



Universidad de Concepción
Dirección de Postgrado
Facultad de Cs. Naturales y Oceanográficas - Programa Magíster Oceanografía

**Fijación autotrófica del carbono a lo largo del gradiente
de oxígeno en zonas marinas anóxicas, una aproximación
meta-ómica**



Tesis para optar al grado de Magíster en Ciencias con mención en
Oceanografía

Paula Sofía Ruiz Fernández
CONCEPCIÓN-CHILE
2018

Profesor Guía: Dr. Osvaldo Ulloa.
Dpto. de Oceanografía, Facultad de Ciencias Naturales y Oceanográficas
Universidad de Concepción

Universidad de Concepción
Dirección de Postgrado

La Tesis de Magíster en Oceanografía titulada “Fijación autotrófica del carbono a lo largo del gradiente de oxígeno en zonas marinas anóxicas, una aproximación meta-ómica”, de la Srta. Paula Ruiz Fernández y realizada bajo la Facultad de Ciencias Naturales y Oceanográficas, Universidad de Concepción, ha sido aprobada por la siguiente Comisión de Evaluación:

Dr. Osvaldo Ulloa
Profesor Guía
Universidad de Concepción

Dr. Rodrigo De la Iglesia
Miembro Comité de Tesis
Pontificia Universidad Católica de Chile

Dr. Marcelo Gutiérrez
Miembro Comité de Tesis
Universidad de Concepción



Dr. Fabián Tapia
Director
Programas de Postgrados en Oceanografía
Universidad de Concepción

AGRADECIMIENTOS

Muchas gracias a todos los miembros del Laboratorio de Oceanografía Microbiana en especial a Montse que me ayudó a hacer análisis estadísticos, a Alejandro Murillo y Álvaro Plominsky, porque me ayudaron en el inicio de mi tesis cuando no entendía nada de nada y con gran paciencia me enseñaron mucho y a la Fran que me corrigió la redacción y así mejoró bastante la tesis. Quiero hacer aquí una mención honrosa a los coautores del paper: Edwin “el despreocupado” Rodríguez, por ser un gran profesor y amigo, siempre con la mejor disposición a enseñarme a programar y también a darme un sabio consejo. A Salvador, que entre otras cosas, me enseñó mucho sobre bases fundamentales de la vida, me presentó al maestro Nick lane y me regaló la mejor música del mundo. Gracias a ustedes, el desarrollo de esta tesis fue de lo más divertida, y si ustedes fueron los maestros de la diversión, no puedo dejar fuera a la mente creadora de la idea de esta tesis, mi excelente profesor guía Osvaldo Ulloa.

Gracias a todos mis amigos, sobre todo a los que me acompañaron aquí en Conce. En especial a mis compañeras del magíster, a los dragones de collao, a Montse, Fran, Lía, Laura, David, Marces (ML & Toro) y Carlos.

Muchas gracias a mi familia, en especial a mis padres Álvaro y Marcela, para quienes mi educación siempre fue prioridad y gracias a ellos soy afortunada en muchos aspectos. Gracias también a Lalbert, Olga, al Cheochardo, al Shimonesan, a la Chari, a la Chechi, al Checho, la Chayén, el Chinti, la Chucky, al Toño y la tía Lola, son lo más.

Sobre todo quiero agradecer a mi primo Simón, a Rod y a mi hermano Alberto, que siempre creyeron en mi, aun antes de que yo misma lo hiciera. A Rod además, porque el fue el punto de inflexión en mi vida que me llevó a interesarme por los microorganismos, venirme a Conce y hacer este hermoso trabajo.

A todos ustedes muchas gracias por hacer de esta experiencia algo tan entretenido y enriquecedor.

Finalmente, le quiero dedicar este trabajo a las nuevas generaciones, en especial a los que más quiero, Vale, Leo, Loreto e Inti.

Curriculum Vitae

Paula Sofía Ruiz Fernández

Nacida el 5 de julio de 1988 en Santiago de Chile

2009-2014: Licenciatura en Biología Marina, Pontificia Universidad Católica de Chile.

2016-2018: Magíster en Ciencias con mención en Oceanografía, Universidad de Concepción, Chile.

PUBLICACIONES

Enviada a *Environmental Pollution* (2018): “Sentinel bacteria in mangrove sediments polluted with heavy metals in the Northwest Coast of South America”. Juan Carlos Fernández Cadena, Telmo Fernández Ronquillo, Paula Ruiz Fernández, Santiago Andrade, Beatriz Díez, Nicole Trefault & Rodrigo De la Iglesia.

Enviada a *The ISME Journal* (2018): “Partitioning of Autotrophic Carbon Fixation Pathways Along the Redox Gradient in Anoxic Marine Zones”. Paula Ruiz, Salvador Ramírez-Flandes, Edwin Rodríguez-León & Osvaldo Ulloa.

ÁREAS DE INVESTIGACIÓN

- Principal: Oceanografía microbiana.
- Secundaria: Ecología microbiana.
- Otras: Bioquímica.

EXPERIENCIA DOCENTE

Seminario de investigación biológica BIO296, Departamento de Genética Molecular, Facultad de Ciencias Biológicas, Pontificia Universidad Católica de Chile: Influencia de los niveles de metales pesados en la composición de la comunidad bacteriana en los sedimentos de manglares. 2013.

Asesora en el seminario de investigación biológica BIO296, Departamento de Genética Molecular, Facultad de Ciencias Biológicas, Pontificia Universidad Católica de Chile: La comunidad bacteriana en los sedimentos de manglar Guayaquil-Ecuador: Influencia de los metales pesados, genes relacionados con el metabolismo del azufre y eliminación de iones metálicos. 2014

Ayudante de Microbiología marina BIO277M, docente Dr. Rodrigo De la Iglesia, Departamento de Genética Molecular, Facultad de Ciencias Biológicas, Pontificia Universidad Católica de Chile. 01/2015.

Ayudante de Microbiología Ambiental y Biotecnología BIO331C, docentes Dra. Beatriz Diéz y Dr. Rodrigo De la Iglesia, Departamento de Genética Molecular, Facultad de Ciencias Biológicas, Pontificia Universidad Católica de Chile. 02/2014 - 02/2015.

ENTRENAMIENTO DE INVESTIGACIÓN

Proyecto de investigación y cooperación con la Universidad de Guayaquil, Ecuador: el microbioma del manglar Estero Salado: un enfoque metagenómico para determinar los patrones de respuesta de la comunidad bacteriana, en sedimentos contaminados por metales pesados. Ayudante de investigación. 2013-2015.

FONDECYT 1161483, Ciclo de carbono microbiano en zonas marinas anóxicas: naturaleza y significado de los procesos autótrofos. Asistente de investigación. 2016-2018.

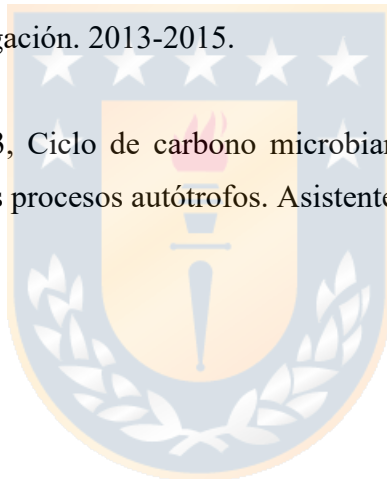
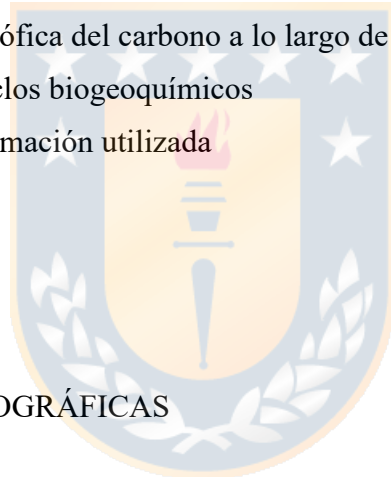


Tabla de Contenidos

Índice de figuras	viii
Índice de tablas	viii
RESUMEN	ix
ABSTRACT	xi
1.- INTRODUCCIÓN	1
2.- HIPÓTESIS Y OBJETIVOS	4
2.1 Hipótesis	4
2.2. Objetivos	5
2.2.1. Objetivo general	5
2.2.2. Objetivos específicos	5
3.- MATERIALES Y MÉTODOS	6
3.1. Selección de los marcadores genéticos de las rutas metabólicas de fijación autotrófica del carbono.	6
3.2. Análisis de secuencias de metagenomas y metatranscriptomas	6
3.3. Afiliación taxonómica de secuencias asociadas a marcadores genéticos	7
3.4. Capas de agua definidas por las concentraciones de oxígeno	7
3.5. Abundancia relativa de genes marcadores	7
3.6. Análisis estadísticos	8
4.- RESULTADOS	9
4.1. Título en español de la publicación	9
4.2. Carta en confirmación de envío	9
4.3. Resumen en español	9
4.4. Manuscrito enviado a The ISME Journal	11

5.- DISCUSIÓN	24
5.1. Abundancia relativa de secuencias metagenómicas relacionados a marcadores genéticos de fijación autotrófica del carbono a lo largo de la columna de agua de ZMAs globalmente distribuidas.	24
5.1.1. Análisis estadísticos sobre la abundancia relativa de secuencias alineadas a todos los marcadores genéticos de fijación autotrófica del carbono en metagenomas.	24
5.2. Afiliación taxonómica de secuencias alineadas a marcadores genéticos de fijación autotrófica del carbono a lo largo de la columna de agua de ZMAs globalmente distribuidas	25
5.3. Secuencias de metatranscriptomas asociadas a marcadores genéticos de la fijación autotrófica del carbono y su afiliación taxonómica	26
5.4. Modelo de fijación autotrófica del carbono a lo largo de la columna de agua y acoplamiento de ciclos biogeoquímicos	27
5.5. Limitaciones de la aproximación utilizada	28
5.6. Proyecciones	29
6.- CONCLUSIONES	31
7.- REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	33
8.- ANEXOS	36
8.1. Análisis estadísticos	40
8.1.1 SIMPER	40
8.1.2 ANOSIM	44



Índice de Figuras

Figura 5.3.1: Abundancia relativa de genes marcadores de la fijación autotrófica de carbono en metatranscriptomas de ZMAs y su asociación taxonómica putativa (Supplementary Figure 3 de capítulo de resultados).	26
---	----

Índice de Tablas

Tabla 1. Números EC (Enzyme Commission number) asociados a los marcadores genéticos de las 6 rutas de fijación autotrófica del carbono.	2
Tabla 8.1. Metadatos asociados con los metagenomas y metatranscriptomas de ZMAs.	36



RESUMEN

Las zonas marinas anóxicas (ZMAs) se caracterizan por contener concentraciones de oxígeno disuelto bajo los niveles de detección y presentar una acumulación de nitrito debido a la utilización de nitrato como aceptor final de electrones en ausencia de oxígeno. Los componentes del ciclo del nitrógeno -y últimamente del ciclo del azufre- han sido los más estudiados en las ZMAs. Sin embargo, muy poco se sabe sobre los procesos y linajes microbianos vinculados al ciclo del carbono en estas zonas, entre los cuales la fijación autotrófica del carbono es un componente crucial debido a que es el proceso biosintético más importante de la naturaleza. Hasta la fecha, se han reportado seis rutas metabólicas de fijación autotrófica del carbono y dado que algunas de estas rutas contienen enzimas sensibles al oxígeno, se espera una partición de ellas a lo largo del gradiente de oxígeno asociado a la columna de agua de ZMAs. Para poner a prueba esta hipótesis, se analizaron 37 metagenomas y 11 metatranscriptomes recolectados de ZMAs geográficamente diversas. Los resultados muestran una clara partición vertical de las abundancias relativas de secuencias alineadas con marcadores genéticos de las seis vías metabólicas de fijación autotrófica del carbono conocidas.

Los resultados metagenómicos muestran que la abundancia relativa de las secuencias alineadas con los genes marcadores del ciclo de Calvin-Benson-Basshan (CBB) y la vía reductiva del acetil_CoA (rCoA) dominaron en aguas anóxicas ($O_2 \leq 2 \mu M$ y $NO_2^- \geq 0.5 \mu M$) de las ZMAs. Sin embargo, mientras que las primeras fueron ubicuas a lo largo de todo el gradiente de oxígeno, las últimas se encontraron casi exclusivamente en aguas subóxicas (O_2 entre 2.3 y $10 \mu M$) y anóxicas. Las secuencias putativamente asociadas con el ciclo 3-hidroxiopionato/4-hidroxiбутирато (3HP/4HB) fueron dominantes en entornos disóxicos (O_2 entre 10 y $90 \mu M$), mayormente en metagenomas ubicados en oxiclina inferior. Con al menos dos órdenes de magnitud menos abundancia relativa que en las rutas mencionadas anteriormente, las secuencias alineadas con genes marcadores del ciclo del 3-hidroxiopionato (3HP) estuvieron presentes en aguas óxicas ($O_2 > 90 \mu M$), disóxicas y subóxicas, mientras que los relacionados con el ciclo reductivo de los ácidos tricarbónicos (rTCA) se encontraron presentes sólo en aguas subóxicas y anóxicas. La afiliación taxonómica de marcadores genéticos relacionó el ciclo de CBB principalmente con el phylum de las cianobacterias en aguas óxicas e iluminadas, mientras que a *gamma*-proteobacterias

oxidantes del azufre (GOS) en aguas bajo la capa fótica. La afiliación taxonómica putativa de los marcadores genéticos de la vía rCoA fue principalmente con bacterias anammox del género *Candidatus Scalindua*, mientras que del ciclo rTCA fue con la bacteria nitrato-oxidante *Nitrospina gracilis*. Los resultados relacionaron el ciclo del 3HP/4HB principalmente con el phylum *Thaumarchaeota*. Resultados inesperados incluyeron secuencias asociadas con los genes marcadores del biciclo 3HP y el ciclo 3HP/4HB a los phyla *Proteobacteria* y *Actinobacteria*.

En concordancia con el análisis metagenómico, los datos metatranscriptómicos soportan el vínculo previamente sugerido del ciclo CBB al phylum de las cianobacterias en aguas óxicas e iluminadas, mientras que las GOS fueron el grupo dominante en aguas bajo la capa fótica, también se confirma la asociación sugerida del ciclo 3HP/4HB a *Thaumarchaeota*, así como la afiliación de *Candidatus Scalindua* y *Nitrospina gracilis*, a la vía rCoA y al ciclo rTCA respectivamente, los últimos dos exclusivamente expresados en ambientes anóxicos.

Este trabajo provee un nuevo antecedente sobre el rol estructurador del oxígeno al observarse una clara partición de aquellos genes que tienen relación con las rutas metabólicas de fijación autotrófica del carbono en columnas de agua de ZMAs geográficamente diversas. Esta partición de acuerdo con el gradiente de oxígeno es consistente por lo descrito previamente por bibliografía y con las hipótesis planteadas en este trabajo, confirmando la naturaleza anóxica de las rutas rCoA y rTCA, sugiriendo que el ciclo 3HP/4HB está presente en oxiclina, y que el ciclo CBB es el más ubicuo asociado a la columna de agua de ZMAs a nivel mundial.

Los taxones que fueron relacionados a cada una de las rutas de fijación autotrófica del carbono antes mencionados también han sido previamente asociados a procesos claves del ciclo del nitrógeno y del azufre en ZMAs, lo que refleja que las concentraciones de oxígeno no sólo estructuran las vías metabólicas de nitrógeno y azufre sino también de la fijación autotrófica del carbono, un componente crucial del ciclo del carbono.

ABSTRACT

Anoxic marine zones (AMZs) are characterized by containing dissolved oxygen concentrations below the detection levels and presenting an accumulation of nitrite due to the use of nitrate as the terminal electron acceptor in the absence of oxygen. The components of the nitrogen cycle - and lately of the sulfur cycle - have been the most studied in the ZMAs. However, little is known about the microbial processes and lineages linked to the carbon cycle in these areas, among them, the autotrophic carbon fixation is a crucial component because it is the most important biosynthetic process in nature. To date, six autotrophic carbon fixation metabolic pathways have been reported. Since some of these pathways contain oxygen-sensitive enzymes, we expected a depth partitioning of them along the redox gradient in the water column of AMZs. To test this hypothesis, we analyzed 37 metagenomes and 11 metatranscriptomes collected from geographically diverse AMZs. The results showed a clear vertical distribution of relative abundances of sequences aligned to the marker genes related to the six known autotrophic carbon fixation metabolic pathways.

The metagenomic results showed that the relative abundance of the sequences aligned with the marker genes of the Calvin-Benson-Basshan cycle (CBB) and the reductive acetyl_CoA pathway (rCoA) dominated in anoxic waters ($O_2 \leq 2 \mu M$ and $NO_2^- \geq 0.5 \mu M$) of the AMZs. However, while the former was ubiquitous throughout all the oxygen gradient, the latter was found almost exclusively in the suboxic (O_2 between 2.3 and 10 μM) and anoxic waters. The sequences putatively associated with the 3-hydroxypropionate/4-hydroxybutyrate (3HP/4HB) cycle were dominant in dysoxic environments (O_2 between 10 and 90 μM), mostly in metagenomes located in lower oxyclines. With at least two orders of magnitude less abundance than in the routes mentioned above, the sequences aligned with marker genes of the 3-hydroxypropionate bicycle (3HP) were present in oxic ($O_2 > 90 \mu M$), dysoxic and suboxic waters, whereas those related to the reductive tricarboxylic acids cycle (rTCA) were found only in suboxic and anoxic waters. The taxonomic affiliation of the marker genes related the CBB cycle mainly with the phylum of the cyanobacteria in oxic and illuminated waters, while the gamma-proteobacteria sulfur oxidizers (GSO) in waters under the photic layer. The putative taxonomic affiliation of the marker genes of the rCoA pathway was mainly with anammox bacteria of the genus *Candidatus Scalindua*, while the rTCA cycle was with the nitrite-oxidant bacterium *Nitrospina gracilis*. The results related the 3HP/4HB cycle

mainly with the phylum *Thaumarchaeota*. Unexpected results included sequences associated with the marker genes of the 3HP bicycle and the 3HP/4HB cycle to the phyla *Proteobacteria* and *Actinobacteria*.

In agreement with the metagenomic analysis, the metatranscriptomic data support the previously suggested link of the CBB cycle to the phylum of the cyanobacteria in oxic and illuminated waters, while the GSO were the dominant group in waters under the photic layer, the suggested association of the 3HP/4HB cycle to *Thaumarchaeota* was also confirmed, as well as the affiliation of *Candidatus Scalindua* and *Nitrospina gracilis*, to the rCoA pathway and the rTCA cycle respectively, the last two exclusively expressed in anoxic environments.

This work provides a new antecedent on the structuring role of oxygen by observing a clear partition of those genes that are related to the autotrophic carbon fixation metabolic pathways in the water column of geographically diverse ZMAs. This partition according to the oxygen gradient is consistent with previously descriptions by the literature and with the hypotheses presented in this work, confirming the anoxic nature of the rCoA and rTCA pathways, suggesting that the 3HP/4HB cycle is present in oxyclines. and that the CBB cycle is the most ubiquitous pathway of autotrophic carbon fixation associated with the water column of AMZs worldwide.

The taxa that were related to each of the aforementioned autotrophic carbon fixation metabolic pathways have also been previously associated with key processes of the nitrogen and sulfur cycle in ZMAs, which reflects that oxygen concentrations not only structure the metabolic pathways of nitrogen and sulfur but also of the autotrophic carbon fixation, a crucial component of the carbon cycle.

1- INTRODUCCIÓN

Las zonas marinas anóxicas (ZMAs) representan agua oceánica subsuperficial en donde se encuentran concentraciones de oxígeno indetectables ($\leq 1-10$ nM), así como una acumulación de nitrito mayor o igual a $0.5 \mu\text{M}$ (Thamdrup *et al.*, 2012; Ulloa *et al.*, 2012). Las ZMAs se producen por la respiración aeróbica y una menor ventilación de la columna de agua y se han descrito en el Mar Árabe, así como en el océano Pacífico Oriental Tropical Norte y Sur (Ulloa *et al.*, 2012). Como consecuencia de la baja concentración de oxígeno, estos ecosistemas se caracterizan por contener una baja diversidad y abundancia de macroorganismos, pero comunidades microbianas complejas, adaptadas a las condiciones anóxicas, cuyos procesos metabólicos son responsables de la producción de gases con efecto climático (e.g., N_2O , CH_4 y CO_2 , Paulmier & Ruiz-Pino, 2009). Sin duda, el ciclo del nitrógeno ha sido el más estudiado en las ZMAs (Lam & Kuypers, 2011), incluyendo la identificación de procesos metabólicos claves, así como de los microorganismos responsables de realizarlos (Ulloa *et al.*, 2012; Stewart *et al.*, 2012). Sin embargo, muy poco se sabe sobre los procesos y linajes microbianos vinculados al ciclo del carbono en ZMAs.

La fijación autotrófica del carbono, que corresponde a la formación de nuevas moléculas de materia orgánica a partir de compuestos inorgánicos con la formación del enlace C-C, es un componente crucial del ciclo del carbono, debido a que es el proceso biosintético más importante de la naturaleza, ya que suministra el carbono orgánico necesario para que los organismos heterótrofos se desarrollen y lo oxiden de nuevo, generando carbono inorgánico y completando el ciclo (Hügler & Siervert, 2011). Hasta la fecha, se han reportado seis rutas o vías metabólicas de fijación autotrófica del carbono (Berg *et al.*, 2010; Hügler & Siervert, 2011): el ciclo de Calvin-Benson-Bassham (CBB), la vía reductiva del acetil-CoA (rCoA), el ciclo reductivo de los ácidos tricarbóxicos (rTCA), el biciclo del 3-hidroxiacetato (3HP), el ciclo del 3-hidroxiacetato/4-hidroxiacetato (3HP/4HB), y el ciclo del dicarboxilato/4-hidroxiacetato (DC/4HB). De ellos, el ciclo del CBB es el más estudiado debido a su importante contribución a la síntesis de materia orgánica cuando acopla sus requerimientos energéticos al uso de luz solar (fotoautotrofia-fotosíntesis). Sin embargo, los organismos quimioautótrofos son importantes en los ecosistemas pelágicos oscuros (Swan *et al.*, 2011), en fuentes hidrotermales (Jannasch & Mottl, 1985) y eventualmente en ZMAs. En sustento del anterior argumento, muchos microorganismos que habitan en aguas deficientes en oxígeno

tienen el potencial genético para llevar a cabo la fijación autotrófica del carbono en ambientes oscuros, incluidas las bacterias que oxidan anaeróbicamente el amonio con nitrito a través del proceso que se conoce como anammox (Woebken *et al.*, 2008) y las abundantes bacterias oxidantes de azufre (Walsh *et al.*, 2009), aunque a través de diferentes vías metabólicas. Dado que algunas de estas vías contienen enzimas sensibles al oxígeno (Berg *et al.*, 2010; Hügler & Siervert, 2011 y Tabla 1), se espera una partición de ellas a lo largo del gradiente de oxígeno asociado a la columna de agua de las ZMAs.

Para probar esta hipótesis, se analizaron 37 metagenomas y 11 metatranscriptomas de muestras recolectadas de ZMAs geográficamente diversas (Tabla 8.1 en anexos). Los resultados muestran una clara distribución vertical (Figura 1 en capítulo de resultados) de las abundancias relativas de secuencias que se alinearon a los genes marcadores (por BLAST: Basic local alignment tool) de las seis vías metabólicas de fijación autotrófica de carbono conocidas hasta la fecha (Tabla 1).

Tabla 1: Adaptada de Berg *et al.*, 2010.

Ruta de fijación autotrófica del carbono	ATP para formar piruvato	Ambiente en el que ha sido reportado	Dominio de la vida	Enzimas marcadoras	Numero EC de enzimas marcadoras
CBB	7	Óxico/Anóxico	Bacteria y Eucaria	Ribulose 1,5-bisphosphate carboxylase	4.1.1.39
				Phosphoribulokinase	2.7.1.19
rCoA	1	Anóxico	Bacteria y Archaea	CO-methylating acetyl-CoA synthase	2.3.1.169
				5-methyltetrahydrofolate:corrinoid/iron-sulfur protein Co-methyltransferase	2.1.1.258
rTCA	2	Anóxico	Bacteria	ATP citrate synthase	2.3.3.8
				Citrate-CoA ligase	6.2.1.18
3HP	7	Óxico/Anóxico	Bacteria	2-methylfumaryl-CoA isomerase	5.4.1.3
				3-methylfumaryl-CoA hydratase	4.2.1.153
				Acrylyl-CoA reductase (NADPH)	1.3.1.84

				Malonyl CoA reductase	1.2.1.75
				3-hydroxypropionyl-CoA synthase	6.2.1.36
3HP/4HB	9	Óxico/Anóxico	Archaea	4-hydroxybutanoyl-CoA dehidratase	4.2.1.120
	5**			4-hydroxybutyrate--CoA ligase	6.2.1.40
				Acrylyl-CoA reductase (NADPH)	1.3.1.84
				Malonyl CoA reductase	1.2.1.75
				3-hydroxypropionyl-CoA synthase	6.2.1.36
DC/4HB	5	Anoxic	Archaea	4-hydroxybutanoyl-CoA dehidratase	4.2.1.120
				4-hydroxybutyrate-CoA synthetase	6.2.1.40

Tabla 1: Números EC (Enzyme Commission number) asociados a los marcadores genéticos de las 6 rutas de fijación autotrófica del carbono descritas hasta la fecha así como las principales diferencias entre ellas. ** Könneke *et al.*, 2014.



2- HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

2.1. *Hipótesis:*

H1: “Las rutas metabólicas de fijación autotrófica del carbono en las zonas marinas anóxicas (ZMAs) están dominadas por rutas adicionales al ciclo de Calvin-Benson-Bassham (CBB), eficientes en ambientes anóxicos limitados en energía, tales como la vía reductiva del acetil-CoA (rCoA), el ciclo reductivo de los ácidos tricarbónicos (rTCA) y/o el ciclo del dicarboxilato/4-hidroxi-butirato (DC/4HB).”

H2: “La asociación taxonómica putativa de las secuencias marcadoras de las rutas metabólicas de fijación autotrófica del carbono difieren a lo largo del gradiente de oxígeno presente en la columna de agua de las ZMAs”



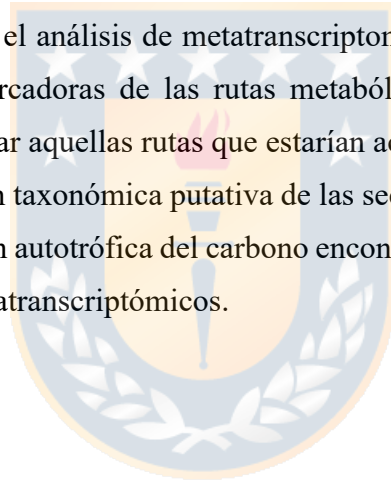
2.2. *Objetivos*

2.2.1. **Objetivo general:**

Determinar cuáles son las rutas metabólicas dominantes y los microorganismos responsables de realizar la fijación autotrófica del carbono a lo largo del gradiente de oxígeno presente en la columna de agua de diferentes ZMAs del mundo en base a la presencia de genes marcadores de cada ruta.

2.2.2. **Objetivos específicos:**

- Identificar y cuantificar la presencia de genes marcadores de las potenciales rutas metabólicas relacionadas con la fijación autotrófica del carbono en ZMAs mediante el análisis de metagenomas.
- Determinar, mediante el análisis de metatranscriptomas, los niveles de transcripción de las secuencias marcadoras de las rutas metabólicas de fijación autotrófica del carbono para evidenciar aquellas rutas que estarían activas.
- Identificar la afiliación taxonómica putativa de las secuencias marcadoras de las rutas metabólicas de fijación autotrófica del carbono encontradas en ZMAs utilizando datos metagenómicos y metatranscriptómicos.



3.- MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. Selección de los marcadores genéticos de las rutas metabólicas de fijación autotrófica de carbono.

Los genes marcadores que codifican para enzimas relacionadas con las rutas metabólicas de fijación autotrófica de carbono se recolectaron a través de la búsqueda en la literatura (Berg *et al.*, 2010 y Hügler & Siervert, 2011) y se verificaron en bases de datos de KEGG y Metacyc (Kanehisa *et al.*, 2016; Caspi *et al.*, 2017) para seleccionar preferiblemente aquellas enzimas que participan exclusivamente en estas rutas. La tabla 1 muestra la lista de enzimas que resultó de este proceso. Nuestra selección es consistente con algunas de las enzimas claves señaladas por Berg *et al.*, 2010 y Hügler & Siervert, 2011, pero excluye algunas enzimas promiscuas que fueron señaladas por ellos como claves.

3.2. Análisis de secuencias de metagenomas y metatranscriptomas

Se analizaron 37 metagenomas (del Mar Árabe y del océano Pacífico Oriental Tropical Norte y Sur) y 11 metatranscriptomas (del océano Pacífico Oriental Tropical Norte y Sur) de diferentes profundidades de la columna de agua asociada a estas ZMAs geográficamente diversas (Tabla 8.1 en anexos) de la fracción de tamaño entre 1.6 (pre-filtro) y 0.22 (filtro) μm .

Los conjuntos de datos metagenómicos (secuencias de ADN) y metatranscriptómicos (secuencias de ARN_m) se descargaron de las Secuencias de Lectura de Archivos (SRA), del sistema de Genomas Microbianos Integrados (IMG/ER) y de bases de datos de MG-RAST (Tabla 8.1 en anexos). Las secuencias contenidas en los datos metagenómicos y metatranscriptómicos se alinearon directamente con un subconjunto de la base de datos de secuencias de proteínas KEGG que solo contenía secuencias con una ortología KEGG definida (KO). El algoritmo BLASTX del paquete de software Diamond se utilizó en todas estas alineaciones masivas. Solo secuencias cuyas alineaciones tuvieron una puntuación de bit-score igual o superior a 50 se utilizaron para continuar el análisis. Posteriormente, se crearon los perfiles de los KOs y los números de la Comisión de Enzimas (EC) para cada meta-oma. El archivo de mapeo "ko2ec" de la base de datos KEGG se usó para convertir un KO a EC, siempre que el KO correspondiera a una enzima. Posteriormente, los perfiles para cada conjunto de datos meta-ómicos se crearon con la abundancia relativa de genes

relacionados por BLAST con enzimas exclusivas de fijación autotrófica del carbono (Tabla 1) para cada conjunto de datos. Estos genes fueron denominados en este trabajo como “marcadores genéticos” de la fijación autotrófica del carbono.

3.3. Afiliación taxonómica de secuencias asociadas a marcadores genéticos.

Las secuencias de los metagenomas y metatranscriptomas, asociadas con los marcadores genéticos de fijación autotrófica del carbono (Tabla 1) se extrajeron de los archivos fasta de nucleótidos originales y se alinearon con el algoritmo BLASTX del paquete de software DIAMOND contra el NCBI RefSeq, NCBI-nr y una base de datos personalizada compuesta de secuencias de célula única provenientes de ZMAs descargadas desde IMG/ER. Se seleccionó la mejor puntuación de bit-score (cuando este era mayor o igual a 50) para cada secuencia entre las alineaciones separadas (con las tres bases de datos mencionadas) para realizar la afiliación taxonómica putativa utilizando la anotación taxonómica de la base de datos de referencia. Cuando esta anotación taxonómica se asoció con un "organismo no cultivado" en este proceso, se utilizó la segunda o la tercera mejor alineación con mejor puntaje de bit-score.

3.4. Capas de agua definidas por las concentraciones de oxígeno.

Las capas de la columna de agua se definieron utilizando las concentraciones de oxígeno y/o nitrito como: óxico ($O_2 > 90 \mu M$), disódico (O_2 entre 10 y 90 μM), subódico (O_2 entre 2.3 y 10 μM) y anódico ($O_2 < 2,3 \mu M$ y $NO_2^- > 0,45 \mu M$; Thamdrup *et al.*, 2012; Ulloa *et al.*, 2012). Las oxiclinalas nombradas en el texto están compuestas por aguas disódicas y subódicas. La Tabla 8.1 en anexos contiene más información sobre las variables ambientales de cada muestra.

3.5. Abundancia relativa de genes marcadores.

Las abundancias relativas de los genes marcadores y los taxones asociados se obtuvieron al dividir las abundancias totales por el número total de secuencias de cada conjunto de datos. Para construir los círculos en la Figura 1 del capítulo de resultados y la Figura 5.3.1. del capítulo de discusión, estas abundancias relativas se multiplicaron por 150000, que es proporcional al radio de cada círculo.

3.6. Análisis estadísticos

Para los análisis estadísticos se elaboró una matriz de abundancia relativa de las secuencias alineadas a todos los marcadores genéticos de los metagenomas, los cuales fueron clasificados según concentración de oxígeno (óxico, disóxico, subóxico y anóxico). Para determinar si las diferencias entre grupos eran estadísticamente significativas se realizó un análisis de similitud no paramétrico (ANOSIM). Finalmente, para determinar cuales son las secuencias marcadoras que más aportan en la similitud/disimilitud observada entre los grupos, se realizó un análisis de similitud (SIMPER). Ambos análisis fueron ejecutados en el programa Primer-E (Plymouth, UK).



4. RESULTADOS

4.1. Título en español de la publicación:

Partición de rutas de fijación autotrófica del carbono a lo largo del gradiente redox en zonas marinas anóxicas.

Manuscrito enviado a The ISME Journal.

4.2 Carta en confirmación de envío:

Dear Prof Ulloa,

Thank you for submitting your manuscript entitled "Partitioning of Autotrophic Carbon Fixation Pathways Along the Redox Gradient in Anoxic Marine Zones" by Osvaldo Ulloa, Paula Ruiz, Salvador Ramírez-Flandes, and Edwin Rodríguez-León for publication in The ISME Journal. The manuscript has been assigned reference ISMEJ-18-01358SC and we would be grateful if you would use this reference in any further correspondence.

To view the progress of your manuscript please click on the URL below:

<http://mts-isme.nature.com/cgi-bin/main.plex?el=A7Br6nl3A3Fjp5J3A9ftdGa6kGWtsth36383ja6VobAZ>

Yours sincerely,

Jaspreet Nijjar
Editorial Office
The ISME Journal

4.3. Resumen en español

Los procesos anaeróbicos microbianos dentro de las zonas marinas anóxicas (ZMAs) se reconocen como componentes claves del ciclo del nitrógeno oceánico. Sin embargo, la naturaleza y el impacto de estos procesos en el ciclo del carbono son menos conocidos. Usando datos metagenómicos y metatranscriptómicos de ZMAs de todo el mundo,

informamos una partición explícita de los genes marcadores, asociada con las vías de fijación autotróficas de carbono, a lo largo del gradiente redox. De acuerdo con la abundancia relativa de marcadores genéticos en los metagenomas, el ciclo de Calvin-Benson-Bassham fue el más ubicuo en todo el gradiente, mientras que la vía reductiva del Acetil-Coa se restringió casi exclusivamente a aguas subóxicas y anóxicas. Secuencias putativamente asociadas con el ciclo 3-hidroxiacetato/4-hidroxiacetato dominaron en las oxiclinal superior e inferior. Con abundancias relativas significativamente menores, los genes marcadores relacionados con el ciclo reductivo de los ácidos tricarboxílicos se encontraron en aguas subóxicas y anóxicas. La afiliación taxonómica de las secuencias estudiadas es consistente con la presencia de microorganismos conocidos involucrados en los ciclos biogeoquímicos cruciales en ZMAs.



4.4. Manuscrito enviado a The ISME Journal:

Partitioning of Autotrophic Carbon Fixation Pathways Along the Redox Gradient in Anoxic Marine Zones

Paula Ruiz^{1,2}, Salvador Ramírez-Flandes¹, Edwin Rodríguez-León¹, Osvaldo Ulloa^{1*}

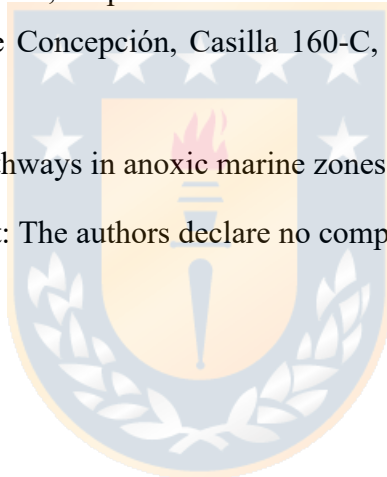
¹Departamento de Oceanografía & Instituto Milenio de Oceanografía, Universidad de Concepción, Concepción, Chile.

²Programa de Postgrado en Oceanografía, Departamento de Oceanografía, Universidad de Concepción, Casilla 160-C, Concepción, Chile..

*Correspondence: Osvaldo Ulloa, Departamento de Oceanografía & Instituto Milenio de Oceanografía, Universidad de Concepción, Casilla 160-C, 4070386 Concepción, Chile; e-mail: oulloa@udec.cl

Running title: Autotrophic pathways in anoxic marine zones

Competing interests statement: The authors declare no competing financial interests.



Abstract

Microbial anaerobic processes within anoxic marine zones (AMZs) are recognised as key components of the oceanic nitrogen cycle. However, the nature and impact of these processes on carbon cycling are less understood. Using metagenomic and metatranscriptomic data from AMZs worldwide, we report an explicit partitioning of the marker genes, associated with the autotrophic carbon fixation pathways, along the redox gradient. According to relative abundances of gene-markers in metagenomes, the Calvin-Benson-Bassham cycle was the most ubiquitous along the entire gradient, while the reductive Acetyl_CoA pathway was almost exclusively restricted to suboxic and anoxic waters. Sequences putatively associated with the 3-hydroxypropionate/4-hydroxybutyrate cycle dominated in the upper and lower oxyclines. With significantly lower relative abundances, marker genes related to the reductive tricarboxylic acid cycle were represented in suboxic and anoxic waters. Taxonomic affiliation of the studied sequences is consistent with the presence of known microorganisms involved in crucial AMZ biogeochemical cycles.



Anoxic marine zones (AMZs) are oceanic regions in which dissolved oxygen concentrations are undetectable ($\leq 1-10$ nM), and nitrite accumulates to levels of ≥ 0.5 μM [1, 2]. Major permanent AMZs can be found in the Arabian Sea, as well as in the Eastern Tropical North and South Pacific Oceans [2]. Anaerobic microbial processes, occurring in these systems, impact the nitrogen cycle at the planetary scale [3]. While microbial processes associated with the nitrogen cycle have been extensively studied in AMZs [4], those linked to the carbon cycle have received considerably less attention in these systems; particularly the autotrophic carbon fixation, which is the crucial component of the carbon cycle. To date, the following six metabolic pathways of autotrophic carbon fixation have been reported [5, 6]: the Calvin-Benson-Bassham cycle (CBB), the reductive Acetyl-CoA or Wood-Ljungdahl pathway (rCoA), the reductive tricarboxylic acids cycle (rTCA), the 3-hydroxypropionate bicycle (3HP), the 3-hydroxypropionate/4-hydroxybutyrate cycle (3HP/4HB), and the dicarboxylate/4-hydroxybutyrate cycle (DC/4HB). Among them, the CBB cycle contributes most to the modern synthesis of organic matter [6]. Nevertheless, chemolithoautotrophs have been reported to be significantly abundant in dark ecosystems [7], such as hydrothermal vents [8]. Many microorganisms that inhabit oxygen deficient waters have the genetic potential for carrying out dark, autotrophic carbon fixation, including the anammox (anaerobic ammonium oxidation) bacteria [9] and the abundant sulphur oxidisers [10], albeit via different pathways. Since some of these pathways contain oxygen-sensitive enzymes [5, 6], we expected a depth partitioning of them along the redox gradient. To test this hypothesis, we analysed 37 metagenomes and 11 metatranscriptomes, collected from geographically diverse AMZs (Supplementary Table 2). The results show a clear vertical distribution (Figure 1) of relative abundances of sequences, encoding the marker genes, related to the six known autotrophic carbon fixation metabolic pathways (Supplementary Table 1).

The analysis of metagenomes (Figure 1 and Supplementary Figure 2) showed that marker genes related to the CBB cycle, like RuBisCO (EC4.1.1.39), were ubiquitous along the entire water-column, and dominated the illuminated oxic (>90 $\mu\text{M O}_2$) and suboxic (<10 $\mu\text{M O}_2$) waters. In contrast, the sequences, associated with the rCoA pathway, were restricted to the anoxic and suboxic waters, being markedly more abundant in the former. With at least two orders of less abundant magnitude, the sequences related to the marker genes of the rTCA cycle were restricted to suboxic and anoxic waters, whereas those associated with the 3HP

bicycle were present from oxic to suboxic water conditions. Since the 3HP/4HB and DC/4HB cycles share the marker enzymes 4-hydroxybutanoyl-CoA dehydratase (EC4.2.1.120) and 4-hydroxybutyrate-CoA synthase (EC6.2.1.40), it was not possible to unambiguously assign sequences to these cycles, based solely on orthology. Given that the 3HP/4HB cycle is the only one that has been found in Thaumarchaeota [11], and the DC/4HB cycle has only been reported in the chrenarchaeal orders, Thermoproteales, and Desulfurococcales [5], we relied on taxonomy to discriminate between them. Thus, sequences putatively associated with the 3HP/4HB cycle were highly abundant in dysoxic waters (10-90 $\mu\text{M O}_2$), dominating in the lower oxycline. No sequences that could be unambiguously assigned to the DC/4HB cycle were found. Complementary results for the presence of the full set of enzymes, for each pathway, is presented in Supplementary Figure 1.

Taxonomic affiliation of the studied genes is presented in Figure 1 and Supplementary Figure 2. Gene markers for the CBB cycle were affiliated to Cyanobacteria (mainly to *Prochlorococcus*) and photosynthetic protists (*Mamielales*) in illuminated waters, as well as to the gamma-proteobacteria sulphur oxidisers (GSO), along the entire oxygen gradient underneath. The importance of the GSO in oxygen-deficient marine environments is well recognised [10], where they couple the nitrogen and sulphur cycling by oxidising reduced sulphur compounds with nitrate [10,12]. Sequences of the rCoA pathway, were affiliated mainly to Planctomycetes of the genus *Candidatus Scalindua*, which are known to carry out the process of anammox in AMZs [9] as well as being able to fix carbon autotrophically [13]. As mentioned above, gene markers for the 3HP/4HB cycle were found associated with thaumarchaeota of the Marine Group I, including *Nitrosopumilus* sp., and a single-amplified genome (SCGC AAA799-D07). Representatives of this phylum have been found to be abundant in AMZs oxyclines [14], and to be able to carry out aerobic ammonium oxidation, as well as use the most efficient variant of the 3HP/4HB cycle known to date [11]. Sequences related to the rTCA cycle were linked to *Nitrospina gracilis*, a known aerobic nitrite oxidiser. The presence of the sequences related to *N. gracilis* in anoxic waters, could be explained by the occurrence of a recently discovered cryptic oxygen cycle [15], or by putative anaerobic

oxidation of nitrite [16]. The analysis of its genome supports the idea of a versatile metabolism, with adaptations to microaerophilic conditions [17].

In agreement with the metagenomic analysis, metatranscriptomic data (Supplementary Figure 3) support the ubiquity of the CBB cycle along the entire redox gradient, related to the photosynthetic microorganisms in the illuminated oxic surface layer, and to the GSO in the rest of the AMZ water column. Additionally, transcripts related to the rCoA and rTCA pathways, linked to *Candidatus Scalindua* and *Nitrospina gracilis*, respectively, were found exclusively in the anoxic waters, stressing the point that these carbon fixation pathways thrive when oxygen is absent [5, 6]. Carbon fixation gene transcription patterns also support the presence of the 3HP/4HB cycle from Thaumarchaeota at the oxyclines. The pattern observed for carbon fixation is, thus, consistent with that observed when the metabolic processes of nitrogen and sulphur are considered [18, 19].

This study provides information about pathway-specific metagenomic and metatranscriptomic analyses, demonstrating an explicit redox partitioning of the carbon fixation pathways in AMZs (Figure 2); thus, reflecting that oxygen concentrations not only structures the nitrogen and sulphur metabolic pathways in AMZs, but also carbon fixation, the crucial component of the carbon cycle. Measurements of the carbon fixation rates, along the redox gradient are necessary to complement and better understand carbon cycling in AMZs.

Figures:

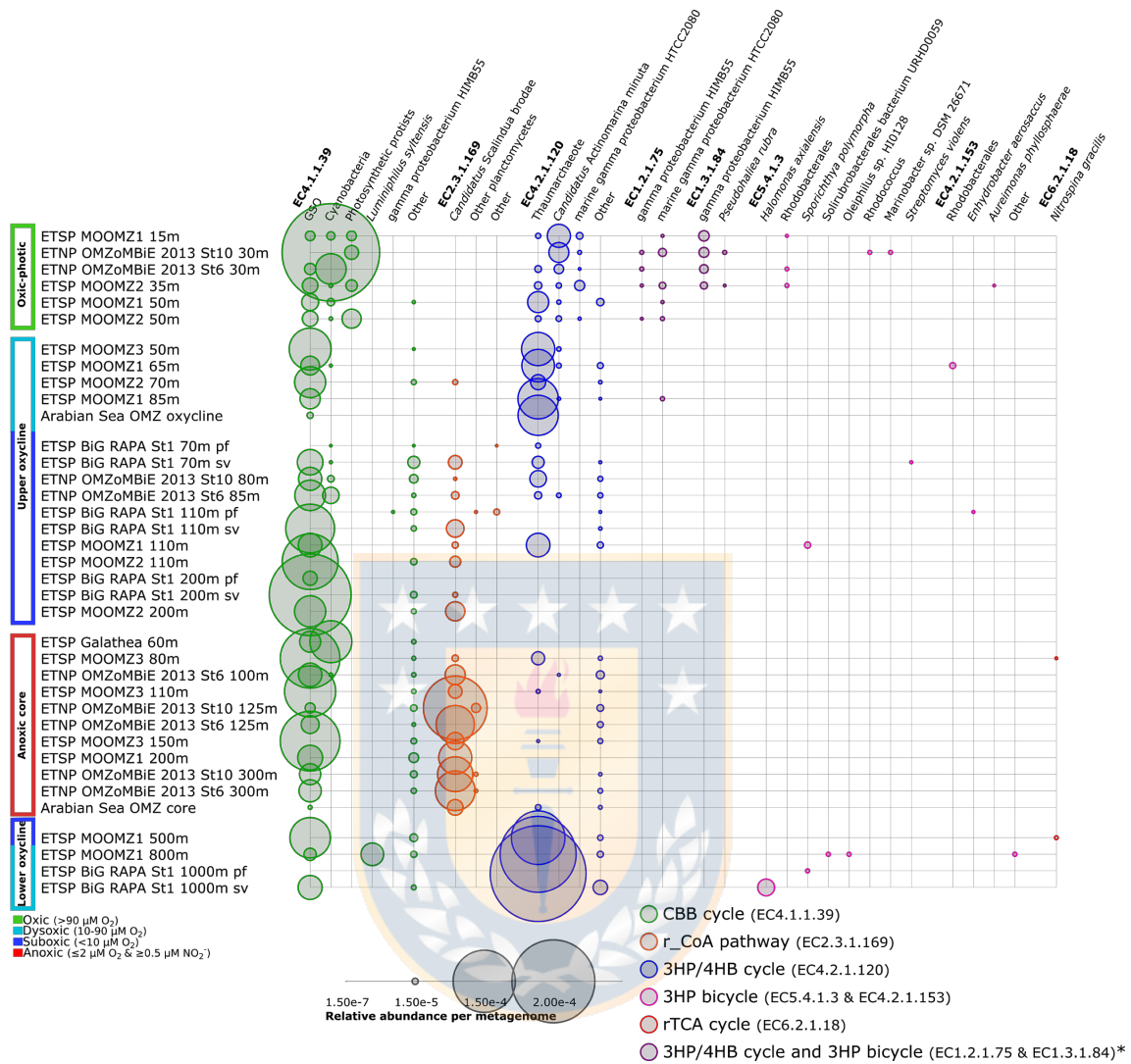


Figure 1: Relative abundance of the marker genes of autotrophic carbon fixation pathways, in the metagenomes extracted from AMZs worldwide, and their putative taxonomic associations. Metagenomes from the Arabian Sea, and the Eastern Tropical North Pacific (ETNP) and South Pacific (ETSP) Oceans, were separated by their oxygen concentrations, as described in the left boxes of the figure. Coloured circle ratios are proportional to the relative abundance of the sequences per metagenome (normalised by the total number of sequences of each metagenome) that were aligned with the marker genes of autotrophic carbon fixation and their putatively related taxonomy. Some taxonomies belonging to known and abundant groups were clustered as cyanobacteria, gamma-proteobacteria sulphur oxidisers (GSO), and photosynthetic protists. The sequences marked with an asterisk symbol were related to both

the 3HP/4HB and the 3HP pathways, to highlight that some of these sequences were associated with those pathways, present in euphotic waters and putatively related to marine gamma-proteobacterium HTCC2080, gamma-proteobacterium HIMB55 and *Candidatus Actinomarina minuta*, in more than one gene marker. These associations suggest the existence of an unknown autotrophic carbon fixation pathway in bacteria inhabiting euphotic waters that could be making use of enzymes from the 3HP/4HB and 3HP pathways. This observation



has been previously reported for the HTCC2080 strain [20]. Sequences related to marker genes, with less than 0.0006% of relative abundance, were not considered in the plot.



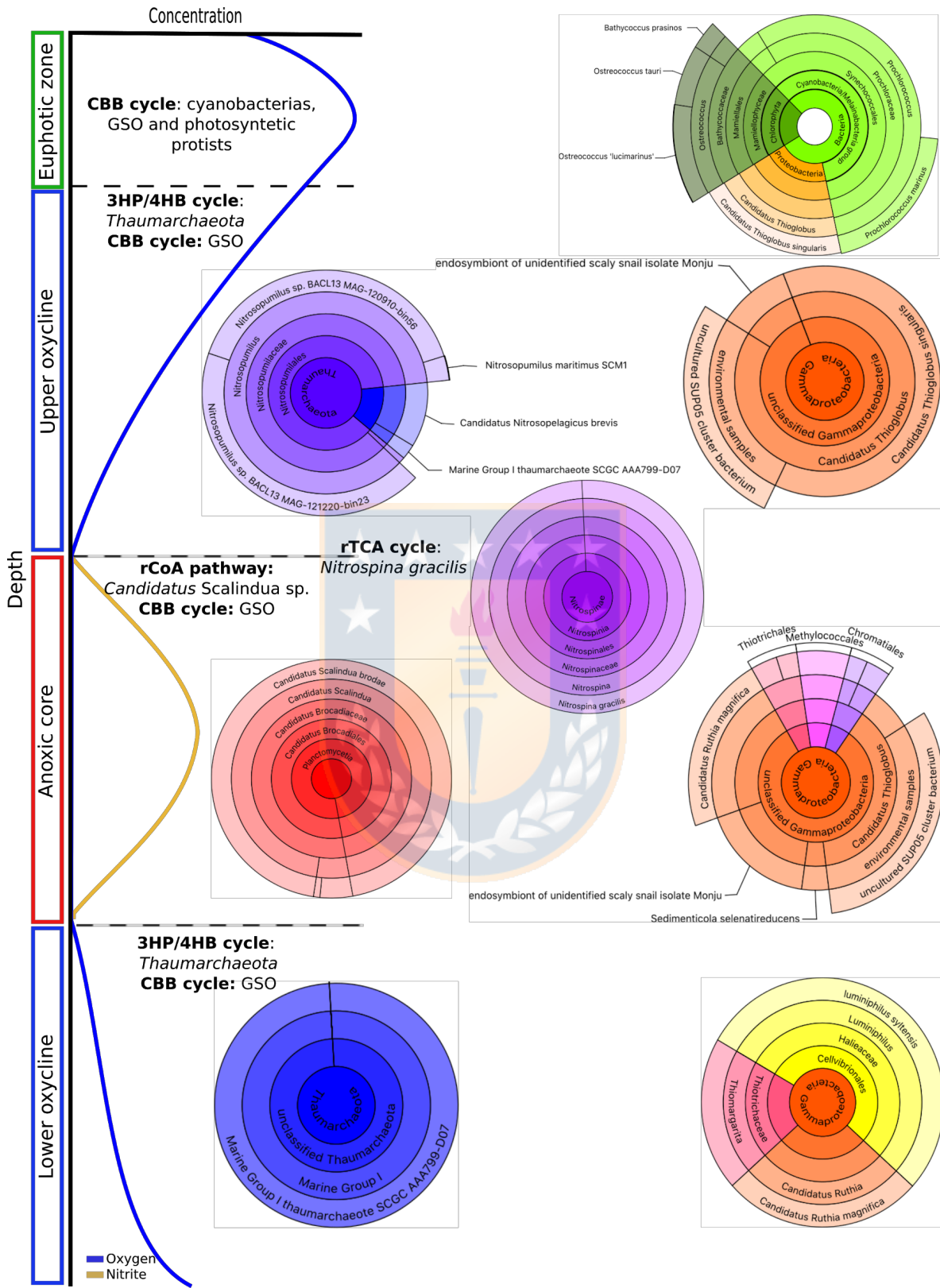


Figure 2: Model of the partition of autotrophic carbon fixation pathways and taxonomic affiliation along redox gradients of AMZs. Autotrophic carbon fixation is carried out in euphotic oxic waters by cyanobacteria and photosynthetic protists, and by gamma-proteobacteria sulphur oxidisers (GSO) along the entire redox gradient, using the CBB cycle. In the oxyclines, members of *Thaumarchaeota* perform this function as well, but with the use of the 3HP/4HB cycle. In the suboxic-anoxic interface, relatives of *Nitrospina gracilis* fix carbon using the rTCA cycle, while in the anoxic core anammox bacteria *Candidatus Scalindua* spp. do it using the rCoA pathway. Pie charts show the hierarchical levels of classification for each abovementioned taxon.



Acknowledgements

This study was supported by the Chilean National Commission for Scientific and Technological Research (grant Fondecyt 1161483) and the Millennium Science Initiative (grant IC 120019).

Competing Interests

Authors declare no competing financial interests.

Supplementary information is available at the ISME Journal website.



References:

1. Thamdrup B, Dalsgaard T, Revsbech NP. Widespread functional anoxia in the oxygen minimum zone of the Eastern South Pacific. *Deep Sea Research Part I: Oceanographic Research Papers*. 2012;65:36–45.
2. Ulloa O, Canfield DE, Delong EF, Letelier RM, Stewart FJ. Microbial oceanography of anoxic oxygen minimum zones. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2012;109:15996–6003.
3. Codispoti LA, Brandes JA, Christensen JP, Devol AH, Naqvi SA, Paerl HW, et al. The oceanic fixed nitrogen and nitrous oxide budgets: Moving targets as we enter the anthropocene? *Scientia Marina*. 2001;65:85–105.
4. Lam P, Kuypers MM. Microbial nitrogen cycling processes in oxygen minimum zones. *Annual Review of Marine Science*. 2011;3:317–45.
5. Berg IA, Kockelkorn D, Ramos-Vera WH, Say RF, Zarzycki J, Hügler M, et al. Autotrophic carbon fixation in archaea. *Nature Reviews Microbiology*. 2010;8:447–60.
6. Hügler M, Sievert SM. Beyond the Calvin cycle: Autotrophic carbon fixation in the ocean. *Annual Review of Marine Science*. 2011;3:261–89.
7. Swan BK, Martinez-Garcia M, Preston CM, Sczyrba A, Woyke T, Lamy D, et al. Potential for chemolithoautotrophy among ubiquitous bacteria lineages in the dark ocean. *Science*. 2011;333:1296–300.
8. Jannasch HW, Mottl MJ. Geomicrobiology of deep-sea hydrothermal vents. *Science*. 1985;229:717–25.
9. Woebken D, Lam P, Kuypers MMM, Naqvi SWA, Kartal B, Strous M, et al. A microdiversity study of anammox bacteria reveals a novel *Candidatus Scalindua* phylotype in marine oxygen minimum zones. *Environmental Microbiology*. 2008;10:3106–19.
10. Walsh DA, Zaikova E, Howes CG, Song YC, Wright JJ, Tringe SG, et al. Metagenome of a versatile chemolithoautotroph from expanding oceanic dead zones. *Science*. 2009;326:578–82.

11. Konneke M, Schubert DM, Brown PC, Hugler M, Standfest S, Schwander T, et al. Ammonia-oxidizing archaea use the most energy-efficient aerobic pathway for CO₂ fixation. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2014;111:8239–44.
12. Canfield DE, Stewart FJ, Thamdrup B, Brabandere LD, Dalsgaard T, Delong EF, et al. A cryptic sulfur cycle in oxygen-minimum-zone waters off the Chilean Coast. *Science*. 2010;330:1375–8.
13. Strous M, Fuerst JA, Kramer EHM, Logemann S, Muyzer G, Pas-Schoonen KTVD, et al. Missing lithotroph identified as new planctomycete. *Nature*. 1999;400:446–9.
14. Belmar L, Molina V, Ulloa O. Abundance and phylogenetic identity of archaeoplankton in the permanent oxygen minimum zone of the eastern tropical South Pacific. *FEMS Microbiol Ecol*. 2011;78:314–26.
15. Garcia-Robledo E, Padilla CC, Aldunate M, Stewart FJ, Ulloa O, Paulmier A, et al. Cryptic oxygen cycling in anoxic marine zones. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2017;114:8319–24.
16. Füssel J, Lam P, Lavik G, Jensen MM, Holtappels M, Günter M, et al. Nitrite oxidation in the Namibian oxygen minimum zone. *ISME J*. 2011;6:1200–9.
17. Lückner S, Nowka B, Rattei T, Spieck E, Daims H. The Genome of *Nitrospina gracilis* illuminates the metabolism and evolution of the major marine nitrite oxidizer. *Frontiers in Microbiology*. 2013;4:27.
18. Stewart FJ, Ulloa O, Delong EF. Microbial metatranscriptomics in a permanent marine oxygen minimum zone. *Environmental Microbiology*. 2011;14:23–40.
19. Hawley AK, Brewer HM, Norbeck AD, Pa A-Toli L, Hallam SJ. Metaproteomics reveals differential modes of metabolic coupling among ubiquitous oxygen minimum zone microbes. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2014;111:11395–400
20. Zarzycki J, Brecht V, Müller M, Fuchs G. Identifying the missing steps of the autotrophic 3-hydroxypropionate CO₂ fixation cycle in *Chloroflexus aurantiacus*. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2009;106:21317–22.

5.- DISCUSIÓN

5.1. Abundancia relativa de secuencias metagenómicas relacionados a marcadores genéticos de fijación autotrófica del carbono a lo largo de la columna de agua de ZMAs globalmente distribuidas.

El análisis de metagenomas (Figura 1 en capítulo de resultados) mostró que los genes marcadores relacionados con el ciclo CBB, como RuBisCO (EC4.1.1.39), fueron ubicuos a lo largo de toda la columna de agua y dominaron en ambientes óxicos ($> 90 \mu\text{M O}_2$) y aguas subóxicas ($<10 \mu\text{M O}_2$). En contraste, la abundancia relativa de secuencias asociadas con la vía rCoA se restringió a aguas anóxicas y subóxicas, siendo notablemente más abundante en las primeras. Con al menos dos órdenes de magnitud menos abundantes, las secuencias relacionadas con los genes marcadores del ciclo rTCA también se restringieron a aguas subóxicas y anóxicas mientras que aquellas relacionadas al ciclo del 3HP se encontraron desde aguas óxicas a aguas subóxicas. Las secuencias asociadas putativamente al ciclo del 3HP/4HB fueron prominentes en aguas disóxicas ($10\text{-}90 \mu\text{M O}_2$), dominando en la oxiclina inferior. No se encontraron secuencias que pudieran asignarse de manera inequívoca al ciclo DC/4HB.

La partición de las secuencias asociadas a los marcadores genéticos de las rutas metabólicas de fijación autotrófica del carbono de acuerdo con las concentraciones de oxígeno medidas en cada uno de los metagenomas es consistente con previas descripciones (Berg *et al.*, 2010, Hügler y Siervert, 2011 y Tabla 1 en anexos), con lo reportado en otras zonas de estudio deficientes en oxígeno (Hawley *et al.*, 2014) y con la hipótesis de este trabajo.

5.1.1. Análisis estadísticos sobre la abundancia relativa de secuencias alineadas a todos los marcadores genéticos de fijación autotrófica del carbono en metagenomas.

El análisis de SIMPER (sección 8.1.1 en anexos) mostró que las secuencias alineadas a los marcadores genéticos de fijación autotrófica del carbono que aportan en mayor porcentaje a la disimilitud de los grupos (óxico, disóxico, subóxico y anóxico) fueron aquellas de las rutas CBB (EC4.1.1.39), 3HP/4HB (EC4.2.1.120) y rCoA (EC2.3.1.169). Los resultados de la prueba estadística ANOSIM (sección 8.1.2. del capítulo de anexos).

Mostraron que las diferencias entre los grupos fueron significativas en la mayoría de los pares de comparaciones.

5.2. Afiliación taxonómica de secuencias alineadas a marcadores genéticos de fijación autotrófica del carbono a lo largo de la columna de agua de ZMAs globalmente distribuidas.

La afiliación taxonómica de las secuencias estudiadas se presenta en la Figura 1 del capítulo de resultados. Las secuencias alineadas a marcadores genéticos del ciclo de CBB fueron afiliadas a cianobacterias (principalmente del género *Prochlorococcus*) y a protistas fotosintéticos (del orden *Mamielales*) en aguas óxicas e iluminadas, mientras que a gamma-proteobacterias oxidantes del azufre (GOS) a lo largo de todo el gradiente de oxígeno. La ocurrencia de cianobacterias fotoautotróficas en la capa fótica ha sido identificada hace años (Li *et al.*, 1983) y la importancia de las GOS en ambientes marinos deficientes en oxígeno es bien reconocida (Walsh *et al.*, 2009), donde combinan el ciclo de nitrógeno y del azufre al oxidar los compuestos reducidos de azufre con nitrato (Canfield *et al.*, 2010; Walsh *et al.*, 2009). Las secuencias alineadas con genes marcadores de la vía rCoA fueron afiliadas principalmente a Planctomycetes del género *Candidatus Scalindua*, que se sabe llevan a cabo el proceso de anammox en ZMAs (Woebken *et al.*, 2008) y ya han sido previamente descritas como autotróficas (Strous *et al.*, 1999). Como ya fue mencionado antes, ciclo del 3HP/4HB fue relacionado al phylum *Thaumarchaeota*, del Grupo Marino I (Marine Group I en inglés), que incluye *Nitrosopumilus sp.*, y un genoma de célula única (SCGC AAA799-D07), entre otros. Representantes de este phylum ya se han descrito como abundantes en las oxiclinas de ZMAs (Belmar *et al.*, 2011; Stewart *et al.*, 2012) y últimamente se ha informado que llevan a cabo la oxidación aeróbica del amonio acoplada a la fijación autotrófica del carbono usando la variante más eficiente del ciclo 3HP/4HB conocida hasta la fecha (Könneke *et al.*, 2014). Las secuencias relacionadas con el ciclo rTCA se afiliaron con *Nitrospina gracilis*, un conocido oxidante aeróbico de nitrito. La presencia de secuencias de *N. gracilis* en aguas anóxicas podría explicarse por la existencia de un ciclo críptico de oxígeno recientemente descubierto (García-Robledo *et al.*, 2017) o por una oxidación anaeróbica de nitrito aún por demostrar (Füssel *et al.*, 2012). Por otro lado, el análisis de su genoma respalda la idea de un metabolismo versátil que tenga adaptaciones para crecer en condiciones deficientes de

oxígeno, como la ausencia de genes relacionados con la protección de especies reactivas del oxígeno o la misma presencia de genes relacionados con el ciclo rTCA (Lücker *et al.*, 2013) que posee enzimas sensibles al oxígeno (Berg *et al.*, 2010; Hügler & Siervert, 2011 y Tabla 1). Resultados inesperados incluyen la presencia de secuencias asociadas con los phyla de *Proteobacteria* y *Actinobacteria* relacionadas con marcadores genéticos del ciclo 3HP. Este ciclo solo se ha descrito en la bacteria verde no del azufre *Chloroflexus aurantiacus* y se ha sugerido para otros miembros de *Chloroflexaceae* (Zarzycki *et al.*, 2009). Este resultado podría significar que el ciclo del 3HP está más diversificado de lo que se cree actualmente, que estos genes están relacionados a rutas metabólicas aún no descubiertas o que las bases de datos están empobrecidas en secuencias de *Chloroflexaceae*, se habla más sobre las limitaciones de este trabajo en la sección 5.5. del presente capítulo. Otro hallazgo inesperado incluye la presencia de secuencias asociadas con genes marcadores del ciclo 3HP/4HB y del ciclo 3HP relacionadas putativamente con las sepas gamma-proteobacteria HTCC2080 y gamma-proteobacteria HIMB55 en más de un gen marcador en aguas óxicas e iluminadas, lo que sugiere que existe una ruta de fijación autotrófica del carbono aún no descubierta que posee enzimas convergentes a las rutas del 3HP/4HB y 3HP que podría estar operando en bacterias que habitan en aguas de la capa fótica de ZMAs. En consistencia con estos resultados, esta observación ya ha sido hecha para la cepa HTCC2080 (Zarzycki *et al.*, 2009) y autotrofia también se ha sugerido para la cepa HIMB55, ambos de los géneros OM60/NOR5 de la clase *Gamma*-proteobacteria. Además, se han encontrado algunos genes relacionados con fototrofia en secuencias del genoma de ambas cepas (Thrash *et al.*, 2010, Huggett & Rappé, 2012).

5.3. Secuencias de metatranscriptomas asociadas a marcadores genéticos de la fijación autotrófica del carbono y su afiliación taxonómica

De acuerdo con el análisis metagenómico, los datos metatranscriptómicos (Figura 5.3.1) respaldan la ubicuidad del ciclo CBB a lo largo de todo el gradiente de oxígeno, asociado con microorganismos fotosintéticos en la capa de óxica e iluminada, y con GOS en el resto de la columna de agua de ZMAs. Además, los transcritos relacionados con las rutas de rCoA y rTCA, vinculados a *Candidatus Scalindua* y *Nitrospina gracilis*, respectivamente, se encontraron exclusivamente en las aguas anóxicas, resaltando el punto en que estas vías de fijación de carbono prosperan cuando el oxígeno está ausente (Berg *et al.*, 2010; Hügler &

Sievert, 2011 y Tabla 1). Los patrones de transcripción de genes de fijación autotrófica del carbono también apoyan la presencia del ciclo 3HP/4HB afiliado a *Thaumarchaeota* en las oxiclina. El patrón descrito en este trabajo para la fijación de carbono es, por lo tanto, consistente con el observado cuando se consideran los procesos metabólicos de nitrógeno y azufre (Stewart *et al.*, 2012, Hawley *et al.*, 2014).

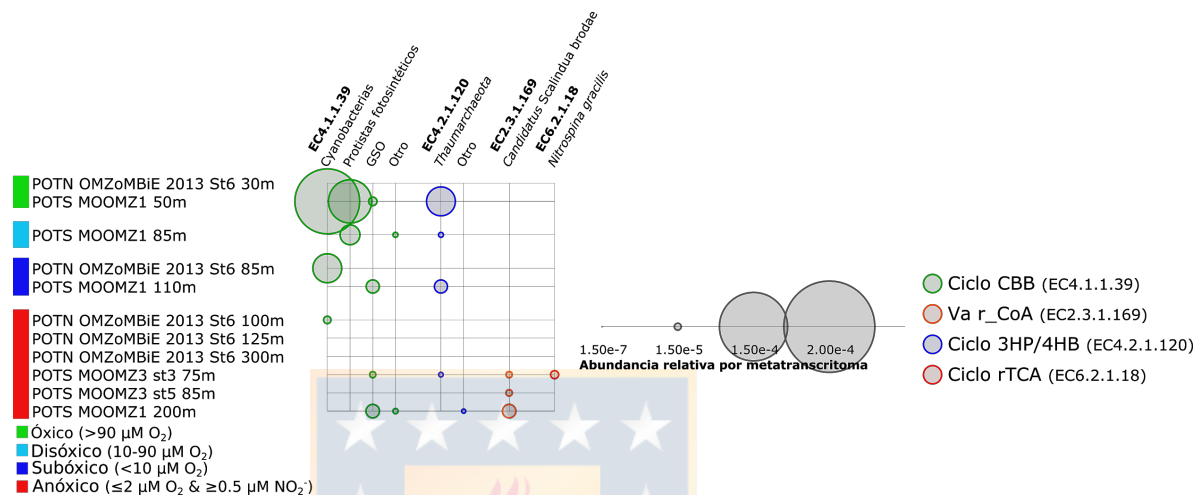


Figura 5.3.1: Abundancia relativa de genes marcadores de fijación autotrófica de carbono, en metatranscriptomas de ZMAs, y su asociación taxonómica putativa (Supplementary Figure 3 de capítulo de resultados). Los metatranscriptomas se tomaron de muestras del océano Pacífico Oriental Tropical Norte y Sur (POTN y POTS respectivamente) y se separaron por sus concentraciones de oxígeno, como se describe en la figura. Los tamaños de los círculos de colores son proporcionales a las abundancias relativas de secuencias por metatranscriptoma (normalizadas por el número total de secuencias para cada metatranscriptoma), alineadas a enzimas marcadoras de fijación autotrófica de carbono y su taxonomía asignada. Las secuencias relacionadas con los genes marcadores, con menos de 0.0006% de abundancia relativa, no se consideraron en el gráfico.

5.4. Modelo de fijación autotrófica del carbono a lo largo de la columna de agua y acoplamiento de ciclos biogeoquímicos

Este estudio proporciona información sobre el análisis de metagenomas y metatranscriptomas, que muestran una partición explícita las secuencias alineadas a los genes marcadores de las vías de fijación autotrófica del carbono en las ZMAs a lo largo del gradiente de oxígeno. En base a esta partición, proponemos que en ZMAs (Figura 2 del capítulo de resultados), la fijación autotrófica del carbono se realiza en aguas óxicas-eufóticas por cianobacterias y protistas fotosintéticos, y por GOS a lo largo de todo el gradiente de oxígeno bajo ella, utilizando el ciclo CBB. En las oxiclina, los miembros del phylum *Thaumarchaeota* también realizan esta función, pero con el uso del ciclo 3HP/4HB. En la

interfaz subóxico-anóxica, parientes de *Nitrospina gracilis* fijan el carbono utilizando el ciclo rTCA, mientras que en el núcleo anóxico bacterias anammox *Candidatus Scalindua* spp., lo hacen usando la vía rCoA. Estos taxones también han sido previamente relacionados a procesos claves del ciclo del nitrógeno y del azufre en ZMAs, lo que refleja que las concentraciones de oxígeno no sólo estructuran las vías metabólicas de nitrógeno y azufre sino también la fijación autotrófica del carbono, un componente crucial del ciclo del carbono. La partición propuesta, tanto de taxones como de las rutas metabólicas utilizadas para llevar a cabo la fijación autótrofa del carbono es consistente con las hipótesis del trabajo expuestas en el capítulo 2 del mismo y con los análisis estadísticos realizados en la sección 5.1.2. del presente capítulo.

5.5. Limitaciones de la aproximación utilizada

Primero, este trabajo está basado en el alineamiento de secuencias contra bases de datos de referencia: aquellas bases de datos que contienen información sobre proteínas tienen gran cantidad de proteínas hipotéticas, cuyas funciones no se saben y otras proteínas cuyas funciones han sido supuestas, pero no comprobadas experimentalmente. Además, las bases de datos que contienen información sobre taxonomía están sesgadas principalmente a tres phyla bacterianos (Proteobacteria, Firmicutes y Actinobacteria) de al menos 50 phyla descritos hasta la fecha, lo que significa que la alineación precisa de las secuencias metagenómicas se ve comprometida si estos genes provienen de organismos que no pertenecen a estos tres phyla más representados. Aunque se han hecho esfuerzos por mejorar estos problemas, aún hay sesgos, y esto se debe principalmente a que la mayoría de los linajes microbianos aun carecen de representantes cultivados (Kunin *et al.*, 2008). Segundo, el pequeño tamaño de las secuencias utilizadas para este trabajo podría inducir a errores, tanto de asignación funcional como taxonómica. Respecto a la asignación taxonómica, hay aún más incerteza ya que podría ser una secuencia insertada en un organismo por transferencia horizontal de genes, causando que el organismo recipiente sea confundido por el organismo dador (Kunin *et al.*, 2008). Tercero, hay un gran desconocimiento sobre rutas metabólicas microbianas, particularmente, ciclos 3HP/4HB y DC/4HB de fijación autotrófica del carbono fueron descubiertos hace sólo un par de años (Berg *et al.*, 2010; Hügler & Siervert, 2011) por lo que probablemente aún hay rutas metabólicas de fijación autotrófica del carbono que se desconocen, pudiendo haber más genes marcadores que no fueron abarcados en este estudio

o bien, rutas que utilizan los mismos genes marcadores, causando conclusiones equivocadas en este estudio. Además, sobre la bioquímica de las rutas ya descubiertas, se sabe muy poco, debido nuevamente a la dificultad de cultivar a los microorganismos. Por ejemplo, respecto al rTCA, se ha descrito recientemente una variante de este ciclo que no utiliza enzimas exclusivas o marcadoras, si no, que utiliza todas las enzimas del ciclo de Krebs catalizando reacciones reversibles (Mall *et al.*, 2018). Este nuevo descubrimiento expone una dificultad para la interpretación de los resultados de este ciclo utilizando la presente aproximación, porque esta variante del ciclo rTCA estaría fijando carbono de manera autotrófica utilizando sólo enzimas promiscuas, es decir, que participan en rutas metabólicas que no son exclusivas de la fijación autotrófica del carbono. Además, inferencias a partir de la abundancia relativa de los genes son inciertas debido a que se desconoce cinética de las enzimas que están participando en las rutas metabólicas. En resumen, las limitaciones son varias y probablemente en unos años más las bases de datos estarán más enriquecidas y este mismo análisis será más preciso. Sin embargo, esta aproximación provee información exploratoria importante sobre la partición de diferentes rutas metabólicas de fijación autotrófica del carbono en función de la concentración de oxígeno presente en el sistema, es consistente con bibliografía, así como con las hipótesis de trabajo y es un buen punto de partida para las proyecciones planteadas a continuación.

5.6. Proyecciones

Hacer este mismo trabajo con metagenomas y metatranscriptomas que tengan mayor cantidad de secuencias más largas podría dar información más precisa y exacta sobre lo sugerido por este estudio.

Este trabajo se basa en el paradigma de la biología molecular de que los genes contenidos en el ADN se transcriben a ARN_m y este se traduce a proteínas. En base a esto, los metagenomas (ADN) dan información sobre el potencial genético, los metatranscriptomas (ARN_m) sobre la transcripción de los genes y en este marco, sería un buen complemento agregar metaproteomas, que darían información sobre la traducción de los genes,

completando el análisis basado en secuencias, dando robustez a la conclusión sobre la función que se está llevando a cabo en el ecosistema.

Mediciones de tasas de fijación de carbono a lo largo del gradiente de oxígeno son necesarias para complementar y comprender mejor el ciclo del carbono, su acoplamiento con el ciclo del nitrógeno y del azufre y el rol estructurador del oxígeno sobre ellos en ZMAs.

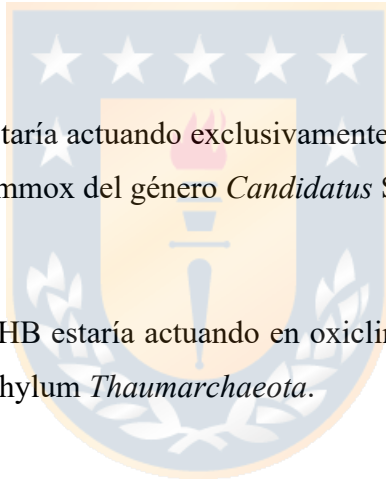
Aislar y cultivar a los microorganismos responsables de estos procesos metabólicos claves y estudiar sus genomas completos (e.g. a través del estudio de genómica de célula única) sería de gran aporte para comprender el acoplamiento de los ciclos biogeoquímicos, comprender mejor las bases bioquímicas de cada una de las rutas (e.g. eficiencia de las enzimas involucradas) así como para medir tasas y mejorar los modelos predictivos de las consecuencias de la expansión de las ZMAs por el cambio climático.



6- CONCLUSIONES

En base a los resultados de esta tesis, se puede concluir que en las ZMAs:

- Existe una clara partición de la abundancia relativa de secuencias relacionadas con marcadores genéticos de las distintas rutas metabólicas de la fijación autotrófica del carbono en función de la concentración de oxígeno, tanto en potencial genético (ADN) y transcripción de genes (ARN_m).
- El ciclo CBB sería el más ubicuo a lo largo de todo el gradiente de oxígeno, pero estaría siendo utilizado principalmente por cianobacterias en la capa fótica y por *gamma*-proteobacterias que oxidan compuestos reducidos de azufre bajo la misma.
- La vía rCoA estaría actuando exclusivamente en ambientes anóxicos, afiliada a bacterias anammox del género *Candidatus Scalindua*.
- El ciclo 3HP/4HB estaría actuando en oxiclina, afiliado a archaeas amonio-oxidantes del phylum *Thaumarchaeota*.
- Las concentraciones de oxígeno en el océano no sólo estructuran las vías metabólicas del nitrógeno y del azufre, sino que también de la fijación autotrófica del carbono, un componente crucial del ciclo del carbono.



FINANCIAMIENTO:

- Instituto Milenio de Oceanografía IC 120019.
- Proyecto Fondecyt Regular 1161483 (Dr. Osvaldo Ulloa).



7- REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Belmar, L., V. Molina, and O. Ulloa. 2011. Abundance and phylogenetic identity of archaeoplankton in the permanent oxygen minimum zone of the eastern tropical South Pacific. *FEMS Microbiol. Ecol.* 78: 314–326. doi:10.1111/j.1574-6941.2011.01159.x
- Berg, I. A., D. Kockelkorn, W. H. Ramos-Vera, R. F. Say, J. Zarzycki, M. Hügler, B. E. Alber, and G. Fuchs. 2010. Autotrophic carbon fixation in archaea. *Nat. Rev. Microbiol.* 8: 447–60. doi:10.1038/nrmicro2365
- Canfield, D. E., F. J. Stewart, B. Thamdrup, L. De Brabandere, T. Dalsgaard, E. F. Delong, N. P. Revsbech, and O. Ulloa. 2010. A cryptic sulfur cycle in oxygen-minimum-zone waters off the Chilean coast. *Science* (80-.). 330: 1375–1378. doi:10.1126/science.1196889
- Caspi, R., R. Billington, C. A. Fulcher, and others. 2018. The MetaCyc database of metabolic pathways and enzymes. *Nucleic Acids Res.* 46: D633–D639. doi:10.1093/nar/gkx935
- Füssel, J., P. Lam, G. Lavik, M. M. Jensen, M. Holtappels, M. Günter, and M. M. M. Kuypers. 2012. Nitrite oxidation in the Namibian oxygen minimum zone. *ISME J.* 6: 1200–1209. doi:10.1038/ismej.2011.178
- Garcia-Robledo, E., C. C. Padilla, M. Aldunate, F. J. Stewart, O. Ulloa, A. Paulmier, G. Gregori, and N. P. Revsbech. 2017. Cryptic oxygen cycling in anoxic marine zones. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 201619844. doi:10.1073/pnas.1619844114
- Ghai, R., C. M. Mizuno, A. Picazo, A. Camacho, and F. Rodriguez-Valera. 2013. Metagenomics uncovers a new group of low GC and ultra-small marine Actinobacteria. *Sci. Rep.* 3: 1–8. doi:10.1038/srep02471
- Hawley, a. K., H. M. Brewer, a. D. Norbeck, L. Pa a-Toli, and S. J. Hallam. 2014. Metaproteomics reveals differential modes of metabolic coupling among ubiquitous oxygen minimum zone microbes. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 111: 11395–11400. doi:10.1073/pnas.1322132111
- Huggett, M. J., and M. S. Rappé. 2012. Genome sequence of strain HIMB55, a novel marine gammaproteobacterium of the OM60/NOR5 clade. *J. Bacteriol.* 194: 2393–2394. doi:10.1128/JB.00171-12
- Hügler, M., and S. M. Sievert. 2011. Beyond the Calvin cycle: autotrophic carbon fixation in the ocean. *Ann. Rev. Mar. Sci.* 3: 261–289. doi:10.1146/annurev-marine-120709-142712
- Jannasch, H. W., and M. J. Mottl. 1985. Geomicrobiology of Deep-Sea Hydrothermal Vents. *Science* 229: 717–725. doi:10.1126/science.229.4715.717
- Kanehisa, M., Y. Sato, M. Kawashima, M. Furumichi, and M. Tanabe. 2016. KEGG as a reference resource for gene and protein annotation. *Nucleic Acids Res.* 44: D457–D462. doi:10.1093/nar/gkv1070

- Konneke, M., D. M. Schubert, P. C. Brown, and others. 2014. Ammonia-oxidizing archaea use the most energy-efficient aerobic pathway for CO₂ fixation. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 111: 8239–8244. doi:10.1073/pnas.1402028111
- Kunin, V., A. Copeland, A. Lapidus, K. Mavromatis, and P. Hugenholtz. 2008. A Bioinformatician's Guide to Metagenomics. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 72: 557–578. doi:10.1128/MMBR.00009-08
- Lam, P., and M. M. M. Kuypers. 2011. Microbial Nitrogen Cycling Processes in Oxygen Minimum Zones. *Ann. Rev. Mar. Sci.* 3: 317–345. doi:10.1146/annurev-marine-120709-142814
- Li, W. K. W., D. V. S. Rao, W. G. Harrison, J. C. Smith, J. J. Cullen, B. Irwin, and T. Platt. 1983. Autotrophic Picoplankton in the Tropical Ocean. *Science* 219: 292–295. doi:10.1126/science.219.4582.292
- Lücker, S., B. Nowka, T. Rattei, E. Spieck, and H. Daims. 2013. The genome of *Nitrospina gracilis* illuminates the metabolism and evolution of the major marine nitrite oxidizer. *Front. Microbiol.* 4: 1–19. doi:10.3389/fmicb.2013.00027
- Mall, A., J. Sobotta, C. Huber, and others. 2018. Reversibility of citrate synthase allows autotrophic growth of a thermophilic bacterium. *Science* (80-.). 359: 563–567. doi:10.1126/science.aao2410
- Martin, W., J. Baross, D. Kelley, and M. J. Russell. 2008. Hydrothermal vents and the origin of life. *Nat Rev Microbiol* 6: 805–814. doi:10.1038/nrmicro1991
- Paulmier, A., and D. Ruiz-Pino. 2009. Oxygen minimum zones (OMZs) in the modern ocean. *Prog. Oceanogr.* 80: 113–128. doi:10.1016/j.pocean.2008.08.001
- Stewart, F. J., T. Dalsgaard, C. R. Young, B. Thamdrup, N. P. Revsbech, O. Ulloa, D. E. Canfield, and E. F. Delong. 2012. Experimental Incubations Elicit Profound Changes in Community Transcription in OMZ Bacterioplankton. 7. doi:10.1371/journal.pone.0037118
- Strous, M., J. A. Fuerst, E. H. M. Kramer, and others. 1999. Missing lithotroph identified as new planctomycete. *Nature* 400: 446–449. doi:10.1038/22749
- Swan, B. K., M. Martinez-Garcia, C. M. Preston, and others. 2011. Potential for chemolithoautotrophy among ubiquitous bacteria lineages in the dark ocean. *Science* 333: 1296–300. doi:10.1126/science.1203690
- Thamdrup, B., T. Dalsgaard, and N. P. Revsbech. 2012. Widespread functional anoxia in the oxygen minimum zone of the Eastern South Pacific. *Deep Sea Research I* 65: 36–45. doi:10.1016/j.dsr.2012.03.001.

Thrash, J. C., J. C. Cho, S. Ferriera, J. Johnson, K. L. Vergin, and S. J. Giovannoni. 2010. Genome sequences of strains HTCC2148 and HTCC2080, belonging to the OM60/NOR5 clade of the Gammaproteobacteria. *J. Bacteriol.* 192: 3842–3843. doi:10.1128/JB.00511-10

Ulloa, O., D. E. Canfield, E. F. DeLong, R. M. Letelier, and F. J. Stewart. 2012. Microbial oceanography of anoxic oxygen minimum zones. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 109: 15996–6003. doi:10.1073/pnas.1205009109

Walsh, D. A., E. Zaikova, C. G. Howes, Y. C. Song, J. J. Wright, S. G. Tringe, P. D. Tortell, and S. J. Hallam. 2009. Metagenome of a versatile chemolithoautotroph from expanding oceanic dead zones. *Science* 326: 578–582. doi:10.1126/science.1175309

Woeckel, D., P. Lam, M. M. M. Kuypers, and others. 2008. A microdiversity study of anammox bacteria reveals a novel *Candidatus* Scalindua phylotype in marine oxygen minimum zones. *Environ. Microbiol.* 10: 3106–3119. doi:10.1111/j.1462-2920.2008.01640.x

Zarzycki, J., V. Brecht, M. Müller, and G. Fuchs. 2009. Identifying the missing steps of the autotrophic 3-hydroxypropionate CO₂ fixation cycle in *Chloroflexus aurantiacus*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 106: 21317–22. doi:10.1073/pnas.0908356106



8- ANEXOS

Tabla 8.1.

Metagenomas						
Nombre	Latitud	Longitud	O ₂ (μM)	NO ₂ (μM)	Database	Número de acceso
Mg_Arabian_Sea_OMZ_600m	21° 55' 36" N	63° 10' 36" E	<u>0</u>	<u>0,45</u>	SRA	SRX13379 39
Mg_Arabian_Sea_OMZ_170m	21° 55' 36" N	63° 10' 36" E	<u>10</u>	<u>0,61</u>	SRA	SRX13379 36
Mg_ETSP_BiG_RAPA_St1_1000m_pf	20° 4' 58.8" S	70° 48' 0" W	61		SRA	SRX34275 6
Mg_ETSP_BiG_RAPA_St1_1000m_sv	20° 4' 58.8" S	70° 48' 0" W	61		SRA	SRX34275 5
Mg_ETSP_BiG_RAPA_St1_110m_pf	20° 4' 58.8" S	70° 48' 0" W	3,1		SRA	SRX34275 2
Mg_ETSP_BiG_RAPA_St1_110m_sv	20° 4' 58.8" S	70° 48' 0" W	3,1		SRA	SRX34274 9
Mg_ETSP_BiG_RAPA_St1_200m_pf	20° 4' 58.8" S	70° 48' 0" W	1,5		SRA	SRX34275 4
Mg_ETSP_BiG_RAPA_St1_200m_sv	20° 4' 58.8" S	70° 48' 0" W	1,5		SRA	SRX34275 3

Mg_ETSP_BiG_RAPA_St1_70m_pf	20° 4' 58.8'' S	70° 48' 0'' W	5,7		SRA	SRX34274 7
Mg_ETSP_BiG_RAPA_St1_70m_sv	20° 4' 58.8'' S	70° 48' 0'' W	5,7		SRA	SRX34230 2
Mg_ETSP_MOOMZ1_15m	20° 07' S	70° 23' W	<u>165</u>	<u>1,5</u>	SRA	SRR30468 4
Mg_ETSP_MOOMZ1_50m	20° 07' S	70° 23' W	<u>100</u>	<u>0</u>	SRA	SRX02590 6
Mg_ETSP_MOOMZ1_65m	20° 07' S	70° 23' W	<u>40</u>	<u>0</u>	SRA	SRX08093 8
Mg_ETSP_MOOMZ1_85m	20° 07' S	70° 23' W	<u>10</u>	<u>2</u>	SRA	SRX02590 8
Mg_ETSP_MOOMZ1_110m	20° 07' S	70° 23' W	<u>3</u>	<u>4</u>	SRA	SRX02591 0
Mg_ETSP_MOOMZ1_200m	20° 07' S	70° 23' W	<u>0</u>	<u>6</u>	SRA	SRX02591 2
Mg_ETSP_MOOMZ1_500m	20° 07' S	70° 23' W	<u>3</u>	<u>0</u>	SRA	SRX08095 0
Mg_ETSP_MOOMZ1_800m	20° 07' S	70° 23' W	<u>50</u>		SRA	SRX08095 1
Mg_ETSP_MOOMZ2_110m	20° 07' S	70° 23' W	<u>0</u>		SRA	SRX08095 5
Mg_ETSP_MOOMZ2_200m	20° 07' S	70° 23' W	<u>0</u>		SRA	SRX02917 1

Mg_ETSP_MOOMZ2_35m	20° 07' S	70° 23' W	<u>150</u>		SRA	SRX08095 3
Mg_ETSP_MOOMZ2_50m	20° 07' S	70° 23' W	<u>90</u>		SRA	SRX08095 4
Mg_ETSP_MOOMZ2_70m	20° 07' S	70° 23' W	<u>25</u>		SRA	SRX02917 0
Mg_ETSP_MOOMZ3_110m	20° 07' S	70° 23' W	0	5,24	SRA	SRX08096 0
Mg_ETSP_MOOMZ3_150m	20° 07' S	70° 23' W	0,01	6,35	SRA	SRX02917 3
Mg_ETSP_MOOMZ3_50m	20° 07' S	70° 23' W	16,25	0,04	SRA	SRX08095 6
Mg_ETSP_MOOMZ3_80m	20° 07' S	70° 23' W	0,01	4,37	SRA	SRX02917 2
Mg_ETNP_OMZoMBiE_2013_St10_125m	18° 48' N	104° 42' W	1	4,75	SRA	SRR15097 99
Mg_ETNP_OMZoMBiE_2013_St10_300m	18° 48' N	104° 42' W	2	20.46 *	SRA	SRR15098 00
Mg_ETNP_OMZoMBiE_2013_St10_30m	18° 48' N	104° 42' W	205,1 4	0	SRA	SRR15097 97
Mg_ETNP_OMZoMBiE_2013_St10_80m	18° 48' N	104° 42' W	4	0,11	SRA	SRR15097 98
Mg_ETNP_OMZoMBiE_2013_St6_100m	18° 54' N	104° 54' W	2	4,19	SRA	SRR15097 93
Mg_ETNP_OMZoMBiE_2013_St6_125m	18° 54' N	104° 54' W	1,84	6,06	SRA	SRR15097 94

Mg_ETNP_OMZoMBiE_2013_St6_3 00m	18° 54' N	104° 54' W	2	1,23	SRA	SRR15097 96
Mg_ETNP_OMZoMBiE_2013_St6_3 0m	18° 54' N	104° 54' W	216	0,42	SRA	SRR15097 90
Mg_ETNP_OMZoMBiE_2013_St6_8 5m	18° 54' N	104° 54' W	2	0,07	SRA	SRR15097 92
Mg_ETSP_Galathea_60m			0	1	NCBI SRA	SRX3036 140
Metatranscriptomas						
Nombre	Latitud	Longitud	O ₂ (μM)	NO ₂ (μM)	Database	Número de acceso
Mt_ETNP_OMZoMBiE_2013_St6_1 00m	18° 54' N	104° 54' W	2	4,19	SRA	SRX85408 1
Mt_ETNP_OMZoMBiE_2013_St6_1 25m	18° 54' N	104° 54' W	1,84	6,06	SRA	SRX85408 3
Mt_ETNP_OMZoMBiE_2013_St6_3 00m	18° 54' N	104° 54' W	2	1,23	SRA	SRX85408 4
Mt_ETNP_OMZoMBiE_2013_St6_3 0m	18° 54' N	104° 54' W	216	0,42	SRA	SRX85407 4
Mt_ETNP_OMZoMBiE_2013_St6_8 5m	18° 54' N	104° 54' W	2	0,07	SRA	SRX85407 8

Mt_ETSP_MOOMZ1_110m	20° 07' S	70° 23' W	<u>3</u>	<u>4</u>	SRA	SRX02591 1
Mt_ETSP_MOOMZ1_200m	20° 07' S	70° 23' W	<u>0</u>	<u>6</u>	SRA	SRX02591 3
Mt_ETSP_MOOMZ1_50m	20° 07' S	70° 23' W	<u>100</u>	<u>0</u>	SRA	SRX02590 7
Mt_ETSP_MOOMZ1_85m	20° 07' S	70° 23' W	<u>40</u>	<u>0</u>	SRA	SRX02590 9
Mt_ETSP_MOOMZ3_st3_75m			0	4,54		
Mt_ETSP_MOOMZ3_st5_85m			0	2,84		

Tabla 8.1.: Metadata asociada con los metagenomas y metatranscriptomas de ZMAs distribuidas en el océano Pacífico Oriental Tropical Norte y Sur (ETNP y ETSP, respectivamente) y del Mar arábigo (AS).

8.1. Análisis estadísticos

8.1.1 SIMPER

Similarity Percentages - species contributions

One-Way Analysis

Data worksheet

Name: Data1

Data type: Abundance

Sample selection: All

Variable selection: All

Parameters

Resemblance: S17 Bray Curtis similarity

Cut off for low contributions: 90.00%

Factor Groups

Sample

oxygen levels

Mg_ETSP_MOOMZ1_15m_DNA_454

oxico

Mg_ETSP_MOOMZ1_50m_DNA_454

oxico

Mg_ETSP_MOOMZ2_35m_DNA_454	oxico
Mg_ETSP_MOOMZ2_50m_DNA_454	oxico
Mg_ETNP_OMZoMBiE_2013_St10_30m_DNA_IluMS	oxico
Mg_ETNP_OMZoMBiE_2013_St6_30m_DNA_IluMS	oxico
Mg_Arabian_Sea_OMZ_oxycline_PA2_IT	disoxico
Mg_ETSP_BiG_RAPA_St1_1000m_pf_454	disoxico
Mg_ETSP_BiG_RAPA_St1_1000m_sv_454	disoxico
Mg_ETSP_MOOMZ1_65m_DNA_454	disoxico
Mg_ETSP_MOOMZ1_85m_DNA_454	disoxico
Mg_ETSP_MOOMZ1_800m_DNA_454	disoxico
Mg_ETSP_MOOMZ2_70m_DNA_454	disoxico
Mg_ETSP_MOOMZ3_50m_DNA_454	disoxico
Mg_ETSP_BiG_RAPA_St1_110m_pf_454	suboxico
Mg_ETSP_BiG_RAPA_St1_110m_sv_454	suboxico
Mg_ETSP_BiG_RAPA_St1_200m_pf_454	suboxico
Mg_ETSP_BiG_RAPA_St1_200m_sv_454	suboxico
Mg_ETSP_BiG_RAPA_St1_70m_pf_454	suboxico
Mg_ETSP_BiG_RAPA_St1_70m_sv_454	suboxico
Mg_ETSP_MOOMZ1_110m_DNA_454	suboxico
Mg_ETSP_MOOMZ1_500m_DNA_454	suboxico
Mg_ETSP_MOOMZ2_110m_DNA_454	suboxico
Mg_ETSP_MOOMZ2_200m_DNA_454	suboxico
Mg_ETNP_OMZoMBiE_2013_St10_80m_DNA_IluMS	suboxico
Mg_ETNP_OMZoMBiE_2013_St6_85m_DNA_IluMS	suboxico
Mg_Arabian_Sea_OMZ_core_PA5_IT	anoxico
Mg_ETSP_MOOMZ1_200m_DNA_454	anoxico
Mg_ETSP_MOOMZ3_110m_DNA_454	anoxico
Mg_ETSP_MOOMZ3_150m_DNA_454	anoxico
Mg_ETSP_MOOMZ3_80m_DNA_454	anoxico
Mg_ETNP_OMZoMBiE_2013_St10_125m_DNA_IluMS	anoxico
Mg_ETNP_OMZoMBiE_2013_St10_300m_DNA_IluMS	anoxico
Mg_ETNP_OMZoMBiE_2013_St6_100m_DNA_IluMS	anoxico
Mg_ETNP_OMZoMBiE_2013_St6_125m_DNA_IluMS	anoxico
Mg_ETNP_OMZoMBiE_2013_St6_300m_DNA_IluMS	anoxico
Mg_ETSP_Galathea_60m_DNA_454	anoxico

Group oxico

Average similarity: 73.31

Species	Av.Abund	Av.Sim	Sim/SD	Contrib%
4.1.1.39	0	25	5,16	34,71
4.2.1.120	0	16	2,83	21,28

2.7.1.19	0	9,4	2,51	12,87
1.3.1.84	0	4,9	1,77	6,71
5.4.1.3	0	4,9	3,44	6,7
6.2.1.36	0	4,9	1,81	6,61
4.2.1.153	0	4	2,04	5,44

Group disoxico

Average similarity: 56.52

Species	Av.Abund	Av.Sim	Sim/SD	Contrib%
4.2.1.120	0	22	1,37	38,62
4.1.1.39	0	17	2,28	29,74
2.7.1.19	0	6,8	1,3	11,96
5.4.1.3	0	5,3	3	9,31
4.2.1.153	0	3,8	1,38	6,67

Group suboxico

Average similarity: 56.85

Species	Av.Abund	Av.Sim	Sim/SD	Contrib%
4.1.1.39	0	23	2,02	41,24
2.7.1.19	0	16	3,12	28,63
4.2.1.120	0	6,1	1,26	10,78
2.3.1.169	0	4,2	1,05	7,32
5.4.1.3	0	2,5	0,77	4,43



Group anoxico

Average similarity: 67.18

Species	Av.Abund	Av.Sim	Sim/SD	Contrib%
4.1.1.39	0	21	2,21	30,57
2.3.1.169	0	14	1,37	20,28
2.7.1.19	0	12	2	17,63
4.2.1.120	0	7,2	2,66	10,65
2.1.1.258	0	4	1,28	5,96
4.2.1.153	0	4	2,54	5,92

Groups oxico & disoxico

Average dissimilarity = 42.67

Group
oxico

Group
disoxico

Species	Av.Abund	Av.Abund	Av.Diss	Diss/SD	Contrib%
4.2.1.120	0	0	11	1,38	25,78
4.1.1.39	0	0	10,55	1,04	24,73
2.7.1.19	0	0	4,31	1,19	10,11
6.2.1.36	0	0	4,07	1,94	9,54
1.3.1.84	0	0	3,97	1,79	9,31
1.2.1.75	0	0	2,5	2,24	5,87
4.2.1.153	0	0	2,05	1,12	4,81

Groups oxico & suboxico
Average dissimilarity = 46.32

Species	Group oxico	Group suboxico	Av.Diss	Diss/SD	Contrib%
	Av.Abund	Av.Abund			
4.1.1.39	0	0	11,67	1,25	25,19
4.2.1.120	0	0	8	1,41	17,26
2.7.1.19	0	0	4,5	1,01	9,72
6.2.1.36	0	0	4,28	2,06	9,23
1.3.1.84	0	0	4,24	1,97	9,16
2.3.1.169	0	0	3,45	1,23	7,45
1.2.1.75	0	0	2,89	3,16	6,23
5.4.1.3	0	0	2,8	1,45	6,05



Groups disoxico & suboxico
Average dissimilarity = 50.03

Species	Group disoxico	Group suboxico	Av.Diss	Diss/SD	Contrib%
	Av.Abund	Av.Abund			
4.2.1.120	0	0	17	1,52	33,99
4.1.1.39	0	0	11,81	1,24	23,6
2.7.1.19	0	0	7,42	1,06	14,84
2.3.1.169	0	0	3,91	1,11	7,81
5.4.1.3	0	0	3,27	1,39	6,54
4.2.1.153	0	0	2,68	1,32	5,35

Groups oxico & anoxico
Average dissimilarity = 48.00

Species	Group oxico	Group anoxico	Av.Diss	Diss/SD	Contrib%
	Av.Abund	Av.Abund			
2.3.1.169	0	0	11,27	1,55	23,47
4.1.1.39	0	0	9,34	1,33	19,47
4.2.1.120	0	0	5,25	1,56	10,94
2.7.1.19	0	0	4,7	1,3	9,8
6.2.1.36	0	0	3,63	2,2	7,56
1.3.1.84	0	0	3,52	2,08	7,33
2.1.1.258	0	0	3,33	1,53	6,94
1.2.1.75	0	0	2,45	3,77	5,11

Groups disoxico & anoxico
Average dissimilarity = 52.57

Species	Group disoxico	Group anoxico	Av.Diss	Diss/SD	Contrib%
	Av.Abund	Av.Abund			
4.2.1.120	0	0	13,79	1,75	26,23
2.3.1.169	0	0	12,58	1,43	23,94
4.1.1.39	0	0	9,75	1,17	18,55
2.7.1.19	0	0	6,64	1,19	12,64
2.1.1.258	0	0	3,64	1,38	6,92
5.4.1.3	0	0	2,1	1,26	3,99

Groups suboxico & anoxico
Average dissimilarity = 42.13

Species	Group suboxico	Group anoxico	Av.Diss	Diss/SD	Contrib%
	Av.Abund	Av.Abund			
4.1.1.39	0	0	11,01	1,29	26,13
2.3.1.169	0	0	10,58	1,26	25,11
2.7.1.19	0	0	6,29	1,26	14,93
4.2.1.120	0	0	4,89	1,23	11,6
2.1.1.258	0	0	3,19	1,29	7,58
5.4.1.3	0	0	2,64	1,23	6,27

8.1.2. ANOSIM Global Test

Sample statistic (Global R): 0.279

Significance level of sample statistic: 0.1%

Number of permutations: 999 (Random sample from a large number)

Number of permuted statistics greater than or equal to Global R: 0

Pairwise Tests

Groups	R	Significance	Possible	Actual	Number >=
	Statistic	Level %	Permutations	Permutations	Observed
oxico, disoxico	0,25	2,1	3003	999	20
oxico, suboxico	0,2	6,1	18564	999	60
oxico, anoxico	0,64	0,1	12376	999	0
disoxico, suboxico	0,2	3,6	125970	999	35
disoxico, anoxico	0,51	0,1	75582	999	0
suboxico, anoxico	0,12	3,4	1E+06	999	33

