



Universidad de Concepción
Dirección de Postgrado
Facultad de Ciencias Naturales y Oceanográficas -Programa de Magíster en
Ciencias con mención en Oceanografía

Caracterización taxonómica de las bacterias y arqueas planctónicas de la Fosa de Atacama



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

FRANCISCA IGNACIA OLIVARES MENDOZA
CONCEPCIÓN-CHILE
2022

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

Universidad de Concepción
Dirección de Postgrado

La Tesis de “*Magíster en Ciencias con mención en Oceanografía*” titulada “*CARACTERIZACIÓN TAXONÓMICA DE LAS BACTERIAS Y ARQUEAS PLANCTÓNICAS DE LA FOSA DE ATACAMA*”, de la Srta. “*FRANCISCA IGNACIA OLIVARES MENDOZA*” 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

Dra. Camila Fernández
Miembro Comité de Tesis
Universidad de Concepción

Dr. Marcelo Gutiérrez
Miembro Comité de Tesis
Universidad de Concepción



Dr. Rodrigo de la Iglesia
Evaluador Externo
Pontificia Universidad Católica

Dr. Diego Narváez
Director
Programa de Magíster en Oceanografía
Universidad de Concepción



“Whatever happens, happens”
- Spike Spiegel

AGRADECIMIENTOS

Quiero agradecer sinceramente a todas las personas que han confiado en mí, que me han apoyado y que, de una u otra forma, han contribuido a la realización de esta tesis, pero por sobre todo, a concluir una etapa.

En primer lugar quiero agradecer a mi familia por su apoyo incondicional y sus incesantes palabras de aliento. Doy las gracias a mi mamá, Ximena Mendoza, por su inagotable amor y gentileza. A mi papá, Jorge Olivares, por siempre confiar en mí y en mis decisiones y enseñarme a no tener miedo de decir lo que pienso. A mi hermana, Constanza Olivares, quien a pesar de ser la persona que más duramente me critica, al final del día siempre me demuestra lo orgullosa que se siente de mí. A mi cuñado, Samuel Bouman, por ser el hermano que no sabía que me hacía falta en mi vida y siempre brindarme su ayuda. A mi sobrino, Thomas Bouman a.k.a. Tomito, porque un abrazo suyo lo arregla todo. También quiero agradecer a quienes me acompañan en mis recuerdos: a mi abuelita, Olga de las Mercedes Vega, y a mi tata, Jorge Olivares, por enseñarme a recorrer la vida con rectitud y fidelidad a mis valores, pero siempre con generosidad. Sin ustedes, mi familia, jamás lo habría logrado. Muchas gracias.

Quiero agradecer a mis amigas y amigos, quienes me han ayudado con las dificultades técnicas de esta tesis, pero, por sobre todo, por brindarme su inmeso apoyo emocional y siempre ofrecerme un tecito, porque todo es mejor con un tecito. Gracias a Constanza Medina, Xaviera Del Río, Carlota Bravo, Estrella Bello, Lenna Ortiz, Sonia Yáñez, Constanza Larson, Julio Poblete y Luciano Radrigán. Gracias por confiar en mí cuando yo dejé de hacerlo. Los quiero infinito.

Quiero agradecer al tremendo equipo de mujeres que es FemenIMO. Gracias por su apoyo, contención y acción. Doy gracias a cada una de sus integrantes por su valentía de alzar la voz y aportar a la lucha, para que nunca más las mujeres en ciencias tengamos que desenvolvemos en ambientes inseguros, dañinos y violentos. Quiero agradecer, en particular, a la Dra. Pamela Hidalgo por su apoyo, confianza y cariño, y a la Dra. Carmen Morales por su fortaleza y sus palabras de aliento. Valoro mucho todo lo que han hecho por mí.

Quiero agradecer al Grupo de Guías y Scouts Helen Keller por permitirme ser parte de esta familia que realiza una hermosa labor en la comuna de Hualpén. Agradezco a cada uno de los dirigentes y guadoras por transmitirme su buena onda e inculcarme la dedicación al servicio. También agradezco a las y los jóvenes caminantes que han conformado el Clan Suyai.

“Suyai” significa “esperanza” en mapudungún, y las y los caminantes del Clan Suyai siempre me han enseñado a mantener la esperanza. Ustedes son la esperanza de hoy y mañana. Muchas gracias por sus enseñanzas.

Quiero agradecer al equipo docente que ha aceptado conformar la comisión evaluadora de esta tesis. Doy las gracias a mi profesor guía, el Dr. Osvaldo Ulloa, por brindarme la oportunidad de realizar esta investigación y de poder perfeccionarme en el área de la oceanografía microbiana. Agradezco a la Dra. Camila Fernández, al Dr. Marcelo Gutiérrez y al Dr. Rodrigo de la Iglesia por su apoyo, sus comentarios, sugerencias y por su visión crítica, pero siempre constructiva de mi trabajo.

Quiero agradecer al director del Programa de Magíster en Ciencias con mención en Oceanografía de la Universidad de Concepción, el Dr. Diego Narváez, por sus eficientes gestiones, por sus consejos para sacar adelante esta tesis y por su constante apoyo. Valoro mucho la ayuda que me ha brindado.

Agradezco a la Agencia Nacional de Investigación y Desarrollo de Chile y al Instituto Milenio de Oceanografía por financiar parte de mis estudios de magíster.

Finalmente, me agradezco a mí misma por no darme por vencida y por encontrar la motivación que hacía falta para 捧げよ！捧げよ！心臓を捧げよ！ porque 全ての犠牲は今、この瞬間のために。



CURRICULUM VITAE

Francisca Ignacia Olivares Mendoza

Nacida el 13 de julio, 1991, en Concepción, Chile

2018-2020: Magíster en Ciencias con mención en Oceanografía, Universidad de Concepción, Chile.

2012-2017: Bióloga marina, Universidad de Concepción, Chile

2012–2016: Licenciatura en Biología Marina, Universidad de Concepción, Chile.

PUBLICACIONES

Aguayo, P., Campos, V. L., Henríquez, C., Olivares, F., De la Iglesia, R., Ulloa, O., Vargas, C. A. 2020. The influence of pCO₂-driven ocean acidification on open ocean bacterial communities during a short-term microcosm experiment in the eastern tropical South Pacific (ETSP) off northern Chile. *Microorganisms*. 8:1924.

Olivares, F., Poulain, J., Wincker, P., Arnaud-Haond⁶, S., Ulloa, O. Distinct planktonic bacteria and archaea thrive in the Atacama Trench. 2022. Enviado a: *The ISME Journal*.

ÁREAS DE INVESTIGACIÓN

Principal: Oceanografía microbiana

Secundaria: Ecología microbiana

Otras: Océano profundo

EXPERIENCIA DOCENTE

- 2021: Instructora en Curso BIOMACC - Fortalecimiento de las capacidades técnico-científicas de nuevos métodos para el estudio de la biodiversidad marina en Colombia y Chile. Universidad de Concepción, Chile.

- 2017: Ayudante de Microbiología Marina, Universidad de Concepción, Chile.
- 2016: Ayudante de Sistemas Pelágicos, Universidad de Concepción, Chile.
- 2016: Ayudante de Fundamentos y Metodología de la Ciencia, Universidad de Concepción, Chile.
- 2015: Ayudante de Fundamentos de la Investigación Científica, Universidad de Concepción, Chile.
- 2015: Ayudante de Introducción a la Biodiversidad Marina, Universidad de Concepción, Chile.
- 2014: Ayudante de Zoología General II, Universidad de Concepción, Chile.

CURSOS

- 2021: Curso online: Metagenómica. Centro bioinformático de investigación BioScience-App.
- 2020: Capacitación: Capacitación Anual de Astrobiología. Sociedad Científica de Astrobiología del Perú, Perú.
- 2020: Curso online: Introduction to Astrobiology. Amity University, India.
- 2019: Taller. EBAME5 - 5th EBAME Workshop on computational microbial ecogenomics. Université de Bretagne Occidentale, Francia.
- 2018: Curso. ECODIM X - Ecology and diversity of marine microorganisms. Instituto Milenio de Oceanografía y Universidad de Concepción, Chile.
- 2016: Curso. Curso básico de seguridad y familiarización a bordo. CEDECAP LTDA, Chile.
- 2016: Taller. Planificación y divulgación científica. Plataforma Científica, SpA., Chile.
- 2016: Capacitación. Habilidades comunicativas y difusión de la carrera de Biología Marina UdeC. Plataforma Científica, SpA., Chile.

CONGRESOS Y OTROS EVENTOS

- 2020: Olivares, F., Ulloa, O. The planktonic microbiome of the Atacama Trench. YOUMARES11 - The conference for young marine researchers. 13-16 Octubre 2020, Kiel, Alemania (Modalidad virtual).

- 2019: Olivares, F., Ulloa, O. El microbioma planctónico de la fosa de Atacama. 1er Congreso ISME América Latina, International Society for Microbial Ecology. 11-13 Septiembre 2019, Universidad Técnica Federico Santa María, Valparaíso, Chile.
- 2018: Olivares, F., Ulloa, O. Estructura comunitaria del dominio Archaea a través del gradiente de oxígeno en el sistema de corriente de Humboldt en el Pacífico Sur Oriental. XXXVIII Congreso de Ciencias del Mar, Sociedad Chilena de Ciencias del Mar. 14-18 Mayo 2018, Universidad Austral de Chile, Valdivia, Chile.
- 2017: Olivares, F., Aldunate, M., Ulloa, O. Ecología molecular del bacterioplancton a través del gradiente de oxígeno en el Pacífico Sur Oriental. XXXVII Congreso de Ciencias del Mar, Sociedad Chilena de Ciencias del Mar. 23-26 Mayo 2017, Pontificia Universidad Católica de Valparaíso, Valparaíso, Chile.
- 2016: Olivares, F., Aldunate, M., Ulloa, O. Citometría de flujo y ecología molecular: Una herramienta para evaluar la microdiversidad de la abundante y ampliamente distribuida picocianobacteria *Synechococcus*. XXXVI Congreso de Ciencias del Mar, Sociedad Chilena de Ciencias del Mar. 23-27 Mayo 2016, Universidad de Concepción, Concepción, Chile.



BECAS Y PREMIOS

- 2020 - 2021. Beca. IMO de postgrado. Instituto Milenio de Oceanografía, Chile.
- 2019: Beca. CONICYT Magíster nacional 2019. Comisión Nacional de Investigación Científica y Tecnológica, Ministerio de Educación, Chile.
- 2018: Beca. Estudios de Postgrado IMO. Instituto Milenio de Oceanografía, Chile.
- 2018: Beca. Estudios de Postgrado. Dirección de Postgrado, Universidad de Concepción, Chile.
- 2017: Premio. Premio Facultad de Ciencias Naturales y Oceanográficas 2016. Mejor rendimiento académico de la promoción. Universidad de Concepción, Chile.
- 2017: Premio. Mejor Tesis de la promoción 2016 de Biología Marina UdeC. Universidad de Concepción, Chile.
- 2016: Beca. IMO de pregrado para seminario de título. Instituto Milenio de Oceanografía, Chile.
- 2016: Beca. IMO de pregrado para proyecto de tesis. Instituto Milenio de Oceanografía, Chile.

COMUNICACIÓN CIENTÍFICA

- 2015 - 2020: Monitora de divulgación científica del Instituto Milenio de Oceanografía. Instituto Milenio de Oceanografía, Chile.
- 2016 - 2017: Monitora de la carrera de Biología Marina, Universidad de Concepción



Índice de contenidos

RESUMEN	1
ABSTRACT	3
1. INTRODUCCIÓN	5
1.1 Características del océano profundo y las zonas hadales.....	5
1.2 Vida en las fosas oceánicas y la importancia de los procariontes.....	6
1.3 Comunidades procariontes de la Fosa de Atacama.....	9
2. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS	10
2.1 Hipótesis.....	10
2.2 Objetivo general.....	10
2.3 Objetivo específico.....	10
3. MATERIALES Y MÉTODOS	11
3.1 Sitio de estudio y recolección de muestras.....	11
3.2 Extracción de ADN, secuenciación y análisis de las secuencias.....	12
3.3 Análisis de datos.....	13
4. RESULTADOS	15
Capítulo 1.....	15
5. DISCUSIÓN	46
5.1 Procariontes dominantes de la columna de agua de la Fosa de Atacama.....	46
5.2 La biósfera rara pelágica de la Fosa de Atacama.....	48
5.3 Características intra-fosa de la Fosa de Atacama.....	49
5.4 Discrepancia entre partidores universales y específicos para arqueas.....	51
5.5 Características inter-fosa de la Fosa de Atacama en comparación a otras fosas...	52

6. CONCLUSIONES.....54
7. REFERENCIAS.....56



Índice de Figuras

Figura 1.1 Anillo de Fuego del Pacífico.....	6
Figura 1.2 Curva de crecimiento de microorganismos según la presión hidrostática.....	8
Figura 3.1 Sitio de estudio.....	12
Figure 1. Sampling location.....	38
Figure 2. Prokaryoplanktonic community composition along a vertical profile in the Atacama Trench.....	38
Figure 3. Comparison of the prokaryotic communities between different vertical oceanic zones of the Atacama Trench region considering the relative abundance of ASVs.....	39
Figure 4. Comparison of the hadal prokaryoplanktonic communities between the Atacama, Mariana and Kermadec trenches considering the abundance of ASVs obtained with universal primers.....	40
Supplementary Figure 1. Relative abundance of the major groups of the pelagic rare biosphere of the Atacama Trench region.....	41
Supplementary Figure 2. Comparison of the prokaryoplanktonic communities between different vertical oceanic zones of the Atacama Trench region considering the abundance of taxa.....	42
Supplementary Figure 3. Archaeoplanktonic community composition of the Atacama Trench.....	43
Supplementary Figure 4. Archaeoplanktonic rare biosphere of the Atacama Trench.....	44
Supplementary Figure 5. Comparison of the hadal prokaryoplanktonic communities between the Atacama, Mariana and Kermadec trenches considering the abundance of taxa.....	45

Índice de Tablas

Tabla 3.1. Información de las estaciones de muestreo.....	12
--	----



RESUMEN

Título: Caracterización taxonómica de las bacterias y arqueas planctónicas de la Fosa de Atacama

Autor: Francisca Olivares

Año: 2022

Profesor guía: Osvaldo Ulloa

Las fosas son angostas y extensas depresiones del fondo marino cuya profundidad excede los 6000 m bajo la superficie, lo que las convierte en los ecosistemas oceánicos más profundos e inexplorados de la Tierra. Las fosas se consideran ambientes extremos, ya que la oscuridad es total, las temperaturas son bajas (-1 - 4 °C) y la presión hidrostática es muy elevada, superando el equivalente a 600 atmósferas terrestres. Aunque estas condiciones podrían parecer adversas para la vida, las fosas presentan una característica muy favorable y es que sus pendientes pronunciadas actúan como un embudo que permite la acumulación de materia orgánica en su interior. En estos ecosistemas recónditos los microorganismos, tales como bacterias y arqueas, son el componente dominante, cumpliendo un rol fundamental en los ciclos biogeoquímicos de las fosas oceánicas. Pero, pese a que su importancia es superlativa, solo se conoce la identidad de las bacterias y arqueas planctónicas (i.e. procarioplancton) que habitan en 4 de las 33 fosas que existen: la Fosa de Puerto Rico y, de forma más exhaustiva, las fosas de las Marianas, Kermadec y Japón. Estudios recientes apuntan a la existencia de una “biósfera hadal”, es decir, una comunidad procarionte en las fosas que es distinta a otros ecosistemas oceánicos, incluyendo la zona abisal adyacente. También, se ha observado que las comunidades procariontes, además, son diferentes en las distintas fosas. Estas características se ha observado, tanto en el componente bentónico, como en el menos estudiado componente pelágico, sin embargo, se requieren más estudios para saber si estas características intra e inter-fosa se cumplen en otras fosas.

Hasta ahora, el conocimiento sobre las comunidades de bacterias y arqueas que habitan en la columna de agua de la Fosa de Atacama es aún limitado, en comparación a los sedimentos. Esta fosa es la única del Océano Pacífico Sur Oriental y tiene características muy particulares, tales como la proximidad al continente (a solo 150 km de la costa de Perú y Chile), la presencia del altamente productivo Sistema de Surgencia de Humboldt en la zona fótica suprayacente y el desarrollo de una Zona Deficiente de Oxígeno en profundidades intermedias (100 - 500 m).

Por lo tanto, el propósito de este estudio es examinar el entorno pelágico poco explorado de la Fosa de Atacama y caracterizar la composición taxonómica de las bacterias y arqueas planctónicas, para luego hacer una comparación con otras zonas oceánicas adyacentes (característica intra-fosa) y con otras fosas oceánicas (característica inter-fosas). De esta forma, se contribuirá al entendimiento global de la ecología microbiana de las zonas hadales. Para ello, se realizó un análisis de metabarcoding de la región V4-V5 del gen 16S ARNr de Archaea y Bacteria con dos tipos de partidores (universales y específicos para arqueas) aplicados a dos clases de tamaño (procariontes de vida libre y asociados a partículas) a partir de ADN extraído de muestras de agua de la Fosa de Atacama y posteriormente secuenciado mediante la plataforma Illumina HiSeq.

Se descubrió que las comunidades procarioplánctónicas de la Fosa de Atacama están compuestas principalmente por arqueas típicamente autótrofas del phylum Thaumarchaeota y por bacterias potencialmente heterótrofas de los taxa Bacteroidetes, *Candidatus* Marinimicrobia, Pelagibacterales, Sphingomonadales, Alteromonadales y Oceanospirillales. A pesar de que los mismos taxa dominantes fueron abundantes en toda la columna de agua, los taxa raros fueron muy diversos y sugieren la existencia de una amplia variedad de potencial funcional, versatilidad metabólica e interacciones biológicas. En cuanto a las características intra-fosa, se confirmó la existencia de una biósfera hadal pelágica, ya que las comunidades procarioplánctónicas de la Fosa de Atacama son diferentes de las que habitan en los sedimentos hadales óxicos y la zona abisopelágica adyacente. Además, una característica nunca antes observada en otras fosas es que las comunidades procarioplánctónicas de la zona hadal de la Fosa de Atacama se diferenciaron claramente entre las que son estrictamente pelágicas y aquellas que habitan en la capa límite de fondo. Por otro lado, la comparación inter-fosas evidenció que las comunidades procarioplánctónicas de la Fosa de Atacama son distintas de las de las fosas de las Marianas y Kermadec. Lo anterior resalta la idea de que cada fosa tiene una biósfera hadal única modulada por condiciones ambientales particulares y compuesta por unos pocos taxa de procariontes abundantes, pero por una gran cantidad de taxa raros que son claves en la contribución a las diferencias inter-fosa. Sin embargo, se requieren más estudios que permitan relacionar estas diferencias a las condiciones particulares de la Fosa de Atacama, como las altas concentraciones de materia orgánica y la presencia de una Zona Deficiente de Oxígeno en aguas suprayacentes.

ABSTRACT

Title: Taxonomic characterization of planktonic bacteria and archaea from the Atacama Trench.

Author: Francisca Olivares

Year: 2022

Advisor: Osvaldo Ulloa

Trenches are elongated seabed depressions deeper than 6000 m below the surface, making them the deepest and most unexplored oceanic ecosystems on Earth. Trenches are considered extreme environments, as darkness is absolute, temperatures are low (-1 - 4 °C) and hydrostatic pressure is very high, exceeding the equivalent of 600 terrestrial atmospheres. Although these conditions may seem adverse for life, trenches have a favorable feature and that is that their steep slopes act as a funnel that allows the accumulation of organic matter. Microorganisms, such as bacteria and archaea, are the dominant component in these deep-sea ecosystems, playing a fundamental role in the biogeochemical cycles of oceanic trenches. Despite their superlative importance, the identity of the planktonic bacteria and archaea (i.e. prokaryoplankton) has been characterized only in 4 out of 33 trenches: the Puerto Rico Trench and, more exhaustively, the Mariana, Kermadec and Japan trenches. Recent studies suggest the existence of a "hadal biosphere", that is, prokaryotic communities in trenches that are distinct from other oceanic ecosystems, including the adjacent abyssal zone. It has also been observed that prokaryotic communities are also different in the individual trenches. These characteristics have been observed not only in the benthic environment, but also in the less studied pelagic counterpart; however, more studies are required to assess whether these intra- and inter-trench features are met in other trenches.

So far, knowledge about the bacterial and archaeal communities inhabiting the water column of the Atacama Trench is still limited compared to the benthic counterpart. This trench is the only one in the Eastern South Pacific Ocean and has quite particular characteristics, such as the proximity to the continent (only 150 km from the coast of Peru and Chile), the presence of the highly productive Humboldt Upwelling System in the overlying photic zone and the development of an Oxygen Deficient Zone at intermediate depths (100 - 500 m). Therefore, the aim of this study is to examine the underexplored pelagic environment of the Atacama Trench and to characterize the taxonomic composition of planktonic bacteria and archaea,

and subsequently to compare it with other adjacent oceanic zones (intra-trench feature) and with other oceanic trenches (inter-trench feature). Therefore, this study will contribute to the global understanding of the microbial ecology of hadal zones. For this purpose, a metabarcoding analysis of the V4-V5 region of the 16S rRNA gene of Archaea and Bacteria was performed with two sets of primers (universal and archaea-specific) targeting two size classes (free-living and particle-associated prokaryotes) to DNA extracted from water samples of the Atacama Trench and subsequently sequenced using the Illumina HiSeq platform. The prokaryoplanktonic communities of the Atacama Trench were composed mainly of the typically autotrophic archaeal phylum Thaumarchaeota and the potentially heterotrophic bacteria of the taxa Bacteroidetes, *Candidatus* Marinimicrobia, Pelagibacterales, Sphingomonadales, Alteromonadales and Oceanospirillales. Although the same dominant taxa were abundant throughout the water column, rare taxa were highly diverse and suggest the existence of a wide variety of functional potential, metabolic versatility and biological interactions. Regarding intra-trench features, the existence of a pelagic hadal biosphere was confirmed, since the prokaryoplanktonic communities of the Atacama Trench were different from those inhabiting the oxic hadal sediments and the adjacent abyssopelagic zone. In addition, a feature never observed before in other trenches is that the prokaryoplanktonic communities in the hadal zone of the Atacama Trench were clearly differentiated between those that are strictly pelagic and those that inhabit the benthic boundary layer. On the other hand, the inter-trench comparison revealed that the prokaryoplanktonic communities of the Atacama Trench were different from those of the Mariana and Kermadec trenches. The aforementioned results highlight the idea that each trench has a unique hadal biosphere modulated by its own particular environmental conditions and composed of a few abundant prokaryotic taxa, but a large number of rare taxa that are key contributors to the inter-trench differences. However, further research is needed to link these differences to the specific conditions of the Atacama Trench, such as high concentrations of organic matter and the presence of an Oxygen Deficient Zone in the overlying waters.

1. INTRODUCCIÓN

1.1 Características del océano profundo y las zonas hadales

El océano profundo por debajo de los 1000 m es uno de los ecosistemas más inexplorados del planeta y se caracteriza por presentar condiciones extremas, tales como la extinción total de luz solar, la alta presión hidrostática (> 10 MPa; 100 atmósferas terrestres, aproximadamente), la baja temperatura ($-1 - 4$ °C) y la escasez de alimentos (Jamieson et al., 2010; Nunoura et al., 2015). Esta última característica se explica por la atenuación de la materia orgánica en hundimiento que proviene de la producción biológica superficial (Buesseler & Boyd, 2009). La zona hadal (> 6000 m) representa la parte más profunda y menos estudiada del océano debido al desafío tecnológico que supone su exploración. Esta zona está compuesta casi exclusivamente por fosas oceánicas que corresponden a alargadas depresiones del fondo marino que están hidrotopográficamente aisladas unas de otras y se producen en zonas de subducción de placas tectónicas. Actualmente, se conocen 33 fosas oceánicas distribuidas principalmente a lo largo del Anillo de Fuego del Pacífico (Figura 1.1). Las características fisicoquímicas de las zonas hadales son estables y similares a los valores batiales (1000 - 4000 m) y abisales (4000 - 6000 m), como la temperatura (1.0 - 2.5 °C), salinidad (34 - 35), pH (7.7 - 7.8), concentración de oxígeno disuelto (90 - 170 μ M) y concentración de nutrientes inorgánicos (*e.g.* nitrato, nitrito y fostato) (Taira et al., 2005; Nunoura et al., 2015). Sin embargo, las fosas oceánicas están sometidas a las presiones hidrostáticas más altas que puede experimentar la columna de agua (> 60 MPa; 600 atmósferas terrestres, aproximadamente) y, de forma contraintuitiva, presentan mayores concentraciones de materia orgánica que las aguas profundas suprayacentes. Esto se debe a que las escarpadas pendientes en forma de V de las fosas actúan como un embudo que favorece el transporte y la posterior acumulación de material en su interior (Glud et al., 2013; Ichino et al., 2015). Los deslizamientos del suelo marino pueden verse acrecentados por la típica actividad sísmica que se produce en las zonas de subducción (Oguri et al., 2013). Las fosas pueden clasificarse como eutróficas u oligotróficas según las ídem condiciones tróficas de la zona eufótica suprayacente como una inferencia de la cantidad de materia orgánica que estaría ingresando a ellas (Liu et al., 2018; Xu et al., 2021). Aunque las entradas de materia orgánica tienen múltiples fuentes y el proceso de deposición es muy heterogéneo en el espacio y el tiempo (Flores et al., 2022; Schauburger et al., 2021a, Xu et al., 2021, Zhang et al., 2022). La principal fuente de materia orgánica particulada en el océano profundo es

fitodetrítus y nieve marina, aunque también existen otras fuentes como carcasas de vertebrados, exoesqueletos de invertebrados, testas de organismos gelatinosos y transporte de material a través de cañones submarinos (Stockton & DeLaca, 1982; Britton, & Morton, 1994; Canals et al., 2006; Lebrato et al., 2013; Bach et al., 2016). Otras fuentes importantes son la materia orgánica terrígena (Xu et al., 2021) y la fijación autotrófica de carbono (Fujikura et al., 1999; Nogi et al., 2002).

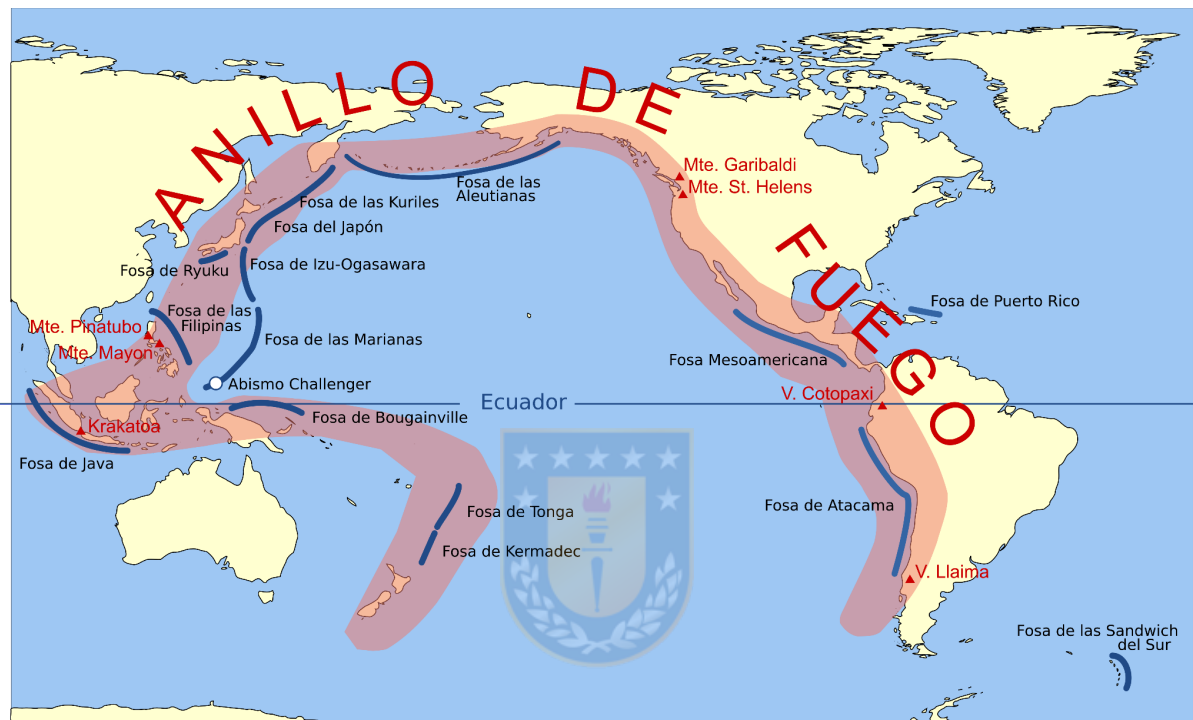


Figura 1.1. Anillo de Fuego del Pacífico. Anillo de Fuego del Pacífico demarcado por la zona coloreada de rojo y la ubicación de algunas fosas oceánicas, incluyendo la Fosa de Atacama en el Océano Pacífico Sur Oriental (Modificado de https://es.wikipedia.org/wiki/Cinturón_de_fuego_del_Pacífico. Acceso: 25.03.2022).

1.2 Vida en las fosas oceánicas y la importancia de los procariontes

La creciente presión hidrostática, la proximidad a los márgenes continentales y la disponibilidad de materia orgánica se han propuesto como algunos de los principales factores ambientales que controlan la estructura y la distribución de las comunidades biológicas en el océano profundo (Fujii et al., 2013; Woolley et al., 2016; Lacey et al., 2016). Sin embargo, este tema es muy debatible, ya que puede haber múltiples factores que estén interactuando (Jamieson et al., 2010). Además, las comunidades macroscópicas y microscópicas no parecen

seguir los mismos patrones a medida que aumenta la profundidad. La tendencia ampliamente conocida es que la abundancia y la diversidad de animales bentónicos disminuyen con la profundidad y luego aumentan en la zona hadal, aunque la vida microbiana es un componente dominante en toda la extensión vertical del océano (Rex et al., 2006; Schmidt & Arbizu, 2015). A pesar de las condiciones ambientales extremadamente adversas, el procarioplancton (i.e. las bacterias y arqueas planctónicas) mantiene una abundancia numérica relativamente constante por debajo de los 2000 m hasta el fondo (Nunoura et al., 2015; Nunoura et al., 2016; Schaubberger et al., 2021b). La alta presión hidrostática genera cambios en las distancias intermoleculares que repercuten en las estructuras y procesos de las células, como la desestabilización de las membranas, la desnaturalización de las proteínas y alteraciones en la replicación, transcripción y traducción (Bartlett, 2002; Macgregor, 2002; Winter & Jeworrek, 2009). Por esto, en un principio se creyó que los microorganismos del océano profundo tendrían una mayor actividad metabólica al dejar de estar sometidos a altas presiones y ser expuestos a la presión atmosférica, sin embargo, actualmente se sabe que no necesariamente sucede así (Jannasch et al., 1976; Nagata et al., 2010; Tamburini et al., 2013). Para habitar y sobrevivir en condiciones de alta presión, las células microbianas deben desplegar adaptaciones específicas para hacer frente al estrés ambiental, como una mayor síntesis de lípidos insaturados para conferir fluidez a la membrana (DeLong & Yayanos, 1985), la acumulación de solutos para mantener la turgencia celular (Martin et al., 2002) y un mayor repertorio de la maquinaria de reparación del ADN (Kerou et al., 2021). Los procariontes que habitan en el océano profundo pueden clasificarse según su presión óptima de crecimiento como: (a) piezotolerantes si su tasa máxima de crecimiento se produce por debajo de 10 MPa, pero soportan presiones mayores, (b) piezófilos si su tasa de crecimiento máxima se produce a 10 MPa o más e (c) hiperpiezófilos si su tasa de crecimiento máxima se produce por encima de 50 MPa (Figura 1.2) (Fang et al., 2010). A pesar de que el procarioplancton desempeña un rol fundamental en los ciclos biogeoquímicos globales (Falkowski et al., 2008), los estudios con una perspectiva comunitaria en la mayoría de las fosas son todavía muy parcelados debido a los desafíos logísticos, tecnológicos y económicos que implica la toma de muestras. De las 33 fosas oceánicas que existen en el mundo, la composición de la comunidad procarioplanctónica solo se ha caracterizado en 4 de ellas: la Fosa de Puerto Rico (Eloe et al., 2011) en el Océano Atlántico Nor-occidental y, de forma más exhaustiva, las fosas de las Marianas (Nunoura et al., 2015; Tarn et al., 2016; Peoples et al., 2018), Kermadec (Peoples et al., 2018) y Japón (Nunoura et al., 2016) en el Océano Pacífico Occidental. Estudios recientes sobre la ecología microbiana y la composición de las

comunidades de las fosas han encontrado diferencias que apuntan a la existencia de una "biósfera hadal" diferente a la de otros ecosistemas oceánicos y regulada por las condiciones ambientales particulares de cada fosa (por ejemplo, las condiciones tróficas de la superficie, la geomorfología de la fosa, el aislamiento geográfico, la ocurrencia de terremotos, etc.) (Nunoura et al., 2016; Peoples et al., 2019; Hiraoka et al., 2020). Las fosas también han mostrado comunidades procariontes distintas entre sí considerando las fracciones de tamaño de vida libre (FL, del inglés "free-living") y asociada a partículas (PA, del inglés "particle-associated") (Nunoura et al., 2015; Nunoura et al., 2016; Tarn et al., 2016; Peoples et al., 2018). No obstante, una imagen más completa de los patrones ecológicos intra- e inter-fosa sigue viéndose obstaculizada por la falta de investigación en la gran mayoría de estos ecosistemas.

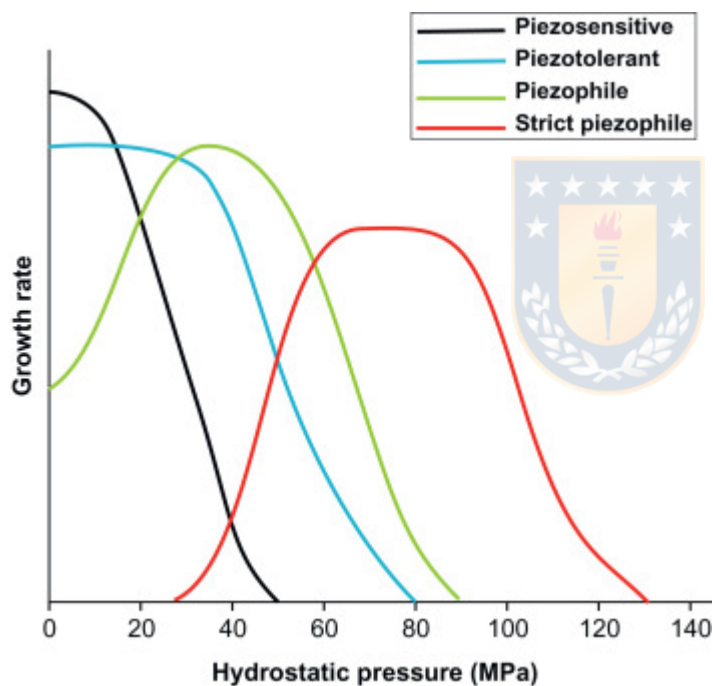


Figura 1.2. Curva de crecimiento de microorganismos según la presión hidrostática. Curva esquemática del crecimiento óptimo de microorganismos ("Growth rate") según la presión hidrostática ("Hydrostatic pressure (MPa)"). La curva negra indica el crecimiento de microorganismos piezosensibles, la curva cian de los piezotolerantes, la curva verde de los piezófilos y la curva roja de los hiperpiezófilos o piezófilos estrictos (Salvador-Castell et al., 2020).

1.3 Comunidades procariontes de la Fosa de Atacama

Hasta ahora el conocimiento sobre el componente planctónico de las comunidades procariontes que habitan en la Fosa de Atacama es limitado, mientras que los estudios se han restringido principalmente al componente bentónico (Danovaro et al., 2003, Danovaro et al., 2016, Schauberger et al., 2021a). Esta fosa es el resultado de la subducción de la placa oceánica de Nazca bajo la placa continental Sudamericana. También es conocida como la Fosa Perú-Chile porque se encuentra a 150 km de la costa de estos países y es la única fosa oceánica que existe en el Pacífico Sur Oriental, por lo que está más aislada geográfica e hidrográficamente de otras fosas. La Fosa de Atacama es considerada como una fosa eutrófica dado que se encuentra bajo el altamente productivo Sistema de Surgencia de Humboldt en la superficie y una Zona de Mínimo Oxígeno (OMZ, del inglés “Oxygen Minimum Zone”) a profundidades intermedias (100 - 500 m) (Ulloa et al., 2012). Además, los sedimentos de la Fosa de Atacama presentan el mayor contenido de carbono orgánico total y las penetraciones de oxígeno más superficiales encontradas en cualquier otra fosa hasta ahora, lo que sugiere el desarrollo de una intensa actividad microbiana aeróbica (Schauberger et al., 2021a; Zhang et al., 2022). Cuando se estudia un entorno inexplorado, una cuestión natural a resolver es conocer lo que ahí habita. Por lo tanto, el propósito de este estudio es caracterizar la composición taxonómica de las bacterias y arqueas planctónicas que habitan en la Fosa de Atacama. Para ello, se amplificó la región hipervariable V4-V5 del gen 16S ARNr de bacterias y arqueas a partir de ADN extraído de muestras de agua de la Fosa de Atacama y posteriormente se secuenció a través de la plataforma Illumina HiSeq. El objetivo de este estudio es dilucidar la existencia de características intra- e inter-fosa mediante la comparación de las comunidades procarioplantónicas hadales de la Fosa de Atacama con: (i) zonas oceánicas adyacentes y (ii) con las encontradas en otras fosas previamente estudiadas. Este estudio contribuirá a la comprensión global de la dinámica ecológica de las comunidades microbianas que habitan en la parte más remota del océano profundo.

2. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

2.1 Hipótesis

H1: La estructura de las comunidades procarioplantónicas de la Fosa de Atacama presentes en la zona hadal difiere de la zona abisal suprayacente.

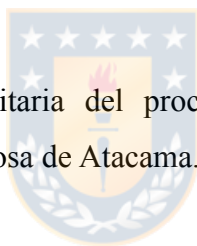
H2: La estructura de las comunidades procarioplantónicas de la Fosa de Atacama es distinta a lo documentado en las fosas oceánicas del Pacífico Occidental.

2.2 Objetivo general

Caracterizar taxonómicamente las comunidades procarioplantónicas de la Fosa de Atacama.

2.3 Objetivos específicos

1. Caracterizar la estructura comunitaria del procarioplancton presente desde la zona epipelágica hasta la zona hadal de la Fosa de Atacama.
2. Evaluar si existen diferencias en la estructura comunitaria del procarioplancton presente en la zona hadal de la Fosa de Atacama en comparación con las zonas oceánicas suprayacentes y los sedimentos hadales óxicos subyacentes.
3. Evaluar si existen diferencias en la estructura comunitaria del procarioplancton presente en la Fosa de Atacama en comparación con lo documentado en fosas oceánicas del Pacífico Occidental (i.e. fosas de las Marianas y Kermadec).



3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 Sitio de estudio y recolección de muestras

La Fosa de Atacama está situada en el Océano Pacífico Sur Oriental (Figura 3.1). Su localización más profunda registrada hasta la fecha es frente a la costa de Antofagasta en Chile a 8081 m bajo la superficie del mar (23,56° S, 71,517° W). Las muestras se recogieron a bordo del R/V Cabo de Hornos durante la Expedición Atacamex (enero-febrero de 2018), y del R/V Sonne durante la Expedición Hades-ERC Atacama Trench (marzo de 2018). Se recogieron muestras de agua desde la superficie (85 m) hasta los 7000 m utilizando botellas Niskin de 10 o 12 L sujetas a la roseta principal o a la roseta hadal, respectivamente. Se desplegó un equipo denominado “lander” para recoger muestras de agua más cerca del fondo de la fosa (7906 - 8081 m); descendiendo a través de la columna de agua mediante cambios de flotabilidad y ascendiendo por la liberación de un peso muerto. Este instrumento contaba con un CTD Seabird 19Plus para medir las variables hidrográficas (temperatura, salinidad, profundidad y oxígeno disuelto) y dos botellas Niskin de 30 L para recolectar agua de mar. La composición de la comunidad procarioplantónica de la Fosa de Atacama se caracterizó en cuatro estaciones frente al norte de Chile (La002, ST2, ST4 y ST5) en las que se recogieron muestras de agua de mar a diferentes profundidades para caracterizar la totalidad vertical de la columna de agua (desde la zona epipelágica hasta la hadopelágica) (Tabla 3.1). Se filtraron aproximadamente de 10 a 45 L de agua de mar en cada lugar de muestreo y la comunidad procarioplantónica se concentró en una fracción de tamaño de 0,22 a 3 μm (arqueas y bacterias de vida libre; filtros de polietersulfona, Sterivex; Millipore SVGP01050) y de 3 a 20 μm (arqueas y bacterias asociadas a partículas; filtro de policarbonato, Millipore TSTP04700). Las muestras se almacenaron en nitrógeno líquido hasta su llegada al laboratorio y se conservaron a -80 °C hasta su posterior análisis. Además, se obtuvieron muestras de agua desde la zona mesopelágica hasta la hadopelágica de la Fosa de Kermadec a bordo del R/V Tangaroa durante la Expedición Hades-ERC a la Fosa de Kermadec (noviembre-diciembre de 2017) con botellas oceanográficas para complementar el conjunto de datos (Tabla 3.1).

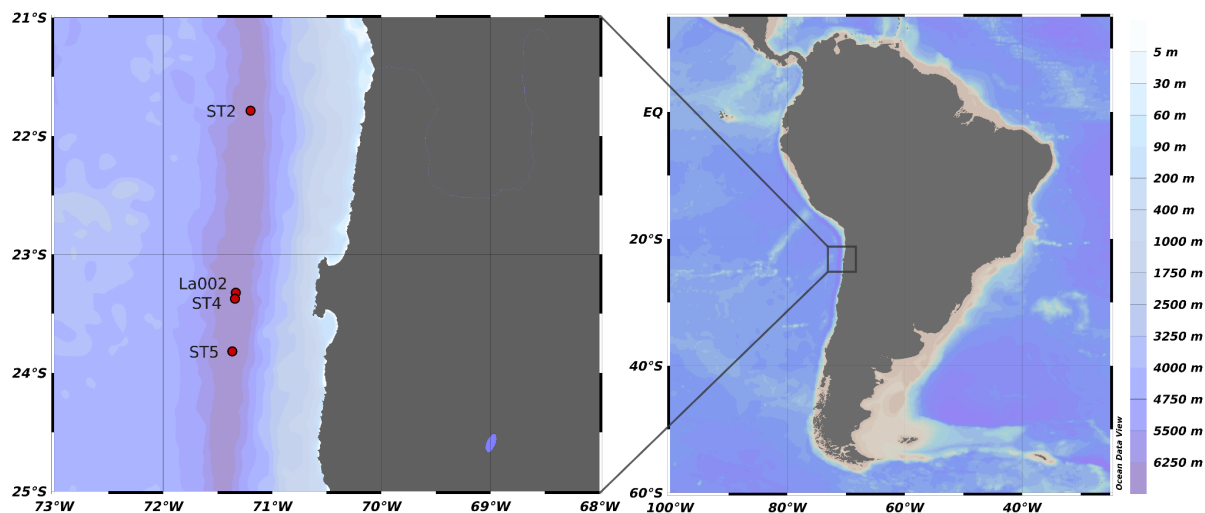


Figura 3.1. Sitio de estudio. Ubicación de las estaciones en donde fueron recolectadas las muestras de agua de la Fosa de Atacama.

Tabla 3.1. Información de las estaciones en donde fueron recolectadas las muestras de agua de las fosas de Atacama y Kermadec.

Fosa	Estación	Latitud	Longitud	Expedición
Atacama	La002	-23.53	-71.569	Atacamex
Atacama	ST2	-21.98	-71.283	Hades-ERC Atacama Trench
Atacama	ST4	-23.97	-71.492	Hades-ERC Atacama Trench
Atacama	ST5	-23.97	-71.492	Hades-ERC Atacama Trench
Kermadec	ST4	-31.14	-176.82	Hades-ERC Kermadec Trench
Kermadec	ST5	-31.93	-177.29	Hades-ERC Kermadec Trench
Kermadec	ST6	-32.16	-177.39	Hades-ERC Kermadec Trench
Kermadec	ST7	-32.18	-176.56	Hades-ERC Kermadec Trench

3.2 Extracción de ADN, secuenciación y análisis de las secuencias

Las muestras contenidas en los filtros se entregaron al French National Sequencing Center - Genoscope (Évry, Francia) para la extracción de ADN, amplificación y secuenciación de la región V4-V5 del gen 16S ARNr utilizando los partidores universales 515F/926R para bacterias y arqueas (Parada et al., 2015) y los partidores específicos para arqueas 517F/958R

(<https://vamaps2.mbl.edu/resources/primers>) utilizando la plataforma Illumina HiSeq 2500 (2 × 250 paired-end). Esta tecnología permite obtener lecturas de extremos pareados. El ADN fue extraído siguiendo el protocolo de extracción de ADN/ARN del laboratorio Genoscope descrito en Alberti et al. (2017).

Las lecturas de secuencias de extremos pareado obtenidas de las fosas de Atacama y Kermadec con los dos tipos de partidores se combinaron de forma independiente y se filtraron según su calidad con VSEARCH (versión 2.17.1) (Rognes et al., 2016), utilizando los parámetros maxEE=0,5, una longitud mínima de 250 bp y una longitud máxima de 500 bp. Los partidores se detectaron y eliminaron con pTrimmer (versión 1.3.4) (Zhang et al., 2019). Las secuencias que carecían de partidores fueron eliminadas. El mismo procedimiento se aplicó a los datos originales de secuencias obtenidos con partidores específicos para arqueas y a las secuencias obtenidas con partidores universales en estudios realizados anteriormente en la columna de agua de las fosas de las Marianas y Kermadec (Peoples et al., 2018) y de los sedimentos hadales óxicos de la Fosa de Atacama (Schauberger et al., 2021a). Las secuencias obtenidas con partidores universales y específicos para arqueas se archivaron por separado y las secuencias únicas de cada archivo se identificaron con VSEARCH.

A continuación, las secuencias resultantes de todo el conjunto de datos asociados a la región V4-V5 se incluyeron en un único archivo para cada conjunto de cebadores, se determinaron las secuencias únicas y se eliminaron las quimeras con VSEARCH, y se crearon las variantes de secuencia de amplicón (ASV, del inglés “Amplicon Sequence Variants”).

Las ASVs se compararon como secuencias de nucleótidos utilizando Blastn (dc-megablast, bitscore cutoff de 50) contra la base de datos SILVA (138.1) (Quast et al., 2013) para crear los perfiles taxonómicos correspondientes. Por separado, se utilizó un proceso similar para construir los perfiles taxonómicos a partir de las secuencias obtenidas con los partidores específicos para arqueas. La taxonomía se asignó a nivel de phylum, excepto para Archaea y Proteobacteria que recibieron una asignación taxonómica más detallada. Se eliminaron las secuencias que coincidían con mitocondrias y cloroplastos. Los datos de las secuencias utilizadas en este estudio se han enviado a NCBI y se puede acceder a ellos a través del número de proyecto PRJNA856291.

3.3 Análisis de datos

Las matrices de datos resultantes con los datos de abundancia de ASVs y grupos taxonómicos en cada muestra se utilizaron para realizar un análisis de escalamiento multidimensional no

métrico (nMDS, del inglés “non-metric Multidimensional Scaling analysis”) de las disimilitudes de Bray-Curtis con el fin de visualizar la disposición de las comunidades procarioplánctónica y evaluar las diferencias entre las muestras. El análisis de similitudes (ANOSIM, del inglés “Analysis of Similarities”) se utilizó para comprobar estadísticamente la existencia de diferencias significativas entre los grupos de muestras (i.e. fosa en la que se recolectó la muestra, zona oceánica y estilo de vida). Se utilizó un valor de significancia de $p < 0,05$ como umbral para considerar las diferencias estadísticamente significativas. El análisis de datos se realizó con R Studio empleando los paquetes *vegan* (Oksanen et al., 2020) y *ggplot2* (Ginestet, 2011). El Análisis de Especies Indicadoras se utilizó para identificar los taxa procariontes que fueran representativos y proporcionaran información sobre el estado del ecosistema hadal. Este análisis se realizó con R Studio y el paquete *indicspecies* (De Cáceres et al., 2010).



4. RESULTADOS

Capítulo 1: Las distintas bacterias y arqueas planctónicas habitan en la Fosa de Atacama

Artículo enviado a: The ISME Journal

Francisca Olivares^{1, 2}, Julie Poulain³, Patrick Wincker^{3,4,5}, Sophie Arnaud -Haond⁶ & Osvaldo Ulloa^{1,2*}

¹ Departamento de Oceanografía, Universidad de Concepción, Concepción, Chile

² Instituto Milenio de Oceanografía, Universidad de Concepción, Concepción, Chile

³ Commissariat à l'Energie Atomique (CEA), Institut de Génomique (IG), Genoscope, 2 rue Gaston Crémieux, BP5706, 91057 Evry, France

⁴ Centre National de Recherche Scientifique (CNRS), UMR 8030, CP5706, Evry, France

⁵ Université d'Evry, UMR 8030, CP5706, Evry, France

⁶ MARBEC, Université Montpellier, Institut Français de Recherche pour L'Exploitation de la Mer, CNRS, Institut de recherche pour le développement, 34203 Sète, France



Distinct planktonic bacteria and archaea thrive in the Atacama Trench

Francisca Olivares^{1, 2}, Julie Poulain³, Patrick Wincker^{3,4,5}, Sophie Arnaud-Haond⁶ & Osvaldo Ulloa^{1,2*}

¹ Departamento de Oceanografía, Universidad de Concepción, Concepción, Chile

² Instituto Milenio de Oceanografía, Universidad de Concepción, Concepción, Chile

³ Commissariat à l'Energie Atomique (CEA), Institut de Génomique (IG), Genoscope, 2 rue Gaston Crémieux, BP5706, 91057 Evry, France

⁴ Centre National de Recherche Scientifique (CNRS), UMR 8030, CP5706, Evry, France

⁵ Université d'Evry, UMR 8030, CP5706, Evry, France

⁶ MARBEC, Université Montpellier, Institut Français de Recherche pour L'Exploitation de la Mer, CNRS, Institut de recherche pour le développement, 34203 Sète, France

*Corresponding author.

E-mail oulloa@udec.cl



ABSTRACT

Trenches (> 6 000 m depth) are the deepest and most unexplored oceanic ecosystems on Earth. Environmental conditions are extreme (no sunlight, near freezing and high hydrostatic pressure), yet microbial life is rife. However, the combined planktonic bacterial and archaeal community composition is known in only a few trenches, limiting our understanding of the hadal microbial ecology. Here, we assessed the community composition of the planktonic bacteria and archaea of the Atacama Trench, an ecosystem fueled by high levels of surface primary production. We performed 16S rRNA metabarcoding with a universal and an archaea-specific primer set applied to two filter size classes, representative of free-living and particle-associated prokaryotes. The dominant archaeal taxon was the predominantly autotrophic Thaumarchaeota and the most abundant bacterial taxa were the preponderant heterotrophic Bacteroidetes, *Candidatus* Marinimicrobia, Alphaproteobacteria (Pelagibacterales and Sphingomodales) and Gammaproteobacteria (Alteromonadales and Oceanospirillales). The prokaryoplanktonic community composition of the Atacama Trench was different from that of the overlying waters and the oxygenated surficial hadal sediments. Moreover, it was distinct from the one of the benthic boundary layer. An inter-trench comparison revealed that the prokaryoplanktonic communities of the Atacama Trench were distinct from those of the other surveyed trenches, underpinning the idea that every trench has a unique hadal biosphere. Although oceanic trenches share the few most abundant taxa with apparently known carbon metabolisms, the less abundant or rare prokaryotes suggest a much broader functional potential, including methane and sulfur cycling, and that might be key to the inter-trench differences.

INTRODUCTION

The ocean below 1000 m depth is characterized by the total absence of sunlight, high hydrostatic pressure (> 10 MPa), low temperature ($-1 - 4$ °C) and food-scarcity [1, 2]. This last characteristic is explained by the attenuation of sinking organic matter derived from surface primary production [3]. The hadal zone ($> 6\ 000$ m) represents the deepest and least explored portion of the ocean and is almost exclusively comprised by oceanic trenches. These elongated seabed depressions are topographically isolated from each other and occur mainly at subduction zones in convergent tectonic plate boundaries. Hadal hydrographic conditions are stable and similar to those found at bathyal (1 000 - 4 000 m) and abyssal (4 000 - 6 000 m) depths [2]. However, trenches are subjected to the highest hydrostatic pressures (> 60 MPa) and, counterintuitively, their sediments exhibit higher organic matter concentration and oxygen consumption rates than those in the near abyssal plains [4, 5]. The V-shaped steep slopes of trenches act as a funnel that favors the downward transport and the subsequent accumulation of material at the bottom [5, 6]. Landslides can be fostered by typical seismic activity occurring at subduction zones [7]. Despite their similarities, trenches can be classified from eutrophic to oligotrophic according to the levels of primary production in their surface layers as a proxy for the organic matter falling into them [8, 9]. However, organic matter inputs have multiple sources and deposition processes that are highly heterogeneous in space and time [9–12].

The increasing hydrostatic pressure and availability of organic matter have been proposed as some of the leading environmental factors controlling the structure and distribution of biological communities in the deep ocean [13–15]. However, this is a highly debatable subject, since multiple factors may be interacting [1]. Moreover, macroscopic and microscopic communities do not seem to follow the same patterns as depth increases [16]. The widely accepted picture is that the abundance and diversity of benthic animals decrease with depth and then increase in the hadal zone, yet microbial life is a dominant component throughout the vertical extension of the ocean [17, 18]. In spite of the extremely harsh environmental conditions, prokaryoplankton (i.e., planktonic bacteria and archaea) maintain a relatively constant numerical abundance below 2 000 m to the bottom [2, 19, 20]. Even though prokaryoplankton play a pivotal role in global biogeochemical cycles [21], a community perspective in most trenches is still patchy due to sampling challenges. There are 27 trenches worldwide, however, the prokaryoplanktonic community composition has been

characterized in only 4 of them: the Puerto Rico Trench in the Western North Atlantic Ocean [22] and, more exhaustively, the Mariana [2, 23, 24], Kermadec [24] and Japan [19] trenches in the Western Pacific Ocean. Recent studies highlight the existence of a “hadal biosphere” different from that of other oceanic ecosystems and regulated by the particular environmental conditions of each trench (e.g. surface trophic levels, trench geomorphology, geographical isolation, earthquake occurrence, etc.) [19, 25, 26]. Trenches also have shown distinct prokaryotic communities from one another considering the free-living and particle-associated size fractions [2, 19, 23, 24]. Nevertheless, a fuller picture of intra- and inter-trench ecological patterns is still hindered by the lack of research in most of these ecosystems.

Knowledge about the planktonic communities of prokaryotes inhabiting the Atacama Trench is still very limited when compared to their benthic counterpart [4, 11, 27]. This trench is also known as the Peru-Chile Trench because it is located along the coast of these countries. Additionally, it is the only one that exists in the Eastern South Pacific Ocean. The Atacama Trench is considered eutrophic, as it lies beneath the highly productive eastern boundary Humboldt Current System and an oxygen minimum zone (OMZ) at intermediate depths (~90 - 450 m) [28, 29]. Furthermore, the sediments of the Atacama Trench exhibit highest content of total organic carbon and the shallowest oxygen penetrations found in any trench so far, suggesting the development of a hotspot of microbial activity [11, 12].

We surveyed the underexplored pelagic environment of the Atacama Trench and to characterize the taxonomic composition of planktonic bacteria and archaea. To this end, the hypervariable V4-V5 region of 16S rRNA gene of Bacteria and Archaea was amplified from DNA extracted from water samples of the Atacama Trench and then sequenced using high throughput technologies. The aim of this study was to shed light on the existence of intra- and inter-trench features by comparing the hadal prokaryoplanktonic communities of the Atacama Trench (i) with those found other depth levels and (ii) with those found in other previously surveyed trenches. This study will contribute to the global understanding of the ecological attributes of microbial communities inhabiting the most remote portion of the deep ocean.

MATERIALS AND METHODS

Study area and sample collection

The Atacama Trench is located in the Eastern South Pacific Ocean (Figure 1). Its deepest location registered to date is off the coast of Antofagasta in Chile (23.56° S, 71.517° W). Samples were collected on board the R/V Cabo de Hornos during the “Atacamex Expedition” (January-February 2018), and the R/V Sonne during the “Hades-ERC Atacama Trench Expedition” (March 2018). Water samples from near the surface (85 m) to 6 000 m and from 6 000 to 7 500 m were collected using 20-L and 12-L Niskin bottles attached to the main oceanographic rosette and the hadal rosette, respectively. An ocean lander was deployed to collect water samples closer to the trench bottom (8 081 m); it descended through the water column by buoyancy shifts and ascended by releasing a dead weight. The oceanographic rosette had a Seabird SBE 911Plus conductivity-temperature-depth (CTD) sensor, while the lander had a Seabird SBE 19Plus CTD. Two 30-L Niskin bottles were used to collect seawater with the ocean lander. The prokaryoplanktonic community composition of the Atacama Trench was characterized along the water column (from the epipelagic zone to the hadopelagic zone) by combining samples from four stations along the trench axis (La002, ST2, ST4 and ST5; Supplementary Table 1). Approximately 10 to 45 L of seawater from each sampling depth were pre-filtered through a 20-mm mesh and then the prokaryoplanktonic community was serially concentrated onto a 3-mm polycarbonate filter (Millipore TSTP04700), the assumed particle-associated fraction, and onto a 0.22-mm polyethersulfone filter (Sterivex; Millipore SVGP01050), the assumed free-living component, respectively. The filters were stored in liquid nitrogen until the arrival to the laboratory and then kept at -80 °C until further analysis. Additionally, water samples ranging from mesopelagic to hadopelagic zone of Kermadec Trench were obtained on board R/V Tangaroa during the “Hades-ERC Kermadec Trench Expedition” (November-December 2017) with oceanographic bottles in order to complement the dataset (Supplementary Table 1).

DNA extraction, sequencing and sequence analysis

The samples contained in the filters were delivered to the French National Sequencing Center - Genoscope (Évry, France) for DNA extraction, amplification and sequencing of the V4-V5 region of the 16S rRNA gene using the universal primers 515F/926R for bacteria and archaea [30] and the archaea-specific primers 517F/958R (<https://vamaps2.mbl.edu/resources/primers>)

using the Illumina HiSeq 2500 platform (2 × 250 paired-end). DNA was extracted following the Genoscope lab DNA/RNA extraction protocol described in Alberti et al. [31]. Paired-end reads obtained from the Atacama and Kermadec trenches with the two sets of primers were merged independently and quality filtered with VSEARCH (version 2.17.1) [32], using parameters maxEE=0.5, minimum length of 250 bp and maximum length of 500 bp. Primers were identified and removed with pTrimmer (version 1.3.4) [33]. Sequences that lacked primers were discarded. The same procedure was applied to the sequence data from the archaeal-specific primers and from the V4-V5 region of the 16S rRNA gene obtained in previous studies of the water column of Mariana and Kermadec trenches [24] and the oxic hadal sediments of the Atacama Trench [11] (Supplementary Table 2). The resulting sequences from all datasets associated with the V4-V5 region were then put into a single file for each primer set, and the unique sequences were determined and chimeras removed with VSEARCH, and the Amplicon Sequence Variants (ASVs) were created. The ASVs were compared as nucleotide sequences using BLASTn (parameter task dc-megablast, bitscore cutoff of 50) against the SILVA database (138.1) to construct the corresponding taxonomic profiles [34, 35]. Separately, a similar process was used to construct the taxonomic profiles from sequences obtained with the archaea-specific primers. Taxonomy was assigned at the phylum level, except for Archaea and Proteobacteria that received a more detailed taxonomic assignation. Sequences that matched mitochondria and chloroplasts were removed. Novel sequence data used in this study have been submitted to NCBI and can be accessed through the project number PRJNA856291 (Supplementary Table 2).

Data analyses and statistics

The resulting ASV and taxonomy abundance data matrices were used to perform non-metric Multidimensional Scaling analysis (nMDS) of Bray-Curtis dissimilarities in order to visualize the prokaryoplanktonic community arrangements and to assess the differences between samples. Analysis of Similarities (ANOSIM) was used to statistically test whether there were significant differences between groups of samples (i.e., trench of collection, vertical oceanic zone and lifestyle). A significance value of $p < 0.05$ was used as threshold for considering statistically significant differences. Data analysis was performed with R Studio employing the vegan and ggplot2 packages [36, 37]. Indicator Species Analysis was used to identify prokaryotic taxa that were representative and provide comprehensive information on the

condition of the hadal ecosystem. This analysis was performed with R Studio and the *indicspecies* package [38].

RESULTS AND DISCUSSION

Dominant prokaryotic taxa in the Atacama Trench waters are typically autotrophic archaea and heterotrophic bacteria

The dataset of the Atacama Trench using universal primers consists of 24 samples collected from the surface ocean (85 m) to the benthic boundary layer (BBL; closer to the sediment surface at 7 906 - 8 081 m) considering the free-living (FL) and particle-associated (PA) lifestyles of prokaryoplankton. A total of 17 230 866 sequence reads of the V4-V5 region of the 16S rRNA gene were clustered in 23 231 ASVs (Supplementary Table 3). The Atacama Trench showed a typical structure of environmental microbial communities [39, 40], comprised of a few abundant taxa and numerous rare taxa (Figure 2 and Supplementary Table 4). Taxa with a relative abundance equal to or higher than 1% of the total prokaryoplanktonic community per sample were considered as abundant. The dominant archaeal taxon of the water column and particularly in the hadal zone was Thaumarchaeota (Marine Group I [2.81 - 13.79%] and order Nitrosopumilales [1.83 - 6.36%]) (Figure 2). This taxon is one of the most abundant prokaryotes in the ocean and is well-known for playing a significant role in the carbon and nitrogen cycles through carbon fixation and most part of ammonia oxidation in oxic marine environments [41, 42]. A previous study has shown that some genes related to these Thaumarchaeota functions are being actively transcribed in the Mariana Trench [43]. On the other hand, the dominant bacterial taxa were Bacteroidetes (6.15 - 17.62%), *Candidatus* (Ca.) Marinimicrobia (3.29 - 6.97%), Alphaproteobacteria (Pelagibacterales [2.97 - 23.68%] and Sphingomonadales [2.39 - 13.45%]), and Gammaproteobacteria (*Ca.* Thioglobus [0.48 - 6.79%], Alteromonadales [6.71 - 18.96%], Chromatiales [0.89 - 4.46%] and Oceanospirillales [5.01 - 8.11%]) (Figure 2). Planctomycetes (2.08 - 4.56%), Betaproteobacteria (Burkholderiales [0.41 - 4.35%]) and Other Deltaproteobacteria (2.23 - 10.33%) were more abundant in the deeper part of the Atacama Trench than in other parts of the water column, while SAR324 (0.04 - 5.90%) was particularly abundant in the FL faction at 7 000 m (Figure 2). These bacterial taxa are ubiquitous in pelagic environments and the ones that comprise most of the relative abundance are well-known for being typically

heterotrophs, as Bacteroidetes, Sphingomonadales, Alteromonadales, Oceanospirillales and the dominant taxon in the global ocean: Pelagibacterales [44, 45]. Other taxa are characterized for having autotrophic representatives, such as *Ca. Marinimicrobia*, Deltaproteobacteria, *Ca. Thioglobus* and Chromatiales. Although the metabolic capacities of *Ca. Marinimicrobia* remain quite elusive, some lineages of this taxon can fix carbon and use different electron acceptors when oxygen is not present [46, 47]. However, consistent with well-oxygenated and organic matter rich hadopelagic environments, no genes encoding for autotrophic carbon fixation have been found in hadal genomes of *Ca. Marinimicrobia*, suggesting a heterotrophic lifestyle in trenches [48, 49]. *Ca. Marinimicrobia* and Pelagibacterales are also abundant in the overlaying OMZ of the Eastern South Pacific Ocean, while the metabolically versatile SAR324 [50] and the sulfur-oxidizing *Ca. Thioglobus* [51] are particularly enriched in this habitat [28]. Although these taxa are ubiquitous in the dark ocean, part of their diversity in the Atacama Trench may be derived from the OMZ, which may act as a seedbank, supplying microbial cells via sinking particles, however, the potential connection between these two ecosystems has not been established [3, 52]. In contrast to our results and those reported for other trenches, Zhao et al. [53] found that the phylum Firmicutes is dominant in the water column of the Atacama Trench. However, this taxon is not characteristically abundant in pelagic environments [45, 54], but it is an abundant component of the human microbiota and the digestive tract of other animals [55, 56]. The archaeal taxon *Ca. Woesearchaeota* exceeded 1% of relative abundance (1.43%) only in the deepest sample of the PA fraction (7 928 m) (Figure 2). This taxon was found to be abundant in the ultra-small FL fraction (0.1 - 0.2 μm) of the Mariana Trench [24], which is reasonable when considering its small cell size. The latter size fraction was not considered in this study, potentially underestimating the abundance of members of the small-sized archaeal DPANN supergroup and the bacterial Candidate Phyla Radiation [57, 58]. Although its metabolic capabilities are unclear, it has been proposed that *Ca. Woesearchaeota* is an anaerobic fermentative heterotroph group [59]. The marked predominance of putative autotrophic archaea and heterotrophic bacteria suggests the occurrence of active carbon fixation and a substantial consumption of organic matter. Further genomic and transcriptomic research, combined with geochemical (e.g., elemental and isotopic) approaches, including rate measurements, will be required to complement these results.

The pelagic rare biosphere of the Atacama Trench is taxonomically diverse with a wide-ranging functional potential

The rare biosphere refers to the long tail of microbial taxa found in an ecosystem, but in low abundances [39, 40]. Taxa with a relative abundance of less than 1% of the total prokaryoplanktonic community per sample were considered rare and thus, part of the rare biosphere (Supplementary Table 4). The rare taxa accounted for 6.89 to 15.69% of the total prokaryoplanktonic community of the Atacama Trench dataset (Supplementary Table 3). Archaea accounted for 3.65 - 16.76%, Proteobacteria for 36.35 - 62.71% and other Bacteria for 31.04 - 53.92% of the pelagic rare biosphere (Supplementary Figure 1). Taxonomic composition of rare taxa was highly diverse and suggests the existence of a wide variety of metabolic potential and ecological functions of prokaryotes. The typically anaerobic and fermentative phylum *Ca. Atribacteria* was part of the rare biosphere in all hadal samples with a maximum relative abundance of 0.35%. Schaubberger et al. [11] reported this taxon as abundant in the deeper ferruginous sediments of the Atacama Trench (reaching to 29% of the prokaryotic community at 40 - 45 cm deep), but rare in the shallower nitrogenous and oxic benthic conditions. They hypothesized that cells were supplied by pelagic seed stocks that were then deposited and buried in sediments. Our results support that *Ca. Atribacteria* flourishing in the Atacama Trench sediments when oxygen and nitrate are depleted comes from the water column. This conveyance can also be true to the typically benthic archaeal taxa *Ca. Hydrotermarchaeota*, *Ca. Woesearchaeota*, *Crenarchaeota* and the Asgard group, as members of the rare pelagic biosphere (Supplementary Table 3), but reported to be more abundant in the ferruginous portion of the sediments of the Atacama Trench [11]. Other detected archaeal rare taxon was *Ca. Heimdallarchaeota* of the Asgard group, considered the most likely ancestor of eukaryotes [60]. Rare taxa might be contributing directly to the carbon cycle through the aerobic degradation of possibly abundant specific organic compounds in trenches, like dimethylsulfoniopropionate by SAR116 (Alphaproteobacteria) [61, 62], polycyclic aromatic hydrocarbons by Kordiimonadales (Alphaproteobacteria) and Immundisolibacterales (Gammaproteobacteria) [63, 64] and cellulose and chitin by *Ca. Sumerlaeota* [9, 65]. Potential methanogens, such as *Methanomada* and *Stenosarchaea* (Euryarchaeota) [66, 67], and methanotrophs as *Methylococcales* (Gammaproteobacteria) [68] and *Ca. Methylomirabilis* (candidate division NC10) [69] were detected, suggesting active cycling of methane in anoxic microenvironments. *Ca. Methylomirabilis* is capable of anaerobic methane oxidation coupled to nitrite reduction, linking methane to the nitrogen

cycle [69]. The autotrophic nitrite-oxidizing bacteria Nitrospinae and Nitrospirae and ammonia-oxidizing archaea *Ca. Nitrosopelagicus* (Thaumarchaeota) might be key contributors not only to the nitrogen cycle, but to carbon fixation in the Atacama Trench [70, 71]. On the other hand, the presence of the sulfur-oxidizing proteobacterial class Acidithiobacillia [72] and the gammaproteobacterial genus *Ca. Thiopapillus* [73] and the OMZ-dwelling sulfate-reducing deltaproteobacterial orders Desulfobacterales and Desulfovibrionales [74] suggest the occurrence of an active sulfur cycle in anoxic microenvironments in the water column of the Atacama Trench. Other rare prokaryotes are well-known for establishing close interactions with other organisms. For example, *Bacteriovorax* (Oligoflexia) and Maricaulales (Alphaproteobacteria) are characterized for preying on other bacteria [75]. *Ca. Margulisbacteria* are known for displaying symbiotic relationships as endosymbionts of diverse eukaryotes [76, 77] and Chlamydiae as endosymbionts of microbial eukaryotes, pathogens of animals and hypothetically free-living [78–80]. Whether or not these functions are being performed in the Atacama Trench is still shrouded in mystery, but further research in the field of meta-omics and single cell genomics is required to disentangle the microbial ecology of the hadal zone.

Hadal prokaryotic communities of the Atacama Trench differ from their shallower counterparts

Hadopelagic prokaryotic communities of the Atacama Trench were compared with those of the overlying oceanic vertical zones (i.e., epipelagic, mesopelagic, bathypelagic and abyssopelagic) and the underlying oxic hadal sediments. The prokaryotic communities of the hadopelagic zone differed significantly from those of the adjacent abyssopelagic zone, the other overlying vertical oceanic zones and the oxic hadal sediments, according to ASV ($p < 0.05$, $R = 0.9652$) and taxonomic composition ($p < 0.05$, $R = 0.9244$) (Figure 3 and Supplementary Figure 2). The uniqueness of hadal biological communities compared to other oceanic ecosystems is what defines the concept of "hadal biosphere" [2, 8], so these results confirmed the existence of a unique pelagic hadal biosphere in the Atacama Trench. The widely accepted global intra-trench pattern is that prokaryotic communities vary in distinct vertical oceanic zones, highlighting the marked differences between the hadal and the overlying zones, particularly considering the adjacent abyssal zone. This distinctness is true for all of the prokaryoplanktonic communities of the trenches that have been exhaustively studied so far: Mariana [2, 24], Kermadec [24] and Japan [19] trenches. Hadal benthic

prokaryotic communities of the Izu-Ogasawara [26], Kermadec and Atacama [11] trenches are also different from those of the abyssal plains. Differences between the hadal communities of the Atacama Trench and those from the upper oceanic zones may be linked to the distinct trophic conditions along the water column due to the attenuation of surface primary production and the funneling of organic matter inside trenches, however more detailed studies relating microbial communities and the availability of organic matter are required [3, 9]. In addition, previous research has already highlighted the difference between pelagic and benthic microbial communities since the conditions of the water column differ from sediments that are characterized by an intense redox gradient [11] and the presence of biofilms [81]. Hence the Atacama Trench exhibits a distinctive benthic hadal biosphere [11] and a newly discovered pelagic hadal biosphere.

Two distinct prokaryoplanktonic communities reside inside the Atacama Trench

As evidenced in Figure 3, the hadal prokaryoplanktonic communities are clustered in two discernibly subgroups that correspond to different sampling zones: the strictly pelagic zone (6 000 - 7 000 m) and the BBL. Both subgroups were treated separately in the prokaryotic community comparison, according to ASV and taxonomic composition (Figure 3 and Supplementary Figure 2). The prokaryoplanktonic communities of the strictly hadopelagic zone differed significantly from those of the BBL, according to ASV ($p < 0.05$, $R = 0.9751$) and taxonomic composition ($p < 0.05$, $R = 0.939$). This difference is an unprecedented result, as this intra-trench feature has never been observed in another trench. These results are complementary to the existence of a pelagic hadal biosphere, as they indicate that the prokaryoplanktonic communities of the Atacama Trench are not only different from those of other oceanic ecosystems, but also exhibit an intra-trench pattern: Two distinct communities (i.e., strictly hadopelagic vs. BBL) are present in the hadal waters.

Discrepancy between universal and archaea-specific primers in the characterization of the archaeoplanktonic communities of the Atacama Trench

Universal primers are not as effective for archaea due to primer-template mismatch, resulting in an underrepresentation of this domain in prokaryotic communities and in the non-detection of specific archaeal phyla [82, 83]. Therefore, archaea-specific primers of the V4-V5 region of 16S rRNA gene were used in this study to achieve a more exhaustive coverage of the archaeal diversity in the water column of the Atacama Trench. A total of 22 428 816

sequence reads were clustered in 2 080 ASVs. The archaeal community composition obtained using the universal primers differed from that obtained using the archaea-specific primers (Supplementary Table 6 and 7). Universal primers covered 20 taxa and archaea-specific covered 13, while 11 taxa were covered by both primers in the Atacama Trench (Supplementary Table 7). The dominant taxa of the archaeal community using the domain-specific primers were Diaforarchaea (Euryarchaeota), Nitrosopumilales and Marine Group I with relative abundances of 15.69 - 57.66%, 1.94 - 38.16% and 21.01 - 75.68%, respectively (Supplementary Figure 3). *Ca. Nitrosopelagicus* (Thaumarchaeota) was only dominant in the FL fraction of the 85 m sample (7.98%) (Supplementary Figure 3 and 4). The dominant archaeal taxa were covered by both primers (Supplementary Table 5). The taxa covered only by universal primers were *Ca. Heimdallarchaeota* from the Asgard group, *Ca. Altiarchaeota*, *Ca. Pacearchaeota* and *Ca. Woesearchaeota* from the DPANN group and Stenosarchaea and candidate division Sediment Archaea-1 from Euryarchaeota phylum (Supplementary Table 7). On the other hand, the taxa covered only by archaea-specific primers were Geothermarchaeota and the thaumarchaeotal class Nitrososphaeria (genera *Ca. Nitrosocaldus* and *Nitrososphaera*) from the TACK group and Thermococci (Euryarchaeota). *Ca. Nitrosocaldus* was present in the BBL of the Atacama Trench at very low relative abundances (0.001 - 0.002%) (Supplementary Table 6 and 7). This genus is typically a thermophilic ammonia-oxidizing inhabitant of hot springs [84, 85]. Genetic sequences related to *Ca. Nitrosocaldus* were detected in the ocean for the first time by Zhong et al. [43], however this genus had never been reported in an oceanic trench so far. The fact that the archaea-specific primers did not match specific archaeal taxa that the universal primers did, indicates that their specificity is not absolute. Combining different sets of universal and domain-specific primers appears to be the best approach to obtain a fuller picture of archaeal diversity. This finding highlights the issue of how poorly studied archaea are and the need to design more rigorous primers for this domain as new archaeal taxa are discovered and the archaeal 16S rRNA sequences are increasing in databases.

Hadal prokaryoplanktonic communities of the Atacama Trench are unique compared to other trenches

Hadal prokaryoplanktonic communities of the Atacama Trench were compared with those of the Kermadec and Mariana trenches. Part of the Kermadec Trench data analyzed was generated in this study, while the other part, together with the Mariana Trench data, came

from Peoples et al. [24]. The combined dataset of hadal samples from the Atacama, Kermadec and Mariana trenches consists of 53 samples and 11 646 491 total sequence reads of the V4-V5 region of the 16S rRNA gene clustered in 16 821 ASVs. The hadal ASV richness in the Atacama Trench was higher compared with the Mariana (9 629) and Kermadec (7 402) trenches (Figure 4B). Moreover, the number of core ASVs (i.e., ASVs present in one trench, but not in the others) was also higher in the Atacama Trench (5 320) in comparison with Kermadec (658) and Mariana (1 768) trenches. The Atacama Trench shared 13.86% of the total hadal ASVs with the Mariana Trench and 7.22% with the Kermadec Trench (Figure 4B). The arrangement of hadal prokaryoplanktonic communities of the three trenches was visualized according to ASV and taxonomic composition (Figure 4A and Supplementary Table 3). The prokaryoplanktonic communities of the hadal zone of the Atacama Trench differed significantly from those of the Kermadec and Mariana trenches according to ASV ($p < 0.05$, $R = 0.6899$) and taxonomic composition ($p < 0.05$, $R = 0.5402$) (Figure 4A and Supplementary Figure 5). The communities of Kermadec and Mariana also differed between them, matching the results obtained by Peoples et al. [24]. Schaubberger et al. [11] found a similar trend in hadal sediments, where benthic prokaryotic communities of the Atacama Trench were also different from those of the Kermadec Trench. According to the Indicator Species Analysis, 45 taxonomic classifications were considered environmentally informative and representative of the Atacama Trench. A minor fraction of the indicator taxa are abundant in the hadopelagic zone (Figure 2 and Supplementary Table 8), such as the proteobacterial orders Oceanospirillales, Burkholderiales, Sphingomonadales and the typically OMZ dwellers Pelagibacterales and *Ca. Thioglobus*. More than 90% of the indicator taxa of the Atacama Trench are members of the pelagic rare biosphere, as the thaumarchaeotal genus *Ca. Nitrosopelagicus*, the euryarchaeal taxa Marine Benthic Group A and Stenosarchaea, *Ca. Lokiarchaeota* and *Ca. Woesearchaeota*. Some interesting indicator bacterial taxa are the potentially pathogenic Fusobacteria [86], the potentially fermentative *Ca. Peregrinibacteria* [87], the aerobic extremophile *Deinococcus-Thermus* [88], the magnetotactic Magnetococcales [89] and the previously discussed *Ca. Thiolapillus*, Kordiimonadales, Immundisolibacterales, Methylococcales and *Ca. Atribacteria*. The differences between the Atacama Trench and the Kermadec and Mariana trenches may be linked to their distinctive characteristics. In contrast to the oligotrophic Mariana and Kermadec trenches, the Atacama Trench is considered a eutrophic trench due to the high concentrations of organic matter presumably derived from the productive eastern boundary Humboldt Current System. The higher input of organic matter falling into Atacama Trench

may modulate the structure of prokaryoplanktonic communities [9]. Another relevant characteristic is the development of an OMZ in the overlaying waters [28] that may be possibly seeding indigenous prokaryotes to the hadal depths, as evidenced by the presence of some typical OMZ dwellers as part of the dominant and rare taxa detected in the Atacama Trench. These results confirmed the uniqueness of the prokaryoplanktonic communities of the Atacama Trench and support the idea that every trench has a hadal biosphere with a distinctive prokaryotic fingerprint.

CONCLUSIONS

The bacterial and archaeal communities of the Atacama Trench waters were characterized for the first time in this study. These communities were mainly formed by typically pelagic taxa of predominantly autotrophic archaea and preponderant heterotrophic bacteria, which play important roles in the carbon and nitrogen cycles. Although the same dominant taxa were abundant throughout the entire water column, the taxa comprising the rare biosphere were highly diverse and suggest the existence of a broad variety of functional potential, metabolic versatility and biological interactions. The prokaryoplanktonic communities of the Atacama Trench were different from those inhabiting the adjacent abyssopelagic zone, probably due to the distinct trophic conditions explained by the attenuation of surface-derived organic matter with depth and its ulterior accumulation inside the trench. In addition, a novel intra-trench insight was that communities of the hadopelagic waters were different from those of the BBL and remarkably distinct from oxic sediments at the bottom of the trench. With respect to archaea, some differences were evident in the characterization of their taxonomic composition obtained with general and archaea-specific primers, so currently it is advisable to use more than one set of primers to obtain a better coverage of their diversity. As a significant inter-trench signature, the prokaryoplanktonic communities of the Atacama Trench were distinct from those of the Mariana and Kermadec trenches. These differences may be due to a higher input of organic matter into the Atacama Trench derived from the productive eastern boundary Humboldt Current System, and perhaps the availability of other electron donors (driving methane and sulfur cycling), as well as of yet unseen biological interactions between prokaryotes and diverse eukaryotes, thus offering supplementary niches. In addition, the overlaying OMZ of the Eastern South Pacific Ocean may be acting as a supplier of microbial cells via sinking particles to the Atacama Trench. These findings

highlight the idea that every trench has a unique hadal biosphere modulated by particular environmental conditions and composed of a few abundant taxa and key rare prokaryotes that contribute to the inter-trench differences.

Acknowledgments

This work was supported by the Chilean National Agency for Research and Development (ANID) through grant Fondecyt 1191360 (to O.U.) and the Millennium Science Initiative-ANID Program (grant ICN12 019-IMO). We thank the captains, crews, and scientific personnel of the RV *Cabo de Hornos* (ship time provided by ANID grant AUB17002 to Wolfgang Schneider), the RV *Sonne* (SO261; ship time provided by BMBF, Germany, awarded to Frank Wenzhoefer, Mathias Zabel, and Ronnie N. Glud), and the RV *Tangaroa* (TAN1711; ship time partly funded by the Coasts & Oceans Centre of New Zealand's National Institute of Water & Atmospheric Research -NIWA-, awarded to Ashley A. Rowden and Ronnie N. Glud), in the framework of the HADES-ERC Advanced grant "Benthic diagenesis and microbiology of hadal trenches"#669947 awarded to Ronnie N. Glud. Additionally, this work was supported by the "Pourquoi Pas les Abysses?" project funded by Ifremer, and the project eDNAbys (AP2016 -228) funded by France Génomique (ANR-10-INBS-09) and Genoscope-CEA. F.O. was additionally supported by the Instituto Milenio de Oceanografía and ANID scholarships for National Master.

REFERENCES

- 1 Jamieson AJ, Fujii T, Mayor DJ, Solan M, Priede IG. Hadal trenches: the ecology of the deepest places on Earth. *Trends Ecol Evol.* 2010;25:190–197.
- 2 Nunoura T, Takaki Y, Hirai M, Shimamura S, Makabe A, Koide O, et al. Hadal biosphere: insight into the microbial ecosystem in the deepest ocean on Earth. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2015;112:1230–1236.
- 3 Buesseler KO, Boyd PW. Shedding light on processes that control particle export and flux attenuation in the twilight zone of the open ocean. *Limnol Oceanogr.* 2009;54:1210–1232.
- 4 Danovaro R, Della Croce N, Dell'Anno A, Pusceddu A. A depocenter of organic matter at 7800 m depth in the SE Pacific Ocean. *Deep Sea Res Part I Oceanogr Res Pap.* 2003;50:1411–1420.

- 5 Glud RN, Wenzhöfer F, Middelboe M, Oguri K, Turnewitsch R, Canfield DE, et al. High rates of microbial carbon turnover in sediments in the deepest oceanic trench on Earth. *Nat Geosci.* 2013;6:284–288.
- 6 Ichino MC, Clark MR, Drazen JC, Jamieson A, Jones DOB, Martin AP, et al. The distribution of benthic biomass in hadal trenches: a modelling approach to investigate the effect of vertical and lateral organic matter transport to the seafloor. *Deep Sea Res Part I Oceanogr Res Pap.* 2015;100:21–33.
- 7 Oguri K, Kawamura K, Sakaguchi A, Toyofuku T, Kasaya T, Murayama M, et al. Hadal disturbance in the Japan Trench induced by the 2011 Tohoku–Oki Earthquake. *Sci Rep.* 2013;3:1–6.
- 8 Liu R, Wang L, Wei Y, Fang J. The hadal biosphere: Recent insights and new directions. *Deep Sea Res II Top Stud Oceanogr.* 2018;155:11–18.
- 9 Xu Y, Li X, Luo M, Xiao W, Fang J, Rashid H, et al. Distribution, Source, and Burial of Sedimentary Organic Carbon in Kermadec and Atacama Trenches. *J Geophys Res Oceans.* 2021;126:e2020JG006189.
- 10 Flores E, Cantarero SI, Ruiz-Fernández P, Dildar N, Zabel M, Ulloa O, et al. Bacterial and eukaryotic intact polar lipids point to in situ production as a key source of labile organic matter in hadal surface sediment of the Atacama Trench. *Biogeosciences.* 2022;19:1395–1420.
- 11 Schaubberger C, Glud RN, Hausmann B, Trouche B, Maignien L, et al. Microbial community structure in hadal sediments: high similarity along trench axes and strong changes along redox gradients. *ISME J.* 2021;15:3455–3467.
- 12 Zhang X, Xu Y, Xiao W, Zhao M, Wang Z, Wang X, et al. The hadal zone is an important and heterogeneous sink of black carbon in the ocean. *Commun Earth Environ.* 2022;3:1–9.
- 13 Fujii T, Kilgallen NM, Rowden AA, Jamieson AJ. Deep-sea amphipod community structure across abyssal to hadal depths in the Peru-Chile and Kermadec trenches. *Mar Ecol Prog Ser.* 2013;492:125–138.
- 14 Lacey NC, Rowden AA, Clark MR, Kilgallen NM, Linley T, Mayor DJ, et al. Community structure and diversity of scavenging amphipods from bathyal to hadal depths in three South Pacific Trenches. *Deep Sea Res Part I Oceanogr Res Pap.* 2016;111:121–137.
- 15 Woolley SN, Tittensor DP, Dunstan PK, Guillera-Arroita G, Lahoz-Monfort JJ, Wintle BA, et al. Deep-sea diversity patterns are shaped by energy availability. *Nature.* 2016;533:393–396.

- 16 Du M, Peng X, Zhang H, Ye C, Dasgupta S, Li J, et al. Geology, environment, and life in the deepest part of the world's oceans. *The Innovation*. 2021;2:100109.
- 17 Rex MA, Etter RJ, Morris JS, Crouse J, McClain CR, Johnson NA, et al. Global bathymetric patterns of standing stock and body size in the deep-sea benthos. *Mar Ecol Prog Ser*. 2006;317:1–8.
- 18 Schmidt C, Arbizu PM. Unexpectedly higher metazoan meiofauna abundances in the Kuril–Kamchatka Trench compared to the adjacent abyssal plains. *Deep Sea Res II Top Stud Oceanogr*. 2015;111: 60–75.
- 19 Nunoura T, Hirai M, Yoshida-Takashima Y, Nishizawa M, Kawagucci S, Yokokawa T, et al. Distribution and niche separation of planktonic microbial communities in the water columns from the surface to the hadal waters of the Japan Trench under the Eutrophic Ocean. *Front Microbiol*. 2016;7:1261.
- 20 Schauburger C, Middelboe M, Larsen M, Peoples LM, Bartlett DH, Kirpekar F, et al. Spatial variability of prokaryotic and viral abundances in the Kermadec and Atacama Trench regions. *Limnol Oceanogr*. 2021 <https://doi.org/10.1002/lno.11711>
- 21 Falkowski PG, Fenchel T, Delong EF. The microbial engines that drive Earth's biogeochemical cycles. *Science*. 2008;320:1034–1039.
- 22 Eloë EA, Shulse CN, Fadrosch DW, Williamson SJ, Allen EE, Bartlett DH. Compositional differences in particle-associated and free-living microbial assemblages from an extreme deep-ocean environment. *Environ Microbiol Rep* 2011;3:449–458.
- 23 Tarn J, Peoples LM, Hardy K, Cameron J, Bartlett DH. Identification of free-living and particle-associated microbial communities present in hadal regions of the Mariana Trench. *Front Microbiol*. 2016;7:665.
- 24 Peoples LM, Donaldson S, Osuntokun O, Xia Q, Nelson A, Blanton J, et al. Vertically distinct microbial communities in the Mariana and Kermadec trenches. *PLoS One*. 2018;13:e0195102.
- 25 Peoples LM, Grammatopoulou E, Pombrol M, Xu X, Osuntokun O, Blanton J, et al. Microbial community diversity within sediments from two geographically separated hadal trenches. *Front Microbiol*. 2019;10:347.
- 26 Hiraoka S, Hirai M, Matsui Y, Makabe A, Minegishi H, Tsuda M, et al. Microbial community and geochemical analyses of trans-trench sediments for understanding the roles of hadal environments. *ISME J*. 2020;14:740–56.
- 27 Danovaro R, Dell'Anno A, Corinaldesi C, Rastelli E, Cavicchioli R, Krupovic M, et al. Virus-mediated archaeal hecatomb in the deep seafloor. *Sci Adv*. 2016;2:e1600492.

- 28 Ulloa O, Canfield DE, DeLong EF, Letelier RM, Stewart FJ. Microbial oceanography of anoxic oxygen minimum zones. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2012;109:15996–16003.
- 29 Fernández-Urruzola I, Ulloa O, Glud RN, Pinkerton MH, Schneider W, Wenzhöfer F, Escribano R. Plankton respiration in the Atacama Trench region: Implications for particulate organic carbon flux into the hadal realm. *Limnol Oceanogr*. 2021;66:3134–48.
- 30 Parada AE, Needham DM, Fuhrman JA. Every base matters: assessing small subunit rRNA primers for marine microbiomes with mock communities, time series and global field samples. *Environ Microbiol*. 2016;18:1403–1414.
- 31 Alberti A, Poulain J, Engelen S, Labadie K, Romac S, Ferrera I, et al. Viral to metazoan marine plankton nucleotide sequences from the Tara Oceans expedition. *Scientific data*. 2017;4:1–20.
- 32 Rognes T, Flouri T, Nichols B, Quince C, Mahé F. VSEARCH: a versatile open source tool for metagenomics. *PeerJ*. 2016;4:e2584.
- 33 Zhang X, Shao Y, Tian J, Liao Y, Li P, Zhang Y, et al. pTrimmer: an efficient tool to trim primers of multiplex deep sequencing data. *BMC Bioinform*. 2019;20:1–6.
- 34 Altschul SF. BLAST algorithm. *eLS*. 2001.
- 35 Quast C, Pruesse E, Yilmaz P, Gerken J, Schweer T, Yarza P, et al. The SILVA ribosomal RNA gene database project: improved data processing and web-based tools. *Nucleic Acids Res*. 2012;41:590–596.
- 36 Oksanen J, Blanchet FG, Kindt R, Legendre P, Minchin PR, O’hara RB, et al. Package ‘vegan’. *Community ecology package*. 2013;2:1-295.
- 37 Ginestet C. ggplot2: elegant graphics for data analysis. *J R Stat Soc Ser*. 2011;174:245–6.
- 38 De Cáceres M, Legendre P, Moretti M. Improving indicator species analysis by combining groups of sites. *Oikos*. 2010;119:1674–1684.
- 39 Sogin ML, Morrison HG, Huber JA, Welch DM, Huse SM, Neal PR, et al. Microbial diversity in the deep sea and the underexplored “rare biosphere”. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2006;103:12115–12120.
- 40 Lynch MD, Neufeld JD. Ecology and exploration of the rare biosphere. *Nat Rev Microbiol*. 2015;13:217–229.
- 41 Karner MB, DeLong EF, Karl DM. Archaeal dominance in the mesopelagic zone of the Pacific Ocean. *Nature*. 2001;409:507–10.

- 42 Könneke M, Bernhard AE, de la Torre J, Walker CB, Waterbury JB, Stahl DA. Isolation of an autotrophic ammonia-oxidizing marine archaeon. *Nature*. 2005;437:543–546.
- 43 Zhong H, Lehtovirta-Morley L, Liu J, Zheng Y, Lin H, Song D, et al. Novel insights into the Thaumarchaeota in the deepest oceans: their metabolism and potential adaptation mechanisms. *Microbiome*. 2020;8:78.
- 44 Morris RM, Rappé MS, Connon SA, Vergin KL, Siebold WA, Carlson CA, et al. SAR11 clade dominates ocean surface bacterioplankton communities. *Nature*. 2002;420:806–810.
- 45 Pommier T, Canback B, Riemann L, Bostrom KH, Simu K, Lundberg P, et al. Global patterns of diversity and community structure in marine bacterioplankton. *Mol Ecol*. 2007;16:867–880.
- 46 Bertagnolli AD, Padilla CC, Glass JB, Thamdrup B, Stewart FJ. Metabolic potential and in situ activity of marine Marinimicrobia bacteria in an anoxic water column. *Environ Microbiol*. 2017;19:4392–4416.
- 47 Hawley AK, Nobu MK, Wright JJ, Durno WE, Morgan-Lang C, Sage B, et al. Diverse Marinimicrobia bacteria may mediate coupled biogeochemical cycles along eco-thermodynamic gradients. *Nat Commun*. 2017;8:1507.
- 48 Gao ZM, Huang JM, Cui GJ, Li WL, Li J, Wei ZF, et al. In situ meta-omic insights into the community compositions and ecological roles of hadal microbes in the Mariana Trench. *Environ Microbiol*. 2019;21:4092–4108.
- 49 Huang JM, Wang Y. Genomic differences within the phylum Marinimicrobia: From waters to sediments in the Mariana Trench. *Mar Genom*. 2020;50:100699.
- 50 Sheik CS, Jain S, Dick GJ. Metabolic flexibility of enigmatic SAR324 revealed through metagenomics and metatranscriptomics. *Environ Microbiol*. 2014;16:304–317.
- 51 Marshall KT, Morris RM. Isolation of an aerobic sulfur oxidizer from the SUP05/Arctic96BD-19 clade. *ISME J*. 2013;7:452–455.
- 52 Mestre M, Ruiz-González C, Logares R, Duarte CM, Gasol JM, Sala MM. Sinking particles promote vertical connectivity in the ocean microbiome. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2018;115:E6799-807.
- 53 Zhao X, Luo H, He S, Yang B, Wei T, Hu Y, et al. Vertical distribution of size-fractionated bacterial communities in the water column of the Atacama Trench. *Reg Stud Mar Sci*. 2022:102470.

- 54 Sunagawa S, Coelho LP, Chaffron S, Kultima JR, Labadie K, Salazar G, et al. Structure and function of the global ocean microbiome. *Science*. 2015;348:1261359.
- 55 The Human Microbiome Project Consortium. Structure, function and diversity of the healthy human microbiome. *Nature*. 2012;486:207–14.
- 56 Ikeda-Ohtsubo W, Brugman S, Warden CH, Rebel JM, Folkerts G, Pieterse CM. How can we define “optimal microbiota?”: A comparative review of structure and functions of microbiota of animals, fish, and plants in agriculture. *Front Nutr*. 2018;5:90.
- 57 Rinke C, Schwientek P, Sczyrba A, Ivanova NN, Anderson IJ, Cheng JF, et al. Insights into the phylogeny and coding potential of microbial dark matter. *Nature*. 2013;499:431–437.
- 58 Nakai R. Size matters: ultra-small and filterable microorganisms in the environment. *Microbes Environ*. 2020;35:ME20025.
- 59 Huang WC, Liu Y, Zhang X, Zhang CJ, Zou D, Zheng S, et al. Comparative genomic analysis reveals metabolic flexibility of Woesearchaeota. *Nat Commun*. 2021;12:1–14.
- 60 Zaremba-Niedzwiedzka K, Caceres EF, Saw JH, Bäckström D, Juzokaite L, Vancaester E, et al. Asgard archaea illuminate the origin of eukaryotic cellular complexity. *Nature*. 2017;541:353–358.
- 61 Zheng Y, Wang J, Zhou S, Zhang Y, Liu J, Xue CX, et al. Bacteria are important dimethylsulfoniopropionate producers in marine aphotic and high-pressure environments. *Nat Commun*. 2020;11:1–2.
- 62 Roda-Garcia JJ, Haro-Moreno JM, Huschet LA, Rodriguez-Valera F, López-Pérez M. Phylogenomics of SAR116 Clade Reveals Two Subclades with Different Evolutionary Trajectories and an Important Role in the Ocean Sulfur Cycle. *Msystems*. 2021;6:e00944–21.
- 63 Kwon KK, Lee HS, Yang SH, Kim SJ. *Kordiimonas gwangyangensis* gen. nov., sp. nov., a marine bacterium isolated from marine sediments that forms a distinct phyletic lineage (*Kordiimonadales* ord. nov.) in the ‘*Alphaproteobacteria*’. *Int J Syst Evol Microbiol*. 2005;55:2033–2037.
- 64 Corteselli EM, Aitken MD, Singleton DR. Description of *Immundisolibacter cernigliae* gen. nov., sp. nov., a high-molecular-weight polycyclic aromatic hydrocarbon-degrading bacterium within the class *Gammaproteobacteria*, and proposal of *Immundisolibacterales* ord. nov. and *Immundisolibacteraceae* fam. nov. *Int J Syst Evol Microbiol*. 2017;67:925.

- 65 Fang Y, Yuan Y, Liu J, Wu G, Yang J, Hua Z, et al. Casting Light on the Adaptation Mechanisms and Evolutionary History of the Widespread Sumerlaeota. *MBio*. 2021;12:e00350–21.
- 66 Balch WE, Fox GE, Magrum LJ, Woese CR, Wolfe R. Methanogens: reevaluation of a unique biological group. *Microbiol Rev*. 1979;43:260–296.
- 67 Aouad M, Taib N, Oudart A, Lecocq M, Gouy M, Brochier-Armanet C. Extreme halophilic archaea derive from two distinct methanogen Class II lineages. *Mol Phylogenet Evol*. 2018;127:46–54.
- 68 Whittenbury R, Phillips KC, Wilkinson JF. Enrichment, isolation and some properties of methane-utilizing bacteria. *Microbiology*. 1970;61:205–218.
- 69 Ettwig KF, Butler MK, Le Paslier D, Pelletier E, Mangenot S, Kuypers MM, et al. Nitrite-driven anaerobic methane oxidation by oxygenic bacteria. *Nature*. 2010;464:543–548.
- 70 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. *Front Microbiol*. 2013;4:27.
- 71 Santoro AE, Dupont CL, Richter RA, Craig MT, Carini P, McIlvin MR, et al. Genomic and proteomic characterization of “*Candidatus Nitrosopelagicus brevis*”: an ammonia-oxidizing archaeon from the open ocean. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2015;112:1173–1178.
- 72 Wang R, Lin JQ, Liu XM, Pang X, Zhang CJ, Yang CL, et al. Sulfur oxidation in the acidophilic autotrophic *Acidithiobacillus* spp. *Front Microbiol*. 2019;9:3290.
- 73 Nunoura T, Takaki Y, Kazama H, Kakuta J, Shimamura S, Makita H, et al. Physiological and genomic features of a novel sulfur-oxidizing gammaproteobacterium belonging to a previously uncultivated symbiotic lineage isolated from a hydrothermal vent. *PLoS One*. 2014;9:e104959.
- 74 Canfield DE, Stewart FJ, Thamdrup B, De Brabandere L, Dalsgaard T, Delong EF, et al. A cryptic sulfur cycle in oxygen-minimum-zone waters off the Chilean coast. *Science*. 2010;330:1375–1378.
- 75 Chen H, Young S, Berhane TK, Williams HN. Predatory *Bacteriovorax* communities ordered by various prey species. *PLoS One*. 2012;7:e34174.
- 76 Gruber-Vodicka HR, Leisch N, Kleiner M, Hinzke T, Liebeke M, McFall-Ngai M, et al. Two intracellular and cell type-specific bacterial symbionts in the placozoan *Trichoplax* H2. *Nat Microbiol*. 2019;4:1465–1474.

- 77 Utami YD, Kuwahara H, Igai K, Murakami T, Sugaya K, Morikawa T, et al. Genome analyses of uncultured TG2/ZB3 bacteria in ‘Margulisbacteria’ specifically attached to ectosymbiotic spirochetes of protists in the termite gut. *ISME J.* 2019;13:455–467.
- 78 Horn M. Chlamydiae as symbionts in eukaryotes. *Annu Rev Microbiol.* 2008;62:113–131.
- 79 Dharamshi JE, Tamarit D, Eme L, Stairs CW, Martijn J, Homa F, et al. Marine sediments illuminate Chlamydiae diversity and evolution. *Curr Biol.* 2020;30:1032–1048.
- 80 Fuerst JA. Microbial Evolution: Chlamydial Creatures from the Deep. *Curr Biol.* 2020;30:267–269.
- 81 Flemming HC, Wingender J. The biofilm matrix. *Nat Rev Microbiol.* 2010;8:623–633.
- 82 Baker GC, Smith JJ, Cowan DA. Review and re-analysis of domain-specific 16S primers. *J Microbiol Methods.* 2003;55:541–555.
- 83 Hoshino T, Doi H, Uramoto GI, Wörmer L, Adhikari RR, Xiao N, et al. Global diversity of microbial communities in marine sediment. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2020;117:27587–27597.
- 84 De la Torre JR, Walker CB, Ingalls AE, Könneke M, Stahl DA. Cultivation of a thermophilic ammonia oxidizing archaeon synthesizing crenarchaeol. *Environ Microbiol.* 2008;10:810–818.
- 85 Daebeler A, Herbold CW, Vierheilig J, Sedlacek CJ, Pjevac P, Albertsen M, et al. Cultivation and genomic analysis of “*Candidatus Nitrosocaldus islandicus*,” an obligately thermophilic, ammonia-oxidizing thaumarchaeon from a hot spring biofilm in Graendalur Valley, Iceland. *Front Microbiol.* 2018;9:193.
- 86 Bennett KW, Eley A. Fusobacteria: new taxonomy and related diseases. *J Med Microbiol.* 1993;39:246–254.
- 87 Anantharaman K, Brown CT, Burstein D, Castelle CJ, Probst AJ, Thomas BC, et al. Analysis of five complete genome sequences for members of the class Peribacteria in the recently recognized Peregrinibacteria bacterial phylum. *PeerJ.* 2016;4:e1607.
- 88 Garrity GM, Holt JG, Battista JR, Rainey FA, Costa MS, Nobre MF. Phylum BIV. “Deinococcus-Thermus”. In: *Bergey’s Manual® of Systematic Bacteriology.* Springer, New York, NY. 2001. pp 395–420.
- 89 Bazylinski DA, Frankel RB. Magnetosome formation in prokaryotes. *Nat Rev Microbiol.* 2004;2:217–230.

FIGURES

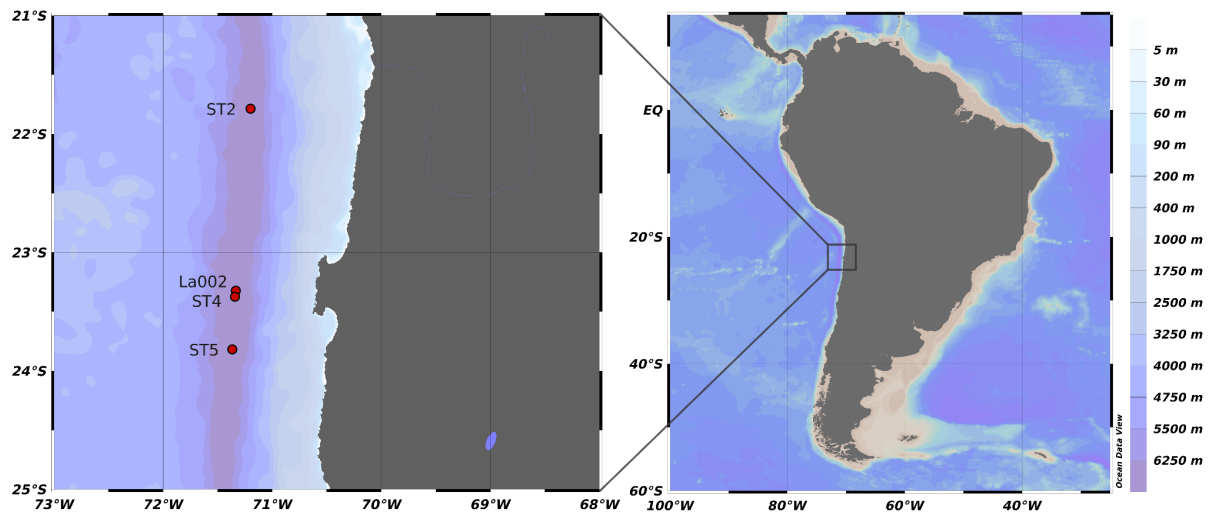


Figure 1. Sampling location. Pelagic stations for sample collection in the Atacama Trench.

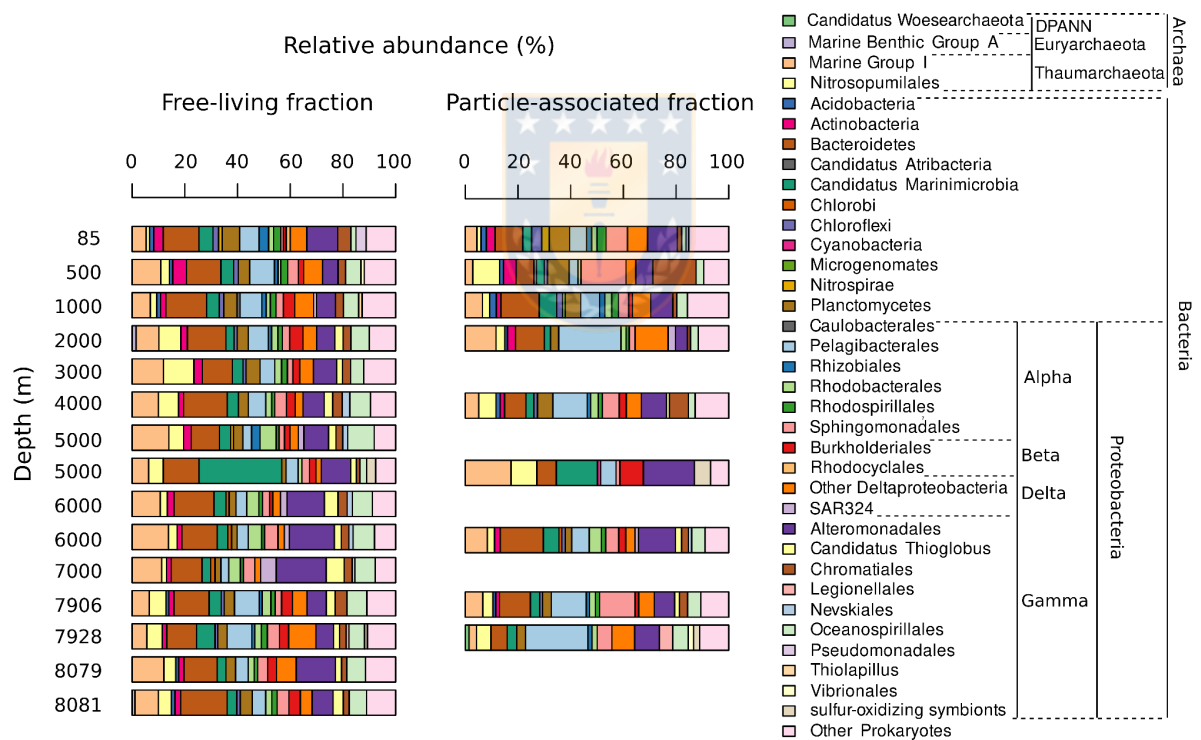


Figure 2. Prokaryoplanktonic community composition along a vertical profile in the Atacama Trench. Relative abundance of abundant bacterial and archaeal taxa (relative abundance $\geq 1\%$ of the community composition) in the water column of the Atacama Trench, considering the free-living (0.22 - 3 μm) and the particle-associated (3 - 20 μm) size fractions.

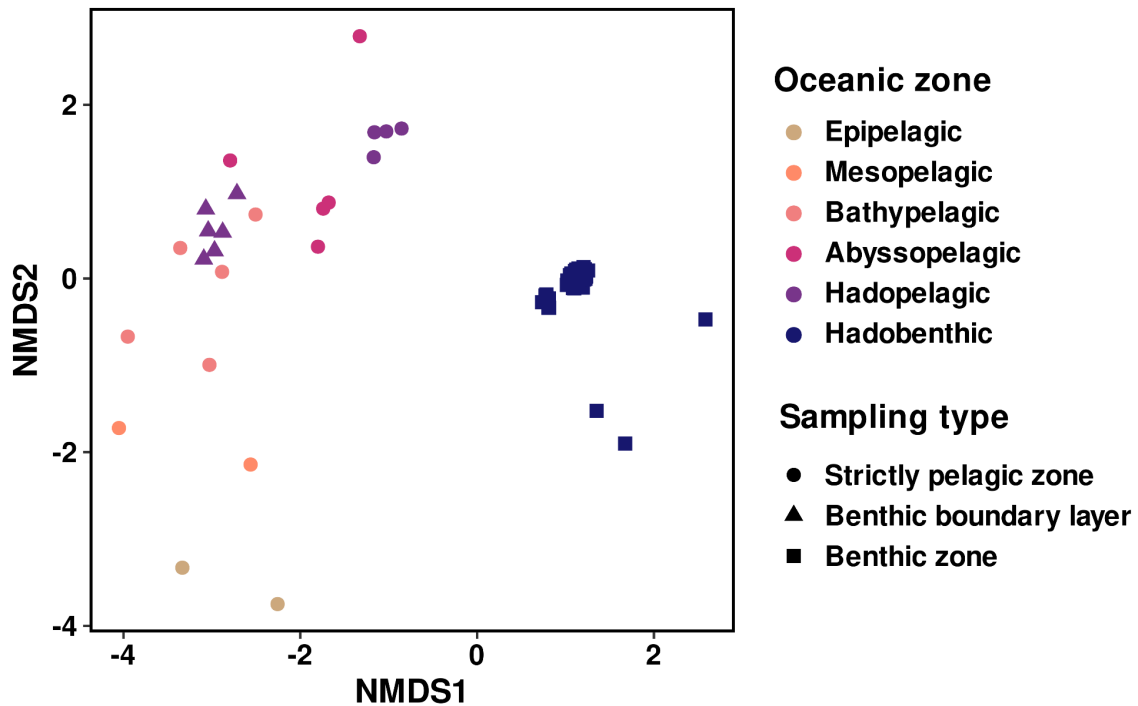


Figure 3. Comparison of the prokaryotic communities between different vertical oceanic zones of the Atacama Trench region considering the relative abundance of ASVs. Non-metric multidimensional scaling (nMDS) of Bray-Curtis dissimilarities of all the samples of the different vertical oceanic zones of the Atacama region highlighting the distinctions between the strictly hadopelagic zone and the hadal benthic boundary layer considering the relative abundance of ASVs.

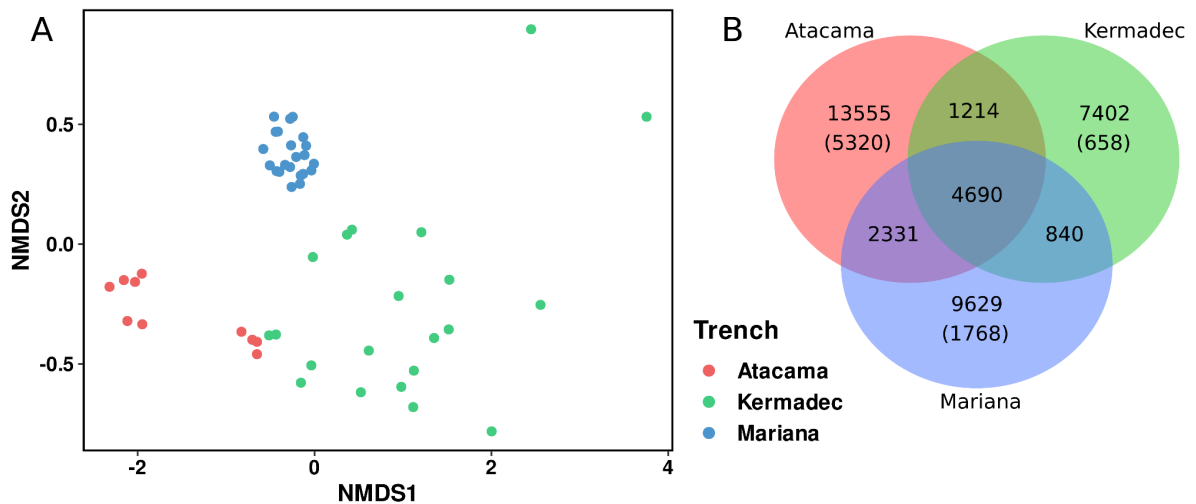
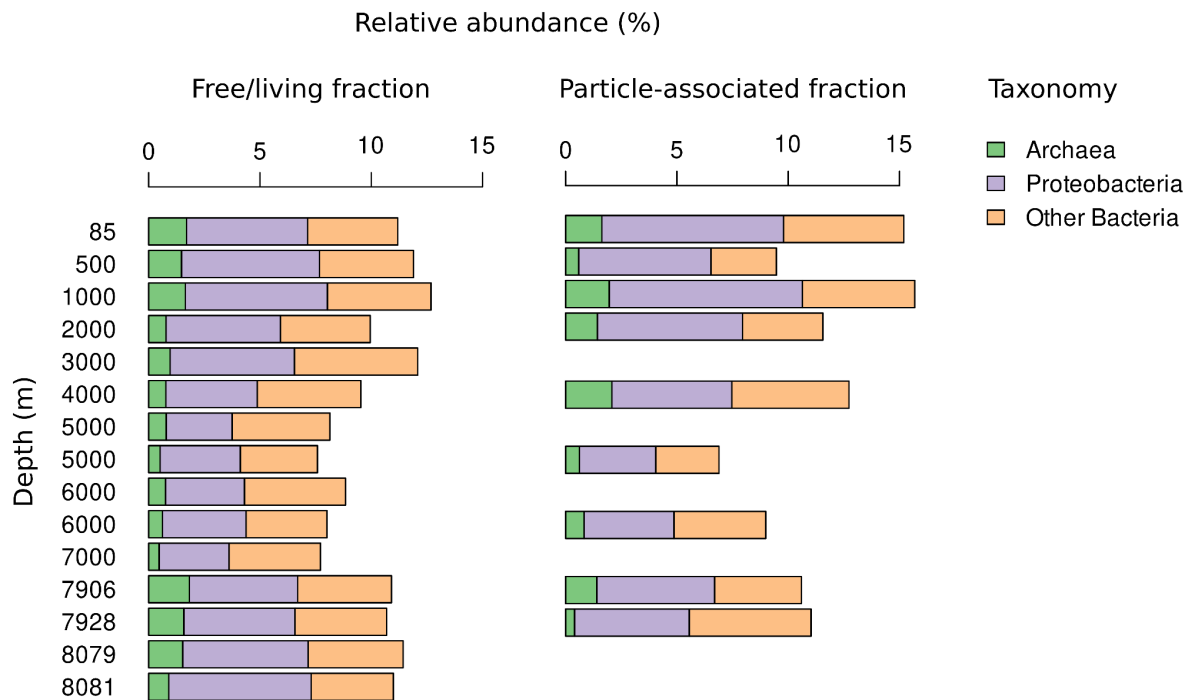


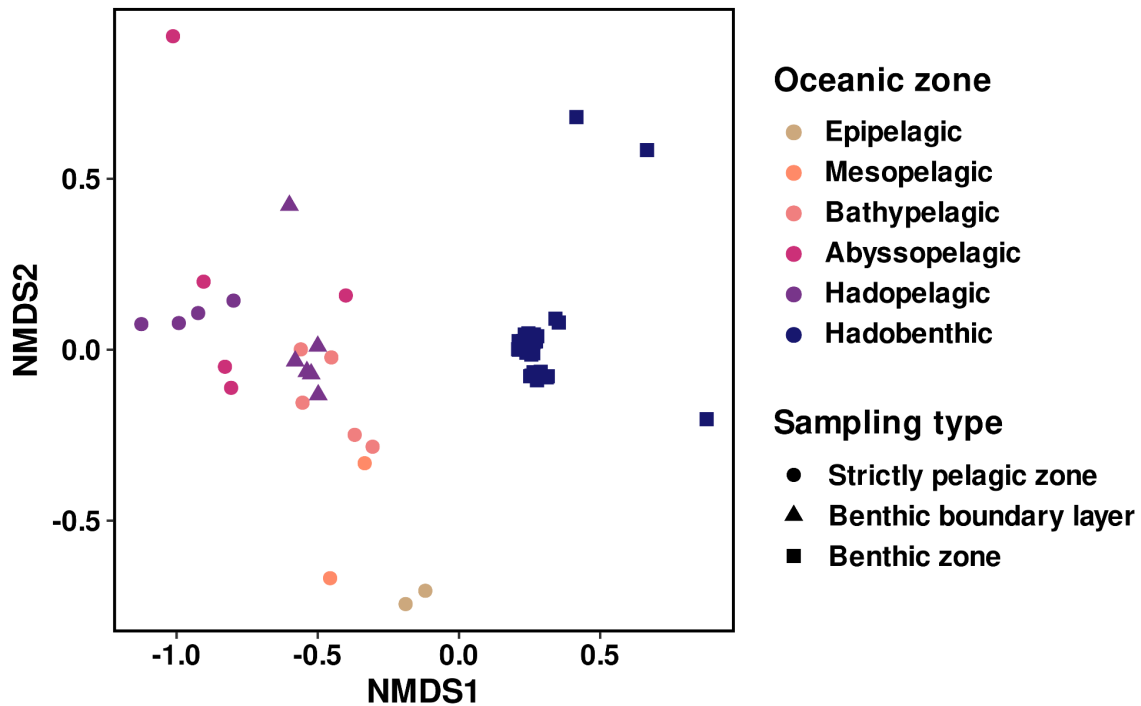
Figure 4. Comparison of the hadal prokaryoplanktonic communities between the Atacama, Mariana and Kermadec trenches considering the abundance of ASVs obtained with universal primers. A Non-metric multidimensional scaling (nMDS) of Bray-Curtis dissimilarities of the hadal samples (> 6 000 m) of the three trenches considering the relative abundance of ASVs. **B** Total number (number not in parenthesis) and unique (number in parenthesis) ASVs detected in every trench and number of shared ASVs between trenches (number in the intersections).



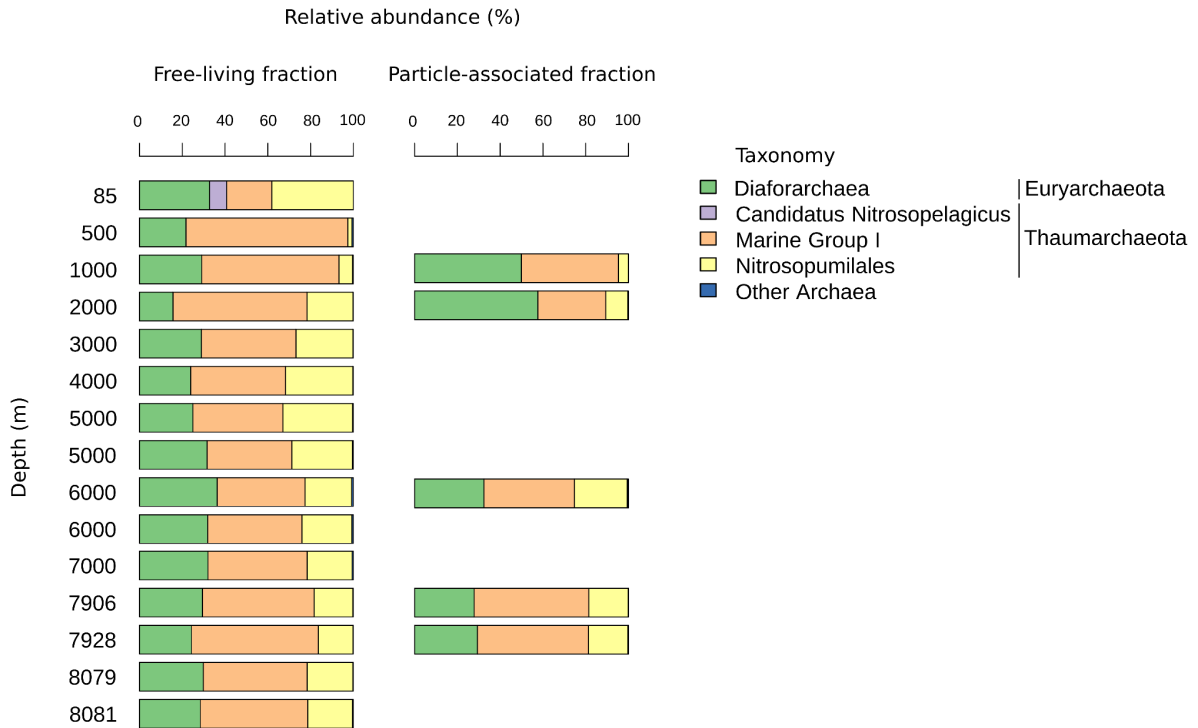
SUPPLEMENTARY MATERIAL



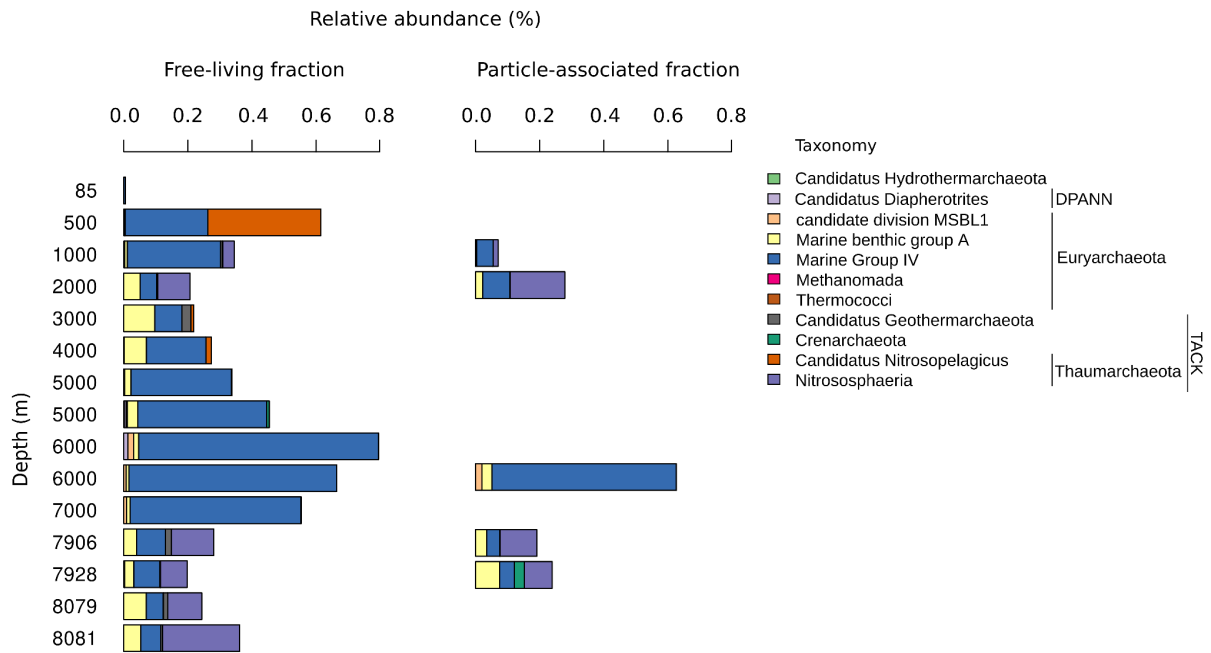
Supplementary Figure 1. Relative abundance of the major groups of the pelagic rare biosphere of the Atacama Trench region. Proportion of Archaea, Proteobacteria and other Bacteria (i.e., different from Proteobacteria) composing the pelagic rare biosphere (i.e., taxa comprising < 1% of the total community composition) of the Atacama Trench region, considering the free-living (0.22 - 3 μm) and the particle-associated (3 - 20 μm) size fractions.



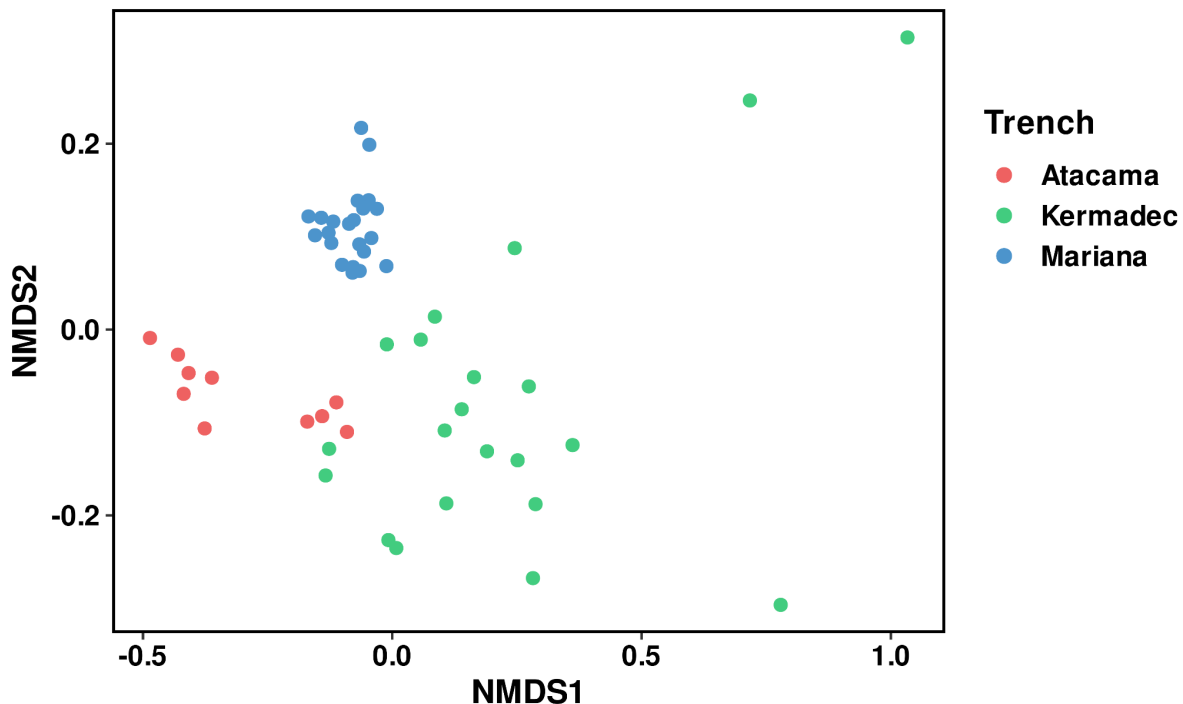
Supplementary Figure 2. Comparison of the prokaryoplanktonic communities between different vertical oceanic zones of the Atacama Trench region considering the abundance of taxa. Non-metric multidimensional scaling (nMDS) of Bray-Curtis dissimilarities of all the samples of the different vertical oceanic zones of the Atacama Trench region highlighting the distinctions between the strictly hadopelagic zone and the hadal benthic boundary layer considering the relative abundance of taxa.



Supplementary Figure 3. Archaeoplanktonic community composition of the Atacama Trench. Relative abundance of abundant archaeal taxa (relative abundance > 1% of the community composition) in the water column of the Atacama Trench region obtained with archaea-specific primers, considering the free-living (0.22 - 3 μm) and the particle-associated (3 - 20 μm) size fractions.



Supplementary Figure 4. Archaeoplanktonic rare biosphere of the Atacama Trench. Relative abundance of rare archaeal taxa (relative abundance < 1% of the community composition) in the water column of the Atacama Trench region obtained with archaea-specific primers, considering the free-living (0.22 - 3 μm) and the particle-associated (3 - 20 μm) size fractions.



Supplementary Figure 5. Comparison of the hadal prokaryoplanktonic communities between the Atacama, Mariana and Kermadec trenches considering the abundance of taxa. Non-metric multidimensional scaling (nMDS) of Bray-Curtis dissimilarities of the hadal samples (> 6 000 m) between the Atacama, Mariana and Kermadec trenches, considering the relative abundance of taxa.

Supplementary Table 1. Pelagic sample collection locations performed in the Atacama Trench.

Supplementary Table 2. Information of the access to the genetic sequences stored in public databases and used in this study.

Supplementary Table 3. Abundance of ASVs obtained with general primers with its respective taxonomy according to SILVA Database in the samples used in this study.

Supplementary Table 4. Categorization of abundance of prokaryotic taxa in the samples of the Atacama Trench. A taxon was considered abundant, rare or absent if its relative abundance in the samples was $\geq 1\%$, $< 1\%$ or 0% of the total community composition per sample.

Supplementary Table 5. Categorization of samples used in this study according to vertical oceanic zone of collection, depth and life style of prokaryotes.

Supplementary Table 6. Abundance of ASVs obtained with archaea-specific primers with its respective taxonomy according to SILVA Database in the samples used in this study.

Supplementary Table 7. Archaeal taxa detected with general and/or archaea-specific primers.

Supplementary Table 8. Indicator species of the Atacama, Mariana and Kermadec trenches according to Indicator Species Analysis.



5. DISCUSIÓN

5.1 Procariontes dominantes de la columna de agua de la Fosa de Atacama

La Fosa de Atacama mostró una estructura típica de comunidades microbianas ambientales, compuesta por unos pocos taxa abundantes y varios taxa raros (Sogin et al., 2006; Lynch & Neufeld, 2015) (Figure 2). Los taxa con una abundancia relativa igual o superior al 1% del total de la comunidad procarioplantónica por muestra se consideraron abundantes. El taxon arqueano dominante de la columna de agua y, en particular, en la zona hadal fue Thaumarchaeota (Marine Group I [2,81 - 13,79%] y orden Nitrosopumilales [1,83 - 6,36%]) (Figure 2). Este taxon es uno de los procariontes más abundantes en el océano y es bien conocido por desempeñar un papel importante en los ciclos del carbono y del nitrógeno a través de la fijación del carbono y de la mayor parte de la oxidación del amonio en los ambientes marinos (Karner et al., 2001; Könneke et al., 2005). Estudios previos han demostrado que los genes de Thaumarchaeota relacionados con estas funciones están siendo activamente transcritos en la Fosa de las Marianas, lo que significa que este taxon es viable a profundidades hadales (Zhong et al., 2020). Por otro lado, los taxa bacterianos dominantes fueron Bacteroidetes (6,15 - 17,62%), *Candidatus* (Ca.) Marinimicrobia (3,29 - 6,97%), Alphaproteobacteria (Pelagibacterales [2,97 - 23,68%] y Sphingomonadales [2,39 - 13,45%]) y Gammaproteobacteria (*Ca.* Thioglobus [0,48 - 6,79%], Alteromonadales [6,71 - 18,96%], Chromatiales [0,89 - 4,46%] y Oceanospirillales [5,01 - 8,11%]) (Figure 2). Planctomycetes (2,08 - 4,56%), Betaproteobacteria (Burkholderiales [0,41 - 4,35%]) y otras Deltaproteobacteria (2,23 - 10,33%) fueron más abundantes en la parte más profunda de la Fosa de Atacama, mientras que SAR324 (0,04 - 5,90%) fue particularmente abundante en la facción FL a 7000 m (Figure 2). Estos taxa bacterianos son ubicuos en ambientes pelágicos y aquellos que componen la mayor parte de la abundancia relativa son bien conocidos por ser típicamente heterótrofos, como Bacteroidetes, Sphingomonadales, Alteromonadales, Oceanospirillales y el taxon dominante en el océano global: Pelagibacterales (Morris et al., 2002; Pommier et al., 2007). Otros taxa se caracterizan por tener representantes autótrofos, como *Ca.* Marinimicrobia, Deltaproteobacteria, *Ca.* Thioglobus y Chromatiales. A pesar de que las capacidades metabólicas de *Ca.* Marinimicrobia han sido poco estudiadas, los linajes de este taxon pueden fijar carbono y utilizar diferentes aceptores de electrones cuando el oxígeno no está presente (Bertagnolli et al., 2017; Hawley et al., 2017). Sin embargo, en congruencia con los ambientes hadopelágicos caracterizados por estar bien oxigenados y con

altas concentraciones de materia orgánica, no se han encontrado genes que codifiquen para la fijación autotrófica del carbono en los genomas hadales de *Ca. Marinimicrobia*, lo que sugiere un estilo de vida heterótrofo en las fosas (Gao et al., 2019; Huang & Wang, 2020). *Ca. Marinimicrobia* y Pelagibacterales también son abundantes en la OMZ suprayacente del Océano Pacífico Sur Oriental, mientras que el metabólicamente versátil SAR324 (Sheik et al., 2014) y el oxidante del azufre *Ca. Thioglobus* (Marshall & Morris, 2013) están particularmente enriquecidos en este hábitat (Ulloa et al., 2012). Aunque estos taxones son ubicuos en el océano, parte de su diversidad en la Fosa de Atacama podría provenir de la ZMO, que podría actuar como un banco de semillas, suministrando células microbianas a través de partículas que se hunden, sin embargo, la conexión potencial entre estos dos ecosistemas no ha sido establecida (Buesseler & Boyd., 2009; Xu et al., 2021). En contraste con nuestros resultados y los reportados para otras fosas, Zhao et al. (2022) encontraron que el phylum Firmicutes es dominante en la columna de agua de la Fosa de Atacama. Sin embargo, este taxón no es característicamente abundante en ambientes pelágicos (Pommier et al., 2007; Sunagawa et al., 2015), pero es un componente abundante de la microbiota humana y del tracto digestivo de otros animales, por lo que es altamente indicativo de contaminación (The Human Microbiome Project Consortium, 2012; Ikeda-Ohtsubo et al., 2018). El taxon arqueano *Ca. Woesearchaeota* superó el 1% de abundancia relativa (1,43%) sólo en la muestra más profunda de la fracción PA (7928 m) (Figure 2). Este taxon es más abundante en la fracción FL ultrapequeña (0,1 - 0,2 μm) de la Fosa de las Marianas (Peoples et al., 2018), lo cual es razonable si se tiene en cuenta su pequeño tamaño celular. Esta última fracción de tamaño no fue considerada en este estudio, por lo que es posible que se esté subestimando la abundancia de arqueas de pequeño tamaño del supergrupo DPANN y de bacterias del grupo Candidate Phyla Radiation (Rinke et al., 2013; Nakai, 2020). Aunque sus capacidades metabólicas no están claras, se ha propuesto que *Ca. Woesearchaeota* es un heterótrofo fermentador anaeróbico (Huang et al., 2021). El marcado predominio de arqueas autótrofas y taxa bacterianos heterótrofos sugiere la ocurrencia de una activa fijación de carbono y un intenso consumo de materia orgánica. Para complementar estos resultados serán necesarias más estudios genómicos y transcriptómicos, combinados con aproximaciones geoquímicas que permitan conocer la composición elemental e isotópica del ambiente.

5.2 La biósfera rara pelágica de la Fosa de Atacama

La biósfera rara se refiere al gran número de taxa microbianos que se encuentran en un ecosistema, pero en bajas abundancias (Sogin et al., 2006; Lynch & Neufeld, 2015). Los taxa con una abundancia relativa inferior al 1% del total de la comunidad procarioplanctónica por muestra se consideraron raros y, por tanto, parte de la biósfera rara. Los taxa raros representaron entre el 6,89 y el 15,69% del total de la comunidad procarioplanctónica del conjunto de datos de la Fosa de Atacama. Las arqueas representaron entre el 3,65 y el 16,76%, Proteobacteria entre el 36,35 y el 62,71% y otras Bacterias entre el 31,04 y el 53,92% de la biósfera rara pelágica (Supplementary Figure 1). La composición de los taxa raros resultó ser sumamente diversa y sugiere la existencia de una amplia variedad de potencial metabólico y funciones ecológicas de los procariontes. El phylum *Ca. Atribacteria* formó parte de la biósfera rara en todas las muestras hadales con una abundancia relativa máxima del 0,35%. Schauberger et al. (2021a) informaron de que este taxon era abundante en los sedimentos ferruginosos más profundos de la Fosa de Atacama, alcanzando el 29% de la comunidad procarionte a 40 - 45 cm de profundidad, pero era raro en las condiciones bentónicas nitrogenadas y óxicas más superficiales. Estos autores plantearon que las células eran suministradas por bancos de semillas pelágicas que luego se depositaban y enterraban en los sedimentos. Nuestros resultados apoyan que *Ca. Atribacteria* que prolifera en los sedimentos de la Fosa de Atacama cuando el oxígeno y el nitrato están agotados procede de la columna de agua. Esto también puede ser cierto para los taxa arqueanos típicamente bentónicos *Ca. Hydrotermarchaeota*, *Ca. Woesearchaeota*, *Crenarchaeota* y el grupo *Asgard*, que son miembros de la rara biósfera pelágica, pero que se ha reportado que son más abundantes en la sección ferruginosa de los sedimentos de la Fosa de Atacama (Schauberger et al. 2021a). Otro taxon arqueano raro detectado fue *Ca. Heimdallarchaeota* del grupo *Asgard*, el ancestro más probable de los eucariontes hasta la fecha (Zaremba-Niedzwiedzka et al., 2017). Los taxa raros podrían estar contribuyendo directamente al ciclo del carbono a través de la degradación aeróbica de compuestos orgánicos específicos y posiblemente abundantes en las fosas, como el dimetilsulfoniopropionato por parte de SAR116 (*Alphaproteobacteria*) (Zheng et al., 2020, Roda-Garcia et al., 2021), hidrocarburos aromáticos policíclicos por *Kordiimonadales* (*Alphaproteobacteria*) e *Immundisolibacterales* (*Gammaproteobacteria*) (Kwon et al., 2005; Corteselli et al., 2017) y celulosa y quitina por *Ca. Sumerlaeota* (Fang et al., 2021; Xu et al., 2021). Se detectaron potenciales metanógenos, como *Methanomada* y *Stenosarchaea* (*Euryaechaeota*) (Balch et al., 1979; Aouad et al.,

2018), y metanótrofos como Methylococcales (Gammaproteobacteria) (Whittenbury et al., 1970) y *Ca. Methyloirabilis* (división candidata NC10) (Ettwig et al., 2010), lo que sugiere la existencia de un ciclo activo del metano en microambientes anóxicos. *Ca. Methyloirabilis* es capaz de realizar la oxidación anaeróbica del metano acoplada a la reducción del nitrito, vinculando el metano al ciclo del nitrógeno (Ettwig et al., 2010). Las bacterias autótrofas oxidantes del nitrito Nitrospinae y Nitrospirae y la arquea oxidante del amonio *Ca. Nitrosopelagicus* (Thaumarchaeota) podrían ser agentes clave no solo del ciclo del nitrógeno, sino de la fijación de carbono en la Fosa de Atacama (Lücker et al., 2013; Santoro et al., 2015). Por otro lado, la presencia de la clase de Proteobacteria oxidante del azufre Acidithiobacillia (Wang et al., 2019) y el género de Gammaproteobacteria *Ca. Thiopillulus* (Nunoura et al., 2014) y los órdenes de Deltaproteobacteria reductores de sulfato que habitan en la OMZ, Desulfobacterales y Desulfovibrionales (Canfield et al., 2010), sugieren la existencia de un ciclo activo del azufre en microambientes anóxicos en la columna de agua de la Fosa de Atacama. Otros procariontes raros son bien conocidos por establecer estrechas interacciones con otros organismos. Por ejemplo, *Bacteriovorax* (Oligoflexia) y Maricaulales (Alphaproteobacteria) se caracterizan por depredar otras bacterias (Chen et al., 2012). *Ca. Margulisbacteria* es conocida por entablar relaciones simbióticas como endosimbiontes de eucariontes macro y microscópicos (Gruber-Vodicka et al., 2019, Utami et al., 2019) y Chlamydiae como endosimbiontes de eucariontes microbianos, patógenos de animales e hipotéticamente de vida libre (Horn, 2008; Dharamshi et al., 2020; Fuerst, 2020). No obstante, el hecho de que estas funciones se estén llevando a cabo en la Fosa de Atacama sigue siendo un misterio, pero es necesario seguir investigando en el ámbito de las meta-ómicas y la genómica de célula única para poder desenmarañar la ecología microbiana de la zona hadal.

5.3 Características intra-fosa de la Fosa de Atacama

El patrón intra-fosa ampliamente aceptado hasta ahora es que las comunidades procariontes varían en las distintas zonas oceánicas, destacando las marcadas diferencias entre la zona hadal y las zonas suprayacentes, especialmente considerando la zona abisal adyacente. Esto es cierto para las comunidades procarioplánctónicas de todas las demás fosas estudiadas exhaustivamente: las Marianas (Nunoura et al., 2015; Peoples et al., 2018), Kermadec (Peoples et al., 2018) y Japón (Nunoura et al., 2016). Las comunidades procariontes bentónicas hadales de las fosas de Izu-Ogasawara (Hiraoka et al., 2020), Kermadec y

Atacama (Schauberger et al., 2021a) también son diferentes a las de las planicies abisales. Este carácter único de las comunidades biológicas hadales en comparación con otros ecosistemas oceánicos es lo que define el concepto de "biósfera hadal" (Nunoura et al., 2015, Liu et al., 2018). En la Fosa de Atacama, las comunidades procarioplánctónicas de la zona hadal difirieron significativamente de las de la zona abisal y de las otras zonas oceánicas suprayacentes (i.e. zonas epipelágica, mesopelágica y batipelágica) y también con las comunidades procariobentónicas de los sedimentos hadales óxicos, según la composición de ASVs ($p < 0,05$, $R = 0,9652$) y la composición taxonómica ($p < 0,05$, $R = 0,9244$) (Figure 3 y Supplementary Figure 2). Estos resultados han confirmado la existencia de una biósfera hadal pelágica única en la Fosa de Atacama. Las diferencias entre las comunidades hadales y las de las zonas oceánicas suprayacentes pueden estar relacionadas con las distintas condiciones tróficas a lo largo de la columna de agua debido a la atenuación de la productividad primaria superficial y a la canalización de la materia orgánica en el interior de las fosas, aunque se requieren estudios más detallados que relacionen las comunidades microbianas pelágicas y la disponibilidad de materia orgánica (Buesseler & Boyd., 2009; Xu et al., 2021). También, investigaciones anteriores ya han puesto de manifiesto la diferencia entre las comunidades microbianas pelágicas y bentónicas, ya que las condiciones de la columna de agua difieren notablemente de las de los sedimentos, que se caracterizan por un intenso gradiente redox (Schauberger et al., 2021a) y por la presencia de biopelículas (Flemming & Wingender, 2010). Por lo tanto, la Fosa de Atacama alberga una biósfera hadal bentónica distintiva y una biósfera hadal pelágica recientemente descubierta.

Además, como se evidencia en la Figure 3, las comunidades procarioplánctónicas hadales se concentran en dos subgrupos claramente distinguibles que corresponden a zonas de muestreo diferentes: la zona estrictamente pelágica (6 000 - 7 000 m) y la capa límite de fondo (BBL, del inglés "benthic boundary layer"; 7906 - 8081 m). Ambos subgrupos se trataron por separado en la comparación de las comunidades procariontes mediante nMDS de las disimilitudes de Bray-Curtis según la composición de ASVs y la composición taxonómica (Figure 3 y Supplementary Figure 2). ANOSIM indicó que las comunidades procarioplánctónicas de la zona estrictamente hadopelágica diferían significativamente de las de la BBL, según ASV ($p < 0,05$, $R = 0,9751$) y composición taxonómica ($p < 0,05$, $R = 0,939$). Se trata de un resultado sin precedentes, ya que esta característica intra-fosa nunca se había observado en otra fosa. Estos resultados son complementarios a la existencia de una biósfera hadal pelágica, ya que implican que las comunidades procarioplánctónicas de la Fosa de Atacama no sólo son diferentes de las de otros ecosistemas oceánicos, sino que además

presentan un patrón intra-fosa de dos subgrupos comunitarios distintos (i.e. la comunidad estrictamente hadopelágica vs. BBL) que no ha sido descrito en ninguna otra fosa hasta la fecha.

5.4 Discrepancia entre partidores universales y específicos para arqueas

Los partidores universales no son tan eficaces en la detección de arqueas debido a la falta de correspondencia con la hebra molde, lo que puede resultar en una subestimación de este dominio en las comunidades procariontes y en la no detección de ciertos phyla arqueanos (Baker et al., 2003; Hoshino et al., 2020). Por lo tanto, en este estudio se utilizaron partidores específicos para arqueas de la región V4-V5 del gen 16S ARNr para lograr una cobertura más exhaustiva de la diversidad arqueana en la columna de agua de la Fosa de Atacama. La composición de la comunidad de arqueas obtenida con los partidores universales difirió de la obtenida con los partidores específicos para arqueas (Supplementary Table 7). Los partidores universales abarcaron 20 taxa y los específicos para arqueas abarcaron 13, mientras que 11 taxa fueron cubiertos por ambos partidores en la Fosa de Atacama (Supplementary Table 7). Los taxa dominantes de la comunidad arqueana utilizando los partidores específicos para arqueas fueron *Diaforarchaea* (Euryarchaeota), Nitrosopumilales y Marine Group I con abundancias relativas de 15,69 - 57,66%, 1,94 - 38,16% y 21,01 - 75,68%, respectivamente (Supplementary Figure 4). *Ca. Nitrosopelagicus* (Thaumarchaeota) únicamente fue dominante en la fracción FL de la muestra de 85 m (7,98%) (Supplementary Figure 4 y 5). Los taxa arqueanos dominantes fueron cubiertos por ambos partidores. Los taxa cubiertos exclusivamente por los partidores universales fueron *Ca. Heimdallarchaeota* del grupo Asgard, *Ca. Altiarchaeota*, *Ca. Pacearchaeota* y *Ca. Woesearchaeota* del grupo DPANN y *Stenosarchaea* y candidate division Sediment Archaea-1 del phylum Euryarchaeota (Supplementary Table 7). Por otro lado, los taxa que fueron abarcados exclusivamente por partidores específicos para arqueas fueron *Geothermarchaeota* y la clase Nitrososphaeria (géneros *Ca. Nitrosocaldus* y *Nitrososphaera*) del grupo TACK y Thermococci (Euryarchaeota). *Ca. Nitrosocaldus* se detectó en la BBL de la Fosa de Atacama en abundancias relativas muy bajas (0,001 - 0,002%). Este género es típicamente un habitante de aguas termales, termófilo y oxidante del amonio (De la Torre et al., 2008; Daebeler et al., 2018). Las secuencias genéticas relacionadas con *Ca. Nitrosocaldus* fueron detectadas en el océano por primera vez por Zhong et al. (2020), sin embargo este género nunca había sido reportado en una fosa oceánica hasta ahora. El hecho de que los partidores específicos para

arqueas no coincidieran con ciertos taxa arqueanos que sí lo hicieron con los partidores universales, indica que su especificidad no es absoluta. Combinar diferentes conjuntos de partidores universales y específicos para arqueas parece ser el mejor enfoque para obtener una visión más completa de la diversidad arqueana. Esto pone de manifiesto lo poco estudiadas que están las arqueas y la necesidad de diseñar partidores más rigurosos para este dominio a medida que se descubren nuevos taxa y las secuencias de 16S ARNr de arqueas aumentan en las bases de datos.

5.5 Características inter-fosa de la Fosa de Atacama en comparación a otras fosas

Las comunidades procarioplantónicas de la Fosa de Atacama se compararon con las de las fosas de Kermadec y de las Marianas. Parte de los datos de la Fosa de Kermadec son nuevos y otra parte ha sido revisitada del trabajo de Peoples et al. (2018) junto con los datos de la Fosa de las Marianas. El conjunto de datos combinados de muestras hadales de las fosas de Atacama, Kermadec y las Marianas consta de 53 muestras y un total de 16821 ASVs. La riqueza de ASVs hadales en la fosa de Atacama fue mayor en comparación con las fosas de las Marianas (9629) y Kermadec (7402) (Figure 4B). Además, el número de ASVs únicos (i.e. ASVs presentes en una fosa, pero no en las otras) fue también mayor en la Fosa de Atacama (5320) en comparación con las fosas de Kermadec (658) y las Marianas (1768). La Fosa de Atacama compartió el 13,86% del total de ASVs hadales con la Fosa de las Marianas y el 7,22% con la Fosa de Kermadec (Figure 4B). Las comunidades procarioplantónicas de la zona hadal de la Fosa de Atacama difieren significativamente de las de las fosas de Kermadec y las Marianas según la composición de ASVs ($p < 0,05$, $R = 0,6899$) y la composición taxonómica ($p < 0,05$, $R = 0,5402$) (Figure 4A y Supplementary Figure 6). Las comunidades de Kermadec y las Marianas también difieren entre sí, coincidiendo con los resultados obtenidos por Peoples et al. (2018). Schauberger et al. (2021a) encontraron una tendencia comparable en los sedimentos hadales, donde las comunidades procariontes bentónicas de la Fosa de Atacama también fueron diferentes a las de la Fosa de Kermadec. Para evaluar qué taxa son representativos de la Fosa de Atacama en contraste con las otras fosas, se aplicó el Análisis de Especies Indicadoras. Según este análisis, 45 clasificaciones taxonómicas fueron consideradas indicadoras de la Fosa de Atacama. Una fracción menor de los taxa indicadores son abundantes en la zona hadopelágica (Figure 2), como Oceanospirillales, Burkholderiales, Sphingomonadales y los habitantes típicos de la OMZ Pelagibacterales y *Ca. Thioglobus*. Más del 90% de los taxa indicadores de la Fosa de

Atacama son miembros de la biósfera rara pelágica, como las arqueas *Ca. Nitrosopelagicus*, Marine Benthic Group A, *Stenosarchaea*, *Ca. Lokiarchaeota* y *Ca. Woesearchaeota*. Algunos taxa bacterianos indicadores interesantes son los potenciales patógenos *Fusobacteria* (Bennett & Eley, 1993), las potencialmente fermentadoras *Ca. Peregrinibacteria* (Anantharaman et al., 2016), los extremófilos aeróbicos *Deinococcus-Thermus* (Garrity et al., 2001), los magnetotácticos *Magnetococcales* (Bazylinski & Frankel, 2004) y los previamente discutidos *Ca. Thiopapillus*, *Kordiimonadales*, *Immundisolibacterales*, *Methylococcales* y *Ca. Atribacteria*. Las diferencias entre la Fosa de Atacama y las fosas de Kermadec y las Marianas pueden estar relacionadas con sus características distintivas, como la profundidad y las condiciones tróficas. Las fosas de Kermadec y las Marianas están sometidas a una mayor presión hidrostática en el fondo porque son más de 2000 m más profundas que la Fosa de Atacama. Además, a diferencia de las fosas de las Marianas y Kermadec, que son oligotróficas, la Fosa de Atacama se considera una fosa eutrófica debido a las altas concentraciones de materia orgánica presumiblemente procedentes del productivo Sistema de Surgencia de Humboldt. El mayor aporte de materia orgánica que ingresa a la Fosa de Atacama puede estar modulando la estructura de las comunidades procariontes (Xu et al., 2021). Otra característica relevante es el desarrollo de una OMZ en las aguas suprayacentes (Ulloa et al., 2012) que posiblemente esté proporcionando procariontes propios hacia las profundidades hadales, tal y como demuestra la presencia de algunos habitantes típicos de la OMZ como parte de los taxa tanto dominantes como raros detectados en la Fosa de Atacama. Estos resultados confirman el carácter único de las comunidades procarioplánctónicas de la Fosa de Atacama y apoyan la idea de que cada fosa tiene una biósfera hadal con una impronta procarionte distintiva.

6. CONCLUSIONES

En este estudio se han caracterizado por primera vez las comunidades procarioplánctónicas de la Fosa de Atacama, sus características intra-fosa y la comparación inter-fosa con las comunidades de las fosas de las Marianas y Kermadec. En consideración de los resultados obtenidos en este estudio se puede concluir lo siguiente:

1. Las comunidades procarioplanctónicas de la Fosa de Atacama están compuestas principalmente por bacterias y arqueas reconocidas por sus hábitos pelágicos en el océano global.
2. Las arqueas dominantes en la Fosa de Atacama corresponden al phylum típicamente autótrofo y oxidante del amonio: Thaumarchaeota. Por otro lado, las bacterias dominantes corresponden a los taxa potencialmente heterótrofos: Bacteroidetes, *Ca.* Marinimicrobia, Pelagibacterales, Sphingomonadales, Alteromonadales y Oceanospirillales. La presencia de estos taxa indica el activo desarrollo de los ciclos del carbono y del nitrógeno en la Fosa de Atacama.
3. Los taxa que componen la biósfera rara pelágica de la Fosa de Atacama son sumamente diversos y sugieren la existencia de una amplia variedad de potencial funcional, versatilidad metabólica e interacciones biológicas, incluso con organismos del dominio Eukarya.
4. Las comunidades procarioplanctónicas de la Fosa de Atacama son diferentes de las que habitan en los sedimentos hadales óxicos subyacentes y las zonas oceánicas suprayacentes, incluyendo la zona abisopelágica adyacente. Lo anterior confirma la existencia de una biósfera hadal pelágica en la Fosa de Atacama.
5. Una característica sin precedentes en fosas oceánicas es que las comunidades procarioplanctónicas de la zona hadal de la Fosa de Atacama se diferencian claramente entre las que son estrictamente pelágicas y aquellas que habitan en la BBL. Lo anterior indica que la biósfera hadal de la Fosa de Atacama está conformada por dos subgrupos enfrentados a condiciones distintas dentro de un mismo ambiente.
6. Las comunidades procarioplanctónicas de la Fosa de Atacama son distintas de las de las fosas de las Marianas y Kermadec. Lo anterior resalta la idea de que cada fosa tiene una biósfera hadal única modulada por condiciones ambientales particulares y compuesta por unos pocos taxa de procariontes abundantes, pero por una gran cantidad de taxa raros que son claves en la contribución a las diferencias inter-fosa.

En concordancia con los resultados expuestos en la presente investigación, se aceptan las hipótesis planteadas.

7. REFERENCIAS

1. Anantharaman, K., Brown, C. T., Burstein, D., Castelle, C. J., Probst, A. J., Thomas, B. C., Williams, K. H., & Banfield, J. F. (2016). Analysis of five complete genome sequences for members of the class Peribacteria in the recently recognized Peregrinibacteria bacterial phylum. *PeerJ*, 4, e1607.
2. Aouad, M., Taib, N., Oudart, A., Lecocq, M., Gouy, M., & Brochier-Armanet, C. (2018). Extreme halophilic archaea derive from two distinct methanogen Class II lineages. *Molecular phylogenetics and evolution*, 127, 46-54.
3. Bach, L. T., Boxhammer, T., Larsen, A., Hildebrandt, N., Schulz, K. G., & Riebesell, U. (2016). Influence of plankton community structure on the sinking velocity of marine aggregates. *Global Biogeochemical Cycles*, 30(8), 1145-1165.
4. Baker, G. C., Smith, J. J., & Cowan, D. A. (2003). Review and re-analysis of domain-specific 16S primers. *Journal of microbiological methods*, 55(3), 541-555.
5. Balch, W. E., Fox, G. E., Magrum, L. J., Woese, C. R., & Wolfe, R. (1979). Methanogens: reevaluation of a unique biological group. *Microbiological reviews*, 43(2), 260-296.
6. Bartlett, D. H. (2002). Pressure effects on in vivo microbial processes. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Protein Structure and Molecular Enzymology*, 1595(1-2), 367-381.
7. Bazylinski, D. A., & Frankel, R. B. (2004). Magnetosome formation in prokaryotes. *Nature Reviews Microbiology*, 2(3), 217-230.
8. Bennett, K. W., & Eley, A. (1993). Fusobacteria: new taxonomy and related diseases. *Journal of medical microbiology*, 39(4), 246-254.
9. Bertagnolli, A. D., Padilla, C. C., Glass, J. B., Thamdrup, B., & Stewart, F. J. (2017). Metabolic potential and in situ activity of marine Marinimicrobia bacteria in an anoxic water column. *Environmental microbiology*, 19(11), 4392-4416.
10. Britton, J. C., & Morton, B. (1994). Marine carrion and scavengers. *Oceanography and Marine Biology: an annual review*.
11. Buesseler, K. O., & Boyd, P. W. (2009). Shedding light on processes that control particle export and flux attenuation in the twilight zone of the open ocean. *Limnology and Oceanography*, 54(4), 1210-1232.

12. Canals, M., Puig, P., de Madron, X. D., Heussner, S., Palanques, A., & Fabres, J. (2006). Flushing submarine canyons. *Nature*, *444*(7117), 354-357.
13. Canfield, D. E., Stewart, F. J., Thamdrup, B., De Brabandere, L., Dalsgaard, T., Delong, E. F., Revsbech, N. P., & Ulloa, O. (2010). A cryptic sulfur cycle in oxygen-minimum-zone waters off the Chilean coast. *Science*, *330*(6009), 1375-1378.
14. Chen, H., Young, S., Berhane, T. K., & Williams, H. N. (2012). Predatory *Bacteriovorax* communities ordered by various prey species. *PLoS One*, *7*(3), e34174.
15. Corteselli, E. M., Aitken, M. D., & Singleton, D. R. (2017). Description of *Immundisolibacter cernigliae* gen. nov., sp. nov., a high-molecular-weight polycyclic aromatic hydrocarbon-degrading bacterium within the class *Gammaproteobacteria*, and proposal of *Immundisolibacterales* ord. nov. and *Immundisolibacteraceae* fam. nov. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, *67*(4), 925.
16. Danovaro, R., Della Croce, N., Dell'Anno, A., & Pusceddu, A. (2003). A depocenter of organic matter at 7800 m depth in the SE Pacific Ocean. *Deep Sea Research Part I: Oceanographic Research Papers*, *50*(12), 1411-1420.
17. Danovaro, R., Dell'Anno, A., Corinaldesi, C., Rastelli, E., Cavicchioli, R., Krupovic, M., Noble, R. T., Nunoura, T., & Prangishvili, D. (2016). Virus-mediated archaeal hecatomb in the deep seafloor. *Science Advances*, *2*(10), e1600492.
18. Daebeler, A., Herbold, C. W., Vierheilig, J., Sedlacek, C. J., Pjevac, P., Albertsen, M., Kirkegaard, R. H., De La Torre, J. R., Daims, H., & Wagner, M. (2018). Cultivation and genomic analysis of “*Candidatus Nitrosocaldus islandicus*,” an obligately thermophilic, ammonia-oxidizing thaumarchaeon from a hot spring biofilm in Graendalur Valley, Iceland. *Frontiers in microbiology*, *9*, 193.
19. De Cáceres, M., Legendre, P., & Moretti, M. (2010). Improving indicator species analysis by combining groups of sites. *Oikos*, *119*(10), 1674-1684.
20. De la Torre, J. R., Walker, C. B., Ingalls, A. E., Könneke, M., & Stahl, D. A. (2008). Cultivation of a thermophilic ammonia oxidizing archaeon synthesizing crenarchaeol. *Environmental microbiology*, *10*(3), 810-818.
21. DeLong, E. F., & Yayanos, A. A. (1985). Adaptation of the membrane lipids of a deep-sea bacterium to changes in hydrostatic pressure. *Science*, *228*(4703), 1101-1103.
22. Dharamshi, J. E., Tamarit, D., Eme, L., Stairs, C. W., Martijn, J., Homa, F., Jørgensen, S. L., Spang, A., & Ettema, T. J. (2020). Marine sediments illuminate Chlamydiae diversity and evolution. *Current Biology*, *30*(6), 1032-1048.

23. Eløe, E. A., Shulze, C. N., Fadrosch, D. W., Williamson, S. J., Allen, E. E., & Bartlett, D. H. (2011). Compositional differences in particle-associated and free-living microbial assemblages from an extreme deep-ocean environment. *Environmental microbiology reports*, 3(4), 449-458.
24. Ettwig, K. F., Butler, M. K., Le Paslier, D., Pelletier, E., Mangenot, S., Kuypers, M. M., Schreiber, F., Dutilh, B. E., Zedelius, J., de Beer, D., Gloerich, J., Wessels, H. J. C. T., van Alen, T., Luesken, F., Wu, M. L., van de Pas-Schoonen, K. T., Op den Camp, H. J. M., Janssen-Megens, E. M., Francoijs, K., Stunnenberg, H., Weissenbach, J., Jetten, M. S. M., & Strous, M. (2010). Nitrite-driven anaerobic methane oxidation by oxygenic bacteria. *Nature*, 464(7288), 543-548.
25. Falkowski, P. G., Fenchel, T., & Delong, E. F. (2008). The microbial engines that drive Earth's biogeochemical cycles. *science*, 320(5879), 1034-1039.
26. Fang, J., Zhang, L., & Bazylinski, D. A. (2010). Deep-sea piezosphere and piezophiles: geomicrobiology and biogeochemistry. *Trends in microbiology*, 18(9), 413-422.
27. Fang, Y., Yuan, Y., Liu, J., Wu, G., Yang, J., Hua, Z., Han, J., Zhang, X., Li, W., & Jiang, H. (2021). Casting Light on the Adaptation Mechanisms and Evolutionary History of the Widespread *Sumerlaeota*. *Mbio*, 12(2), e00350-21.
28. Flemming, H. C., & Wingender, J. (2010). The biofilm matrix. *Nature reviews microbiology*, 8(9), 623-633.
29. Flores, E., Cantarero, S. I., Ruiz-Fernández, P., Dildar, N., Zabel, M., Ulloa, O., & Sepúlveda, J. (2022). Bacterial and eukaryotic intact polar lipids point to in situ production as a key source of labile organic matter in hadal surface sediment of the Atacama Trench. *Biogeosciences*, 19(5), 1395-1420.
30. Fuerst, J. A. (2020). Microbial Evolution: Chlamydial Creatures from the Deep. *Current Biology*, 30(6), R267-R269.
31. Fujii, T., Kilgallen, N. M., Rowden, A. A., & Jamieson, A. J. (2013). Deep-sea amphipod community structure across abyssal to hadal depths in the Peru-Chile and Kermadec trenches. *Marine Ecology Progress Series*, 492, 125-138.
32. Fujikura, K., Kojima, S., Tamaki, K., Maki, Y., Hunt, J., & Okutani, T. (1999). The deepest chemosynthesis-based community yet discovered from the hadal zone, 7326 m deep, in the Japan Trench. *Marine Ecology Progress Series*, 190, 17-26.
33. Gao, Z. M., Huang, J. M., Cui, G. J., Li, W. L., Li, J., Wei, Z. F., Chen, J., Xin, Y. Z., Cai, D. S., Zhang, A. Q., & Wang, Y. (2019). In situ meta-omic insights into the

- community compositions and ecological roles of hadal microbes in the Mariana Trench. *Environmental microbiology*, 21(11), 4092-4108.
34. Garrity, G.M., Holt, J.G., Battista, J.R., Rainey, F.A., da Costa, M.S., Nobre, M.F. (2001). Phylum BIV. "Deinococcus-Thermus". In: Boone, D.R., Castenholz, R.W., Garrity, G.M. (eds) *Bergey's Manual® of Systematic Bacteriology*. Springer, New York, NY.
 35. Ginestet, C. (2011). ggplot2: elegant graphics for data analysis. *Journal-Royal Statistical Society Series A*, 174, 245-245.
 36. Glud, R. N., Wenzhöfer, F., Middelboe, M., Oguri, K., Turnewitsch, R., Canfield, D. E., & Kitazato, H. (2013). High rates of microbial carbon turnover in sediments in the deepest oceanic trench on Earth. *Nature Geoscience*, 6(4), 284-288.
 37. Gruber-Vodicka, H. R., Leisch, N., Kleiner, M., Hinzke, T., Liebeke, M., McFall-Ngai, M., Hadfield, M.G., & Dubilier, N. (2019). Two intracellular and cell type-specific bacterial symbionts in the placozoan *Trichoplax* H2. *Nature microbiology*, 4(9), 1465-1474.
 38. Hawley, A. K., Nobu, M. K., Wright, J. J., Durno, W. E., Morgan-Lang, C., Sage, B., Schwientek, P., Swan, B. K., Rinke, C., Torres-Beltrán, M., Mewis, K., Liu, W. T., Stepanauskas, R., Woyke, T., & Hallam, S. J. (2017). Diverse Marinimicrobia bacteria may mediate coupled biogeochemical cycles along eco-thermodynamic gradients. *Nature communications*, 8(1), 1-10.
 39. Hiraoka, S., Hirai, M., Matsui, Y., Makabe, A., Minegishi, H., Tsuda, M., Juliarni, Rastelli, E., Danovaro, R., Corinaldesi, C., Kitahashi, T., Tasumi, E., Nishizawa, M., Takai, K., Nomaki, H., & Nunoura, T. (2020). Microbial community and geochemical analyses of trans-trench sediments for understanding the roles of hadal environments. *The ISME journal*, 14(3), 740-756.
 40. Horn, M. (2008). Chlamydiae as symbionts in eukaryotes. *Annual review of microbiology*, 62(1), 113-131.
 41. Hoshino, T., Doi, H., Uramoto, G. I., Wörmer, L., Adhikari, R. R., Xiao, N., Morono, Y., D'Hondt, S., Hinrichs, K. U., & Inagaki, F. (2020). Global diversity of microbial communities in marine sediment. *Proceedings of the national academy of sciences*, 117(44), 27587-27597.
 42. Huang, J. M., & Wang, Y. (2020). Genomic differences within the phylum Marinimicrobia: From waters to sediments in the Mariana Trench. *Marine genomics*, 50, 100699.

43. Huang, W. C., Liu, Y., Zhang, X., Zhang, C. J., Zou, D., Zheng, S., Xu, W., Luo, Z., Liu, F., & Li, M. (2021). Comparative genomic analysis reveals metabolic flexibility of Woesearchaeota. *Nature communications*, *12*(1), 1-14.
44. Ichino, M. C., Clark, M. R., Drazen, J. C., Jamieson, A., Jones, D. O., Martin, A. P., Rowden, A. A., Shank, T. M., Yancey, P. H., & Ruhl, H. A. (2015). The distribution of benthic biomass in hadal trenches: a modelling approach to investigate the effect of vertical and lateral organic matter transport to the seafloor. *Deep Sea Research Part I: Oceanographic Research Papers*, *100*, 21-33.
45. Ikeda-Ohtsubo, W., Brugman, S., Warden, C. H., Rebel, J. M., Folkerts, G., & Pieterse, C. M. (2018). How can we define “optimal microbiota?”: A comparative review of structure and functions of microbiota of animals, fish, and plants in agriculture. *Frontiers in nutrition*, *5*, 90.
46. Jamieson, A. J., Fujii, T., Mayor, D. J., Solan, M., & Priede, I. G. (2010). Hadal trenches: the ecology of the deepest places on Earth. *Trends in Ecology & Evolution*, *25*(3), 190-197.
47. Jannasch, H. J., Wirsen, C. O., & Taylor, C. D. (1976). Undecompressed microbial populations from the deep sea. *Applied and Environmental Microbiology*, *32*(3), 360-367.
48. Karner, M. B., DeLong, E. F., & Karl, D. M. (2001). Archaeal dominance in the mesopelagic zone of the Pacific Ocean. *Nature*, *409*(6819), 507-510.
49. Kerou, M., Ponce-Toledo, R. I., Zhao, R., Abby, S. S., Hirai, M., Nomaki, H., Takaki, Y., Nunoura, T., Jørgensen, S. L., & Schleper, C. (2021). Genomes of Thaumarchaeota from deep sea sediments reveal specific adaptations of three independently evolved lineages. *The ISME journal*, *15*(9), 2792-2808.
50. Könneke, M., Bernhard, A. E., de La Torre, J. R., Walker, C. B., Waterbury, J. B., & Stahl, D. A. (2005). Isolation of an autotrophic ammonia-oxidizing marine archaeon. *Nature*, *437*(7058), 543-546.
51. Kwon, K. K., Lee, H. S., Yang, S. H., & Kim, S. J. (2005). *Kordiimonas gwangyangensis* gen. nov., sp. nov., a marine bacterium isolated from marine sediments that forms a distinct phyletic lineage (*Kordiimonadales* ord. nov.) in the ‘Alphaproteobacteria’. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, *55*(5), 2033-2037.
52. Lacey, N. C., Rowden, A. A., Clark, M. R., Kilgallen, N. M., Linley, T., Mayor, D. J., & Jamieson, A. J. (2016). Community structure and diversity of scavenging

- amphipods from bathyal to hadal depths in three South Pacific Trenches. *Deep Sea Research Part I: Oceanographic Research Papers*, 111, 121-137.
53. Lebrato, M., Mendes, P. D. J., Steinberg, D. K., Cartes, J. E., Jones, B. M., Birsa, L. M., Benavides, R., & Oschlies, A. (2013). Jelly biomass sinking speed reveals a fast carbon export mechanism. *Limnology and Oceanography*, 58(3), 1113-1122.
54. Liu, R., Wang, L., Wei, Y., & Fang, J. (2018). The hadal biosphere: Recent insights and new directions. *Deep Sea Research Part II: Topical Studies in Oceanography*, 155, 11-18.
55. Lucker, S., Nowka, B., Rattei, T., Spieck, E., & Daims, H. (2013). The genome of *Nitrospina gracilis* illuminates the metabolism and evolution of the major marine nitrite oxidizer. *Frontiers in microbiology*, 4, 27.
56. Lynch, M. D., & Neufeld, J. D. (2015). Ecology and exploration of the rare biosphere. *Nature Reviews Microbiology*, 13(4), 217-229.
57. Macgregor Jr, R. B. (2002). The interactions of nucleic acids at elevated hydrostatic pressure. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Protein Structure and Molecular Enzymology*, 1595(1-2), 266-276.
58. Marshall, K. T., & Morris, R. M. (2013). Isolation of an aerobic sulfur oxidizer from the SUP05/Arctic96BD-19 clade. *The ISME journal*, 7(2), 452-455.
59. Martin, D., Bartlett, D. H., & Roberts, M. F. (2002). Solute accumulation in the deep-sea bacterium *Photobacterium profundum*. *Extremophiles*, 6(6), 507-514.
60. Morris, R. M., Rappe, M. S., Connon, S. A., Vergin, K. L., Siebold, W. A., Carlson, C. A., & Giovannoni, S. J. (2002). SAR11 clade dominates ocean surface bacterioplankton communities. *Nature*, 420(6917), 806-810.
61. Nagata, T., Tamburini, C., Arıstegui, J., Baltar, F., Bochdansky, A. B., Fonda-Umani, S., Fukuda, H., Gogou, A., Hansell, D. A., Hansman, R. L., Herndl, G. J., Panagiotopoulos, C., Reinthaler T., Sohrink, R., Verdugo, P., Yamada, N., Yamashita, Y., Yokokawa, T., & Bartlett, D. H. (2010). Emerging concepts on microbial processes in the bathypelagic ocean—ecology, biogeochemistry, and genomics. *Deep Sea Research Part II: Topical Studies in Oceanography*, 57(16), 1519-1536.
62. Nakai, R. (2020). Size matters: ultra-small and filterable microorganisms in the environment. *Microbes and environments*, 35(2), ME20025.
63. Nogi, Y., Kato, C., & Horikoshi, K. (2002). *Psychromonas kaikoa* sp. nov., a novel from the deepest piezophilic bacterium cold-seep sediments in the Japan Trench. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, 52(5), 1527-1532.

64. Nunoura, T., Takaki, Y., Kazama, H., Kakuta, J., Shimamura, S., Makita, H., Hirai, M., Miyazaki, M., & Takai, K. (2014). Physiological and genomic features of a novel sulfur-oxidizing gammaproteobacterium belonging to a previously uncultivated symbiotic lineage isolated from a hydrothermal vent. *PLoS One*, *9*(8), e104959.
65. Nunoura, T., Takaki, Y., Hirai, M., Shimamura, S., Makabe, A., Koide, O., Kikuchi, T., Miyazaki, J., Koba, K., Yoshida, N., Sunamura, M., & Takai, K. (2015). Hadal biosphere: insight into the microbial ecosystem in the deepest ocean on Earth. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *112*(11), E1230-E1236.
66. Nunoura, T., Hirai, M., Yoshida-Takashima, Y., Nishizawa, M., Kawagucci, S., Yokokawa, T., Miyazaki, J., Koide, O., Makita, H., Takaki, Y., Sunamura, M., & Takai, K. (2016). Distribution and niche separation of planktonic microbial communities in the water columns from the surface to the hadal waters of the Japan Trench under the Eutrophic Ocean. *Frontiers in microbiology*, *7*, 1261.
67. Oguri, K., Kawamura, K., Sakaguchi, A., Toyofuku, T., Kasaya, T., Murayama, M., Fujikura, K., Glud, R. N., & Kitazato, H. (2013). Hadal disturbance in the Japan Trench induced by the 2011 Tohoku–Oki Earthquake. *Scientific Reports*, *3*(1), 1-6.
68. Oksanen, J., Blanchet, F. G., Kindt, R., Legendre, P., Minchin, P. R., O'hara, R. B., Simpson, G. L., Solymos, P., Stevens, M. H. H., Wagner, H., & Oksanen, M. J. (2013). Package 'vegan'. *Community ecology package, version*, *2*(9), 1-295.
69. Parada, A. E., Needham, D. M., & Fuhrman, J. A. (2016). Every base matters: assessing small subunit rRNA primers for marine microbiomes with mock communities, time series and global field samples. *Environmental microbiology*, *18*(5), 1403-1414.
70. Peoples, L. M., Donaldson, S., Osuntokun, O., Xia, Q., Nelson, A., Blanton, J., Allen, E. E., Church, M. J., & Bartlett, D. H. (2018). Vertically distinct microbial communities in the Mariana and Kermadec trenches. *Plos one*, *13*(4), e0195102.
71. Peoples, L. M., Grammatopoulou, E., Pombrol, M., Xu, X., Osuntokun, O., Blanton, J., Allen, E. E., Nunnally, C. C., Drazen, J. C., Mayor, D. J., & Bartlett, D. H. (2019). Microbial community diversity within sediments from two geographically separated hadal trenches. *Frontiers in microbiology*, *10*, 347.
72. Pommier, T., Canbäck, B., Riemann, L., Boström, K. H., Simu, K., Lundberg, P., Tunlid, A., & Hagström, Å. (2007). Global patterns of diversity and community structure in marine bacterioplankton. *Molecular ecology*, *16*(4), 867-880.

73. Quast, C., Pruesse, E., Yilmaz, P., Gerken, J., Schweer, T., Yarza, P., Peplies, J., & Glöckner, F. O. (2012). The SILVA ribosomal RNA gene database project: improved data processing and web-based tools. *Nucleic acids research*, *41*(D1), D590-D596.
74. Rex, M. A., Etter, R. J., Morris, J. S., Crouse, J., McClain, C. R., Johnson, N. A., Stuart, C. T., Deming, J. W., Thies, R., & Avery, R. (2006). Global bathymetric patterns of standing stock and body size in the deep-sea benthos. *Marine Ecology Progress Series*, *317*, 1-8.
75. Rinke, C., Schwientek, P., Sczyrba, A., Ivanova, N. N., Anderson, I. J., Cheng, J. F., Darling, A., Malfatti, S., Swan, B. K., Gies, E. A., Dodsworth, J. A., Hedlund, B. P., Tsiamis, G., Sievert, S. M., Liu, W. T., Eisen, J. A., Hallam, S. J., Kyrpides, N. C., Stepanauskas, R., Rubin, E. M., Hugenholtz, P., & Woyke, T. (2013). Insights into the phylogeny and coding potential of microbial dark matter. *Nature*, *499*(7459), 431-437.
76. Roda-Garcia, J. J., Haro-Moreno, J. M., Huschet, L. A., Rodriguez-Valera, F., & López-Pérez, M. (2021). Phylogenomics of SAR116 Clade Reveals Two Subclades with Different Evolutionary Trajectories and an Important Role in the Ocean Sulfur Cycle. *Msystems*, *6*(5), e00944-21.
77. Rognes, T., Flouri, T., Nichols, B., Quince, C., & Mahé, F. (2016). VSEARCH: a versatile open source tool for metagenomics. *PeerJ*, *4*, e2584.
78. Salvador-Castell, M., Oger, P., & Peters, J. (2020). High-pressure adaptation of extremophiles and biotechnological applications. In *Physiological and biotechnological aspects of extremophiles* (pp. 105-122). Academic Press.
79. Santoro, A. E., Dupont, C. L., Richter, R. A., Craig, M. T., Carini, P., McIlvin, M. R., Yang, Y., Orsi, W. D., Moran, D. M., & Saito, M. A. (2015). Genomic and proteomic characterization of “*Candidatus Nitrosopelagicus brevis*”: an ammonia-oxidizing archaeon from the open ocean. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *112*(4), 1173-1178.
80. Schauberger, C., Glud, R. N., Hausmann, B., Trouche, B., Maignien, L., Poulain, J., Wincker, P., Arnaud-Haond, S., Wenzhöfer, F., & Thamdrup, B. (2021a). Microbial community structure in hadal sediments: high similarity along trench axes and strong changes along redox gradients. *The ISME journal*, *15*(12), 3455-3467.
81. Schauberger, C., Middelboe, M., Larsen, M., Peoples, L. M., Bartlett, D. H., Kirpekar, F., Rowden, A. A., Wenzhöfer, F., Thamdrup, B., & Glud, R. N. (2021). Spatial variability of prokaryotic and viral abundances in the Kermadec and Atacama Trench regions. *Limnology and Oceanography*, *66*(6), 2095-2109.

82. Schmidt, C., & Arbizu, P. M. (2015). Unexpectedly higher metazoan meiofauna abundances in the Kuril–Kamchatka Trench compared to the adjacent abyssal plains. *Deep Sea Research Part II: Topical Studies in Oceanography*, *111*, 60-75.
83. Sheik, C. S., Jain, S., & Dick, G. J. (2014). Metabolic flexibility of enigmatic SAR 324 revealed through metagenomics and metatranscriptomics. *Environmental microbiology*, *16*(1), 304-317.
84. Sogin, M. L., Morrison, H. G., Huber, J. A., Welch, D. M., Huse, S. M., Neal, P. R., Arrieta, J. M., & Herndl, G. J. (2006). Microbial diversity in the deep sea and the underexplored “rare biosphere”. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *103*(32), 12115-12120.
85. Stockton, W. L., & DeLaca, T. E. (1982). Food falls in the deep sea: occurrence, quality, and significance. *Deep Sea Research Part A. Oceanographic Research Papers*, *29*(2), 157-169.
86. Sunagawa, S., Coelho, L. P., Chaffron, S., Kultima, J. R., Labadie, K., Salazar, G., et al. (2015). Structure and function of the global ocean microbiome. *Science*, *348*(6237), 1261359.
87. Taira, K., Yanagimoto, D., & Kitagawa, S. (2005). Deep CTD casts in the challenger deep, Mariana Trench. *Journal of Oceanography*, *61*(3), 447-454.
88. Tamburini, C., Boutrif, M., Garel, M., Colwell, R. R., & Deming, J. W. (2013). Prokaryotic responses to hydrostatic pressure in the ocean—a review. *Environmental microbiology*, *15*(5), 1262-1274.
89. Tarn, J., Peoples, L. M., Hardy, K., Cameron, J., & Bartlett, D. H. (2016). Identification of free-living and particle-associated microbial communities present in hadal regions of the Mariana Trench. *Frontiers in Microbiology*, *7*, 665.
90. The Human Microbiome Project Consortium. (2012). Structure, function and diversity of the healthy human microbiome. *Nature* *486*, 207–214.
91. Ulloa, O., Canfield, D. E., DeLong, E. F., Letelier, R. M., & Stewart, F. J. (2012). Microbial oceanography of anoxic oxygen minimum zones. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *109*(40), 15996-16003.
92. Utami, Y. D., Kuwahara, H., Igai, K., Murakami, T., Sugaya, K., Morikawa, T., Nagura, Y., Yuki, M., Deevong, P., Inoue, T., Kihara, K., Lo, N., Yamada, A., Ohkuma, M., & Hongoh, Y. (2019). Genome analyses of uncultured TG2/ZB3 bacteria in ‘Margulisbacteria’ specifically attached to ectosymbiotic spirochetes of protists in the termite gut. *The ISME journal*, *13*(2), 455-467.

93. Wang, R., Lin, J. Q., Liu, X. M., Pang, X., Zhang, C. J., Yang, C. L., Gao, X. Y., Lin, C. M., Li, Y. Q., Li, Y., Lin, J. Q., & Chen, L. X. (2019). Sulfur oxidation in the acidophilic autotrophic *Acidithiobacillus* spp. *Frontiers in microbiology*, 3290.
94. Winter, R., & Jeworrek, C. (2009). Effect of pressure on membranes. *Soft Matter*, 5(17), 3157-3173.
95. Whittenbury, R., Phillips, K. C., & Wilkinson, J. F. (1970). Enrichment, isolation and some properties of methane-utilizing bacteria. *Microbiology*, 61(2), 205-218.
96. Woolley, S. N., Tittensor, D. P., Dunstan, P. K., Guillera-Aroita, G., Lahoz-Monfort, J. J., Wintle, B. A., Worm, B., & O'Hara, T. D. (2016). Deep-sea diversity patterns are shaped by energy availability. *Nature*, 533(7603), 393-396.
97. Xu, Y., Li, X., Luo, M., Xiao, W., Fang, J., Rashid, H., Peng, Y., Li, W., Wenzhöfer, F., Rowden, A. A., & Glud, R. N. (2021). Distribution, Source, and Burial of Sedimentary Organic Carbon in Kermadec and Atacama Trenches. *Journal of Geophysical Research: Biogeosciences*, 126(5), e2020JG006189.
98. Zaremba-Niedzwiedzka, K., Caceres, E. F., Saw, J. H., Bäckström, D., Juzokaite, L., Vancaester, E., Seitz, K. W., Anantharaman, K., Starnawski, P., Kjeldsen, K. U., Stott, M. B., Nunoura, T., Banfield, J. F., Schramm, A., Baker, B. J., Spang A., & Ettema, T. J. (2017). Asgard archaea illuminate the origin of eukaryotic cellular complexity. *Nature*, 541(7637), 353-358.
99. Zhang, X., Shao, Y., Tian, J., Liao, Y., Li, P., Zhang, Y., Chen, J., & Li, Z. (2019). pTrimmer: an efficient tool to trim primers of multiplex deep sequencing data. *BMC bioinformatics*, 20(1), 1-6.
100. Zhang, X., Xu, Y., Xiao, W., Zhao, M., Wang, Z., Wang, X., Xu, L., Luo, M., Li, X., Fang, J., Fang, Y., Wang, Y., Oguri, K., Wenzhöfer, F., Rowden, A. A., Mitra, S., & Glud, R. N. (2022). The hadal zone is an important and heterogeneous sink of black carbon in the ocean. *Communications Earth & Environment*, 3(1), 1-9.
101. Zhao, X., Luo, H., He, S., Yang, B., Wei, T., Hu, Y., Wang, Z., & Li, X. (2022). Vertical distribution of size-fractionated bacterial communities in the water column of the Atacama Trench. *Regional Studies in Marine Science*, 55, 102470.
102. Zheng, Y., Wang, J., Zhou, S., Zhang, Y., Liu, J., Xue, C. X., Williams, B. T., Zhao, X., Zhao, L., Zhu, X. Y., Sun, C., Zhang, H. H., Xiao, T., Yang, G. P., Todd J. D., & Zhang, X. H. (2020). Bacteria are important dimethylsulfoniopropionate producers in marine aphotic and high-pressure environments. *Nature communications*, 11(1), 1-12.

103. Zhong, H., Lehtovirta-Morley, L., Liu, J., Zheng, Y., Lin, H., Song, D., Todd, J. D., Tian, J., & Zhang, X. H. (2020). Novel insights into the Thaumarchaeota in the deepest oceans: their metabolism and potential adaptation mechanisms. *Microbiome*, 8(1), 1-16.

