman Sea and the Indian Ocean. *African Journal of Microbiology Research* 5:5273–5283. <https://doi.org/10.5897/AJMR11.302>

- Xu X-W, Huo Y-Y, Bai X-D, et al (2011) *Kordiimonas lacus* sp. nov., isolated from a ballast water tank, and emended description of the genus *Kordiimonas*. *Int J Syst Evol Microbiol* 61:422–426. <https://doi.org/10.1099/ijs.0.018200-0>
- Yamada T, Sekiguchi Y, Hanada S, Imachi H, Ohashi A, Harada A, and Yoichi Kamagata (2010). *Anaerolinea thermolimos* sp. nov., *Levilinea saccharolytica* gen. nov., sp. nov. and *Leptolinea tardivitalis* gen. nov., sp. nov., novel filamentous anaerobes, and description of the new classes *Anaerolineae* class is nov. and *Caldilineae* class is nov. in the bacterial phylum *Chloroflexi*. 56, 1331–1340. DOI10.1099/ijs.0.64169-0
- Yang T, Speare K, Luke M, et al (2016) Distinct bacterial communities in surficial seafloor sediments following the 2010 DWH blowout. *Frontier in Microbiology* 7:1–18. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.01384>
- Youssef NH, Farag IF, Rinke C, Hallam SJ, Woyke T, Elshahed MS (2015). In Silico Analysis of the Metabolic Potential and Niche Specialization of Candidate Phylum "*Latescibacteria*" (WS3). *PlosOne*. DOI:10.1371/journal.pone.012749
- Zhang H, Sekiguchi Y, Hanada S, Hugenholz P, Kim H, Kamagata Y, and Nakamura K (2003). *Gemmatimonas aurantiacagen*. nov., sp. nov., a Gram-negative, aerobic, polyphosphate-accumulating micro-organism, the first cultured representative of the new bacterial phylum *Gemmatimonadetes* phyl. nov. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 53, 1155–1163. DOI10.1099/ijs.0.02520-0
- Zhang Y, Wang X, Zhen Y, et al (2017) Microbial diversity and community structure of sulfate-reducing and sulfur-oxidizing bacteria in sediment cores from the East China Sea. *Frontiers in Microbiology* 8:1–17. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.02133>
- Zhang Y, Zhen Y, Tiezhu M, et al (2016) Molecular characterization of sulfate-reducing bacteria community in surface sediments from the adjacent area of Changjiang estuary. *Oceanic and Coastal Sea Research* 15:107–116. <https://doi.org/10.1007/s11802-016-2781-7>
- Zhilina TN, Zavarzina DG, Kuever J, et al (2005) *Psychrobacter aquimaris* sp. nov. and *Psychrobacter namhaensis* sp. nov., isolated from sea water of the South Sea in Korea. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 55:1007–1013. <https://doi.org/10.1099/ijs.0.63464-0>
- Zhou L, Ou P, Zhao B, et al (2021) Assimilatory and dissimilatory sulfate reduction in the bacterial diversity of biofoulant from a full-scale biofilm-membrane bioreactor for textile wastewater treatment. *Science of the Total Environment* 772:.. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2021.145464>
- Zinger L, Amaral-zettler LA, Fuhrman JA, et al (2011) Global Patterns of Bacterial Beta-Diversity in Seafloor and Seawater Ecosystems. *PLoS one* 6:1–11. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0024570>

7. ANEXOS

Anexo 1. Variables fisicoquímicas.

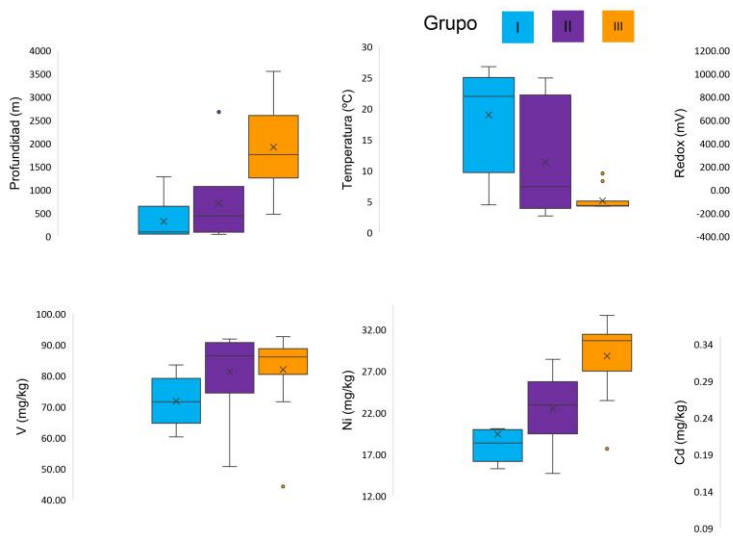
Muestra	^a	^a	^b	^b	^a	^b	^b	^b	^b	^b
	Prof. m	Temp. °C	Redox mV	pH	OD mg/L	MO	CO	AM	AF	AMF
						(%)				
A1	50.4	25.05	195.80	7.49	4.12	1.9	1.1	43.3	39.8	16.9
A2	97.6	21.37	50.53	7.34	2.89	0.6	0.4	37.2	52.1	10.7
A3	372.5	9.38	-118.17	7.27	2.41	0.5	0.3	46.1	38.2	15.6
A4	1000	8.3	164.28	7.24	2.5	0.6	0.3	41.4	52.9	5.6
A5	1448	4.36	228.67	7.08	4.5	1.1	0.6	38.5	51.2	10.3
A6	1998	4.27	245.67	7.71	4.62	0.9	0.5	24.4	69.9	5.7
B1	47	26.77	-125.37	7.23	4.62	1.6	0.9	89.6	8.5	1.9
B2	105.8	22.6	-169.60	7.33	4.15	0.9	0.5	31.1	57.2	11.8
B3	503.8	5.43	-132.23	7.28	3.58	0.4	0.2	33.6	55.3	11.2
B4	1065.7	5.08	264.67	7.35	3.83	0.2	0.1	46.4	32.2	21.4
B5	1644.5	4.29	1105.33	7.11	4.57	0.2	0.1	76.0	18.6	5.4
B6	1971	4.26	241.67	7.03	4.66	0.4	0.3	25.9	62.7	11.4
B7	2676.8	4.32	237.00	7.25	4.61	0.2	0.1	29.3	54.0	16.6
C1	44	24.95	-107.50	7.38	4.61	0.2	0.1	26.8	39.2	33.9
C2	107	21.27	-134.30	7.35	3.2	0.4	0.2	32.5	47.3	20.2
C3	473.4	9.53	-112.13	7.52	2.42	0.2	0.1	32.0	48.9	19.1
C4	826	6.1	-129.03	7.29	3.2	0.3	0.2	64.6	29.4	6.0
C5	1280	4.46	255.67	7.08	4.4	0.2	0.1	20.1	63.5	16.4
C6	2215	4.28	238.67	7.01	4.63	0.4	0.2	23.5	49.9	26.6
C7	2984.7	4.34	264.67	7.16	4.6	0.4	0.3	27.9	67.5	4.6
D1	48.1	24.97	-121.93	7.06	4.11	0.1	0.1	23.5	49.9	26.6
D2	93	20.4	-72.70	7.47	2.75	0.6	0.4	30.6	51.2	18.3
D3	537	2.7	-86.83	7.39	2.4	1.1	0.6	32.2	58.5	9.3
D4	1616	4.27	248.33	7.04	4.61	0.3	0.2	45.4	46.1	8.5
D5	1760	4.27	236.33	7.20	4.62	0.8	0.4	29.8	57.7	12.5
D6	3254.7	5.09	228.33	7.01	4.59	0.8	0.5	62.6	33.5	3.9
D7	3548	4.4	238.33	7.31	4.58	0.6	0.4	17.4	68.1	14.4

Prof., profundidad de agua; **Temp.**, Temperatura; **OD**, oxígeno disuelto; **MO**, materia orgánica; **CO**, carbono orgánico; **AM**, arenas medias; **AF**, arenas finas; **AMF**, arenas muy finas. *a* Medido en el fondo de la columna de agua. *b* Medido en sedimentos. *Variables ambientales relacionadas con los cambios en la estructura de la comunidad de MSR basado en secuencias del gen *dsrB* ($p < 0.05$)

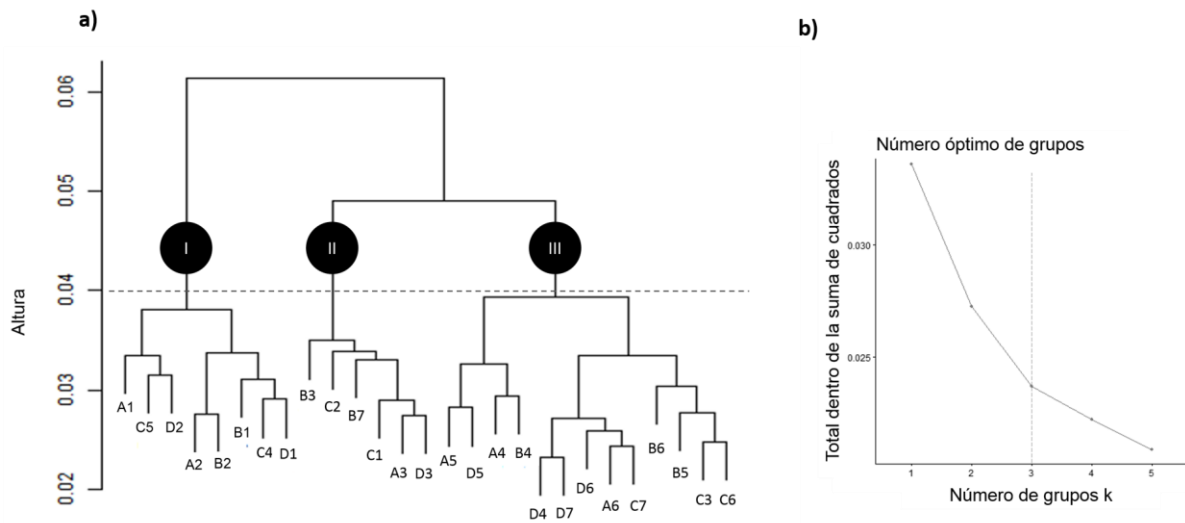
Continuación **Anexo 1**

<i>*b</i>	<i>*b</i>	<i>*b</i>	<i>*b</i>	<i>*b</i>	<i>*b</i>
V	Ni	Cd	Pb	Al	HCT
mg/kg					
60.29	15.27	0.15	19.48	13841.36	18.85
64.37	16.35	0.13	23.16	9975.98	9.98
84.52	24.84	0.23	28.17	11579.11	7.95
44.27	17.67	0.22	11.19	11839.25	21.95
82.21	31.03	0.23	19.90	7368.22	7.26
71.64	25.53	0.23	18.27	6662.05	7.26
70.69	18.08	0.16	24.54	6239.81	11.69
72.48	18.64	0.16	26.67	8904.00	8.40
50.68	14.71	0.11	17.75	6219.00	7.59
87.83	29.99	0.26	27.09	12744.73	6.46
84.73	31.98	0.33	21.77	7709.69	5.56
86.73	30.74	0.26	24.17	7524.37	14.68
90.39	28.43	0.21	20.79	9679.60	15.27
82.38	21.07	0.19	28.79	13371.77	8.86
91.83	22.99	0.19	32.76	15311.78	7.34
84.36	23.46	0.21	31.62	12351.04	9.73
77.16	19.66	0.21	28.91	9188.09	11.49
83.50	31.25	0.28	23.39	12877.24	11.19
78.75	28.48	0.24	22.32	14033.64	9.36
92.63	30.66	0.24	23.68	11953.66	11.40
65.73	16.07	0.19	25.21	10430.10	15.02
79.84	20.09	0.21	31.36	12534.28	10.31
88.36	22.84	0.28	34.26	6306.19	6.15
86.83	30.84	0.30	26.66	4577.73	3.38
90.48	33.71	0.30	22.82	5945.74	4.56
86.09	28.72	0.23	25.32	12652.38	16.22
89.65	31.83	0.24	20.34	15069.57	10.64

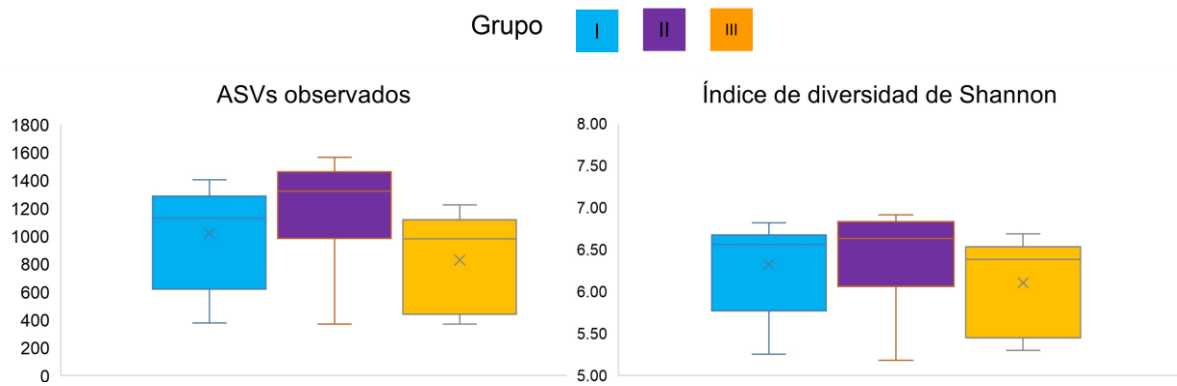
Metales pesados: **V**, vanadio; **Ni**, níquel; **Cd**, cadmio; **Pb**, plomo. **HCT**, hidrocarburos totales. *a* Medido en el fondo de la columna de agua. *b* Medido en sedimentos. *Variables ambientales relacionadas con los cambios en la estructura de la comunidad de MSR basado en secuencias del gen *dsrB* ($p < 0.05$)



Anexo 2. Gráfico de cajas de variables fisicoquímicas con diferencias significativas ($p < 0.05$) entre los grupos comparados. El tache en el gráfico de caja representa el valor promedio y la línea horizontal la mediana. Tamaño de la muestra del grupo I $n=8$, grupo II $n=6$ y grupo III $n=13$.



Anexo 3. a) Dendrograma construido con la matriz de distancias UniFraq mediante el análisis jerárquico de agrupamiento aglomerativo con método Ward de varianza mínima. La Matriz de distancias UniFraq se generó a partir de las secuencias del gen 16S ARNr. **b)** Número óptimo de grupos definido con la herramienta elbow



Anexo 4. Gráfico de cajas mostrando estimadores de riqueza y diversidad. Riqueza como el número de ASV observados y diversidad como el valor del índice de diversidad de Shannon. El tache en el gráfico de caja representa el valor promedio y la línea horizontal la mediana. Tamaño de la muestra del grupo I n=8, grupo II n=6 y grupo III n=13. Basado en secuencias del gen 16S ARNr

Anexo 5. Índice de correlación de Spearman. La Variable(1) se relacionó con los cambios en la estructura y abundancia de las comunidades sulfato-reductoras. Significancia estadística con valor $p < 0.05$

Variable(1)	Variable(2)	n	Spearman
Temperatura	Profundidad	23	-0.847
Redox	Profundidad	23	0.679
Redox	Temperatura	23	-0.644
Redox	Oxígeno disuelto	23	0.454
Níquel	Profundidad	23	0.742
Níquel	Temperatura	23	-0.711
Níquel	Oxígeno disuelto	23	0.423
Níquel	Redox	23	0.673
Níquel	Vanadio	23	0.788
Cadmio	Profundidad	23	0.695
Cadmio	Temperatura	23	-0.815
Cadmio	Redox	23	0.681
Cadmio	Vanadio	23	0.644
Cadmio	Níquel	23	0.835
ASVs observados	Profundidad	23	-0.741
ASVs observados	Temperatura	23	0.615
ASVs observados	Redox	23	-0.528
ASVs observados	Níquel	23	-0.687
ASVs observados	Cadmio	23	-0.631
Shannon	Profundidad	23	-0.751
Shannon	Temperatura	23	0.637
Shannon	Redox	23	-0.533
Shannon	Níquel	23	-0.692
Shannon	Cadmio	23	-0.647
Shannon	ASVs observados	23	0.999
copias gen <i>dsrB</i>	Profundidad	23	-0.685
copias gen <i>dsrB</i>	Temperatura	23	0.737
copias gen <i>dsrB</i>	Redox	23	-0.708
copias gen <i>dsrB</i>	Níquel	23	-0.696
copias gen <i>dsrB</i>	Cadmio	23	-0.788
copias gen <i>dsrB</i>	ASVs observados	23	0.740
copias gen <i>dsrB</i>	Shannon	23	0.747