

## Distribución y actividad potencial de bacterias desnitrificantes aerobias aisladas de sedimentos de una laguna costera al noroeste de México

Pedro Peña-Zuñiga<sup>1</sup>, Guillermo A Samperio-Ramos<sup>2</sup>, Silvia Pajares-Moreno<sup>1\*</sup>

### INFORMACIÓN DEL ARTÍCULO

#### Historial del artículo:

Recibido 08 de enero de 2024

Aceptado 01 de julio de 2024

Publicado 02 de agosto de 2024

#### READ IN ENGLISH:

<https://doi.org/10.7773/cm.v2024.3459>

#### AUTOR DE CORRESPONDENCIA

\* E-mail: spajares@cmar.unam.mx

<sup>1</sup> Laboratorio de Ecología Microbiana Acuática, Instituto de Ciencia del Mar y Limnología, Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM), 04510 Coyoacán, Ciudad de México, México.

<sup>2</sup> Laboratorio de Biogeoquímica de Nutrientes, Instituto de Investigaciones Oceanológicas, Universidad Autónoma de Baja California (UABC), 22860 Ensenada, Baja California, México.

**RESUMEN.** La desnitrificación es la principal vía por la cual el nitrógeno fijado se pierde en los sistemas marinos y consiste en la respiración secuencial de nitrato a nitrógeno molecular a través de diversos microorganismos heterótrofos. Ya que los sedimentos estuarinos representan un nicho importante para la desnitrificación, este estudio evaluó la distribución y actividad potencial de bacterias desnitrificantes aerobias aisladas de sedimentos a 2 profundidades y en 2 hábitats (con pastos de *Zostera marina* y sin pastos) a lo largo de un transecto en la Bahía de San Quintín (México), así como su relación con diferentes parámetros ambientales. Se aislaron 1,611 bacterias, de las cuales 85.1% contuvieron alguno de los genes desnitrificantes (*nirK*, *nirS* o *nosZ*). Su distribución fue heterogénea en la bahía y estuvo influenciada principalmente por la textura, el pH, el carbono orgánico total y el nitrógeno total de los sedimentos, encontrándose una mayor abundancia de bacterias desnitrificantes en los sedimentos superficiales (66.2%). Los aislados desnitrificantes se clasificaron en 23 especies pertenecientes a  $\gamma$ -Proteobacteria (82.4% de los aislados),  $\alpha$ -Proteobacteria (7.9%), Bacilli (5.7%) y Actinobacteria (4%). Se comprobó la actividad desnitrificante en condiciones aerobias en 7 especies de bacterias portadoras de genes desnitrificantes: *Paracoccus marcusii*, *Planococcus maritimus*, *Planococcus rifietoensis*, *Pseudomonas songnenensis*, *Psychrobacter alimentarius*, *Psychrobacter celer* y *Psychrobacter piscatorii*. Los resultados sugieren que estos sedimentos presentan una elevada abundancia de bacterias cultivables con genes *nirK*, *nirS* o *nosZ*; sin embargo, en la mayoría no se pudo comprobar la actividad desnitrificante en condiciones aerobias, posiblemente debido a la inactividad de estos genes o de aquellos involucrados en la reducción de nitrato (*nas*, *nar* o *nap*). Este estudio representa el primer paso hacia el entendimiento de la ecología de los microorganismos involucrados en la desnitrificación aerobia en la Bahía de San Quintín y en las lagunas costeras en general.

**Palabras clave:** aislamiento, desnitrificación aerobia, estuario, genes desnitrificantes, sedimentos.

## INTRODUCCIÓN

La desnitrificación es un proceso importante del ciclo del nitrógeno (N) marino (Hutchins y Capone 2023). Se trata de una vía respiratoria modular realizada por diversos microorganismos, principalmente anaerobios facultativos heterótrofos, y consiste en la reducción secuencial de nitrato ( $\text{NO}_3^-$ ), nitrito ( $\text{NO}_2^-$ ), óxido nítrico (NO) y óxido nitroso ( $\text{N}_2\text{O}$ ) a N molecular ( $\text{N}_2$ ) en una vía completa, o quedándose en  $\text{N}_2\text{O}$  en una vía incompleta (Zumft 1997). Este proceso puede producir  $\text{N}_2\text{O}$ , un gas de efecto invernadero 300 veces más potente que el dióxido de carbono (Ravishankara et al. 2009), además participa en el reciclaje de la materia orgánica y elimina el N

reactivo en ambientes limitados en oxígeno ( $\text{O}_2$ ), como los sedimentos marinos (Devol 2015).

Las metaloenzimas involucradas en la desnitrificación son las nitrato reductasas dependientes de molibdeno citoplasmáticas (Nas), de membrana (Nar) y periplásmicas (Nap); las nitrito reductasas con sitio activo de cobre (NirK) o hierro hemo (NirS); las óxido nítrico reductasas (Nor); y las óxido nitroso reductasas dependientes de cobre (Nos) (Zumft 1997). Los genes desnitrificantes más usados como marcadores en el estudio de las comunidades desnitrificantes son *nirK/nirS* porque generan NO, el primer producto gaseoso, así como el gen *nosZ* por participar en la reducción de  $\text{N}_2\text{O}$  (Damashek y Francis 2017, Pajares y Ramos 2019).

Acceso abierto

En línea ISSN: 2395-9053

Verificado con Similarity Check impulsado por iThenticate

<https://doi.org/10.7773/cm.v2024.3459>



Este es un artículo de acceso abierto distribuido bajo los términos de [Creative Commons Attribution 4.0 International License \(CC BY 4.0\)](https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/), que permite compartir y adaptar el trabajo, siempre y cuando se dé el crédito apropiado a los autores originales y la fuente, proporcione un enlace a la licencia Creative Commons e indique si se realizaron cambios. Las figuras, tablas y otros elementos del artículo están incluidos en la licencia CC BY 4.0 del artículo, a menos que se indique lo contrario. Debe solicitar permiso al titular de los derechos de autor para utilizar material no cubierto por esta licencia. El título de la revista está protegido por derechos de autor propiedad de la Universidad Autónoma de Baja California, y el título y el logotipo de la revista no están sujetos a esta licencia.

Ciertos microorganismos también pueden realizar la desnitrificación utilizando simultáneamente el  $O_2$  y el  $NO_3^-$  como aceptores de electrones (e.g., Lu et al. 2019, Cheng et al. 2020, Feng et al. 2020). La desnitrificación aerobia fue propuesta formalmente por Robertson y Kuenen (1984) y ha sido reportada en sedimentos costeros permeables (Gao et al. 2010, Marchant et al. 2017). Esta ruta sigue la misma secuencia de reducciones que la desnitrificación anaerobia, diferenciándose por presentar una cadena de transporte de electrones más ramificada y una reducción de  $NO_3^-$  dominada por Nap y por facilitar la coocurrencia de la nitrificación y desnitrificación (Yang et al. 2020a, Zhang et al. 2023). Además, los microorganismos que realizan la desnitrificación aerobia tienen la ventaja de que su actividad metabólica no se interrumpe por la presencia de  $O_2$ .

Las zonas costeras sustentan el 44% de la desnitrificación global (Seitzinger et al. 2006). En particular, la desnitrificación en los estuarios inversos influenciados por eventos de surgencias, como la Bahía de San Quintín (México), contribuye a la eliminación del exceso de  $NO_3^-$  y materia orgánica que llegan del océano (Camacho-Ibar et al. 2003). Además, los principales factores ambientales que regulan la desnitrificación en los sedimentos costeros son el  $O_2$  disuelto, el  $NO_3^-$  y la materia orgánica (Devol 2015). Por otra parte, los pastos marinos tienden a intensificar las tasas de desnitrificación, ya que facilitan la disponibilidad de  $NO_3^-$  y materia orgánica en forma de tejidos vegetales (Eyre et al. 2016).

Las proteobacterias son el grupo microbiano más abundante en llevar a cabo este metabolismo en los ambientes marinos, en particular los géneros *Pseudomonas*, *Alcaligenes* y *Paracoccus* (Sousa y Bhosle 2012). Sin embargo, se desconoce la taxonomía y actividad de bacterias desnitrificantes de sedimentos de estuarios inversos. Además, existen muy pocos estudios sobre bacterias desnitrificantes aerobias aisladas en sedimentos marinos (Zheng et al. 2011, Zhang et al. 2023) y aún menos en sistemas costeros (Chen et al. 2020). Por lo tanto, el objetivo del presente trabajo fue evaluar la distribución de bacterias aerobias con genes desnitrificantes aisladas de los sedimentos de la Bahía de San Quintín y su relación con diferentes parámetros ambientales, así como la actividad potencial desnitrificante en condiciones aerobias en aquellos aislados que presentaron los genes marcadores *nirK*, *nirS* o *nosZ*.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### Sitio de estudio y muestreo

San Quintín es una laguna costera hipersalina de ~2 m de profundidad promedio situada en un terreno basáltico de conos volcánicos cineríticos en la costa noroeste de la Península de Baja California, México (Fig. 1). El 45% del área de la bahía está cubierto por praderas de *Zostera marina* (Ward et al. 2003). La bahía tiene forma de “Y” y comprende un brazo oriental prístino conocido como Brazo San Quintín y un brazo occidental con actividad ostrícola conocido como

Bahía Falsa. Las aportaciones terrestres de agua y nutrientes a la bahía son mínimas; la circulación está dominada por los intercambios mareales con el Océano Pacífico y la surgencia costera es la principal fuente de nutrientes (Camacho et al. 2003). El tiempo de residencia medio del agua a la entrada de la bahía es menor a 2 días, mientras que en la parte más interna es mayor a 12 días (Canu et al. 2016).

En octubre de 2021 se colectaron 4 núcleos de sedimentos en zonas con praderas de *Z. marina* (sedimentos con pasto) y otros 4 núcleos en zonas sin pasto (sedimentos desnudos) ~25 m de los bordes de las praderas en un transecto de 3 estaciones (boca, media y cabeza) en el Brazo San Quintín, evitando la zona del canal (Fig. 1). Los núcleos se colectaron mediante SCUBA con nucleadores de PVC (5 cm de diámetro y 25 cm de profundidad), los cuales se sellaron en bolsas de plástico estériles, se almacenaron a 4 °C y se transportaron al laboratorio en un plazo de 5 h. En el laboratorio de Biogeoquímica de Nutrientes del Instituto de Investigaciones Oceanológicas de la Universidad Autónoma de Baja California (UABC, Ensenada) se obtuvieron los estratos superiores (superficie: 0-5 cm) e inferiores (fondo: 15-20 cm) de 3 núcleos por zona y se caracterizaron sus propiedades fisicoquímicas. El aislamiento de las bacterias desnitrificantes se realizó a partir de muestras compuestas y homogeneizadas procedentes de 3 núcleos por zona, las cuales se congelaron a -80 °C hasta su procesamiento en el laboratorio de Ecología Microbiana Acuática del Instituto de Ciencias del Mar y Limnología de la Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM, Ciudad de México). En cada estación se midió *in situ* la temperatura, salinidad y  $O_2$  disuelto de la columna de agua por encima de los sedimentos con una sonda multiparamétrica YSI 6-Series (Yellow Spring Instruments, Yellow Springs, EE. UU.).

### Análisis fisicoquímicos

Los análisis fisicoquímicos se llevaron a cabo por triplicado (excepto los perfiles de  $O_2$ , que se determinaron en un núcleo intacto por estación y hábitat) como se describe en Samperio-Ramos et al. (2024). Brevemente, el perfil del  $O_2$  disuelto se midió con un microsensado Unisense (Aarhus, Dinamarca) en los núcleos equilibrados por burbujeo constante durante 6-12 h. La textura de los sedimentos se determinó con un analizador de partículas LA-910 (Horiba Instruments, Irvine, EE. UU.) y el pH se analizó con un pHmetro Starter 2100 (Ohaus, Parsippany, EE. UU.). Las concentraciones de Fe(II) y Fe(III) se obtuvieron por el método de extracción con HCl y ferrozina (Lovley y Phillips 1987, Samperio-Ramos et al. 2016) utilizando un espectrofotómetro FLAME-S UV-Vis (Ocean Insight, Orlando, EE. UU.). El carbono orgánico total (COT) y el N total (NT) se determinaron en un analizador Elemental Vario (Elemental Americas, Inc., Ronkonkoma, EE. UU.). El contenido de carbohidratos totales se determinó por hidrólisis ácida con  $H_2SO_4$  a 105 °C durante 25 h (Myklestad et al. 1997). Se extrajeron  $NO_3^-$  y  $NO_2^-$  con KCl

(Wheatley et al. 1989) y se analizaron con un autoanalizador de flujo segmentado AA3-HR (Seal Analytical Ltd., Mequon, EE. UU.).

### Aislamiento de bacterias desnitrificantes

A partir de 100 mg de 12 muestras compuestas de sedimentos (correspondientes a 3 estaciones, 2 hábitats y 2 profundidades) procedentes de 3 núcleos por zona de muestreo, se sembraron alícuotas de 100  $\mu$ L de diluciones seriadas ( $10^{-1}$ ,  $10^{-2}$  y  $10^{-3}$ ) en 2 medios de cultivo selectivos para bacterias desnitrificantes (medio marino: 5 g de peptona de caseína, 1 g  $\text{KNO}_3$ , 1.5 g de extracto de carne, 1.5 g de extracto de levadura, 15 g de agar bacteriológico y 35 g de sales marinas por litro de agua destilada; medio Braker: 37.35 g de medio marino comercial, 0.51 g  $\text{KNO}_3$ , 0.5 g de extracto de levadura y 15 g de agar bacteriológico por litro de agua destilada), los cuales fueron incubados en condiciones aerobias durante 2-4 días a  $28 \pm 1$  °C. Las colonias obtenidas se caracterizaron morfológicamente. Posteriormente, se resembró una colonia representante en el medio de cultivo donde fue aislada y en condiciones aerobias durante 1-2 días a  $28 \pm 1$  °C para la obtención de suficiente biomasa.

### Amplificación de genes desnitrificantes, secuenciación del gen ARNr 16S y filogenia

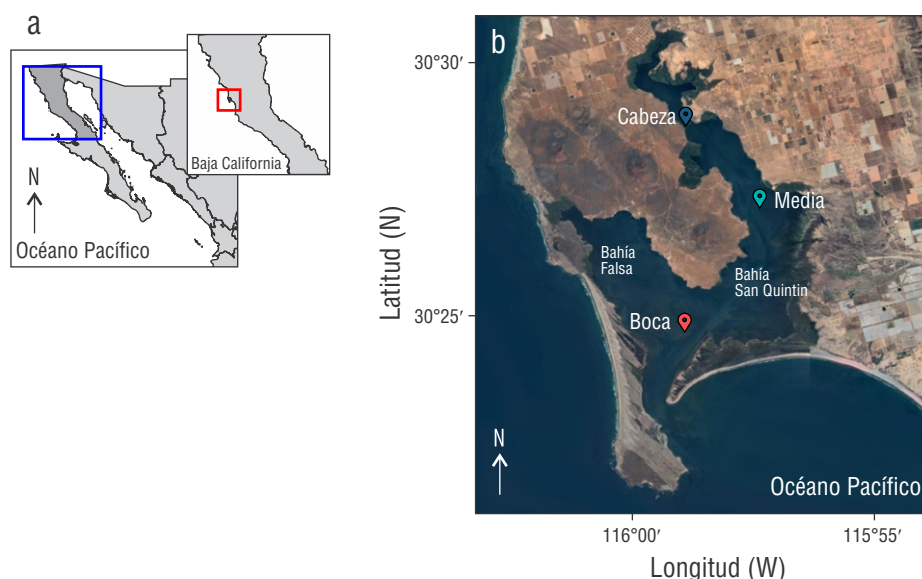
Se extrajo el ADN de cada representante bacteriano con la técnica de bromuro de hexadeciltrimetilamonio (CTAB) al 2% (Stewart y Via 1993) y se verificó su calidad y concentración en un espectrofotómetro NanoDrop 2000c (Thermo Fisher Scientific, Waltham, EE. UU.). Se amplificaron los genes *nirK*, *nirS* y *nosZ* mediante la reacción en cadena de

la polimerasa (PCR) usando 2 pares de primers diferentes por gen (Tabla 1), considerándose una amplificación positiva con al menos uno de los pares de primers. Dada la alta variabilidad de los genes desnitrificantes, se emplearon primers degenerados para poder detectar la mayor parte posible de la comunidad desnitrificante, que es filogenéticamente muy diversa (Wei et al. 2015). La concentración final de los reactivos usados en las PCR fue: Buffer  $0.9\times$  suplementado con 2.7 mM de  $\text{MgCl}_2$  y 0.9 mM de dNTPs, 0.2  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$  de albúmina de suero bovino grado molecular (BioLabs, San Diego, EE. UU.), 0.3-0.5  $\mu\text{M}$  de cada primer, 0.025 U/ $\mu\text{L}$  de MyTaq (Bioline, Londres, Reino Unido), 1.7 ng/ $\mu\text{L}$  de ADN y agua de grado molecular. Se comprobó la presencia de *nirK*, *nirS* o *nosZ* por electroforesis en agarosa.

Se amplificó el gen ARNr 16S mediante PCR en el ADN de los representantes con uno o más genes desnitrificantes (Tabla 1) y se secuenció por el método de Sanger en el Instituto de Biología de la UNAM (Ciudad de México). Las secuencias se clasificaron taxonómicamente con las herramientas en línea Classifier del Ribosomal Database Project (Cole et al. 2014) y BLASTn del Centro Nacional para la Información Biotecnológica (NCBI) (Altschul et al. 1990). Posteriormente, las secuencias se alinearon con el algoritmo ClustalW en BioEdit (Hall 1999) y se realizó un árbol filogenético con el método de neighbor-joining y un bootstrap de 10,000 repeticiones en MEGA 11 (Tamura et al. 2021), el cual se editó en el programa Tree of Life (Ciccarelli et al. 2006).

### Pruebas de reducción de $\text{NO}_3^-$ y $\text{NO}_2^-$

Para determinar la actividad potencial desnitrificante en condiciones aerobias de las bacterias aisladas con los



**Figura 1.** Localización de la Bahía de San Quintín (cuadro rojo) en Baja California (cuadro azul), México (a). Localización de las estaciones de muestreo en la Bahía de San Quintín (cabeza [marcador azul marino], media [marcador turquesa] y boca [marcador coral]) (b).

**Tabla 1.** Primers utilizados para amplificar los genes *nirK*, *nirS*, *nosZ* y ARNr 16S, y sus condiciones de termociclado. Abreviaturas: touchdown (TD), ciclo (c) y pares de bases (pb).

Gen	Primer	Secuencia del primer (5'–3')	Condiciones del termociclado	Longitud	Referencia
<i>nirK</i>	nirK1F	GG(A/C)ATGGT(G/T)CC(C/G)TGGCA	95 °C × 5 min, 10 TD (95 °C × 30 s, 56-51 °C × 30 s, 72 °C × 45 s), 25 c (95 °C × 30 s, 51 °C × 30 s, 72 °C × 45 s), 72 °C × 7 min	510 pb	Braker et al. (1998)
	nirK5R	GCCTCGATCAG(A/G)TT(A/G)TGG			
	F1aCu	ATCATGGT(C/G)CTGCCGCG	95 °C × 5 min, 6 TD (95 °C × 15 s, 63-58 °C × 30 s, 72 °C × 30 s), 34 c (95 °C × 15 s, 58 °C × 30 s, 72 °C × 30 s), 72 °C × 5 min	473 pb	Hallin et al. (1999)
<i>nirS</i>	R3Cu	GCCTCGATCAG(A/G)TTGTGGTT			
	cd3aF	GT(C/G)AACGT(C/G)AAGGA(A/G)AC(C/G)GG	95 °C × 5 min, 6 TD (95 °C × 30 s, 62-57 °C × 20 s, 72 °C × 40 s), 34 c (95 °C × 30 s, 57 °C × 20 s, 72 °C × 40 s), 72 °C × 5 min	425 pb	Michotey et al. (2000)
	R3cd	GA(C/G)TTCGG(A/G)TG(C/G)GTCTTGA			
<i>nosZ</i>	nirS1F	CCTA(C/T)TGGCCGCC(A/G)CA(A/G)T	95 °C × 5 min, 10 TD (95 °C × 30 s, 57-52 °C × 30 s, 72 °C × 1 min), 30 c (95 °C × 30 s, 52 °C × 30 s, 72 °C × 1 min), 72 °C × 7 min	890 pb	Braker et al. (1998)
	nirS6R	CGTTGAACTT(A/G)CCGGT			
	nosZ1-2F	CGCRACGGCAASAAGGTSMSSTG	95 °C × 5 min, 35 c (95 °C × 30 s, 60 °C × 30 s, 72 °C × 30 s), 72 °C × 5 min	267 pb	Throback et al. (2004)
<i>nosZ</i>	nosZ1-2R	CAKRTGACKSGCARTGGCAGAA			
	Nos661F	CGGCTGGGGGCTGACCAA	94 °C × 5 min, 35 c (94 °C × 30 s, 55 °C × 1 min, 72 °C × 1 min), 72 °C × 10 min	1,140 pb	Scala y Kerkhof (1998)
ARNr 16S	Nos1773R	AACGA(A/C/G)CAG(T/C)TGATCGA(T/C)AT			
	27F	TACCTTGTTACGACTT	94 °C × 5 min, 30 c (94 °C × 1 min, 52 °C × 1 min, 72 °C × 1.20 min), 72 °C × 10 min	1,465 pb	Lane et al. (1985)
	1492R	AGAGTTTGATCMTGGCTCAG			

genes *nirK*, *nirS* o *nosZ* se llevó a cabo la prueba modificada de Holding y Colle (1971) en tubos con caldo marino o Braker a  $28 \pm 1$  °C y campana Durham hasta alcanzar su fase exponencial (~48 h). Se tomaron alícuotas de 5 mL y se añadieron 5 gotas de reactivo  $\beta$  (0.4 g de ácido sulfanílico y 50 mL de ácido acético 5N) y 5 gotas de reactivo  $\alpha$  (0.25 g de  $\alpha$ -naftilamina y 50 mL de ácido acético 5N). En los casos en los que no se produjo un viraje a rojo (ausencia de  $\text{NO}_2^-$ ), se añadió ~0.1 g de zinc en polvo para comprobar la presencia o ausencia de  $\text{NO}_3^-$ . La presencia de gas en la campana Durham fue indicativo de producción de N gaseoso.

#### Análisis de datos

Los datos se analizaron en RStudio v. 2023.3.0 (Posit team 2023). Se calcularon los índices de diversidad  $\alpha$  de Chao1, Simpson y Shannon de la comunidad desnitrificante con el

paquete ‘vegan’ (Oksanen et al. 2021). Con los datos de abundancias por especie se realizó: (1) un análisis de distribución de las especies desnitrificantes mediante un mapa de calor con cladograma usando la matriz de disimilitud de Canberra y el agrupamiento ‘average’ con el paquete ‘ComplexHeatmap’ (Gu et al. 2016), (2) una matriz de correlación de Spearman con los datos físicoquímicos usando los paquetes ‘corrplot’ (Wei y Simko 2021) y ‘Hmisc’ (Harrell 2021) y (3) un análisis de la estructura de la comunidad desnitrificante mediante un escalamiento multidimensional no métrico (NMDS, por sus siglas en inglés) usando la matriz de disimilitud de Bray-Curtis con el paquete ‘vegan’ y graficado con el paquete ‘ggplot2’ (Wickham 2016), donde se integraron los vectores de datos ambientales significativos ( $P < 0.05$ ).

Por último, se contrastó la presencia de los genes *nirK*, *nirS* o *nosZ* encontrados en las especies de los aislados con la herramienta BLASTn del NCBI. Para ello, se accedió a los genomas de referencia de las especies con el alineamiento de

mayor porcentaje de identidad y se buscó el locus del gen en la tabla de proteínas.

## RESULTADOS

### Propiedades fisicoquímicas del agua y de los sedimentos muestreados

En la columna de agua de la bahía hubo un aumento de temperatura (de 20.8 a 22.7 °C), salinidad (de 32.42 a 35.39 ‰) y O<sub>2</sub> disuelto (de 7.02 a 7.59 mg·L<sup>-1</sup>) de la boca a la cabeza (Tabla 2). Los sedimentos fueron anóxicos desde los 2 mm de profundidad (Fig. 2) y alcalinos (pH de 7.89 a 8.2; Tabla 3). El contenido de arena disminuyó de la boca a la cabeza en ambos hábitats y profundidades (pasto: de 62.4-70.4% a 21.4-29.6%; desnudo: de 82.9-90.9% a 23.4-37.3%), mientras que el limo aumentó (pasto: de 29.6-37.6% a 70.3-78.0%; desnudo: de 9.1-17.2% a 62.4-76.4%) (Tabla 3). Las concentraciones de Fe(III) fueron mayores que las de Fe(II), y ambas fueron más altas en la zona media (pasto: 8.0-10.9 mg·g<sup>-1</sup> y 0.2-0.7 mg·g<sup>-1</sup>; desnudo: 5.9-9.1 mg·g<sup>-1</sup> y 0.2-0.6 mg·g<sup>-1</sup>, respectivamente). De la boca a la cabeza aumentaron el COT (pasto: de 0.23-0.67% a 1.17-1.45%; desnudo: de 0.14-0.31% a 0.58-1.03%) y el NT (pasto: de 0.03-0.07% a 0.11-0.16%; desnudo: de 0.02-0.04% a 0.06-0.10%). Las concentraciones de carbohidratos totales, NO<sub>3</sub><sup>-</sup> y NO<sub>2</sub><sup>-</sup> no mostraron un patrón claro de distribución (Tabla 3).

### Distribución y diversidad de bacterias desnitrificantes aerobias aisladas de los sedimentos

Se obtuvieron un total de 1,611 aislados en los sedimentos de esta bahía, que fueron agrupados en 155 grupos morfológicos, de los cuales 66 representantes (correspondientes a 1,371 aislados) contuvieron alguno de los genes *nirK*, *nirS* o *nosZ* (85.1% del total de los aislados).

El gen marcador más abundante en los aislados fue *nirK* (843 aislados), seguido de *nosZ* (740 aislados) y *nirS* (573 aislados) (Fig. 3). Las bacterias con solo *nosZ* (20.3% del total de los aislados) y *nirK* (20.1%) fueron las dominantes, mientras que las bacterias con solo *nirS* representaron el

13.1%. Entre los aislados con 2 genes, los que tuvieron *nirK* y *nosZ* fueron los más abundantes (17.9%), seguidos de los que tuvieron *nirK* y *nirS* (12.8%), mientras que los menos abundantes fueron los que presentaron *nirS* y *nosZ* (5.1%). El 10.7% de aislados tuvieron los 3 genes (Fig. 3a).

La distribución de los desnitrificantes aislados en la bahía fue heterogénea. Por profundidad, los sedimentos superficiales tuvieron mayor abundancia relativa de desnitrificantes (66.2%) que los de fondo (33.8%) (Fig. 3b). Sin embargo, la abundancia relativa de los aislados en estas profundidades varió en función del hábitat, de manera que en la superficie fue mayor en los sedimentos con pasto (38.2%) que en los desnudos (29.4%) y en el fondo fue mayor en los sedimentos desnudos (24.3%) que en los de pasto (8.1%) (Fig. 3b). Los aislados con *nirS* fueron más abundantes en la cabeza (45.4%), mientras que los aislados con *nirK* y *nosZ* lo fueron en la boca (44.7 y 38.4%, respectivamente). Los desnitrificantes fueron aislados en menor proporción en la estación media (*nosZ*: 27.6%; *nirS*: 16.9%; *nirK*: 15.2%) (Fig. 3c, d). Esta distribución también estuvo influenciada por el hábitat, de manera que la abundancia relativa de estos aislados en la cabeza fue mayor en los sedimentos desnudos (78.7%), mientras que en las estaciones media y de la boca lo fue en el pasto (72.7% y 57.7%, respectivamente) (Fig. 3d).

En general, en estos sedimentos hubo una baja dominancia (Simpson: 0.83 a 0.88) y una alta diversidad (Shannon: 1.96 a 2.36; cercanos a H<sub>max</sub>: 2.71 a 3.04) de aislados desnitrificantes (Tabla 4). Los ambientes con mayor riqueza de aislados desnitrificantes fueron la estación media, el estrato del fondo y el sedimento desnudo (Chao1: 28.2, 31 y 30.1, respectivamente).

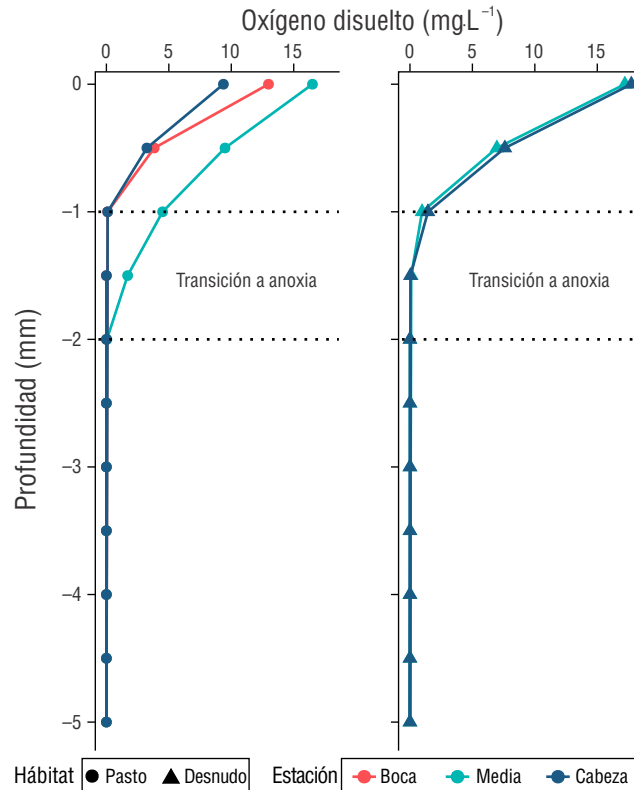
### Taxonomía, filogenia y actividad de las bacterias con genes desnitrificantes

Se construyó un árbol filogenético con las secuencias de ARNr 16S de los 62 representantes correspondientes a 1,338 aislados (se descartaron 4 representantes con secuencias de mala calidad, pertenecientes a 33 aislados) clasificadas en 4 clases ( $\gamma$ -Proteobacteria [82.4% de aislados],  $\alpha$ -Proteobacteria [7.9%], Bacilli [5.7%] y Actinobacteria

**Tabla 2.** Condiciones fisicoquímicas de la columna de agua en las 3 estaciones de muestreo.

Estación	Temperatura (°C)	Salinidad (‰)	Oxígeno (mg·L <sup>-1</sup> )
Boca	20.8	32.42	7.02
Media	21.7	34.45	7.11
Cabeza	22.7	35.39	7.59





**Figura 2.** Perfiles verticales (desde la superficie hasta 5 mm de profundidad) de la concentración de oxígeno disuelto en los núcleos de sedimentos con pasto (derecha) y desnudos (izquierda) del Brazo San Quintín. El oxígeno disuelto no se pudo medir en los sedimentos desnudos de la boca.

[4%]) distribuidas en 7 familias, 11 géneros y 23 especies (Fig. 4). Los géneros con mayor número de aislados fueron *Psychrobacter* (986 aislados), *Pseudomonas* (117 aislados) y *Paracoccus* (106 aislados). Además, las especies con mayor número de aislados fueron *Psychrobacter piscatorii* (267 aislados), *Psychrobacter celer* (193 aislados), *Psychrobacter submarinus* (130 aislados), *Psychrobacter pacificensis* (124 aislados) y *Pseudomonas songnenensis* (117 aislados) (Fig. 4).

De las 23 especies clasificadas, 18 tuvieron representación de su genoma en el NCBI, de los cuales solo 3 contuvieron alguno de los genes marcadores encontrados en este estudio: *Mesobacillus jeotgali* (*nosZ*; ID: WP\_102264655.1), *Mesobacillus maritimus* (*nosZ*; ID: WP\_251428094.1) y *P. songnenensis* (*nirK* y *nosZ*; ID: WP\_239060843.1 y WP\_015275732.1, respectivamente). En este estudio también se encontró *nirS* en *P. songnenensis*, aunque en su genoma no aparece reportado (secuencia de referencia NCBI: NZ\_RFFN01000004.1).

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

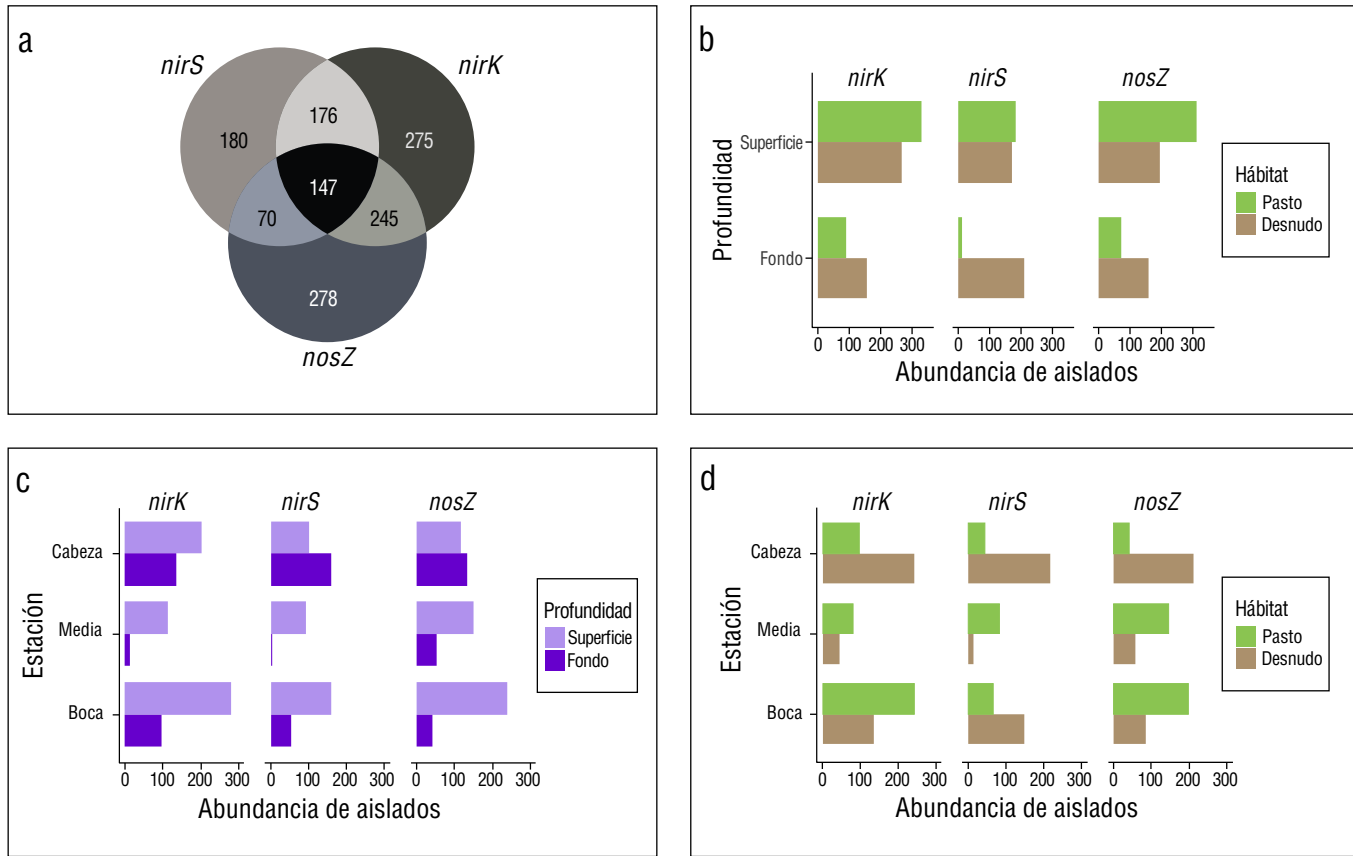
El mapa de calor mostró que *P. songnenensis* y *Paracoccus marcusii* dominaron en el fondo del sedimento desnudo de

la cabeza. *Psychrobacter piscatorii* y *P. submarinus* fueron abundantes en varias muestras de sedimento, dominando en la superficie del sedimento desnudo de la cabeza y en el pasto de la boca. *Psychrobacter celer* y *P. pacificensis* fueron más abundantes en el sedimento superficial desnudo de la boca (Fig. 5a). Las abundancias de las especies desnitrificantes mostraron pocas correlaciones significativas con las variables ambientales estudiadas, destacando las correlaciones positivas significativas de *P. piscatorii* con el pH, Fe(III), COT y carbohidratos; *Psychrobacter alimentarius* con el  $\text{NO}_3^-$  y  $\text{NO}_2^-$  y *Micrococcus endophyticus* con el pH y Fe(III). Las correlaciones negativas significativas fueron principalmente de *P. celer* con el contenido de limo, arcilla y NT; *Arthrobacter* sp. con el pH, Fe (III) y COT; y *P. marcusii* con el  $\text{NO}_3^-$  y  $\text{NO}_2^-$ , aunque éste último también tuvo una correlación positiva significativa con el Fe(II) (Fig. 5b).

El NMDS (Fig. 6) mostró 3 agrupaciones en función de la abundancia de las especies desnitrificantes aisladas: (1) las especies de los sedimentos superficiales, excepto las del sedimento desnudo de la boca, tuvieron una ligera relación positiva con el pH y estuvieron representadas por *Metabacillus endolithicus*, *P. alimentarius*, *Psychrobacter nivimaris*, *P. piscatorii* y *P. submarinus*. (2) Las especies del

**Tabla 3.** Valores (promedio  $\pm$  desviación estándar) de los parámetros fisicoquímicos analizados por triplicado en las muestras de los sedimentos del Brazo San Quintín. Abreviaturas: pasto (P), desnudo (D), superficie (S), fondo (F), C orgánico total (COT), N total (NT), carbohidratos totales (TCCHO), nitrato ( $\text{NO}_3^-$ ) y nitrito ( $\text{NO}_2^-$ ).

Muestras	pH	Arena (%)	Limo (%)	Arcilla (%)	Fe(III) ( $\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$ )	Fe(II) ( $\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$ )	COT (%)	NT (%)	TCCHO ( $\mu\text{mol}\cdot\text{C}\cdot\text{g}^{-1}$ )	$\text{NO}_3^-$ ( $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ )	$\text{NO}_2^-$ ( $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ )
Boca.PS	8.04 $\pm$ 0.04	62.39 $\pm$ 0.67	37.62 $\pm$ 0.67	0.00 $\pm$ 0.01	5.16 $\pm$ 1.10	0.09 $\pm$ 0.10	0.67 $\pm$ 0.16	0.07 $\pm$ 0.02	27.0 $\pm$ 1.47	0.98 $\pm$ 0.13	0.08 $\pm$ 0.03
Boca.PF	7.89 $\pm$ 0.07	70.36 $\pm$ 1.17	29.64 $\pm$ 1.16	0.01 $\pm$ 0.00	4.14 $\pm$ 0.24	0.47 $\pm$ 0.1	0.23 $\pm$ 0.0	0.03 $\pm$ 0.0	4.86 $\pm$ 1.04	0.70 $\pm$ 0.0	0.06 $\pm$ 0.03
Boca.DS	8.01 $\pm$ 0.03	90.90 $\pm$ 1.47	9.10 $\pm$ 1.47	0.00 $\pm$ 0.00	5.24 $\pm$ 1.32	0.16 $\pm$ 0.1	0.31 $\pm$ 0.0	0.04 $\pm$ 0.0	6.51 $\pm$ 0.95	1.42 $\pm$ 0.25	0.10 $\pm$ 0.05
Boca.DF	7.94 $\pm$ 0.09	82.85 $\pm$ 2.31	17.16 $\pm$ 2.31	0.00 $\pm$ 0.00	3.52 $\pm$ 0.51	0.31 $\pm$ 0.2	0.14 $\pm$ 0.0	0.02 $\pm$ 0.0	1.80 $\pm$ 0.33	0.55 $\pm$ 0.21	0.03 $\pm$ 0.01
Media.PS	8.09 $\pm$ 0.09	57.27 $\pm$ 7.71	42.72 $\pm$ 7.71	0.01 $\pm$ 0.00	10.85 $\pm$ 1.82	0.20 $\pm$ 0.1	0.98 $\pm$ 0.2	0.11 $\pm$ 0.0	28.9 $\pm$ 3.51	1.41 $\pm$ 0.26	0.21 $\pm$ 0.01
Media.PF	7.96 $\pm$ 0.06	63.79 $\pm$ 1.99	36.14 $\pm$ 2.08	0.07 $\pm$ 0.08	8.03 $\pm$ 1.35	0.74 $\pm$ 0.1	0.71 $\pm$ 0.0	0.07 $\pm$ 0.0	10.9 $\pm$ 4.06	0.46 $\pm$ 0.21	0.03 $\pm$ 0.01
Media.DS	8.08 $\pm$ 0.04	67.16 $\pm$ 4.48	32.84 $\pm$ 4.48	0.00 $\pm$ 0.01	9.07 $\pm$ 1.07	0.18 $\pm$ 0.07	0.75 $\pm$ 0.23	0.08 $\pm$ 0.02	11.4 $\pm$ 0.75	0.40 $\pm$ 0.14	0.06 $\pm$ 0.01
Media.DF	7.98 $\pm$ 0.04	53.35 $\pm$ 2.04	46.49 $\pm$ 2.04	0.16 $\pm$ 0.00	5.87 $\pm$ 0.99	0.59 $\pm$ 0.2	0.53 $\pm$ 0.0	0.05 $\pm$ 0.0	4.10 $\pm$ 0.55	0.13 $\pm$ 0.01	0.00 $\pm$ 0.00
Cabeza.PS	8.15 $\pm$ 0.06	29.56 $\pm$ 3.87	70.25 $\pm$ 3.87	0.19 $\pm$ 0.00	8.07 $\pm$ 1.15	0.18 $\pm$ 0.1	1.45 $\pm$ 0.2	0.16 $\pm$ 0.0	48.3 $\pm$ 7.87	1.70 $\pm$ 0.37	0.09 $\pm$ 0.04
Cabeza.PF	8.04 $\pm$ 0.05	21.40 $\pm$ 0.64	78.04 $\pm$ 0.74	0.57 $\pm$ 0.10	5.49 $\pm$ 1.34	0.59 $\pm$ 0.09	1.17 $\pm$ 0.06	0.11 $\pm$ 0.01	21.4 $\pm$ 2.36	0.85 $\pm$ 0.23	0.02 $\pm$ 0.00
Cabeza.DS	8.20 $\pm$ 0.09	23.36 $\pm$ 0.41	76.37 $\pm$ 0.31	0.27 $\pm$ 0.10	8.70 $\pm$ 1.40	0.23 $\pm$ 0.1	1.03 $\pm$ 0.1	0.10 $\pm$ 0.0	16.4 $\pm$ 4.72	1.05 $\pm$ 0.36	0.06 $\pm$ 0.01
Cabeza.DF	8.08 $\pm$ 0.03	37.26 $\pm$ 0.88	62.39 $\pm$ 0.91	0.35 $\pm$ 0.03	6.48 $\pm$ 0.33	0.32 $\pm$ 0.2	0.58 $\pm$ 0.0	0.06 $\pm$ 0.0	4.01 $\pm$ 0.68	0.40 $\pm$ 0.07	0.03 $\pm$ 0.00



**Figura 3.** Distribución de la abundancia de los genes marcadores (*nirK*, *nirS* o *nosZ*) en los aislados obtenidos de los sedimentos del Brazo San Quintín (a), por profundidad y hábitat (b), por estación y profundidad (c) y por estación y hábitat (d).

fondo de las estaciones media y cabeza tuvieron una relación positiva con la textura arcillosa y una alta abundancia de *Psychrobacter* sp., *P. celer*, *P. songnenensis*, *Planococcus maritimus* y *Planococcus rifietoensis*. (3) Las especies de la boca (excepto las de la de superficie con *Z. marina*) se relacionaron positivamente con la textura arenosa y negativamente con el COT y NT, y estuvieron asociadas principalmente con *M. maritimus* y *Arthrobacter enclensis*.

#### Verificación de actividad desnitrificante en las especies aisladas

Se comprobó la actividad desnitrificante en condiciones aerobias en 7 especies (Tabla 5): *P. marcusii* (2 representantes con *nirK*, 1 con *nirS* y 1 con *nirK/nirS* y *nosZ* activos), *P. maritimus* (2 representantes con *nirS* activo), *P. rifietoensis* (1 representante con *nirS* activo), *P. songnenensis* (1 representante con *nirS* y *nosZ* activos y 1 con *nirK/nirS* y *nosZ* activos), *P. alimentarius* (1 representante con *nirK/nirS* activos), *P. celer* (4 representantes con *nirK* y 1 con *nirS* activos) y *P. piscatorii* (1 representante con *nirK/nirS* y *nosZ* activos).

## DISCUSIÓN

### Distribución de bacterias desnitrificantes aerobias aisladas del Brazo San Quintín

Hasta la fecha se han aislado desnitrificantes aerobios en diferentes sistemas marinos (e.g., Zheng et al. 2011, Chen et al. 2020, Zhang et al. 2023), excepto en estuarios inversos. Los sedimentos costeros permeables, como los de la Bahía de San Quintín, son ambientes propicios para el desarrollo de bacterias aerobias desnitrificantes (Gao et al. 2010, Marchant et al. 2017). Además, la proliferación de *Z. marina* y el estado somero de esta bahía promueven grandes aportes de materia orgánica para las bacterias desnitrificantes en estos sedimentos (Eyre et al. 2016). Asimismo, las altas concentraciones de Fe en el sedimento de la bahía, derivadas de la erosión de rocas basálticas del campo volcánico de San Quintín (Navarro et al. 2006), pueden estimular el desarrollo de bacterias con *nirS* (Zumft 1997). En este estudio se aísla por primera vez una gran cantidad de bacterias desnitrificantes en condiciones aerobias en los sedimentos del Brazo San Quintín (85.1% de 1,611 aislados presentaron genes desnitrificantes).



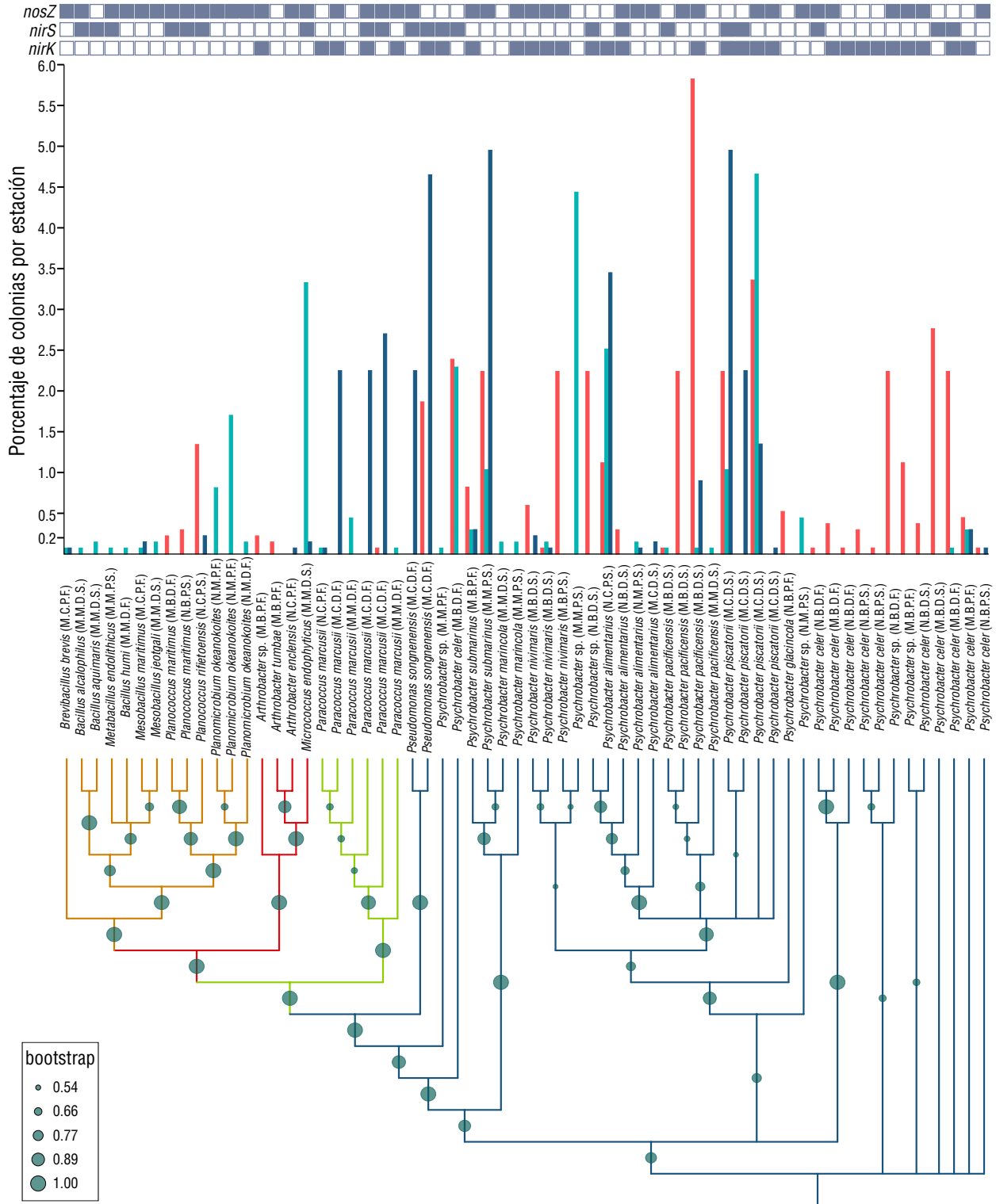
Los aislados con genes *nirK*, *nirS* o *nosZ* pertenecieron a las clases Actinobacteria, Bacilli,  $\gamma$ -Proteobacteria y  $\alpha$ -Proteobacteria, las cuales se han asociado con la desnitrificación en sedimentos costeros (Zhu et al. 2018, Ming et al. 2021). Los 3 géneros más abundantes fueron *Psychrobacter*, *Pseudomonas* y *Paracoccus*. *Pseudomonas* y *Paracoccus* son considerados los géneros bacterianos desnitrificantes más abundantes en sedimentos marinos (Sousa y Bhosle 2012) y también se han asociado con la desnitrificación aerobia (Chen et al. 2020, Zhang et al. 2023). Asimismo, *Psychrobacter* se ha relacionado con la desnitrificación anaerobia (Zhu et al. 2018, Cabezas et al. 2022) y aerobia (Zheng et al. 2011) en ambientes marinos; además, su genoma revela afinidad por la ruta de la desnitrificación aerobia (Lasek et al. 2017).

Hubo especies bacterianas que presentaron simultáneamente los genes *nirK* y *nirS*, como *P. songnenensis*, *Psychrobacter* sp., *P. alimentarius*, *P. celer* y *P. piscatorii* (Fig. 4). Estos resultados contradicen la idea tradicional de que dichos genes son mutuamente excluyentes en genomas de organismos desnitrificantes (Zumft 1997, Jones et al. 2008), pero están en línea con las observaciones de coocurrencia *nirK/nirS* encontrados en genomas del NCBI (Graf et al. 2014), cultivos anaerobios y microaerobios de *Bradyrhizobium oligotrophicum* S58 (Sánchez y Minamisawa 2018) y cultivos aerobios de *Pseudomonas stutzeri* (Wittorf et al. 2018). Por lo tanto, se necesita profundizar en el estudio de la fisiología y el metabolismo de bacterias con *nirK/nirS* en sus genomas.

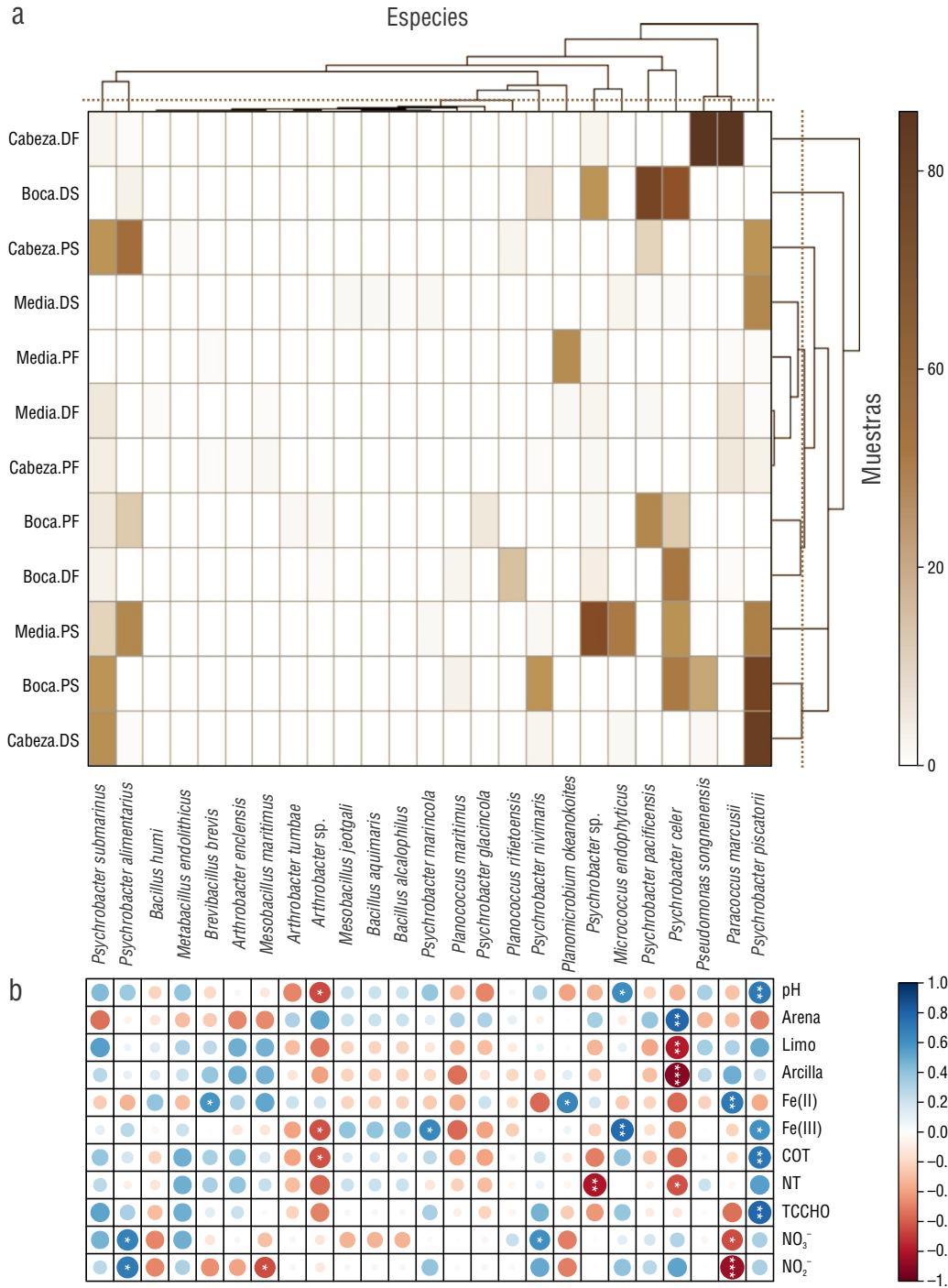
A lo largo del Brazo San Quintín se producen fuertes gradientes físicoquímicos (Canu et al. 2016, Samperio-Ramos et al. 2024), que podrían influir en la distribución de las bacterias desnitrificantes. Sin embargo, la distribución de estos aislados fue heterogénea en este brazo, siendo más abundantes en la boca y la cabeza que en la zona media, y sin diferencias claras entre sedimentos desnudos o con *Z. marina*. Se ha demostrado actividad desnitrificante aerobia en sedimentos costeros permeables (Gao et al. 2010, Marchant et al. 2017). Por lo tanto, la mayor permeabilidad de los sedimentos arenosos en la boca y la llegada de nutrientes por las surgencias costeras asociadas a la corriente de California (Canu et al. 2016), intensificadas por una fase de La Niña atípica en la época de muestreo (Cheng et al. 2022), pudieron fomentar un mayor desarrollo de bacterias desnitrificantes aerobias en esta zona. Además, los mayores contenidos de COT en los sedimentos de la cabeza, debido a su contenido limoso y al mayor tiempo de confinamiento del agua (Ribas-Ribas et al. 2011, Canu et al. 2016), pudieron promover también una alta abundancia de bacterias desnitrificantes aerobias en esta zona de la bahía. En general, los sedimentos superficiales tuvieron mayor abundancia relativa de bacterias desnitrificantes aerobias que los de fondo, posiblemente debido a la difusión de  $O_2$  y nutrientes del agua a los sedimentos superficiales (Ribas-Ribas et al. 2011) y a sus mayores contenidos de materia orgánica con respecto a los sedimentos más profundos. Por otro lado, las bacterias con *nirS* fueron las menos abundantes en estos sedimentos, a pesar de la afinidad de la enzima *cdI* de *nirS*

**Tabla 4.** Índices de diversidad alpha: Riqueza específica (número de especies presentes por muestra), Chao1, Simpson y Shannon, calculados a partir de las abundancias de los aislados bacterianos con genes desnitrificantes por ambiente estudiado.  $H_{max}$ : máximo valor teórico del índice de Shannon.

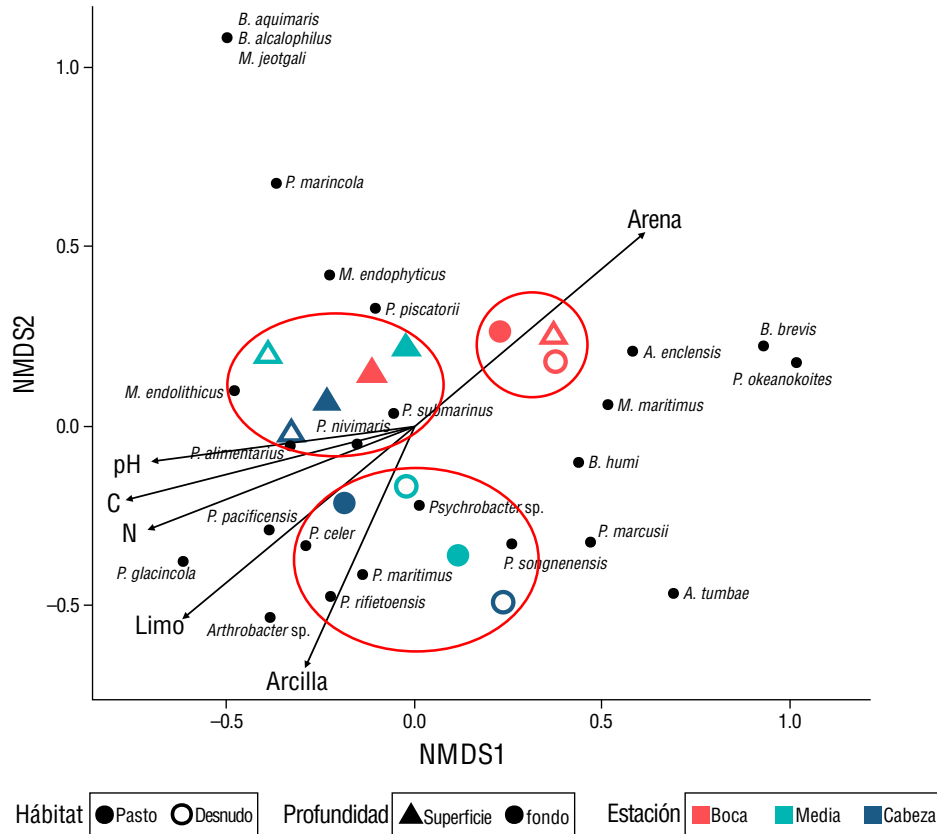
Ambiente	Riqueza específica	Chao1	Simpson	Shannon	$H_{max}$
Boca	14.0	14.5	0.833	2.067	2.639
Media	20.0	28.2	0.856	2.171	2.996
Cabeza	15.0	17.3	0.831	1.957	2.708
Superficie	17.0	18.0	0.854	2.169	2.833
Fondo	22.0	31.0	0.858	2.259	3.091
Desnudo	24.0	30.1	0.878	2.310	3.178
Pasto	21.0	21.4	0.882	2.355	3.045
Media	19.0	22.93	0.856	2.184	2.927
Desviación estándar	3.74	6.75	0.02	0.14	0.20



**Figura 4.** Árbol filogenético de las secuencias de ARNr 16S de los representantes bacterianos desnitrificantes aislados en los sedimentos del Brazo San Quintín. El valor del bootstrap se muestra en círculos azules en los nodos. El color de las ramas representa la clase a la que pertenece cada representante: α-Proteobacteria (—), γ-Proteobacteria (—), Actinobacteria (—) o Bacilli (—). En paréntesis se indica la procedencia del representante: medio de cultivo (marino [M] o nutritivo [N]), estación (boca [B], media [M] o cabeza [C]), hábitat (pasto [P] o desnudo [D]) y profundidad (superficie [S] o fondo [F]). La gráfica de barras del árbol presenta la abundancia relativa de los aislados asociados a cada representante en cada estación: boca (■), media (■) o cabeza (■). En el sistema binario se muestra la presencia (■) o ausencia (□) de los genes *nirK*, *nirS* o *nosZ*.



**Figura 5.** Mapa de calor de las abundancias de las especies desnitrificantes aisladas por muestra (gradiente de colores de blanco a café) (a). Los dendrogramas muestran la agrupación jerárquica entre las especies (columnas) y las muestras (filas), respectivamente. Matriz de correlación de Spearman entre las abundancias de especies desnitrificantes y los parámetros fisicoquímicos de los sedimentos (b). El gradiente de color corresponde a los valores del coeficiente de correlación y el tamaño del círculo a su valor absoluto. Las correlaciones significativas se representan con asteriscos blancos dentro de los círculos (\*  $P < 0.05$ ; \*\*  $P < 0.01$ ; \*\*\*  $P < 0.001$ ). Abreviaturas: pasto (P), desnudo (D), superficie (S), fondo (F), C orgánico total (COT), N total (NT) y carbohidratos totales (TCCHO).



**Figura 6.** Gráfica NMDS de la distribución de las muestras (símbolos) en función de la matriz de distancia de Bray-Curtis de las especies desnitrificantes aisladas y su relación con los vectores ambientales significativos ( $P < 0.05$ ). Nivel de estrés: 0.069. Abreviaturas: C orgánico total (C) y N total (N).

con el Fe (Zumft 1997) y a las elevadas concentraciones de este metal en la Bahía de San Quintín (Navarro et al. 2006, Samperio-Ramos et al. 2024). Por lo tanto, no es descartable una posible subestimación de la abundancia real de bacterias portadoras de *nirS* debido a la técnica de aislamiento (Stewart 2012).

La diversidad de las bacterias desnitrificantes aisladas en San Quintín fue menor que la encontrada en sedimentos de otros estuarios en donde se usaron técnicas de secuenciación masiva (Ming et al. 2021) y librerías de clonas (Zheng et al. 2015). Por tanto, esto pudo ser consecuencia de la técnica de estudio, ya que el aislamiento en agar no permite el crecimiento de la mayoría de las bacterias presentes en un determinado ambiente, las cuales se han podido identificar, sin necesidad de cultivar, por medio de la amplificación por PCR y la secuenciación de genes marcadores como el ARNr 16S (Stewart 2012). Además, la distribución heterogénea de las bacterias desnitrificantes en esta bahía, junto con la escasa correlación significativa encontrada entre las especies desnitrificantes y los parámetros ambientales, podría deberse también al aislamiento en agar. Por otra parte, de acuerdo al NMDS, la distribución de estos aislados estuvo condicionada principalmente por la textura, el pH y la concentración

de COT y NT de estos sedimentos, resultados que coinciden con los obtenidos mediante PCR cuantitativa en sedimentos de diversos estuarios de China (Wang et al. 2014, Zhu et al. 2018, Ming et al. 2021).

### Actividad desnitrificante en las bacterias aisladas con genes desnitrificantes

Pese a que la desnitrificación es un proceso modular (Zumft 1997), lo que dificulta observar la reducción completa de  $\text{NO}_3^-$  a  $\text{N}_2$  en monocultivos, se logró confirmar una desnitrificación aerobia completa en 3 especies (*P. marcusii*, *P. songnenensis* y *P. piscatorii*). También se confirmó la reducción de  $\text{NO}_3^-$  y  $\text{NO}_2^-$  en condiciones aerobias en otras 4 especies (*P. maritimus*, *P. rifietoensis*, *P. alimentarius* y *P. celer*).

La comprobación de la actividad desnitrificante en condiciones aerobias en 3 especies de *Psychrobacter* apoya la propuesta de que este género puede realizar la desnitrificación aerobia (Lasek et al. 2017). La capacidad de realizar este proceso en presencia de  $\text{O}_2$  podría explicar la dominancia de *Psychrobacter* en los aislados obtenidos en San Quintín, ya que las condiciones de aislamiento también fueron aerobias. Por otro lado, la actividad desnitrificante observada en

**Tabla 5.** Aislados representantes cuya actividad de sus genes desnitrificantes identificados por PCR pudo ser comprobada en condiciones aerobias. Procedencia del representante: medio de cultivo (marino [M] o nutritivo [N]), estación (boca [B], media [M] o cabeza [C]), hábitat (pasto [P] o desnudo [D]), profundidad (superficie [S] o fondo [F]) y número asignado en el aislamiento (abundancia de aislados para cada representante [N]).

Especie	Representante	Principal morfología (color, elevación, borde)	N	Genes encontrados por PCR			Genes comprobados
				<i>nirK</i>	<i>nirS</i>	<i>nosZ</i>	
<i>Paracoccus marcusii</i>	M.M.D.F.5	Crema, achatada, liso	1	+	—	+	<i>nirK</i>
	M.C.D.F.2	Crema, elevada, liso	37	—	+	—	<i>nirS</i>
	M.C.D.F.3	Café claro, achatada, ondulado	30	+	+	+	<i>nirK/nirS, nosZ</i>
<i>Planococcus maritimus</i>	M.C.D.F.4	Naranja, achatada, liso	30	+	—	—	<i>nirK</i>
	M.B.D.F.7	Naranja, elevada, lobulado	3	—	+	—	<i>nirS</i>
<i>Planococcus rifietoensis</i>	N.B.P.S.7	Naranja, achatada, liso	4	—	+	—	<i>nirS</i>
	N.C.P.S.2	Naranja, elevada, liso	3	—	+	—	<i>nirS</i>
<i>Pseudomonas songnenensis</i>	M.C.D.F.6	Naranja, elevada, ondulado	30	—	+	+	<i>nirS, nosZ</i>
	M.C.D.F.8	Naranja, elevada, liso	87	+	+	+	<i>nirK/nirS, nosZ</i>
<i>Psychrobacter alimentarius</i>	N.B.D.S.3	Naranja, achatada, ondulado	4	+	+	—	<i>nirK/nirS</i>
	N.B.P.S.6	Blanco, achatada, liso	30	+	—	+	<i>nirK</i>
<i>Psychrobacter celer</i>	N.B.P.S.8	Crema, protuberante, liso	4	+	—	+	<i>nirK</i>
	N.B.P.S.9	Amarillo, achatada, liso	1	+	—	+	<i>nirK</i>
	N.B.D.F.6	Crema, achatada, lobulado	1	+	—	+	<i>nirK</i>
<i>Psychrobacter piscatorii</i>	N.B.D.F.10	Crema, elevada, lobulado	1	—	+	+	<i>nirS</i>
	M.C.D.S.3	Incoloro, achatada, ondulado	30	+	+	+	<i>nirK/nirS, nosZ</i>

*P. marcusii* y *P. songnenensis* podría seguir una ruta de desnitrificación completa (con producción de  $N_2$ ), ya que se ha descrito la presencia del gen *nosZ* en ambos géneros (Jones et al. 2013) y el genoma de *P. songnenensis* contiene los genes *nirK* y *nosZ* (NCBI: NZ\_RFFN01000004.1). En cuanto a la reducción de  $NO_3^-$  y  $NO_2^-$  comprobada en *P. maritimus* y *P. rifietoensis*, no hay registros previos de dicha actividad en este género; sin embargo, se sabe que su clase (Bacilli) puede llevar a cabo la desnitrificación aerobia (Yang et al. 2020b).

## CONCLUSIONES

En los sedimentos del Brazo San Quintín hay una alta abundancia de bacterias aerobias con genes

desnitrificantes, de las cuales en al menos 7 especies se pudo comprobar su capacidad para llevar a cabo la desnitrificación en presencia de  $O_2$ . A pesar de que la técnica de aislamiento en agar no permite hacer una estimación real de la abundancia y diversidad de bacterias desnitrificantes presentes en esta bahía, se trata del primer trabajo en aislar bacterias aerobias con potencial desnitrificante en sedimentos de un estuario de tipo lagunar costero. En futuros estudios sería interesante comparar la comunidad desnitrificante entre el brazo prístino (Brazo San Quintín) y el influenciado por actividad ostrícola (Bahía Falsa) para analizar los efectos de este tipo de actividades antrópicas en la comunidad desnitrificante de la Bahía de San Quintín.



## DECLARACIONES FINALES

### Material suplementario

Este trabajo no incluye material suplementario.

### Agradecimientos

Agradecemos a los integrantes del laboratorio de Biogeoquímica de Nutrientes del Instituto de Investigaciones Oceanológicas (UABC) por los análisis fisicoquímicos.

### Fondos

Este estudio fue financiado por el Consejo Nacional de Humanidades, Ciencias y Tecnologías (CONAHCYT) a través del proyecto “Ciclo de nitrógeno en sedimentos marinos: procesos canónicos y ‘nuevos’ actores evaluados en una laguna costera influenciada por surgencias y con acuicultura de ostras” (CF–2019–682328).

### Conflicto de intereses

Los autores declaran no tener ningún conflicto de intereses.

### Contribuciones de autor

Conceptualización: SP-M; Curación de datos: PP-Z; Análisis formal: PP-Z; Adquisición de financiamiento: GAS-R; Investigación: PP-Z, SP-M; Metodología: PP-Z, SP-M, GAS-R; Supervisión: SP-M; Validación: SP-M; Redacción—borrador original: PP-Z, SP-M; Redacción—revisión y edición: SP-M, GAS-R.

### Disponibilidad de datos

Las secuencias se encuentran en el GenBank con los números de acceso OR987974–OR988035.

### Uso de herramientas de IA

Los autores no utilizaron ninguna herramienta de inteligencia artificial para este trabajo.

## REFERENCIAS

Altschul SF, Gish W, Miller W, Myers EW, Lipman DJ. 1990. Basic local alignment search tool. *J Mol Biol.* 215(3):403-410. [https://doi.org/10.1016/s0022-2836\(05\)80360-2](https://doi.org/10.1016/s0022-2836(05)80360-2)

Braker G, Fesefeldt A, Witzel KP. 1998. Development of PCR primer systems for amplification of nitrite reductase genes (*nirK* and *nirS*) to detect denitrifying bacteria in environmental samples. *Appl Environ Microbiol.* 64(10):3769-3775. <https://doi.org/10.1128/AEM.64.10.3769-3775.1998>

Cabezas A, Azziz G, Bovio-Winkler P, Fuentes L, Braga L, Wenzel J, Sabaris S, Tarlera S, Etchebere C. 2022. Ubiquity

and diversity of cold adapted denitrifying bacteria isolated from diverse Antarctic ecosystems. *Front Microbiol.* 13:827228.

<https://doi.org/10.3389/fmicb.2022.827228>

Camacho-Ibar VF, Carriquiry JD, Smith SV. 2003. Non-conservative P and N fluxes and net ecosystem production in San Quintin Bay, Mexico. *Estuar Coast* 26(5):1220-1237. <http://dx.doi.org/10.1007/BF02803626>

Canu DM, Aveytua-Alcázar L, Camacho-Ibar VF, Querin S, Solidoro C. 2016. Hydrodynamic properties of San Quintin Bay, Baja California: merging models and observations. *Mar Pollut.* 108:203-214.

<https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2016.04.030>

Chen Z, Jiang Y, Chang Z, Wang J, Song X, Huang Z, Chen S, Li J. 2020. Denitrification characteristics and pathways of a facultative anaerobic denitrifying strain, *Pseudomonas denitrificans* G1. *J Biosci Bioeng.* 129(6):715-722.

<https://doi.org/10.1016/j.jbiosc.2019.12.011>

Cheng L, Abraham J, Trenberth KE, Fasullo J, Boyer T, Mann ME, Zhu J, Wang F, Locarnini R, Li Y, et al. 2022. Another record: ocean warming continues through 2021 despite La Niña conditions. *Adv Atmos Sci.* 39:373-385.

<https://doi.org/10.1007/s00376-022-1461-3>

Cheng HY, Xu AA, Awasthi MK, Kong DD, Chen JS, Wang YF, Xu P. 2020. Aerobic denitrification performance and nitrate removal pathway analysis of a novel fungus *Fusarium solani* RADF-77. *Bioresour Technol.* 295:122250.

<https://doi.org/10.1016/j.biortech.2019.122250>

Ciccarelli FD, Doerks T, Von Mering C, Creevey CJ, Snel B, Bork P. 2006. Toward automatic reconstruction of a highly resolved tree of life. *Science.* 311(5765):1283-1287.

<https://doi.org/10.1126/science.1123061>

Cole JR, Wang Q, Fish JA, Chai B, McGarrell DM, Sun Y, Brown CT, Porras-Alfaro A, Kuske CR, Tiedje JM. 2014. Ribosomal Database Project: Data and tools for high throughput rRNA analysis. *Nucleic Acids Res.* 42(D1):D633-D642.

<https://doi.org/10.1093/nar/gkt1244>

Damashek J, Francis CA. 2018. Microbial nitrogen cycling in estuaries: from genes to ecosystem processes. *Estuar Coast.* 41:626-660.

<https://doi.org/10.1007/s12237-017-0306-2>

Devol A. 2015. Denitrification, anammox, and N<sub>2</sub> production in marine sediments. *Annu Rev Mar Sci.* 7:403-423.

<https://doi.org/10.1146/annurev-marine-010213-135040>

Eyre BD, Maher DT, Sanders C. 2016. The contribution of denitrification and burial to the nitrogen budgets of three geomorphically distinct Australian estuaries: Importance of seagrass habitats. *Limnol Oceanogr.* 61:1144-1156.

<https://doi.org/10.1002/lno.10280>

Feng L, Yang J, Ma F, Pi S, Xing L, Li A. 2020. Characterisation of *Pseudomonas stutzeri* T13 for aerobic denitrification: stoichiometry and reaction kinetics. *Sci Total Environ.* 717:135181.

<https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2019.135181>

Gao H, Schreiber F, Collins G, Jensen MM, Kostka JE, Lavik G, de Beer D, Zhou H, Kuypers MM. 2010. Aerobic denitrification in permeable Wadden Sea sediments. *ISME J.* 4(3):417-426.

<https://doi.org/10.1038/ismej.2009.127>

Graf DR, Jones CM, Hallin S. 2014. Intergenomic comparisons highlight modularity of the denitrification pathway and underpin the importance of community structure for N<sub>2</sub>O emissions. *PLoS One.* 9(12):e114118.

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0114118>

Gu Z, Eils R, Schlesner M. 2016. Complex heatmaps reveal patterns and correlations in multidimensional genomic data. *Bioinform.* 32(18):2847-2849.

<https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btw313>

- Hall TA. 1999. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for windows 95/98nt. *Nucleic Acids Symp Ser.* 41(41):95-98.
- Hallin S, Lindgren PE. 1999. PCR detection of genes encoding nitrite reductase in denitrifying bacteria. *Appl Environ Microbiol.* 65(4):1652-1657. <https://doi.org/10.1128/AEM.65.4.1652-1657.1999>
- Harrell F. 2021. 'Hmisc': Harrell miscellaneous. R package v. 4.6-0. <https://hbiostat.org/R/Hmisc>
- Holding AJ, Colle JG. 1971. Routine biochemical tests. In: Norris JR, Ribbons DW (eds.), *Methods in Microbiology* (6A). London: Academic Press. p. 1-32.
- Hutchins DA, Capone DG. 2022. The marine nitrogen cycle: new developments and global change. *Nat Rev Microbiol.* 20:401-414. <https://doi.org/10.1038/s41579-022-00687-z>
- Jones CM, Graf DR, Bru D, Philippot L, Hallin S. 2013. The unaccounted yet abundant nitrous oxide-reducing microbial community: a potential nitrous oxide sink. *ISME J.* 7:417-426. <https://doi.org/10.1038/ismej.2012.125>
- Jones CM, Stres B, Rosenquist M, Hallin S. 2008. Phylogenetic analysis of nitrite, nitric oxide, and nitrous oxide respiratory enzymes reveal a complex evolutionary history for denitrification. *Mol Biol Evol.* 25:1955-1966. <https://doi.org/10.1093/molbev/msn146>
- Lane DJ, Pace B, Olsen GJ, Stahl DA, Sogin ML, Pace NR. 1985. Rapid determination of 16S ribosomal RNA sequences for phylogenetic analyses. *Proc Natl Acad Sci.* 82(20):6955-6959 <https://doi.org/10.1073/pnas.82.20.6955>
- Lasek R, Dziewit L, Ciok A, Decewicz P, Romaniuk K, Jedrys Z, Wibberg D, Schlüter A, Pühler A, Bartosik D. 2017. Genome content, metabolic pathways and biotechnological potential of the psychrophilic Arctic bacterium *Psychrobacter* sp. DAB\_AL43B, a source and a host of novel *Psychrobacter*-specific vectors. *J Biotechnol.* 263:64-74. <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2017.09.011>
- Lovely DR, Phillips EJ. 1987. Rapid assay for microbially reducible ferric iron in aquatic sediments. *Appl Environ Microbiol.* 53(7):1536-1540. <https://doi.org/10.1128/aem.53.7.1536-1540.1987>
- Lu ZY, Gan L, Lin JJ, Chen ZL. 2019. Aerobic denitrification by *Paracoccus* sp. YF1 in the presence of Cu(II). *Sci Total Environ.* 658:80-86. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2018.12.225>
- Marchant HK, Ahmerkamp S, Lavik G, Tegetmeyer HE, Graf J, Klatt JM, Holtappels M, Walpersdorf E, Kuypers MM. 2017. Denitrifying community in coastal sediments performs aerobic and anaerobic respiration simultaneously. *ISME J.* 11:1799-1812. <https://doi.org/10.1038/ismej.2017.51>
- Michotey V, Mejean V, Bonin P. 2000. Comparison of methods for quantification of cytochrome cd 1-denitrifying bacteria in environmental marine samples. *Appl Environ Microbiol.* 66(4):1564-1571. <https://doi.org/10.1128/AEM.66.4.1564-1571.2000>
- Ming H, Fan J, Chen Q, Su J, Song J, Yuan J, Shi T, Li B. 2021. Diversity and abundance of denitrifying bacteria in the sediment of a eutrophic estuary. *Geomicrobiol J.* 38(3):199-209. <https://doi.org/10.1080/01490451.2020.1822959>
- Myklestad SM, Skanoy E, Hestmann S. 1997. A sensitive and rapid method for analysis of dissolved mono- and polysaccharides in seawater. *Mar Chem.* 56:279-286. [https://doi.org/10.1016/S0304-4203\(96\)00074-6](https://doi.org/10.1016/S0304-4203(96)00074-6)
- Navarro E, Daesslé LW, Camacho-Ibar VF, Ortiz-Hernández MC, Gutiérrez-Galindo EA. 2006. La geoquímica de Fe, Ti y Al como indicadora de la sedimentación volcánoclastica en la laguna costera de San Quintín, Baja California, México = Geochemistry of Fe, Ti and Al as an indicator of volcanoclastic sedimentation in San Quintín coastal lagoon, Baja California, Mexico. *Cienc Mar.* 32(2):205-217. <https://doi.org/10.7773/cm.v32i21.1067>
- Oksanen J, Blanchet FG, Friendly M. 2021. 'vegan': Community Ecology Package. R package v. 2.6-4. <https://CRAN.R-project.org/package=vegan>
- Pajares S, Ramos R. 2019. Processes and microorganisms involved in the marine nitrogen cycle: knowledge and gaps. *Front Mar Sci.* 6:739. <https://doi.org/10.3389/fmars.2019.00739>
- Posit team. 2023. R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. <http://www.posit.co>
- Ravishankara AR, Daniel JS, Portmann RW. 2009. Nitrous oxide (N<sub>2</sub>O): the dominant ozone-depleting substance emitted in the 21st century. *Science.* 326(5949):123-125. <https://doi.org/10.1126/science.1176985>
- Ribas-Ribas M, Hernández-Ayón JM, Camacho-Ibar VF, Cabello-Pasini A, Mejía-Trejo A, Durazo R, Galindo-Bect S, Souza AJ, Forja JM, Siqueiros-Valencia A. 2011. Effects of upwelling, tides and biological processes on the inorganic carbon system of a coastal lagoon in Baja California. *Estuar Coast Shelf Sci.* 95(4):367-376. <https://doi.org/10.1016/j.ecss.2011.09.017>
- Robertson LA, Kuenen JG. 1984. Aerobic denitrification: a controversy revived. *Arch Microbiol.* 139(4):351-354. <https://doi.org/10.1007/BF00408378>
- Samperio-Ramos G, Santana-Casiano JM, Gonzalez-Davila M. 2016. Effect of ocean warming and acidification on the Fe (II) oxidation rate in oligotrophic and eutrophic natural waters. *Biogeochem.* 128:19-34. <https://doi.org/10.1007/s10533-016-0192-x>
- Samperio-Ramos G, Hernández-Sánchez O, Camacho-Ibar VF, Pajares S, Gutiérrez A, Sandoval-Gil JM, Reyes M, De Gyves S, Balint S, Oczkowski A, Ponce-Jahen SJ, Cervantes FJ. 2024. Ammonium loss microbiologically mediated by Fe(III) and Mn(IV) reduction along a coastal lagoon system. *Chemosphere.* 349:140933. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2023.140933>
- Sánchez C, Minamisawa K. 2018. Redundant roles of *Bradyrhizobium oligotrophicum* Cu-type (*nirK*) and cd 1-type (*nirS*) nitrite reductase genes under denitrifying conditions. *FEMS Microbiol Lett.* 365(5):fny015. <https://doi.org/10.1093/femsle/fny015>
- Scala DJ, Kerkhof LJ. 1998. Nitrous oxide reductase (*nosZ*) gene-specific PCR primers for detection of denitrifiers and three *nosZ* genes from marine sediments. *FEMS Microbiol Lett.* 162(1):61-68. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.1998.tb12979.x>
- Seitzinger S, Harrison JA, Böhlke JK, Bouwman AF, Lowrance R, Peterson B, Tobias C, Dreht GV. 2006. Denitrification across landscapes and waterscapes: a synthesis. *Ecol Appl.* 16(6):2064-2090. [https://doi.org/10.1890/1051-0761\(2006\)016\[2064:dalawa\]2.0.co;2](https://doi.org/10.1890/1051-0761(2006)016[2064:dalawa]2.0.co;2)
- Sousa T, Bhosle S. 2012. Microbial denitrification and its ecological implications in the marine system. In: Satyanarayana T, Johri B (eds.), *Microorganisms in Environmental Management*. Dordrecht: Springer. p. 683-700. [https://doi.org/10.1007/978-94-007-2229-3\\_30](https://doi.org/10.1007/978-94-007-2229-3_30)
- Stewart CN, Via LE. 1993. A rapid CTAB DNA isolation technique useful for RAPD fingerprinting and other PCR applications. *Biotechniques.* 14(5):748-751.
- Stewart EJ. 2012. Growing unculturable bacteria. *J Bacteriol.* 194(16):4151-4160. <https://doi.org/10.1128/jb.00345-12>
- Tamura K, Stecher G, Kumar S. 2021. MEGA11: molecular evolutionary genetics analysis version 11. *Mol Biol Evol.*

- 38(7):3022-3027.  
<https://doi.org/10.1093/molbev/msab120>
- Throbäck IN, Enwall K, Jarvis Å, Hallin S. 2004. Reassessing PCR primers targeting *nirS*, *nirK* and *nosZ* genes for community surveys of denitrifying bacteria with DGGE. *FEMS Microbiol Ecol.* 49(3):401-417.  
<https://doi.org/10.1016/j.femsec.2004.04.011>
- Wang L, Zheng B, Nan B, Hu P. 2014. Diversity of bacterial community and detection of *nirS*- and *nirK*-encoding denitrifying bacteria in sandy intertidal sediments along Laizhou Bay of Bohai Sea, China. *Mar Pollut Bull.* 88(1-2):215-223.  
<https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2014.09.002>
- Ward DH, Morton A, Tibbitts TL, Douglas DC, Carrera-González E. 2003. Long-term change in eelgrass distribution at Bahía San Quintín, Baja California, Mexico, using satellite imagery. *Estuaries.* 26(6):1529-1539.  
<http://doi.org/10.1007/BF02803661>
- Wei T, Simko V. 2021. 'corrplot': Visualization of a Correlation Matrix. R package v. 0.92. <https://github.com/taiyun/corrplot>.
- Wei W, Isobe K, Nishizawa T, Zhu L, Shiratori Y, Ohte N, Koba K, Otsuka S, Senoo K. 2015. Higher diversity and abundance of denitrifying microorganisms in environments than considered previously. *ISME J.* 9:1954-1965.  
<http://doi.org/10.1038/ismej.2015.9>
- Wheatley RE, MacDonald R, Smith AM. 1989. Extraction of nitrogen from soils. *Biol Fertil Soils.* 8:189-190.  
<https://doi.org/10.1007/BF00257765>
- Wickham H. 2016. *ggplot2: Elegant Graphics for Data Analysis*. New York (USA): Springer-Verlag New York, Inc. 260 p.
- Wittorf L, Jones CM, Bonilla-Rosso G, Hallin S. 2018. Expression of *nirK* and *nirS* genes in two strains of *Pseudomonas stutzeri* harbouring both types of NO-forming nitrite reductases. *Res Microbiol.* 169(6):343-347.  
<https://doi.org/10.1016/j.resmic.2018.04.010>
- Yang J, Feng L, Pi S, Cui D, Ma F, Zhao HP, Li A. 2020a. A critical review of aerobic denitrification: insights into the intracellular electron transfer. *Sci Total Environ.* 731:139080.  
<https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.139080>
- Yang T, Xin Y, Zhang L, Gu Z, Li Y, Ding Z, Shi G. 2020b. Characterization on the aerobic denitrification process of *Bacillus* strains. *Biomass Bioenerg.* 140:105677.  
<https://doi.org/10.1016/j.biombioe.2020.105677>
- Zhang K, Zeng Q, Jiang R, Shi S, Yang J, Long L, Tian X. 2023. Three novel marine species of *Paracoccus*, *P. aerodenitrificans* sp. nov., *P. sedimicola* sp. nov. and *P. albus* sp. nov., and the characterization of their capability to perform heterotrophic nitrification and aerobic denitrification. *Microorganisms.* 11(6):1532.  
<https://doi.org/10.3390/microorganisms11061532>
- Zheng H, Liu Y, Sun G, Gao X, Zhang Q, Liu Z. 2011. Denitrification characteristics of a marine origin psychrophilic aerobic denitrifying bacterium. *J Environm Sci.* 23(11):1888-1893.  
[https://doi.org/10.1016/S1001-0742\(10\)60615-8](https://doi.org/10.1016/S1001-0742(10)60615-8)
- Zheng Y, Hou L, Liu M, Gao J, Yin G, Li X, Deng F, Lin X, Jiang X, Chen F, et al. 2015. Diversity, abundance, and distribution of *nirS*-harboring denitrifiers in intertidal sediments of the Yangtze estuary. *Microb Ecol.* 70:30-40.  
<https://doi.org/10.1007/s00248-015-0567-x>
- Zhu W, Wang C, Sun F, Zhao L, Dou W, Mao Z, Wu W. 2018. Overall bacterial community composition and abundance of nitrifiers and denitrifiers in a typical macrotidal estuary. *Mar Pollut Bull.* 126:540-548.  
<https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2017.09.062>
- Zumft WG. 1997. Cell biology and molecular basis of denitrification. *Microbiol Mol Biol Rev.* 61(4):533-616.  
<https://doi.org/10.1128/mmlr.61.4.533-616.1997>