



UNIVERSIDAD  
DE LA REPÚBLICA  
URUGUAY



FACULTAD DE  
**CIENCIAS**  
UDELAR | [fcien.edu.uy](http://fcien.edu.uy)



Ministerio  
**de Educación  
y Cultura**



Tesina de grado para la obtención de título de Licenciatura en  
Bioquímica

# **Estudio de la desnitrificación en ambientes fríos, ¿existen vías aún no conocidas?**

Micaela González Steffano

Orientadora: Dra. Claudia Etchebehere

Co-orientadora: Dra. Patricia Bovio-Winkler

Laboratorio de Ecología Microbiana  
Instituto de Investigaciones Biológicas Clemente Estable  
Montevideo, Uruguay

7 de octubre de 2024

*“Nada en biología tiene sentido si no es a la luz de la evolución.”*

Dobzhansky, 1973

## **Agradecimientos**

A mis tutoras, Claudia y Patricia, por su constante apoyo y paciencia durante la realización de esta tesina, así como por su invaluable ayuda para presentarme en los congresos.

A mis compañeros del Laboratorio de Ecología Microbiana y a los investigadores del laboratorio de Ángela Cabezas en la UTEC, por escuchar mis presentaciones en los seminarios, sus sugerencias y por auxiliarme en el transporte de los viales.

A Javier y Shirley, que a pesar de no poder lograr el experimento estuvieron haciendo todo lo posible.

A las personas de BIOGEM, por recibirme en su laboratorio.

A mi familia, por acompañarme a lo largo de estos años de carrera y por creer en mí, incluso cuando yo no lo hacía.

A mis amigos y compañeros de facultad, quienes me apoyaron incondicionalmente y soportaron los altibajos emocionales de este proceso.

A Zira y Rufo, por su compañía incondicional.

A todas aquellas personas, compañeros y profesores, que estuvieron conmigo en estos años.

## Tabla de contenido

Resumen	5
1. Introducción	
1.1 Nitrógeno en la biósfera	7
1.2 Desnitrificación	9
1.3 Condiciones de la desnitrificación	12
1.4 Desnitrificación a bajas temperaturas	13
2. Antecedentes	14
3. Objetivos	
3.1 Objetivo general	16
3.2 Objetivos específicos	16
4. Materiales y métodos	
4.1 Medio de cultivo y procedimiento de aislamiento	17
4.2 Caracterización por secuenciación del gen de ARNr 16S	17
4.3 Temperatura óptima de crecimiento en condiciones desnitrificantes	19
4.4 Secuenciación de genomas y anotación funcional	20
5. Resultados	
5.1 Medio y procedimiento de aislamiento	22
5.2 Caracterización por secuenciación del gen de ARNr 16S	23
5.3 Curva de crecimiento a distintas temperaturas	24
5.4 Anotación funcional en genomas secuenciados y de referencia	25
6. Discusión	29
7. Conclusiones y perspectivas	34
8. Referencias bibliográficas	36
9. Anexos	50

## Resumen

La desnitrificación es un proceso clave en el ciclo del nitrógeno, donde el nitrato ( $\text{NO}_3^-$ ) y el nitrito ( $\text{NO}_2^-$ ) son reducidos a nitrógeno atmosférico mediante la respiración anaeróbica. Este proceso produce intermediarios gaseosos como óxido nitroso ( $\text{N}_2\text{O}$ ), cuyo impacto en el calentamiento global es significativo. Esta vía adquiere importancia debido a que es la principal responsable de la pérdida de nitrógeno en suelos agrícolas y aguas residuales. Factores como la disponibilidad de oxígeno, sustrato, pH y temperatura influyen en la tasa de desnitrificación, por lo que la investigación en ambientes extremos es de interés. En un trabajo previo realizado en nuestro laboratorio se aislaron 199 bacterias desnitrificantes de diferentes ecosistemas antárticos de la Isla Rey Jorge, capaces de reducir  $\text{NO}_3^-$  a  $4^\circ\text{C}$ . Se determinó la capacidad de desnitrificación de las cepas mediante la técnica de bloqueo con acetileno, que consiste en inhibir el paso de conversión de  $\text{N}_2\text{O}$  a  $\text{N}_2$  realizado por la óxido nitroso reductasa. Se encontró que la mayoría de estas cepas presentaron actividad desnitrificante pero, no se encontraron los genes responsables en los genomas de las especies más cercanas.

En este trabajo se seleccionaron cepas representativas de los principales géneros y especies aisladas en el estudio previo, y se verificó su capacidad de consumo de  $\text{NO}_3^-/\text{NO}_2^-$  a  $4^\circ\text{C}$ . De esta etapa, se continuó con 20 cepas a las cuales se les secuenció el gen completo de ARNr 16S, obteniéndose 2 cepas de *Flavobacterium*, 6 cepas de *Janthinobacterium* y 8 cepas de *Pseudomonas*. Para poder determinar las vías metabólicas involucradas se realizó la secuenciación de los genomas de dos cepas de diferentes géneros que fueron seleccionadas. Ambas resultaron potenciales nuevas especies de los géneros *Flavobacterium* y *Pseudomonas*, con temperaturas óptimas de crecimiento en medio 1/10 TSB-N

cercanas a 25°C, respectivamente. Para las dos cepas estudiadas se encontraron genes codificantes para enzimas desnitrificantes, y para el caso de *Flavobacterium* la enzima para el primer y segundo paso de la vía parecería ser una enzima de la vía asimilatoria de reducción del nitrato. En este trabajo se logró identificar genes asociados a la desnitrificación en las cepas bacterianas seleccionadas, verificando su potencial desnitrificante en las condiciones de la Antártida.

**Palabras claves:** Desnitrificación, Antártida, Microbiología

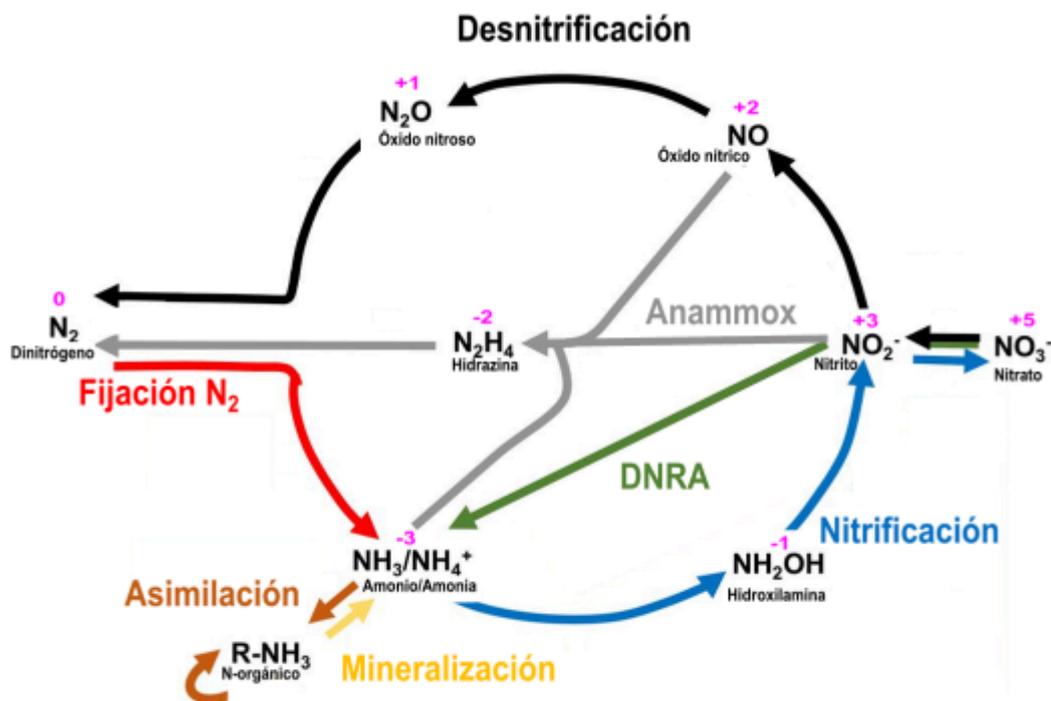
# 1. Introducción

## 1.1 Nitrógeno en la biósfera

El nitrógeno es uno de los elementos más abundantes en la atmósfera de nuestro planeta, así como un elemento fundamental para todos los seres vivos ya que conforma la estructura de moléculas orgánicas como proteínas y ácidos nucleicos, así como otras moléculas de importancia biológica. También tiene un rol activo en metabolismos respiratorios y energéticos (Thamdrup, B., 2012). En la atmósfera, la presión parcial de nitrógeno ( $pN_2$ ) tiene efectos en cuanto al grado de incremento de la presión en la absorción de gases de efecto invernadero, contribuyendo así a la temperatura de la superficie terrestre (Stüken, E. E. et al., 2016). Además, la  $pN_2$  tiene una influencia directa en la cantidad de oxígeno liberado a la atmósfera (Ramirez, R. M., 2020). Por otro lado, el nitrógeno reactivo se forma naturalmente y lleva a la producción de óxidos de nitrógeno ( $NO_x$ ) y óxido nitroso ( $N_2O$ ), que actúan como gases de efecto invernadero (Cassia, R. et al., 2018). La actividad humana ha aumentado la cantidad de nitrógeno presente en el ambiente, por ejemplo a través del agregado de fertilizantes y la quema de combustibles fósiles. Como consecuencia de los  $NO_x$  y  $N_2O$  formados excesivamente, se dan los fenómenos de lluvia ácida y deposición de nitrógeno, smog, eutrofización de cuerpos de agua, aumento del efecto invernadero y el agotamiento del ozono estratosférico (Galloway, J. N. et al., 2013).

El intercambio entre el nitrógeno atmosférico y compuestos nitrogenados está controlado por la actividad microbiológica. Los procesos que convierten al nitrógeno en sus diferentes estados oxidativos en la biósfera conforman el ciclo biogeoquímico del nitrógeno (Stein, L. Y. y Klotz, M. G., 2016). El ciclo comienza con la

transformación del nitrógeno atmosférico a amonio ( $\text{NH}_4^+$ ), realizado a través de fijación biológica del nitrógeno (FBN) o por la reducción disimilatoria de nitrato a amonio (DNRA) (**Figura 1**). El  $\text{NH}_4^+$  es incorporado en la biomasa a través de la asimilación, y su proceso inverso es la mineralización, que dispone  $\text{NH}_4^+$  para la nitrificación que genera  $\text{NO}_3^-$ . La desnitrificación convierte el  $\text{NO}_3^-$  a  $\text{N}_2$  a través de intermediarios nitrogenados gaseosos (Fowler, D. et al., 2013; Jetten, M. S. M., 2008). También se puede generar  $\text{N}_2$  a partir de  $\text{NO}_2^-$  y  $\text{NH}_4^+$  en el proceso de anammox.



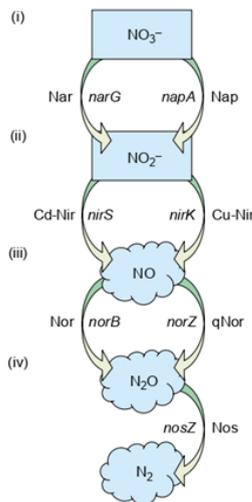
**Figura 1.** Ciclo biogeoquímico del nitrógeno adaptado de Zhang, X. et al., (2020). En rojo está señalizada la vía de FBN, en marrón la asimilación de  $\text{N}_2$ , en amarillo la mineralización del N-orgánico, en azul la nitrificación, en verde la vía DNRA, en gris anammox y en negro la vía de desnitrificación. Los números rosados son los estados oxidativos del nitrógeno.

## 1.2 Desnitrificación

La desnitrificación es uno de los procesos mediante el cual los compuestos nitrogenados reactivos ( $N_r$ ) se transforman en nitrógeno atmosférico. Esta vía metabólica es una reducción desasimilatoria de  $NO_3^-$  y  $NO_2^-$ , los cuales actúan como aceptores terminales de electrones durante la respiración anaeróbica. Durante el metabolismo se producen intermediarios gaseosos: óxido nítrico (NO) y óxido nitroso ( $N_2O$ ), siendo este último de especial interés debido a su potencial de calentamiento global (Global Warming Potential, GWP), que es 310 veces mayor que el del dióxido de carbono ( $CO_2$ ) (Bergaust, L. et al., 2011). La desnitrificación es la principal fuente de producción de gases de óxidos nitrosos y causa pérdidas significativas de nitrógeno en suelos agrícolas fertilizados, así como de compuestos nitrogenados en aguas residuales (Braker, G. et al., 1998). En sedimentos marinos costeros, la desnitrificación elimina entre el 40% y el 50% del nitrógeno inorgánico disuelto que ingresa por fuentes externas (por ejemplo, por actividad humana) (Seitzinger, S. P., 1990).

El proceso de desnitrificación consiste en cuatro pasos de reducción, catalizados por enzimas ligadas al translocador de protones del sistema de transporte de electrones del organismo, de modo que la vía está asociada a la membrana citoplasmática bacteriana con importantes pasos metabólicos que ocurren en el periplasma.

El primer paso es la reducción de  $NO_3^-$  a  $NO_2^-$  mediante la enzima nitrato reductasa, de la cual hay dos tipos diferentes, una unida a la membrana plasmática y otra unida al periplasma, Nar y Nap respectivamente (**Figura 2**). La enzima Nar está codificada



**Figura 2.** Esquema de la vía de desnitrificación. (i) Reducción del nitrato soluble catalizado por la nitrato reductasa, mediante Nar o Nap. (ii) Reducción del nitrito soluble catalizado tanto por la nitrito citocromo cd 1 reductasa o por la nitrito cobre reductasa. (iii) Reducción de óxido nítrico catalizado por la óxido nítrico reductasa. (iv) Reducción de óxido nitroso a nitrógeno molecular catalizada por la óxido nitroso reductasa (Philippot, L. y Hallin, S., 2005).

por genes *narGHI* organizados en un operón junto con el gen *narJ*, mientras que la enzima Nap está codificada por el operón *napABC* (Kandeler et al., 2006). El segundo paso, en el cual el  $\text{NO}_2^-$  es reducido a  $\text{NO}$ , puede ser catalizado por enzimas no relacionadas evolutivamente, que se diferencian en estructura y en la presencia del metal prostético. Una tiene hemo c y hemo d (cd1-Nir), y la otra enzima contiene cobre (Cu-Nir). La cd1-Nir reductasa, codificada por *nirS* predomina en bacterias desnitrificantes, mientras que Cu-Nir reductasa codificada por *nirK*, tiene una distribución más amplia en bacterias que no están estrechamente relacionada taxonómicamente y en bacterias no definidas como desnitrificantes típicas. Este paso es clave en la vía ya que es lo que distingue a los desnitrificantes de los microorganismos que respiran  $\text{NO}_2^-$  (Hallin, S. y Lindgren, P. E., 1999). La formación de  $\text{N}_2\text{O}$  a partir de  $\text{NO}$  está catalizada por la óxido nítrico reductasa (Nor),

codificada por el operón *norCBQD*. Finalmente, la última etapa, que reduce el óxido nitroso a dinitrógeno, es realizada por la altamente conservada óxido nitroso reductasa (Nos), codificada por el operón *nosZDFYL* (van Spanning, R. J. M. et al., 2007; Philippot, L., 2002). Este último paso permite diferenciar a los desnitrificantes completos de los desnitrificantes truncados, dado que no todos los microorganismos desnitrificantes poseen la enzima Nos (Zhang, Z. et al., 2020).

En la **Tabla 1** se presentan con mayor detalle los genes involucrados en las reacciones de la vía de desnitrificación. Es importante señalar que se han identificado variantes génicas para algunos de estos genes. Por ejemplo, las variantes del gen *nosZ* derivan en dos proteínas con características distintivas que definen dos clados, como lo describen Hallin et al. (2018) y lo analiza Yoon et al. (2016). Aunque este trabajo no profundizará en cuanto a las variantes, estas están incluidas en algunas de las bases de datos empleadas.

**Tabla 1.** Genes para el proceso de desnitrificación y sus funciones, adaptado de Zumft, W. G. (1997).

Proceso	Gen	Proteínas
Reducción de nitrato a nitrito en membrana interna	<i>narG</i>	Subunidad $\alpha$ de la nitrato reductasa
	<i>narH</i>	Subunidad $\beta$ de la nitrato reductasa
	<i>narI</i>	Subunidad del citocromo b de la nitrato reductasa respiratoria
	<i>narJ</i>	Proteína necesaria para el ensamblaje de la nitrato reductasa
Reducción de nitrato a nitrito en periplasma	<i>napA</i>	Subunidad grande de la nitrato reductasa periplásmica
	<i>napB</i>	Subunidad pequeña de la nitrato reductasa periplásmica
	<i>napC</i>	Proteína tipo citocromo c

Reducción de nitrito a óxido nítrico	<i>nirS</i>	Citocromo cd1 nitrito reductasa
	<i>nirK</i>	Nitrito reductasa que contiene Cu
	<i>nirB</i>	Citocromo <i>c</i> <sub>552</sub>
Reducción de óxido nítrico a óxido nitroso	<i>norB</i>	Subunidad del citocromo β de la NO reductasa
	<i>norC</i>	Subunidad del citocromo c de la NO reductasa
Reducción de óxido nitroso a dinitrógeno	<i>nosZ</i>	Óxido nitroso reductasa
	<i>nosD</i>	Proteína periplásmica implicada en la inserción de Cu en NosZ
	<i>nosY</i>	Proteína de membrana interna implicada en el procesamiento de Cu para NosZ
	<i>nosL</i>	Lipoproteína de membrana externa putativa
	<i>nosF</i>	Proteína de unión a ATP/GTP implicada en la inserción de Cu en NosZ

### 1.3 Condiciones de la desnitrificación

Tradicionalmente, la desnitrificación es considerada como un proceso anaeróbico. Esto se debe a que los genes codificantes de las proteínas necesarias para la vía suelen expresarse únicamente en condiciones anóxicas, y que al menos algunas de las reacciones de las reductasas involucradas, son inhibidas en células intactas por la presencia de oxígeno (Ferguson, S. J., 1994; Hochstein, L. I. y Tomlinson, G. A., 1988). Sin embargo, se ha demostrado que varias bacterias pueden desnitrificar en presencia de O<sub>2</sub> (Hayatsu, M. et al., 2008).

La desnitrificación es una vía respiratoria mediante la cual microorganismos anaerobios facultativos generan significativamente más energía que a través de la fermentación y que la fosforilación a nivel de sustrato (Coyne, M. S., 2008). A partir de lo mencionado, se puede reconocer cuatro requisitos fundamentales para que la

desnitrificación pueda llevarse a cabo: 1) la presencia de bacterias con capacidad metabólica adecuada, 2) la disponibilidad de compuestos donadores de electrones, tales como carbono orgánico, compuestos reducidos de azufre o hidrógeno molecular, 3) condiciones anaeróbicas o con baja disponibilidad de oxígeno (microaerofilia), y 4) la presencia de óxidos de nitrógeno capaces de aceptar electrones (Firestone, M. K., 2015). Por lo tanto, los microorganismos desnitrificantes son ubicuos, lo que significa que están presentes en gran variedad de ambientes y condiciones, así como presentan variedad fisiológica y taxonómica (Chèneby, D. et al., 2000; Braker, G. et al., 2000).

#### **1.4 Desnitrificación a bajas temperaturas**

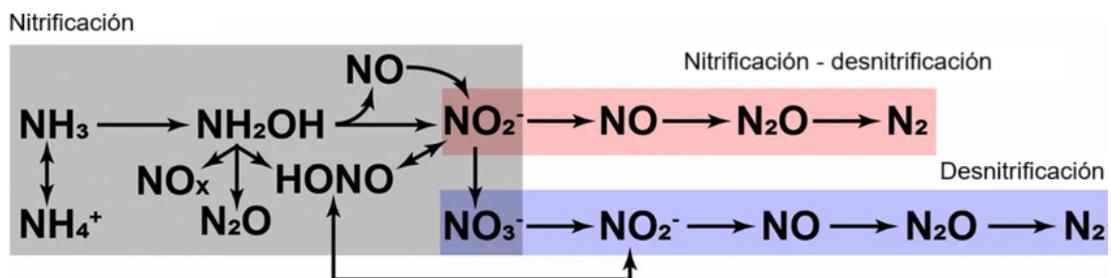
Existen diversos factores ambientales que controlan el proceso de desnitrificación causando variación en la tasa de desnitrificación, incluyendo disponibilidad de oxígeno, disponibilidad de sustrato, pH, temperatura y abundancia de especies desnitrificantes (Saleh-Lakha, S. et al, 2009). Si bien la desnitrificación ha sido muy estudiada, en cuanto a microorganismos extremófilos la mayoría de los estudios se centran en bacterias y arqueas termofílicas y arqueas halófilas. Sin embargo, el ciclo de nitrógeno ha sido estudiado en la última década en otros ambientes extremos como cercanías de volcanes, tierras secas, ambientes fríos y a altas presiones (Martínez-Espinosa, R. M., 2020; Orlando, J., 2012). En estudios de microbiología de suelos a nivel de laboratorio, se ha visto que hay una mayor acumulación de óxido nitroso como producto de la desnitrificación a bajas temperaturas (Coyne, M. S., 2008).

Para Uruguay, el lugar más accesible para realizar el estudio a bajas temperaturas es en la Base Científica Antártica Artigas (BCAA). La Antártida se caracteriza por frío extremo, intensa radiación UV y posee poca influencia antropogénica directa (Walton, D. W. H., 2005). Asimismo, este ambiente particular presenta una diversidad de grupos de microorganismos, muchos de ellos aún desconocidos debido a su limitada accesibilidad y poco estudios, ofreciendo la oportunidad de describir nuevos taxones microbianos (Bottos et al., 2014). La desnitrificación en la Antártida ha sido poco estudiada en comparación a otras regiones frías (Palacin-Lizarbe, C. et al., 2018). El desarrollo de técnicas moleculares ha permitido un abordaje importante para la evaluación y descripción de la diversidad de bacterias (Philippot, L. y Hallin, S., 2005). No obstante, los eventos de transferencia horizontal de genes dificultan estudios filogenéticos basados en la actividad de desnitrificación (Heylen, K. et al., 2006). De hecho, varios estudios han identificado la presencia de múltiples copias de genes asociados a la vía de desnitrificación. Se ha propuesto que las comunidades desnitrificantes que poseen copias de ambos genes, podrían estar expresando uno de ellos en una condición ambiental determinada, por lo que podrían ocupar distintos nichos ecológicos (Etchebehere y Tiedje, 2005; Jones y Hallin, 2010; Graf, D. R. H. et al., 2014).

## **2. Antecedentes**

Es en este contexto que en el trabajo de Cabezas, A. et al. (2022) se estudió mediante el aislamiento la diversidad de bacterias cultivables desnitrificantes presentes en distintos ecosistemas de la isla Rey Jorge en la Antártida, incluyendo lagos, agua de deshielo, agua de mar, muestras de hielo de glaciar, suelo

ornitogénico y heces de pingüinos, en diferentes períodos de deshielo (campañas de verano 2012-2013 en la Base Científica Antártica Artigas). En dicho estudio, fueron obtenidas 199 cepas bacterianas capaces de crecer en un medio anaeróbico y reducir nitrato a 4°C. La posterior caracterización por secuenciación del gen de ARNr 16S, ha demostrado la presencia de géneros como *Pseudomonas*, *Janthinobacterium*, *Flavobacterium*, *Psychrobacter* y *Yersina*, entre otros. Si bien la desnitrificación genera óxido nitroso, la generación de este gas puede deberse a otras vías metabólicas como nitrificación y nitrificación-desnitrificación (acople de ambas vías) (**Figura 3**). Un posible estudio con inhibición de acetileno ( $C_2H_2$ ), el cual inhibe la reducción de  $N_2O$  por desnitrificación, podría descartar la posibilidad de que la generación de gas sea por vías alternas a desnitrificación (Yoshinari, T. y Knowles, R., 1976). Esta técnica fue realizada para estas cepas, y se encontró que algunos aislamientos presentaron actividad desnitrificante en ausencia de genes codificantes para la vía metabólica en los genomas de especies más cercanas.



**Figura 3.** Esquema de las vías de nitrificación (gris), nitrificación-desnitrificación (rojo) y desnitrificación (violeta) (Mushinski, R. M. et al., 2019).

### **3. Objetivos**

#### **3.1 Objetivo general**

Estudio de las vías metabólicas involucradas en la desnitrificación en cepas aisladas de la Antártida capaces de desnitrificar en ambientes fríos.

#### **3.2 Objetivos específicos**

Verificación del consumo de nitrato y nitrito a 4°C por cepas aisladas desnitrificantes.

Caracterización de aislamientos bacterianos desnitrificantes por secuenciación del gen de ARNr 16S.

Evaluación del crecimiento de los aislamientos bacterianos en condiciones desnitrificantes a diferentes temperaturas.

Búsqueda de genes desnitrificantes en genomas secuenciados de aislamientos seleccionados.

## 4. Materiales y métodos

### 4.1 Medio de cultivo y procedimiento de aislamiento

A partir de las 199 cepas obtenidas en Cabezas, A. et al., (2022), estas fueron agrupadas en 32 filotipos (agrupación según similitud entre secuencias del gen de ARNr 16S). Según los filotipos definidos, en este trabajo se tomó al menos una cepa representativa de cada filotipo considerando el reporte de presencia de genes desnitrificantes (*nirS*, *nirK* y *nosZ*) según el genoma de referencia de la especie más cercana, y la acumulación de N<sub>2</sub>O dado por Cabezas, A. et al., (2022).

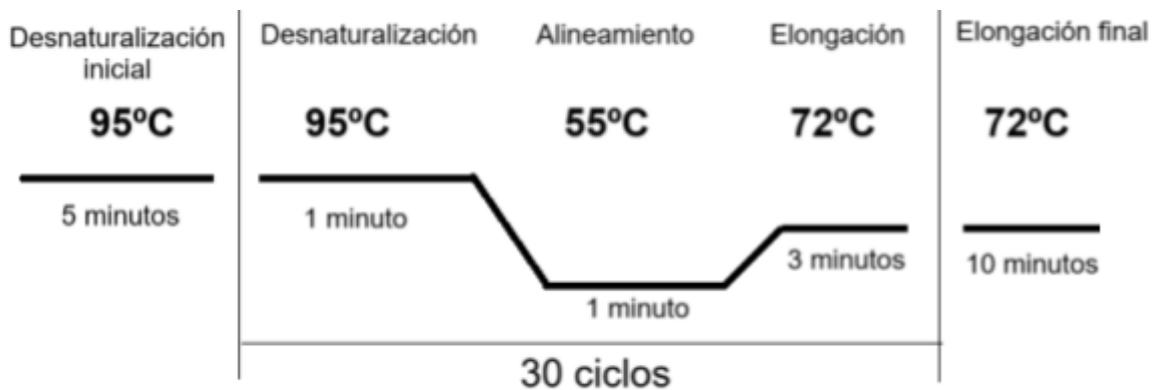
Las cepas se cultivaron a 4°C en medio líquido a TSB-N diluido al décimo (1/10 TSB-N, ver composición en la **Tabla A1** gaseado con N<sub>2</sub> para la generación de una atmósfera anaerobia. Aquellas que presentaron crecimiento fueron reaisladas en placas con el mismo medio en agar a 4°C en bolsas para cultivo anaerobio y/o en jarra anaeróbica con catalizador AnaeroGen™ Thermo Scientific.

Una vez obtenidos los aislamientos puros de las cepas seleccionadas se procedió a evaluar su posible capacidad de desnitrificar a través de la medición de los niveles de consumo de nitrato y nitrito utilizando tiras de prueba nitrato/nitrito semicuantitativa Quantofix®. Aquellas que consumieron el nitrato fueron seleccionadas para las siguientes etapas.

### 4.2 Caracterización por secuenciación del gen de ARNr 16S

A partir de cultivo puro de las cepas se realizó lisis por choque térmico. La misma se realizó colocando una colonia aislada en medio TSA en un pequeño tubo con agua ultrapura estéril. El tubo se calentó por 15 minutos a 100 °C y se colocó a

-20°C por un mínimo de 20 minutos. Posteriormente, se centrifugó para separar el ADN genómico en suspensión del pellet compuesto por resto de componentes celulares como las paredes y membranas celulares. La suspensión fue utilizada para realizar PCR con los cebadores 27F (5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3') y 1492R (5'-AAGGAGGTGATCCAGCCGCA-3') para amplificar el gen de ARNr 16S completo, siguiendo el programa de ciclado mostrado en la **Figura 4**. La longitud de los fragmentos obtenidos de la PCR fueron confirmados por electroforesis en gel de agarosa al 1,5%. Los mismos se mandaron a Macrogen Inc. (Corea) para ser secuenciados por el método de Sanger (secuenciación de electroforesis capilar), utilizando los cebadores 27F, 1492R, y en algunos casos, se utilizó el cebador intermedio 800R (5'-TACCAGGGTATCTAATCC-3') para lograr recuperar la mayor cantidad de nucleótidos posibles.



**Figura 4.** Programa de termociclador para amplificación del gen de ARNr 16s completo.

Las secuencias obtenidas fueron procesadas en Chromas v2.6.6 según su calidad, y para alinear y realizar consenso entre los fragmentos secuenciados reversos y directos de una misma cepa se utilizó BioEdit v7.0 (Technelysium Pty Ltd., 2021; Hall, T. A., 1999). Estas secuencias de consensos fueron comparadas con

secuencias depositadas en la base de datos EzBioCloud (<https://www.ezbiocloud.net/>). De acuerdo con los resultados y la consulta en base de datos del Centro Nacional para la Información Biotecnológica (NCBI) de disponibilidad de genomas para las especies más cercanas, así como la cantidad de genomas existentes dado por Cabezas, A. et al., (2022), se decidió proseguir con los análisis enfocados en dos cepas: D21 y M18.

#### **4.3 Temperatura óptima de crecimiento en condiciones desnitrificantes**

Para determinar las temperaturas óptimas de crecimiento para las cepas seleccionadas, D21 y M18, se realizaron curvas de crecimiento a distintas temperaturas. Para ello, se realizaron aislamientos en placas de medio 1/10 TSB-N agar para D21 y agar triptona-soja sin  $\text{NO}_3^-$  suplementado (TSA, ver en **Tabla A2**) para M18, para tener colonias frescas con su mejor estado metabólico. Una colonia en placa, se introdujo en el medio 1/10 TSB-N en tubo largo de vidrio con tapón (permite crecimiento anaerobio) y se siguió su crecimiento a  $\text{DO}_{620 \text{ nm}}$  en colorímetro Erna Model AE-22 (Erna Optical Works Ltd., Japón) a lo largo del tiempo, a partir del día de inoculación hasta la fase estacionaria. Se realizaron tres réplicas de cada cepa para las distintas temperaturas en estufas y sin agitación. Las temperaturas ensayadas para D21 fueron; 6°C, 13°C, 18°C, 25°C y 30°C, y para M18: 4°C, 13°C, 20°C, 25°C, 30°C y 37°C. Los controles triplicados para cada temperatura se realizaron con el mismo medio y condiciones de incubación que los tubos ensayados con las cepas, pero sin inóculo. La velocidad máxima para cada temperatura se determinó a partir de la fase exponencial del gráfico  $\text{DO}_{620 \text{ nm}}$  en función del tiempo (h) realizado para cada réplica. Los valores de velocidad máxima

de réplicas para una misma temperatura y cepa fueron promediados y se calcularon los desvíos estándar asociados. Estos valores fueron graficados en función de la temperatura (°C), lo que permitió determinar la temperaturas óptimas de crecimiento para las cepas en condiciones desnitrificantes.

#### **4.4 Secuenciación de genomas y anotación funcional**

Para secuenciar el genoma completo de las cepas, se partió de cultivos puros de las cepas M18 y D21. De los mismos se colocó una colonia en un pequeño tubo con agua ultrapura estéril para luego utilizar el kit Zymo Quick-DNA Fungal/Bacterial Miniprep para extraer el ADNg. A través de NanoDrop se confirmó el índice de pureza ( $A_{260}/A_{280} \geq 1,8$ ) así como la concentración, y la integridad del ADNg se confirmó a través de un gel de agarosa al 1%. Los ADNg de ambas cepas fueron enviados a Novogen Co. (Sacramento CA, Estados Unidos) para secuenciación de genoma completo a través de la plataforma Illumina NovaSeq 6000 (PE150).

A las secuencias crudas obtenidas para cada cepa se les comprobó la calidad de secuencia a través de la herramienta FastQC v0.11.8 (Andrew, S., 2010). Para ambas secuencias se les recortó los adaptadores mediante Trimmomatic v0.39, y en el caso de M18 se recortó bases con nivel de calidad debajo (menores a 25) (Bolger, A. M., et al., 2014). El ensamblado de los genomas se realizó independientemente con MEGAHIT v1.1.4–2 (k-mer 43, max-k-mer 75, steps 4) (Li, D., et al., 2015). A los genomas ensamblados se les estimó su completitud y contaminación mediante CheckM v1.0.1 (Parks, D.H., et al., 2015), y se les realizó la asignación taxonómica con Genome Taxonomy Database GTDB-Tk v1.3.0 (versión

de datos de referencia r214 de GTDB-Tk (<https://github.com/GenomeTaxonomy/GTDBTk>). GTDB-Tk se utilizó para clasificar los genomas obtenidos basándose en una base de datos de genomas curada y actualizada. Durante el análisis se calcula Average Nucleotide Identity (ANI), el cual es utilizado para determinar la similitud genética entre dos genomas y así determinar si pertenecen o no a la misma especie. Se asigna una especie al genoma estudiado cuando el valor de ANI es > 95-96% (mostrando el valor calculado para el genoma). Sin embargo, cuando el genoma estudiado no se le asigna una especie (valor ANI < 95%), el programa muestra la identificación hasta género pero sin mostrar el valor de ANI.

A modo de determinar las posiciones filogenéticas de las cepas secuenciadas y las de referencia, también se consideraron genomas de especies cercanas de las especies de referencia y de las cepas secuenciadas. Con estos genomas, se realizó un árbol filogenómico a través de FastTree v2.1.11, infiriendo el árbol por el método Jones-Taylor-Thornton (JTT) y con valores de soporte de Shimodaira-Hasegawa (Price, M.N., et al., 2010). Como grupo externo, se utilizaron los genomas de referencia de las especies: *Bacillus suaedae*, *Bacillus merinisedimentorum*, *Bacillus cabrialesi* y *Bacillus subtilis subsp. subtilis str. 168*. Para mejorar la resolución del árbol se utilizaron los genomas de especies que son cercanas a las clasificadas por el análisis del gen de ARNr 16S y de las secuenciadas: *F. gillisiae* DSM 22376, *F. hiemivividum* TSA-D2, *P. prosekii* LMG 26887, *P. emilianonis* TNT11, *J. psychrotolerans* S3-2, *J. rivuli* DEMB2, *J. kumbetense* GK y *J. lividum* DSM 1522. Se cargó el archivo de árbol en formato Newick a iTOL v6 para anotar y editar el árbol (Letunic, I. y Bork, P., 2021). La anotación funcional de genes se realizó con EnrichM v0.6.5 (<https://github.com/geronimp/enrichM>) empleando la base de datos

de genes ortólogos de la Enciclopedia de Genes y Genomas de Kioto (Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes, KEGG) (Kanehisa, M. y Goto, S., 2000). También se utilizó la base de datos NCyc desarrollada por Tu, Q. et al., (2019), la cual fue generada en respuesta a la ineficiencia de otras bases de datos convencionales en la búsqueda de ortólogos inespecíficos y la limitada cobertura de genes y subfamilias de genes del ciclo del nitrógeno. Esta base de datos incluye mayor cantidad de variantes de los genes para la desnitrificación. La búsqueda se centró en los genes que codifican para los clústeres de enzimas involucradas en los procesos de desnitrificación, DNRA, nitrificación, así como en la asimilación de nitrato y nitrito.

## 5. Resultados

### 5.1 Medio y procedimiento de aislamiento

El criterio considerado para la selección de las muestras derivó en la elección de 36 cepas que comprenden los géneros *Pseudomonas*, *Janthinobacterium* y *Flavobacterium*. De estas cepas, 20 crecieron y consumieron nitrato y nitrito del medio en condiciones anaeróbicas a 4°C (**Tabla 2**). Sin embargo, 15 cepas crecieron pero no consumieron nitrato y nitrito del medio, y una única cepa (Z10) no creció (ver **Tabla A3**).

**Tabla 2.** Cepas con su medida de consumo de  $\text{NO}_3^-$  y presencia de  $\text{NO}_2^-$  realizada.

ID cepa	Consumo $\text{NO}_3^-$ /Presencia $\text{NO}_2^-$ (mg/L)	ID cepa	Consumo $\text{NO}_3^-$ /Presencia $\text{NO}_2^-$ (mg/L)
D6	≤ 10/0	E27	≤ 10/0
D7	≤ 10/0	M18	≤ 10/0
D21	≤ 10/0	M23	≤ 10/0
D25	≤ 10/0	M32	≤ 10/0

E14	≤ 10/0	M44	≤ 10/0
E15	≤ 10/0	Z1	≤ 10/0
E16	≤ 10/0	Z5	≤ 10/0
E18	≤ 10/0	Z16	≤ 10/0
E24	≤ 10/0	Z19	≤ 10/0
E26	≤ 10/0	Z22	≤ 10/0

## 5.2 Caracterización por secuenciación del gen de ARNr 16S

A partir de colonias aisladas de las cepas se obtuvo la identificación mediante el gen de ARNr 16S por EzBioCloud (**Tabla 3**). De las 20 cepas analizadas, 15 fueron identificadas mediante el gen de ARNr 16S. De estas, 13 presentaron una completitud del gen superior al 94,8% (según resultados en tabla), mientras que en dos cepas (E24 y E16) se obtuvieron secuencias parciales. Para las cinco cepas restantes (Z19, M32, Z5, D6 y E26) se logró secuenciar pero los resultados no pudieron ser procesados debido a la mala calidad de las secuencias. Además, la especie más cercana para las cepas D25, E14, M44 y Z22 fue *Janthinobacterium svalbardensis*, mientras que para M18, Z1 y M23, fue *Pseudomonas piscicola*. Solo dos cepas, D7 y D21, fueron identificadas para el género *Flavobacterium*.

**Tabla 3.** Identificación por gen de ARNr 16S. Se muestra la longitud de la secuencia (pares de bases) después del recorte, el taxón más cercano identificado en EzBioCloud y el porcentaje de similitud y completitud de secuencia correspondiente.

ID cepa	Largo secuencia (pb)	Mejor hit EzBioCloud	% similitud	% completitud
D7	1378	<i>Flavobacterium frigidarium</i>	98,40	96,0
D21	1387	<i>Flavobacterium degerlachei</i>	98,19	96,4

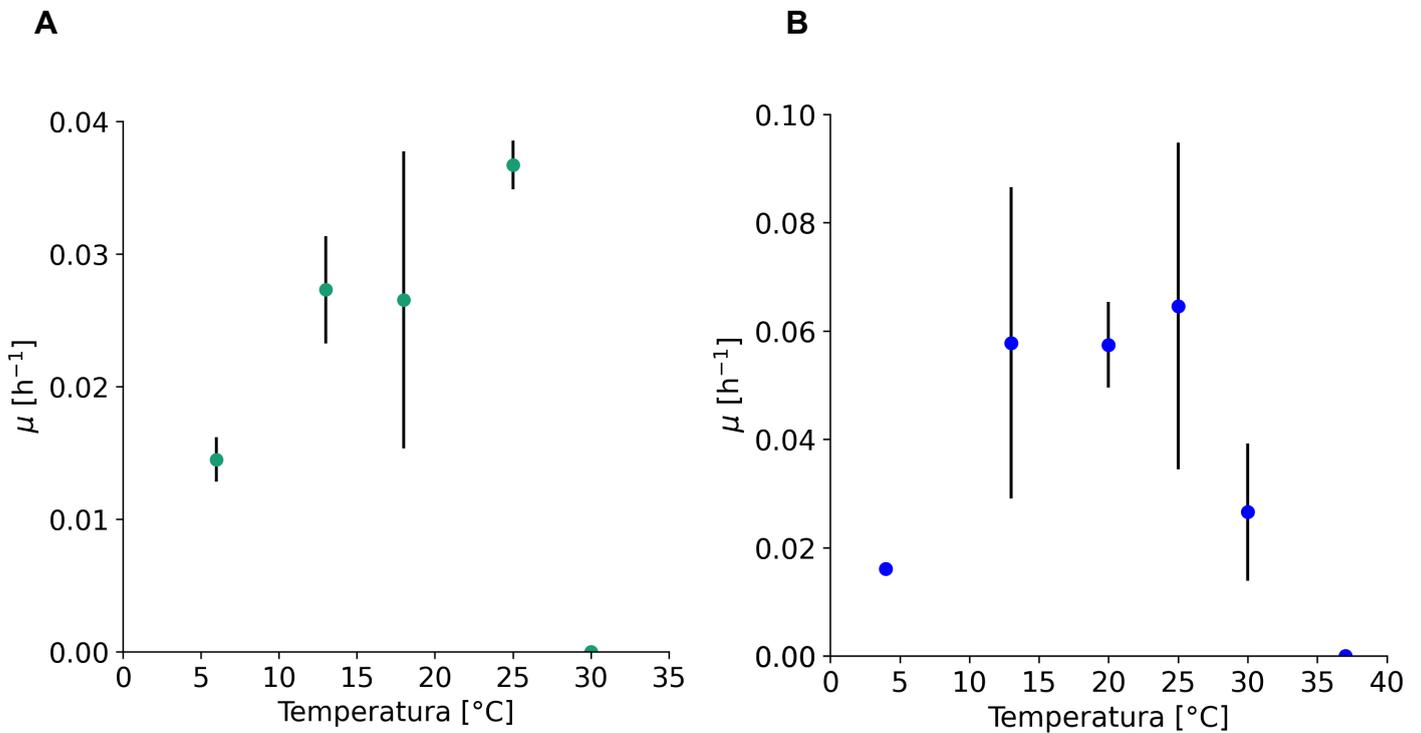
D25	1389	<i>Janthinobacterium svalbardensis</i>	100,00	95,7
E14	1389	<i>Janthinobacterium svalbardensis</i>	99,93	95,7
E15	1412	<i>Pseudomonas mandelii</i>	100,00	96,7
E16	929	<i>Pseudomonas fildesensis</i>	96,93	60,3
E18	1406	<i>Pseudomonas nunensis</i>	99,79	96,2
E24	677	<i>Pseudomonas gregormendelii</i>	97,00	42,7
E27	1403	<i>Janthinobacterium tractae</i>	99,79	96,6
M18	1399	<i>Pseudomonas piscicola</i>	99,84	95,9
M23	1406	<i>Pseudomonas piscicola</i>	98,78	96,2
M44	1376	<i>Janthinobacterium svalbardensis</i>	100,00	94,8
Z1	1400	<i>Pseudomonas piscicola</i>	99,76	95,8
Z16	1404	<i>Pseudomonas gessardii</i>	99,86	96,2
Z22	1404	<i>Janthinobacterium svalbardensis</i>	99,64	96,3

Se observa que de las 15 cepas, ocho pertenecen al género *Pseudomonas*, cinco al género *Janthinobacterium* y dos cepas al género *Flavobacterium*. Cabe destacar que la cepa M44 previamente identificada como *Pseudomonas*, fue reidentificada como *Janthinobacterium*.

### 5.3 Curva de crecimiento a distintas temperaturas

La cepa D21 en el medio 1/10 TSB-N en anaerobiosis mostró crecimiento dentro de un rango de temperatura de 6 a 25°C (**Figuras A1A-A1E**) con temperatura óptima cercana a 25°C (**Figura 6A**). En cambio, la cepa M18 creció en un rango más amplio, de 4°C a 30°C (**Figuras A2A-A2F**), con temperatura óptima

cercana a 25 °C (**Figura 6B**). Ambas cepas son capaces de crecer a temperaturas bajas ( entre 4°C y 6°C) en las condiciones estudiadas.



**Figura 6.** Gráficos de constante de velocidad específica ( $h^{-1}$ ) en función de temperatura ( $^{\circ}C$ ) para **(A)** D21 y **(B)** M18. Las barras negras en cada gráfico representa la desviación estándar para cada medida.

#### 5.4 Anotación funcional en genomas secuenciados y de referencia

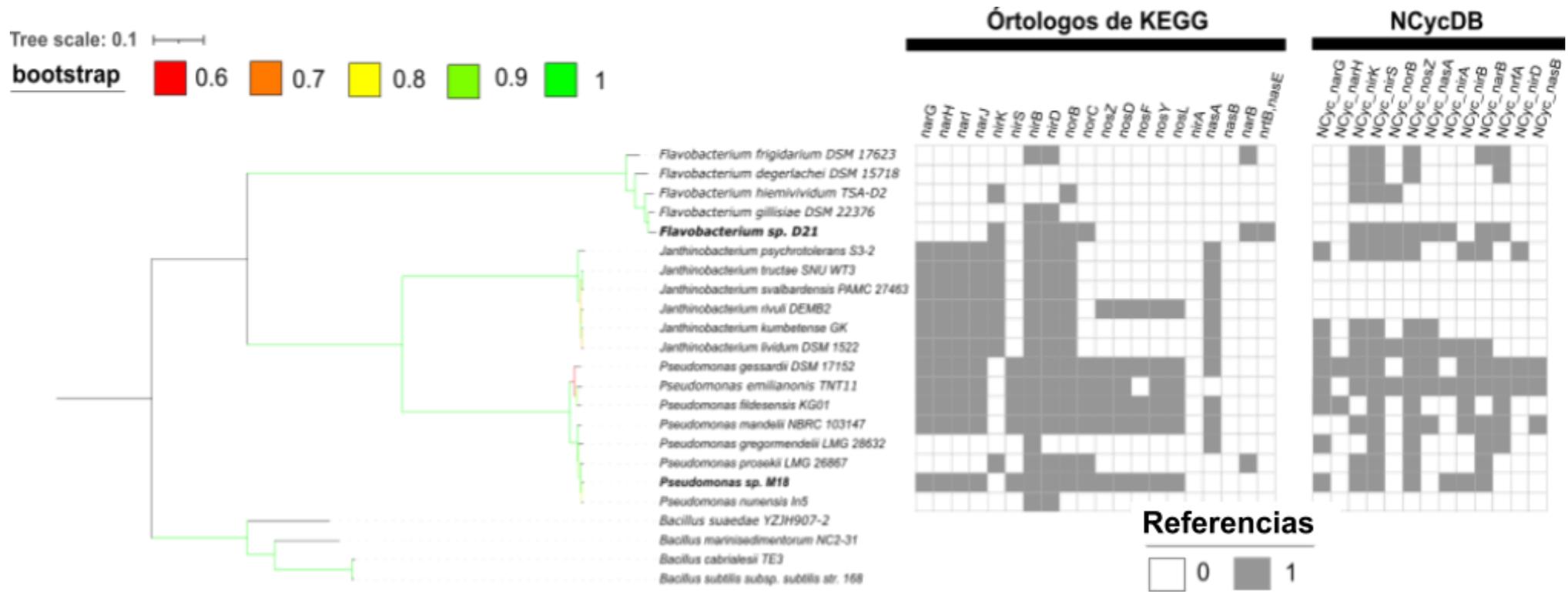
Los genomas secuenciados para las cepas D21 y M18, fueron ensamblados e identificados como pertenecientes a los géneros de *Flavobacterium* y *Pseudomonas*, respectivamente (**Tabla 4**).

**Tabla 4.** Propiedades de los genomas secuenciados para cepa D21 y M18, identificadas como *Flavobacterium sp.* y *Pseudomonas sp.*, respectivamente.

	<i>Flavobacterium sp.</i>	<i>Pseudomonas sp.</i>
Complejidad (%)	99,86	99,44
Contaminación (%)	0,14	0,56
Densidad de codificación	874	886
Contig N50 (Mb)	0,305	0,075
Longitud promedio del gen (pb)	340	326
Tamaño de genoma (Mb)	4,28	6,89
Contenido GC (%)	34	60
Secuencias codificantes totales (pb)	3673	6257

A partir de los 2 genomas ensamblados y con los genomas de referencia para las especies más cercanas según del gen de ARNr 16S, se generó un árbol filogenómico y se anotaron los genes con las bases de datos KEGG y NCyc como se muestra en la **Figura 7**. Se observa que las cepas de *Flavobacterium*, *Janthinobacterium* y *Pseudomonas* se agruparon en tres distintos clados. Para los genomas de *Flavobacterium* y *Janthinobacterium* se observa una buena resolución de filogenia según el valor de bootstrap, mientras que para *Pseudomonas* en el nodo que separa a *P. gessardii* de *P. emilianonis* y *P. fildesensis* se observa un menor resolución de las ramas (valor de bootstrap menor).

En cuanto a la anotación de genes, según KEGG la mayoría de las especies de *Pseudomonas* tienen el gen *narG* para la reducción del nitrato a nitrito en desnitrificación, con excepción de *P. gregormendelii* y *P. prosekii*, mientras que la anotación con la base de datos NCyc a *P. gregormandelli* le encontró el gen pero no



**Figura 7.** Árbol filogenómico asociado con heatmap que indica la presencia (gris) y ausencia (blanco) de enzimas desnitrificantes y otras enzimas involucradas en el ciclo del nitrógeno (base de datos KEGG y NCyc). A la izquierda el árbol construido a partir del alineamiento de 120 genes marcadores para el dominio Bacteria de genomas de referencia de especies más cercanas identificadas por gen de ARNr 16S y genomas secuenciados en este trabajo (destacados en negrita). Se muestran la referencia de colores para los valores de bootstrap: 0,60 (rojo), 0,7 (naranja), 0,8 (amarillo), 0,9 (verde claro), 1 (verde). Las especies del género *Bacillus* corresponden a la raíz del árbol.

a *P. mandelli* y *P. prosekii*. En el análisis con KEGG, *P. proeskii* tiene el gen *narB* que codifica para una nitrato reductasa de la vía asimilatoria de reducción de nitrato. Para las enzimas del segundo paso de la desnitrificación (reducción de nitrito a óxido nítrico), la mayoría de *Pseudomonas* tiene el gen *nirS* en la anotación con KEGG y solo *P. prosekii* tiene *nirK*. Si bien *P. gregormendelii* no parecería tener ninguna de las dos enzimas, en la anotación con NCyc presenta *nirS*. Nótese que en los resultados de anotación utilizando NCyc, la mayoría de las *Pseudomonas* tienen ambos genes. En cuanto al paso de la reducción de óxido nítrico a óxido nitroso, a la enzima codificada por *norBC*, todas las *Pseudomonas* la presentan con excepción de *P. gregormendelii*, según KEGG, mientras que utilizando NCyc, solo se detectó *norBC* en *P. emilianonis*. Respecto al último paso de la vía de desnitrificación realizado por la óxido nitroso reductasa codificada por *nosZ*, se detecta con NCyc que todas las *Pseudomonas* analizadas tienen el gen, y en KEGG solo *P. gregormendelii* y *P. prosekii* no tendrían. Es necesario destacar que *P. nunensis* en ninguna de las dos bases de datos utilizadas mostró tener genes para la desnitrificación, solo en KEGG se detectó los genes *nirB* y *nirD*, que codifican para subunidades de la enzima nitrito reductasa de la vía asimilatoria. Por otro lado, el gen *nrfA* que codifica la nitrito reductasa para la vía DNRA, es detectada en los genomas estudiados a través de NCyc, a excepción de *P. gessardii*, *P. prosekii* y *Pseudomonas sp.* M18. Por último, según NCyc, el genoma para la cepa M18 tiene los genes para la nitrito reductasa de la vía asimilativa: *nirB* y *nirD*.

En cuanto a los genomas de las especies del género *Janthinobacterium*, todos tienen *narG* según los análisis con KEGG y para NCyc, solo se detecta la presencia del mismo gen para *J. lividum*, *J. kumbetense* y *J. psychrotolerans*. En esta última especie, fue la única que presentó el gen *napA*. Utilizando KEGG también se

detectó la presencia de *nasA* en todos los genomas de las especies analizadas para este género, y en NCyc solo fue detectado para *J. kumbetense* y *J. lividum*. Según KEGG, los genomas de *Janthinobacterium* tienen *nirK* exclusivamente, mientras que en NCyc algunas especies tienen también *nirS*. También se destaca que todas las *Janthinobacterium* analizadas presentan *nirBD*, así como *norBC*. Por último, según KEGG solo *J. rivuli* tendría el gen *nosZ* y según NCyc las especies *J. psychrotolerans*, *J. kumbetense* y *J. lividum*. Ninguno de los genomas analizados de las especies de este género presenta el gen *nrfA*.

Según la anotación con KEGG, el genoma de la cepa *Flavobacterium sp. D21* así como en otros genomas de *Flavobacterium* analizadas, carece de genes codificantes del inicio de la vía de desnitrificación (*narGHIJ*, *napAB*, ver **Tabla A2**). Sin embargo, al utilizar NCyc se halló el gen *nasA* codificante para nitrato reductasa asimilatoria y *narB* codificante para una nitrito ferredoxina reductasa, en *Flavobacterium sp. D21*, *F. frigidarium* y *F. gillisiae*. En cuanto a los genes para la nitrito reductasa de desnitrificación, no se detecta *nirS* para *Flavobacterium* en KEGG y solo *nirK* para *F. hiemivividum* y *Flavobacterium sp. D21*. En cambio, al utilizar NCyc, se detectan ambos genes en las mismas especies exceptuando *F. gillisiae*, la cual parecería tener *nirBD*. En cuanto al gen *norB* en *F. hiemivividum* y *Flavobacterium sp. D21* se detecta en ambas bases de datos, y para el gen *nosZ* en KEGG no hay detección en ninguno de los genomas para *Flavobacterium* pero en NCyc se detectan para *Flavobacterium sp. D21*, *F. frigidarium* y *F. degerlachei*.

## 6. Discusión

El medio de aislamiento 1/10 TSB-N no es selectivo, sino que es un medio con cantidad reducida de nutrientes para simular las condiciones presentes en la

Antártida. Aunque las condiciones de crecimiento como la temperatura de 4°C y la anaerobiosis hacen presión selectiva, el medio no es específico para aislamiento de bacterias desnitrificantes. Contiene digeridos de caseína pancreática y de papaína de soja, que pueden actuar como fuentes de nitrógeno así como glucosa y peptonas, que podría servir como fuente de carbono y energía. Por lo tanto, es factible que en este medio se desarrollen bacterias con otros tipos de metabolismo energético, como la fermentación de glucosa.

En cuanto a las diferentes vías, estas no pueden ser diferenciadas específicamente con las tiras semicuantitativas de nitrato y nitrito, ya que tienen un rango aproximado de concentración y por tanto se saturación del color para su detección. Por lo que la vía DNRA no puede ser diferenciada de la desnitrificación por el consumo del sustrato. Debido a estas limitaciones, Christensen, S. y Tiedje, J. M. (1988) desarrollaron una metodología basada en el uso de acetileno para el bloqueo de la enzima Nos, lo que permite acumular óxido nitroso en el medio para luego ser cuantificado mediante cromatografía de gases. La técnica permite detectar si el aislamiento bacteriano realiza la desnitrificación completa, pero no desnitrificación parcial, por lo que aun así, a partir de esta técnica no se podría diferenciar de la producción o acumulación de  $N_2O$  entre un microorganismo reductor de nitrato a amonio disimilatorio o desnitrificante parcial.

La caracterización del gen de ARNr 16S no se logró realizar para cinco cepas, y en dos cepas no se logró de forma completa. Esto se podría atribuir principalmente a la baja calidad de las secuencias obtenidas, posiblemente causada por la presencia de componentes interferentes, como proteínas presentes en el

lisado. Como resultado, no se logró la identificación en algunas cepas debido a una mayor eliminación de nucleótidos en los extremos de las secuencias. Además, la secuenciación por método de Sanger suele tener un alto porcentaje de error a partir de los 600 pares de bases. Se intentó mejorar la calidad de la secuenciación utilizando primers intermedio 800R para mejorar la recuperación de información, pero aún así para algunas cepas no se logró. Debido a la heterogeneidad intragenómica y la presencia de múltiples copias del gen de ARNr 16S, la identificación basada en este marcador permite asignar las cepas únicamente a nivel de género (Pei et al., 2010). En este estudio, se identificaron 2 cepas de *Flavobacterium*, 5 cepas de *Janthinobacterium* y 8 cepas de *Pseudomonas*. Si bien la identificación realizada es respecto a especies cercanas y no es exacta, estas especies parecerían ser de ecosistemas fríos tanto del Ártico como de la Antártida. No obstante, algunas de estas cepas no coincidieron con las especies reportadas por Cabezas, A. et al. (2022), lo que podría deberse a la menor completitud de las secuencias utilizadas en dicho estudio o a la descripción de nuevas especies después de su análisis. Un ejemplo de ello es la cepa E18, que previamente presentaba alta homología con la especie *P. deceptionensis* y ahora está reidentificada como *P. nunensis*, la cual es una especie de *Pseudomonas* recientemente descrita (Ntana et al., 2023). De manera similar, la cepa E17 fue reidentificada como una *J. tructae* (Jung et al., 2021). Para mejorar la precisión taxonómica, se recomienda el uso de otros genes que funcionan como marcadores moleculares, como *rpoB*, entre otros (Dahllöf et al., 2000; Bittar y Rolain, 2010). Por lo tanto, la información obtenida a partir de la secuenciación fue útil como primera aproximación para la selección de genomas de referencia representativos de dichas especies cercanas. Una metodología alternativa es la secuenciación del genoma

completo (por secuenciación shotgun), la cual no solo permite una identificación más precisa de las cepas, sino que además proporciona un conjunto de datos genéticos que pueden ser utilizados para estudios metabólicos. En las cepas D21 y M18, los resultados obtenidos a partir de la secuenciación del gen de ARNr 16S y la secuenciación del genoma completo presentaron inconsistencias a nivel de especie. Por ello, es fundamental evaluar la secuenciación del genoma completo en términos de costo-beneficio. Su principal ventaja reside en la cantidad de información obtenida, lo que permite estudios adicionales como la anotación génica, o análisis comparativos de variaciones en secuencias codificantes entre cepas de diferentes ambientes.

Considerando el árbol filogenómico, la baja resolución observada en un nodo específico (0,6) para *Pseudomonas* podría atribuirse a la utilización de un número limitado de genomas. El bajo valor de bootstrap es particularmente relevante dado que los genomas analizados corresponden a *Pseudomonas* aisladas de ecosistemas fríos, lo que sugiere una alta similitud entre ellos debido a numerosos eventos de transferencia horizontal de genes. Además, es importante tener en cuenta las dificultades previamente documentadas en la separación taxonómica dentro del género *Pseudomonas*. No obstante, este valor aún se considera aceptable en el contexto del análisis filogenético (Saati-Santamaría, Z. et al., 2021; Gomila, M. et al., 2015).

En relación con la anotación de genes vinculados a la vía de desnitrificación, otros estudios han reportado limitaciones en el uso de bases de datos convencionales, dado que esta vía está ampliamente distribuida entre diversos grupos filogenéticos (Isokpehi, R. D. et al., 2024). Para abordar esta problemática, recientemente se han desarrollado bases de datos específicas de genes vinculados

al ciclo de nitrógeno. En el presente trabajo, el uso de la base de datos NCyc permitió identificar genes que, utilizando los ortólogos de la base de datos de KEGG, no fueron hallados. Esto no solo se repite para los genomas secuenciados, sino que también para los genomas de referencia seleccionados. Esto se puede ver reflejado en el resultado más extremo para la *Flavobacterium frigidarium* cercana a la cepa D7, que de acuerdo con KEGG no hay detección de genes para la vía de desnitrificación pero sí a través de NCyc. En el caso de algunas especies de *Flavobacterium*, se identificó el gen *nasA* que codifica para una nitrato reductasa de la vía de reducción de nitrato asimilatoria, y genes desnitrificantes para las enzimas Nir, Nor y Nos. Este resultado es inusual debido a las diferencias funcionales entre las vías asimilatorias y desimilatorias. Krupper, M. M. M., et al., (2018) plantean que la distinción entre ambas vías no es absoluta, dando un reporte de que *Mycobacterium tuberculosis* utiliza la enzima Nar desnitrificante para realizar la asimilación de nitrato. En otros estudios de Jiang et al., (2015) y en Cai y Jiao, (2008) han detectado presencia de *nasA* en *Flavobacterium*, y en el trabajo de Abdelhamed, et al., (2021) observaron una pérdida de capacidad de crecimiento anaeróbico en un medio suplementado con nitrato y con una incapacidad de reducir nitrato a nitrito en una cepa mutada de *Flavobacterium* (desnitrificante con genes *nasA*, *nirS*, *norB*, y *nosZ*) en comparación con la cepa salvaje.

Tanto la cepa D21 como la cepa M18 presentaron bajos niveles de acumulación de óxido nitroso en Cabezas, A. et al. (2022), lo cual podría explicarse por una baja expresión de la enzima responsable o por una alteración en su función. Un factor que influye en esta actividad es la temperatura, ya que estudios previos han señalado la necesidad de condiciones térmicas más elevadas para su óptimo funcionamiento (Wang et al., 2014; Ramírez-Fernández et al., 2021). Por lo que en

ambientes a bajas temperaturas como es el caso de la Antártida, podría estar deteniéndose la vía en el último paso dando la acumulación de óxido nitroso. Esto podría estar de acuerdo con la temperatura óptima. A pesar de los elevados desvíos estándar, se observa que las cepas *Flavobacterium sp.* D21 y *Pseudomonas sp.* M18 no tienen una tendencia de crecimiento psicrófilo en las condiciones anaeróbicas en medio 1/10 TSB-N.

## 7. Conclusiones y perspectivas

A partir de las 36 cepas seleccionadas en este trabajo del estudio de Cabezas, A. et al., (2022), se confirmó el crecimiento y consumo de nitrato y nitrito en un medio anaerobio para 20 cepas. De estas, 15 fueron identificadas con alta homología a especies cercanas utilizando el gen de ARNr 16S, de las cuales 2 cepas fueron elegidas para realizar secuenciación de genoma completo. Los genomas de las cepas D21 y M18 fueron ensamblados e identificados, y se les realizó un árbol filogenético incluyendo a especies del género *Janthinobacterium*, en el cual se distinguen 3 clados diferentes para cada género: *Pseudomonas*, *Janthinobacterium* y *Flavobacterium*. Para la anotación de los genomas ensamblados para las cepas D21 y M18 se usaron dos bases de datos KEGG y NCyc. La anotación de los genomas secuenciados y los de referencia de especies cercanas a las cepas caracterizadas por el gen de ARNr 16S, permitió hallar los genes para la vía de desnitrificación, así como de las vías de asimilación de reducción de nitrito y DNRA. Sin embargo, existen diferencias a nivel de la vía de desnitrificación entre los tres clados. Para especies de *Pseudomonas* y *Janthinobacterium* se ha detectado en la gran mayoría los genes para la desnitrificación. En los genomas analizados de ambos géneros, parecería que las

*Janthinobacterium* no estarían presentando el gen *nosZ*, por lo que su capacidad de desnitrificación estaría incompleta. En general las *Flavobacterium* estudiadas no parecerían tener genes para la desnitrificación, y aquellas que sí tienen genes se la vía de reducción de nitrato y nitrito asimilativas, y genes desnitrificantes para los dos últimos pasos hasta la conversión hacia  $N_2$ . Con las capacidades medidas de crecimiento a 4°C así como del consumo de nitrato y nitrito y con genes desnitrificantes presentes, podría estar indicando que las cepas tienen la capacidad de desnitrificación en la Antártida. Finalmente, sabemos que ambas cepas secuenciadas podrían ser potenciales nuevas especies: *Flavobacterium* sp. D21 y *Pseudomonas* sp. M18. En este trabajo no se identificaron nuevas vías, sino que se destaca la necesidad de abordar el estudio de la desnitrificación de manera integrada. Esto implica combinar la bioinformática, a través del secuenciado y la anotación de genomas utilizando bases de datos curadas y actualizadas con variantes de los genes, junto con estudios microbiológicos y bioquímicos sobre la capacidad de consumo de sustratos, la generación de productos gaseosos y la actividad de enzimas desnitrificantes.

Este trabajo ha intentado aproximarse a nivel de genoma la presencia de genes desnitrificantes que podrían estar explicando los resultados obtenidos en Cabezas, A. et al., (2020). Sin embargo, faltan varios estudios. Se podría empezar realizando un árbol filogenético que incluya mayor cantidad de genomas de los géneros bacterianos estudiados, y de esta manera obtener las especies más cercanas a las cepas D21 y M18 que fueron secuenciadas. Con el conocimiento de estas especies, sería posible analizar estudios realizados por diferentes autores que permitan establecer distinciones fisiológicas entre ellas. Entre los enfoques relevantes se incluyen la evaluación de los ácidos grasos presentes en las

membranas, la caracterización de pigmentos producidos, la detección de glucanos extracelulares, los estudios de consumo de sustratos como fuentes de carbono y energía, y la evaluación de la capacidad de degradación de la pectina, entre otros. Estos resultados en conjunto con valores de ANI, información codificada en el genoma y contenido de GC de genomas, podría llevarnos a determinar si estas cepas podrían ser nuevas especies. Por otro lado, en el laboratorio se podrían hacer estudios de expresión de los genes desnitrificantes a bajas temperaturas para aislar el ARNm y realizar transcriptómica con ellos. Esto permitiría saber si bajo las condiciones de frío, estas cepas son capaces de hacer desnitrificación. Un paso más avanzado, sería poder determinar la actividad enzimática de las enzimas desnitrificantes en laboratorio. Por último, faltan realizar estudios *in situ* en la Antártida de metatranscriptómica con el objetivo de determinar qué especies están activas metabólicamente y cuáles de ellas están realizando desnitrificación. Ese estudio daría información acerca de aquellas bacterias que no son cultivables, ya que en estos estudios se han realizado técnicas dependientes de cultivo.

## 8. Referencias bibliográficas

Abdelhamed, H., Nho, S. W., Karsi, A. y Lawrence, M. L. (2021) *The role of denitrification genes in anaerobic growth and virulence of Flavobacterium columnare*. Journal of Applied Microbiology, Apr;130(4): 1062-1074. doi: 10.1111/jam.14855

Andrews, S. (2010). *FastQC: A Quality Control Tool for High Throughput Sequence Data*. [Online] Disponible en: <https://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc/>

Bergau, L., Bakken, L. R. y Frostegård, A. (2011) *Denitrification regulatory phenotype, a new term for the characterization of denitrifying bacteria*. Biochemical Society transactions, 39(1): 207–212. doi: 10.1042/BST0390207

Bittar, F. y Rolain, J.-M. (2010) *Detection and accurate identification of new or emerging bacteria in cystic fibrosis patients*. Clinical microbiology and infection: the official publication of the European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases, 16(7): 809–820. doi: 10.1111/j.1469-0691.2010.03236.x

Bolger, A.M., Lohse, M. y Usadel, B. (2014). *Trimmomatic: A flexible trimmer for Illumina sequence data*. Bioinformatics, 30(15): 2114-2120

Bottos, E. M., Woo, A. C., Zawar-Reza, P., Pointing, S. B., y Cary, S. C. (2013). *Airborne Bacterial Populations Above Desert Soils of the McMurdo Dry Valleys, Antarctica*. Microbial Ecology, 67(1): 120–128. doi:10.1007/s00248-013-0296-y

Braker, G., Zhou, J., Wu, L., Devol, A. H. y Tiedje, J. M. (2000) *Nitrite reductase genes (nirK and nirS) as functional markers to investigate diversity of denitrifying bacteria in pacific northwest marine sediment communities*. Applied and Environmental Microbiology, May;66(5): 2096-104. doi: 10.1128/AEM.66.5.2096-2104.2000

Braker, G., Fesefeldt, A. y Witzel, K. P. (1998) *Development of PCR primer systems for amplification of nitrite reductase genes (nirK and nirS) to detect denitrifying bacteria in environmental samples*. Applied and Environmental Microbiology, 64(10): 3769–3775. doi: 10.1128/AEM.64.10.3769-3775.1998

Cabezas, A., Azziz, G., Bovio-Winkler, P., Fuentes, L., Braga, L., Wenzel, J., Sabaris, S., Tarlera, S. y Etchebehere, C. (2022) *Ubiquity and Diversity of Cold Adapted Denitrifying Bacteria Isolated From Diverse Antarctic Ecosystems*. Frontiers in Microbiology, Jul 18;13:827228. doi: 10.3389/fmicb.2022.827228

Cai, H. y Jiao, N. (2008) *Diversity and abundance of nitrate assimilation genes in the northern South China sea*. Microbial Ecology, 56(4): 751–764. doi: 10.1007/s00248-008-9394-7

Cassia, R., Nocioni, M., Correa-Aragunde, N. y Lamattina, L. (2018) *Climate Change and the Impact of Greenhouse Gasses: CO<sub>2</sub> and NO, Friends and Foes of Plant Oxidative Stress*. Frontiers in Plant Science, Mar 1;9:273. doi: 10.3389/fpls.2018.00273

Chèneby, D., Philippot, L., Hartmann, A., Hénault, C. y Germon, J. (2000) *16S rDNA analysis for characterization of denitrifying bacteria isolated from three agricultural soils*. FEMS Microbiology Ecology, Dec 1;34(2): 121-128. doi: 10.1111/j.1574-6941.2000.tb00761.x

Christensen, S. y Tiedje, J. M. (1988) *Sub-parts-per-billion nitrate method: Use of an N<sub>2</sub> O-producing denitrifier to convert NO<sub>3</sub> – or 15 NO<sub>3</sub> – to N<sub>2</sub> O*. Applied and Environmental Microbiology, 54(6): 1409–1413. doi: 10.1128/aem.54.6.1409-1413.1988

Coyne, M. S. (2008) *Biological Denitrification*. In Schepers, J.S. and Raun, W.R. (eds.) Nitrogen in Agricultural Systems. Madison: American Society of Agronomy, Crop Science Society of America, Soil Science Society of America, pp. 202-254. doi: 10.2134/agronmonogr49.c7

Dahlöf, I., Baillie, H. y Kjelleberg, S. (2000) *rpoB -based microbial community analysis avoids limitations inherent in 16S rRNA gene intraspecies heterogeneity*. Applied and Environmental Microbiology, 66(8): 3376–3380. doi: 10.1128/aem.66.8.3376-3380.2000.

Dobzhansky, T. (1973) *Nothing in biology makes sense except in the light of evolution*. The American Biology Teacher, 35(3): 125–129.

Etchebehere, C. y Tiedje, J. (2005) *Presence of two different active nirS nitrite reductase genes in a denitrifying Thauera sp. From a high-nitrate-removal-rate reactor*. Applied and Environmental Microbiology, 71(9): 5642–5645. doi: 10.1128/aem.71.9.5642-5645.2005

Ferguson, S. J. (1994) *Denitrification and its control*. *Antonie van Leeuwenhoek*, 66(1–3):. 89–110. doi: 10.1007/bf00871634.

Firestone, M. K. (1982) *Biological Denitrification*. In Stevenson, F.J. (ed.) *Nitrogen in Agricultural Soils*. Agron. Monogr. 22. Madison: American Society of Agronomy, Crop Science Society of America and Soil Science Society of America, pp. 289-326

Fowler, D., Coyle, M., Skiba, U., Sutton, M. A., Cape, J. N., Reis, S., Sheppard, L. J., Jenkins, A., Grizzetti, B., Galloway, J. N., Vitousek, P., Leach, A., Bouwman, A. F., Butterbach-Bahl, K., Dentener, F., Stevenson, D., Amann, M. y Voss, M. (2013) *The global nitrogen cycle in the twenty-first century*. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, May 27;368(1621): 20130164. doi: 10.1098/rstb.2013.0164

Galloway, J. N., Leach, A. M., Bleeker, A. y Erisman, J. W. (2013) *A chronology of human understanding of the nitrogen cycle*. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, May 27;368(1621): 20130120. doi: 10.1098/rstb.2013.0120

Gomila, M., Peña, A., Mulet, M., Lalucat, J. y García-Valdés, E. (2015) *Phylogenomics and systematics in Pseudomonas*. *Frontiers in Microbiology*, Mar 18;6: 214. doi: 10.3389/fmicb.2015.00214

Graf, D. R. H., Jones, C. M. y Hallin, S. (2014) *Intergenomic comparisons highlight modularity of the denitrification pathway and underpin the importance of community structure for N<sub>2</sub>O emissions*. PLOS ONE, 9(12), p. e114118. doi: 10.1371/journal.pone.0114118

Hall, T. A. (1999). *BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT*. Nucleic Acids Symposium Series, 41, pp. 95-98

Hallin, S. y Lindgren, P. E. (1999) *PCR detection of genes encoding nitrite reductase in denitrifying bacteria*. Applied and Environmental Microbiology, 65(4): 1652–1657. doi: 10.1128/aem.65.4.1652-1657.1999

Hallin, S., Philippot, L., Löffler, F. E., Sanford, R. A., Y Jones, C. M. (2018) *Genomics and Ecology of Novel N<sub>2</sub>O-Reducing Microorganisms*. Trends in Microbiology, 26(1): 43–55. doi:10.1016/j.tim.2017.07.003

Hayatsu, M., Tago, K. y Saito, M. (2008) *Various players in the nitrogen cycle: Diversity and functions of the microorganisms involved in nitrification and denitrification*. Journal of Soil Science and Plant Nutrition, 54(1): 33–45. doi: 10.1111/j.1747-0765.2007.00195.x

Heylen, K., Gevers, D., Vanparys, B., Wittebolle, L., Geets, J., Boon, N. y De Vos, P. (2006) *The incidence of nirS and nirK and their genetic heterogeneity in cultivated denitrifiers*. Environmental Microbiology, Nov;8(11):2012-21. doi: 10.1111/j.1462-2920.2006.01081.x

Hochstein, L. I. y Tomlinson, G. A. (1988) *The enzymes associated with denitrification*. Annual Review of Microbiology, 42(1): 231–261. doi: 10.1146/annurev.mi.42.100188.001311

Isokpehi, R. D., Kim, Y., Krejci, S. E. y Trivedi, V. D. (2024) *Ecological Trait-Based Digital Categorization of Microbial Genomes for Denitrification Potential*. Microorganisms, Apr 13;12(4):791. doi: 10.3390/microorganisms12040791

Jetten, M. S. M. (2008) *The microbial nitrogen cycle*. Environmental microbiology, 10(11): 2903–2909. doi: 10.1111/j.1462-2920.2008.01786.x

Jiang, X., Dang, H. y Jiao, N. (2015) *Ubiquity and diversity of heterotrophic bacterial nasA genes in diverse marine environments*. PLOS ONE, 10(2), p. e0117473. doi: 10.1371/journal.pone.0117473

Jones, C. M. y Hallin, S. (2010) *Ecological and evolutionary factors underlying global and local assembly of denitrifier communities*. The ISME Journal, 4(5): 633–641. doi:10.1038/ismej.2009.152

Jung, W. J., Kim, S. W., Giri, S. S., Kim, H. J., Kim, S. G., Kang, J. W., Kwon, J., Lee, S. B., Oh, W. T., Jun, J. W., y Park, S. C. (2021) *Janthinobacterium tructae* sp. nov., Isolated from Kidney of Rainbow Trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Pathogens*, 10(2), 229. doi: 10.3390/pathogens10020229

Kanehisa, M. y Goto, S. (2000) *KEGG: Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes*. *Nucleic Acids Research*, 28(1): .27–30

Kandeler, E., Deiglmayr, K., Tschirko, D., Bru, D. y Philippot, L. (2006) *Abundance of narG, nirS, nirK, and nosZ genes of denitrifying bacteria during primary successions of a glacier foreland*. *Applied and Environmental Microbiology*, 72(9): 5957–5962. doi: 10.1128/aem.00439-06

Kuypers, M. M. M., Marchant, H. K., y Kartal, B. (2018) *The microbial nitrogen-cycling network*. *Nature Reviews Microbiology*, 16(5): 263–276. doi:10.1038/nrmicro.2018.9

Letunic, I. y Bork, P. (2021) *iTOL v6: interactive tree of life*. *Nucleic Acids Research*, 49(W1), pp.W293–W296.

Li, D., Liu, C. M., Luo, R., Sadakane, K. y Lam, T. W. (2015) *MEGAHIT: An ultra-fast single-node solution for large and complex metagenomics assembly via succinct de Bruijn graph*. *Bioinformatics*, 31(10):. 1674-1676

Martínez-Espinosa, R. M. (2020) *Microorganisms and their metabolic capabilities in the context of the biogeochemical nitrogen cycle at extreme environments*. *International Journal of Molecular Sciences*, 21(12): 4228. doi: 10.3390/ijms21124228

Mushinski, R. M., Phillips, R. P., Payne, Z. C., Abney, R. B., Jo, I., Fei, S., Pusede, S. E., White, J. R., Rusch, D. B. y Raff, J. D. (2019) *Microbial mechanisms and ecosystem flux estimation for aerobic NO<sub>y</sub> emissions from deciduous forest soils*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, Feb 5;116(6):2138-2145. doi: 10.1073/pnas.1814632116

Ntana, F., Hennessy, R. C., Zervas, A. y Stougaard, P. (2023) *Pseudomonas nunensis sp. nov. isolated from a suppressive potato field in Greenland*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, Feb;73(2). doi: 10.1099/ijsem.0.005700

Orlando, J., Carú, M., Pommerenke, B. y Braker, G. (2012) *Diversity and activity of denitrifiers of chilean arid soil ecosystems*. *Frontiers in Microbiology*, Apr 5;3:101. doi: 10.3389/fmicb.2012.00101

Palacin-Lizarbe, C., Camarero, L. y Catalan, J. (2018) *Denitrification temperature dependence in remote, cold, and N-poor lake sediments*. Water Resources Research, 54(2): 1161–1173. doi: 10.1002/2017wr021680

Parks, D. H., Imelfort, M., Skennerton, C. T., Hugenholtz, P. y Tyson, G. W. (2015) *CheckM: assessing the quality of microbial genomes recovered from isolates, single cells, and metagenomes*. Genome Research, 25(7):1043–1055

Pei, A. Y., Oberdorf, W. E., Nossa, C. W., Agarwal, A., Chokshi, P., Gerz, E. A., Jin, Z., Lee, P., Yang, L., Poles, M., Brown, S. M., Sotero, S., Desantis, T., Brodie, E., Nelson, K. y Pei, Z. (2010) *Diversity of 16S rRNA genes within individual prokaryotic genomes*. Applied and Environmental Microbiology, Jun;76(12):3886-97. doi: 10.1128/AEM.02953-09

Philippot, L. (2002) *Denitrifying genes in bacterial and Archaeal genomes*. Biochimica et Biophysica Acta - Gene Structure and Expression, 1577(3): 355–376. doi: 10.1016/s0167-4781(02)00420-7

Philippot, L. y Hallin, S. (2005) *Finding the missing link between diversity and activity using denitrifying bacteria as a model functional community*. Current Opinion In Microbiology, 8(3): 234–239. doi: 10.1016/j.mib.2005.04.003

Price, M. N., Dehal, P. S. y Arkin, A. P. (2010) *FastTree: computing large minimum evolution trees with profiles instead of a distance matrix*. *Molecular Biology and Evolution*, 27(10):1701–1710

Ramirez, R. M. (2020) *The effect of high nitrogen pressures on the habitable zone and an appraisal of greenhouse states*. *Monthly notices of the Royal Astronomical Society*, 494(1):. 259–270. doi: 10.1093/mnras/staa603

Ramírez-Fernández, L., Orellana, L. H., Johnston, E. R., Konstantinidis, K. T. y Orlando, J. (2021) *Diversity of microbial communities and genes involved in nitrous oxide emissions in Antarctic soils impacted by marine animals as revealed by metagenomics and 100 metagenome-assembled genomes*. *Science of the Total Environment*, Sep 20;788:147693. doi: 10.1016/j.scitotenv.2021.147693

Saleh-Lakha, S., Shannon, K. E., Henderson, S. L., Goyer, C., Trevors, J. T., Zebarth, B. J. y Burton, D. L. (2009) *Effect of pH and temperature on denitrification gene expression and activity in Pseudomonas mandelii*. *Applied and Environmental Microbiology*, Jun;75(12):3903-11. doi: 10.1128/AEM.00080-09

Saati-Santamaría, Z., Peral-Aranega, E., Velázquez, E., Rivas, R. y García-Fraile. P. (2021) *Phylogenomic Analyses of the Genus Pseudomonas Lead to the Rearrangement of Several Species and the Definition of New Genera*. *Biology (Basel)*, Aug 16;10(8):782. doi: 10.3390/biology10080782

Seitzinger, S. P. (1990) *Denitrification in aquatic sediments*. In Denitrification in Soil and Sediment. Boston, MA: Springer US, pp. 301–322

van Spanning, R. J. M., Richardson, D. J. y Ferguson, S. J. (2007) *Introduction to the biochemistry and molecular biology of denitrification*. In Biology of the Nitrogen Cycle. Elsevier, pp. 3–20

Stein, L. Y. y Klotz, M. G. (2016) *The nitrogen cycle*. Current Biology: CB, 26(3): 94–98. doi: 10.1016/j.cub.2015.12.021

Stüeken, E. E., Kipp, M. A., Koehler, M. C., y Buick, R. (2016) *The evolution of Earth's biogeochemical nitrogen cycle*. Earth-Science Reviews, 160: 220–239. doi:10.1016/j.earscirev.2016.07.0

Thamdrup, B. (2012) *New pathways and processes in the global nitrogen cycle*. Annual review of ecology, evolution, and systematics, 43(1): 407–428. doi: 10.1146/annurev-ecolsys-102710-145048

Technelysium Pty Ltd. (2021) *Chromas: Sequence Viewer and Editor*. Version 2.6.6. [Online] Disponible en: <http://www.technelysium.com.au/wp/chromas/>

Yoon, S., Nissen, S., Park, D., Sanford, R. A. y Löffler, F. E. (2016) *Nitrous Oxide Reduction Kinetics Distinguish Bacteria Harboring Clade I NosZ from Those Harboring Clade II NosZ*. *Applied and Environmental Microbiology*, Jun 13;82(13):3793-800. doi: 10.1128/AEM.00409-16

Tu, Q., Lin, L., Cheng, L., Deng, Y. y He, Z. (2019) *NCycDB: a curated integrative database for fast and accurate metagenomic profiling of nitrogen cycling genes*. *Bioinformatics*, Mar 15;35(6):1040-1048. doi: 10.1093/bioinformatics/bty74

Walton, D.W.H. (2005b) *Antarctic ecosystems: environmental contamination, climate change and human impact* by R. Bargagli *Ecological Studies 175*. Springer (2005) ISBN 3 540 22091 7. *Antarctic Science*, 17(4): 570–570. doi: 10.1017/s0954102005223003.

Wang, X., Yang, X., Zhang, Z., Ye, X., Kao, C. M. y Chen, S. (2014) *Long-term effect of temperature on N<sub>2</sub>O emission from the denitrifying activated sludge*. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, Mar;117(3): 298-304. doi: 10.1016/j.jbiosc.2013.08.009

Yoshinari, T. y Knowles, R. (1976) *Acetylene inhibition of nitrous oxide reduction by denitrifying bacteria*. *Biochemical and biophysical research communications*, 69(3): 705–710. doi: 10.1016/0006-291x(76)90932-3

Zhang, X., Ward, B. B. y Sigman, D. M. (2020) *Global nitrogen cycle: Critical enzymes, organisms, and processes for nitrogen budgets and dynamics*. Chemical Reviews, 120(12): 5308–5351. doi: 10.1021/acs.chemrev.9b00613

Zhang, Z., Zhang, Y. y Chen, Y. (2020) *Recent advances in partial denitrification in biological nitrogen removal: From enrichment to application*. Bioresource technology, 298(122444), p. 122444. doi: 10.1016/j.biortech.2019.122444

Zumft, W. G. (1997) *Cell biology and molecular basis of denitrification*. Microbiology and molecular biology reviews: MMBR, 61(4): 533–616. doi: 10.1128/membr.61.4.533-616.1997

## 9. Anexos

**Tabla A1.** Composición de medio TSB.

<b>Compuestos</b>	<b>Concentración</b>
Digerido pancreático de caseína	17,0 g/L
Digerido enzimático de poroto de soja	3,0 g/L
Cloruro de sodio	5,0 g/L
Fosfato dipotásico	2,5 g/L
Glucosa	2,5 g/L

Ajuste de pH a 7.

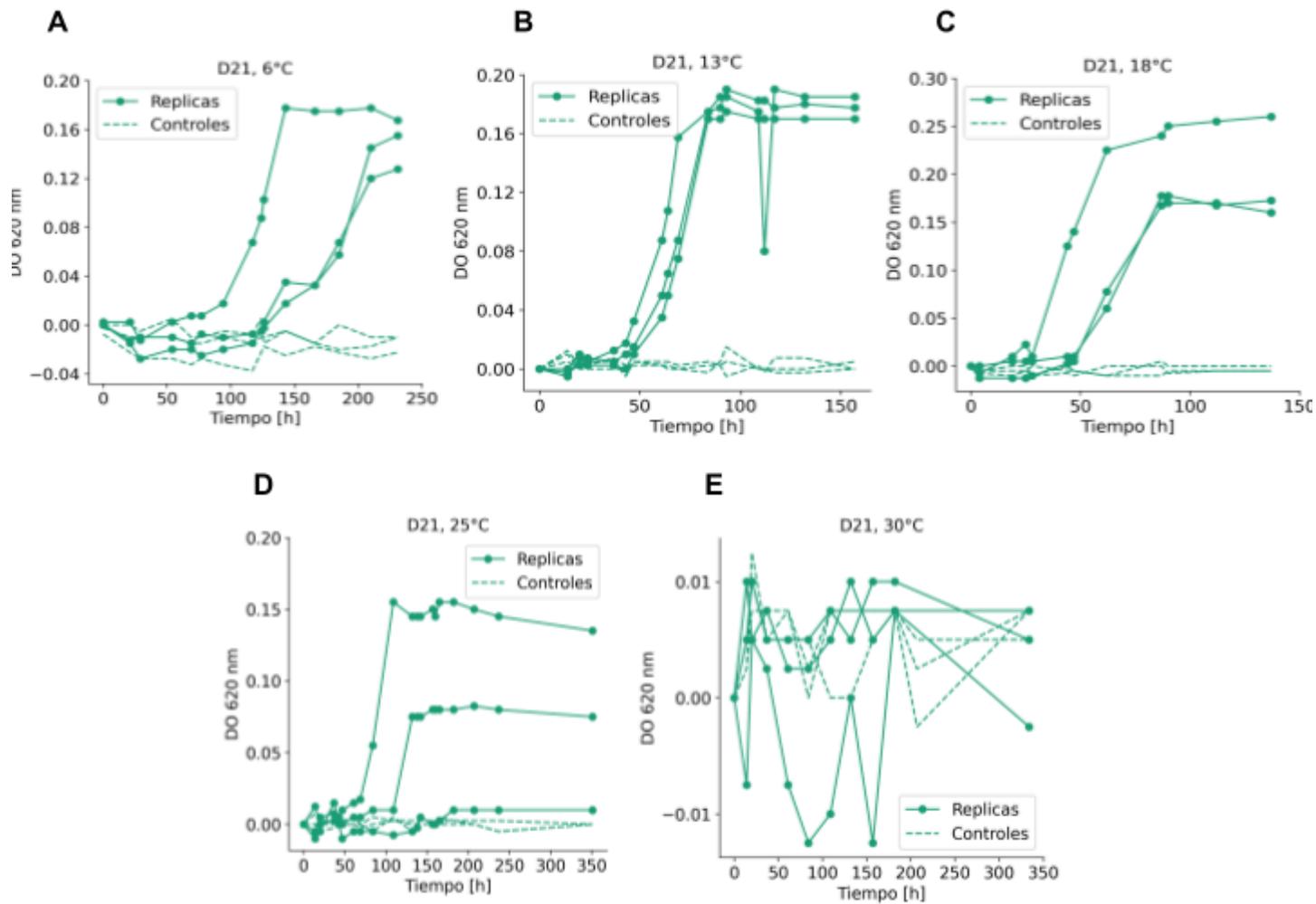
**Tabla A2.** Composición de medio TSA.

<b>Compuestos</b>	<b>Concentración</b>
Digerido pancreático de caseína	15,0 g/L
Digerido enzimático de poroto de soja	5,0 g/L
Cloruro de sodio	5,0 g/L
Agar	15 g/L

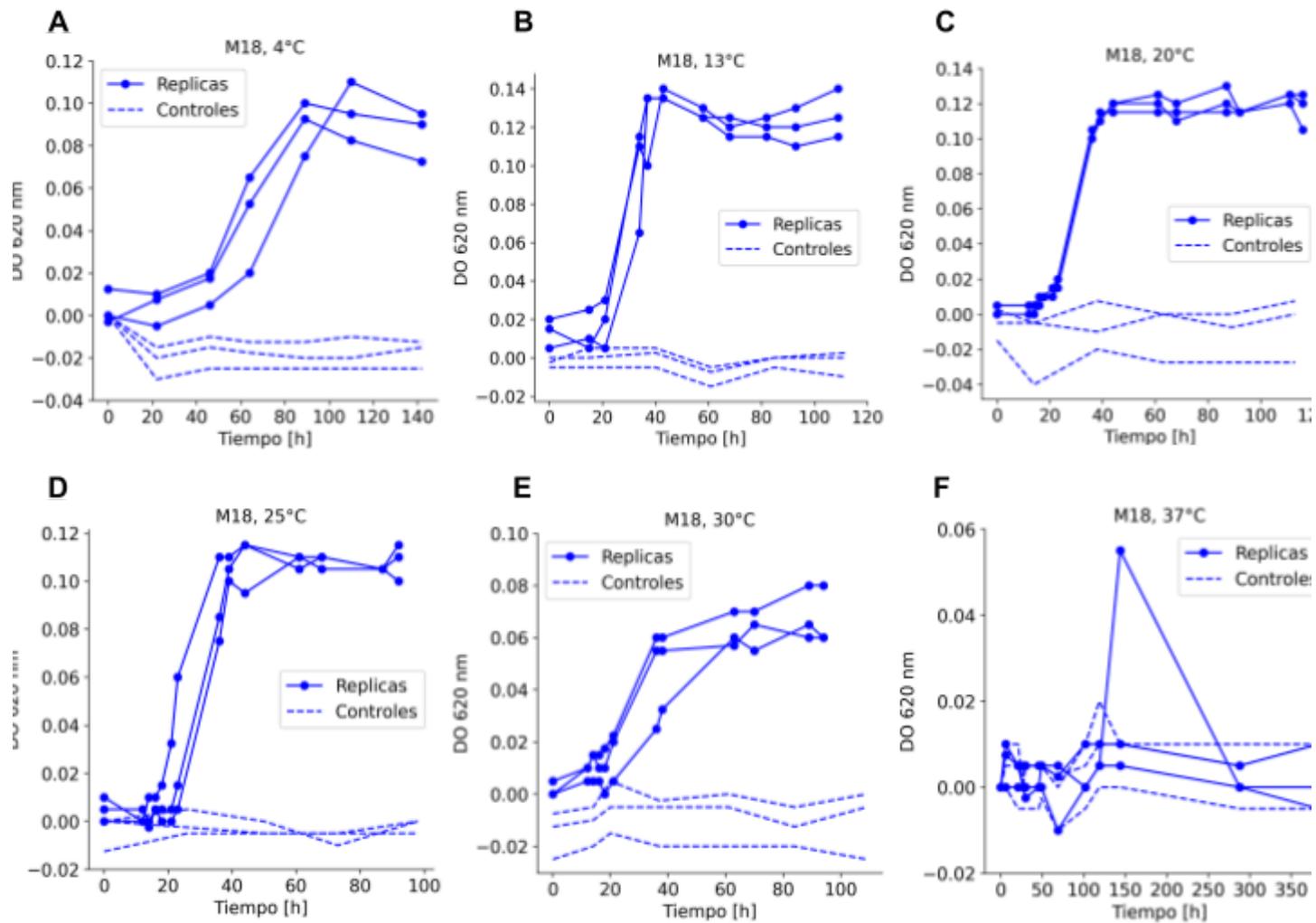
Ajuste de pH a 7.

**Tabla A3.** Cepas con su respectiva identificación en EzBioCloud, con su reporte de genes de nitrito reductasa (*nirS* y *nirK*) y óxido nitroso reductasa (*nosZ*) para el genoma de las especies más cercanas, asociadas a registro de acumulación de óxido nitroso (N<sub>2</sub>O) reportado previamente en Cabezas, A. et al., (2022). Se presenta el porcentaje de homología y largo en pares de bases de la secuencias del gen de ARNr 16S. En la última columna se muestran los valores para las medidas de consumo de NO<sub>3</sub><sup>-</sup> y NO<sub>2</sub><sup>-</sup> realizadas. ++ = acumulación mayor a 50%, + = acumulación de 5-50%, ND = sin datos, X = ausencia, ✓ = presencia.

ID cepa	Mejor hit EzBioCloud	% homología	Largo (pb)	NO2 reductasa	N2O reductasa	Acumulación N2O	Consumo NO3 (mg/L)	Presencia NO2 (mg/L)
D6	<i>Pseudomonas caspiana</i>	99,69	970	nirS	✓	++	≤ 10	0
D7	<i>Flavobacterium frigidarium</i>	99,14	1046	X	X	+	≤ 10	0
D10	<i>Flavobacterium faecale</i>	98,38	801	X	X	+	100	0
D21	<i>Flavobacterium degerlachei</i>	97,85	1070	X	X	+	≤ 10	0
D25	<i>Janthinobacterium svalbardensis</i>	100,00	698	nirK	X	+	≤ 10	0
E1	<i>Pseudomonas bubulae</i>	100,00	1060	X	X	ND	100-250	0
E2	<i>Pseudomonas kairouanensis</i>	98,97	1069	X	X	+	500	80
E5	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	99,88	869	nirS	✓	+	100-250	0
E10	<i>Janthinobacterium svalbardensis</i>	99,80	989	X	X	++	-	-
E12	<i>Flavobacterium degerlachei</i>	99,02	1021	X	X	ND	100-250	0
E14	<i>Janthinobacterium svalbardensis</i>	100,00	821	X	X	++	≤ 10	0
E15	<i>Pseudomonas weihenstephanensis</i>	99,62	1055	X	X	+	≤ 10	0
E16	<i>Pseudomonas extremaustralis</i>	99,79	960	nirK precursor	✓	ND	≤ 10	0
E17	<i>Pseudomonas deceptionensis</i>	99,33	596	nirK precursor	✓	+	100-250	0
E18	<i>Pseudomonas deceptionensis</i>	99,60	1000	nirK precursor	✓	++	≤ 10	0
E24	<i>Pseudomonas kairouanensis</i>	99,14	1053	nirS	✓	++	≤ 10	0
E26	<i>Pseudomonas mandelii</i>	99,71	1046	X	X	+	≤ 10	0
E27	<i>Janthinobacterium svalbardensis</i>	99,63	1082	X	X	++	≤ 10	0
M18	<i>Pseudomonas thivervalensis</i>	99,42	1031	nirS	✓	+	≤ 10	0
M19	<i>Pseudomonas lurida</i>	99,72	1070	X	X	+	250	0
M22	<i>Pseudomonas bubulae</i>	99,35	769	X	X	+	50	0
M23	<i>Pseudomonas avellanae</i>	98,79	1070	nirS	✓	+	≤ 10	0
M26	<i>Pseudomonas deceptionensis</i>	99,62	1059	X	X	+	100-250	0
M32	<i>Pseudomonas mandelii</i>	99,63	1071	nirK	X	++	≤ 10	0
M36	<i>Pseudomonas antarctica</i>	99,52	827	X	X	ND	500	80
M42	<i>Pseudomonas helleri</i>	99,89	886	X	X	ND	100	0
M44	<i>Pseudomonas lurida</i>	99,72	1070	nirS, nirK	✓	++	≤ 10	0
M53	<i>Pseudomonas psychrophila</i>	99,81	1061	X	X	ND	250	0,5-0,1
M58	<i>Pseudomonas mandelii</i>	100,00	1071	nirS	✓	+	500	80
Z1	<i>Pseudomonas frederiksbergensis</i>	100,00	961	X	X	++	≤ 10	0
Z5	<i>Pseudomonas caspiana</i>	99,70	1011	X	X	+	≤ 10	0
Z10	<i>Pseudomonas moorei</i>	98,29	1071	nirK	X	+	100	0
Z16	<i>Pseudomonas gessardii</i>	99,90	966	ND	ND	+	≤ 10	0
Z19	<i>Janthinobacterium lividum</i>	100,00	654	X	X	++	≤ 10	0
Z21	<i>Flavobacterium laiguens</i>	97,67	1071	X	X	+	ND	ND
Z22	<i>Pseudomonas mandelii</i>	99,63	1071	X	X	+	≤ 10	0



**Figura A1.** Curvas de crecimiento para cepa D21 en diferente temperaturas, 6°C (A1A), 13°C (A1B), 18°C (A1C), 25°C (A1D) y 30°C (A1E), medido por densidad óptica a 620 nm con el tiempo. Los controles para cada temperatura se presentan con el mismo código de colores en línea discontinua.



**Figura A2.** Curvas de crecimiento para cepa M18 en diferentes temperaturas, 4°C (A2A), 13°C (A2B), 20°C (A2C), 25°C (A2D), 30°C (A2E) y 37°C (A2F), medido por densidad óptica a 620 nm con el tiempo. Los controles para cada temperatura se presentan con el mismo código de colores en línea discontinua.

**Tabla A2.** Cepas con su respectiva identificación en EzBioCloud, reportando presencia (1) u ausencia (0) de un gen del cluster necesario para el funcionamiento de su enzima.

Cepa	D21		M18		D7		E27		D25, E14, M44		E15		E16		E18		E24		Z16		
Especie	<i>Flavobacterium spp.</i>		<i>Pseudomona spp.</i>		<i>Flavobacterium frigidarium</i>		<i>Janthinobacterium tractae</i>		<i>Janthinobacterium svalbardensis</i>		<i>Pseudomonas mandelli</i>		<i>Pseudomonas fildeensis</i>		<i>Pseudomonas nunensis</i>		<i>Pseudomonas gregomendellii</i>		<i>Pseudomonas gessardii</i>		
Cluster de genes/Base de datos	KEGG	NCyc	KEGG	NCyc	KEGG	NCyc	KEGG	NCyc	KEGG	NCyc	KEGG	NCyc	KEGG	NCyc	KEGG	NCyc	KEGG	NCyc	KEGG	NCyc	
<b>Nitrato reductasa</b>																					
<i>narG</i>	0	0	1	1	0	0	1	0	1	0	1	0	1	0	1	0	0	0	0	1	1
<i>narH</i>	0	0	1	0	0	0	1	0	1	0	1	0	1	0	1	0	0	0	0	1	1
<i>narJ</i>	0	0	1	0	0	0	1	0	1	0	1	0	1	0	1	0	0	0	0	1	0
<i>narJ</i>	0	0	1	0	0	0	1	0	1	0	1	0	1	0	1	0	0	0	0	1	0
<b>Nitrato reductasa asimilatoria</b>																					
<i>narB</i>	0	0	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	1	0	1
<b>Nitrato reductasa (periplasma)</b>																					
<i>napA</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>napB</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>napC</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>napD</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>napF</i>	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<b>Nitrato reductasa asimilatoria</b>																					
<i>nasA</i>	0	1	0	0	0	0	1	0	1	0	1	1	1	0	0	0	0	1	0	1	1
<i>nasB</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1
<b>Nitrito reductasa</b>																					
<i>nirK</i>	1	1	0	1	0	1	1	0	1	0	0	1	0	1	0	0	0	0	1	0	1
<i>nirS</i>	0	1	1	1	0	1	0	0	0	0	1	1	1	1	0	0	0	0	1	1	1
<i>nirB</i>	1	0	1	1	1	0	1	0	1	0	1	1	1	1	1	0	1	0	1	1	1
<i>nirC</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>nirM</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>nirF</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0	1	0
<i>nirD</i>	1	0	1	0	1	0	1	0	1	0	1	0	1	0	1	0	0	0	0	1	0
<i>nirI</i>	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>nirA</i>	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<b>Nitrito reductasa Cys C (formadora de NH4+)</b>																					
<i>nrfA</i>	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0	1	0	1	0	0	0	0	1	0	1
<b>Óxido nítrico reductasa</b>																					
<i>norB</i>	1	0	1	0	0	0	1	0	1	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0	1	0
<i>norC</i>	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0	1	0
<i>norQ</i>	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0	1	0
<i>norD</i>	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0	1	0
<b>Óxido nítrico reductasa</b>																					
<i>nosZ</i>	0	1	1	1	0	1	0	0	0	0	1	1	1	1	0	0	0	1	1	1	1
<i>nosR</i>	0	0	1	0	0	0	1	0	1	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0	1	0
<i>nosD</i>	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0	1	0
<i>nosF</i>	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0	1	0
<i>nosY</i>	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0	1	0
<i>nosL</i>	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0	1	0
<i>nosX</i>	0	0	1	0	1	0	1	0	1	0	1	0	1	0	1	0	1	0	1	0	0