



*Efecto de la salinidad sobre genes asociados a ciclos biogeoquímicos del manglar de la desembocadura del Río Ranchería, La Guajira.*

UNIVERSIDAD COLEGIO MAYOR DE CUNDINAMARCA  
FACULTAD DE CIENCIAS DE LA SALUD  
PROGRAMA DE BACTERIOLOGÍA Y LABORATORIO CLÍNICO  
TRABAJO DE GRADO  
BOGOTÁ D.C, 2019



*Efecto de la salinidad sobre genes asociados a ciclos biogeoquímicos del manglar de la desembocadura del Río Ranchería, La Guajira.*

Angie Vanessa Sandoval Figueredo

María Camila Rodelo Bernal

ASESOR EXTERNO

PhD. MSc. Javier Vanegas Guerrero

ASESOR INTERNO

PhD. Martha Lucía Posada Buitrago

UNIVERSIDAD COLEGIO MAYOR DE CUNDINAMARCA  
FACULTAD DE CIENCIAS DE LA SALUD  
PROGRAMA DE BACTERIOLOGÍA Y LABORATORIO CLÍNICO  
TRABAJO DE GRADO  
BOGOTÁ D.C, 2019

## **Dedicatoria**

*A mi pareja idónea Ferneys López por su amor y apoyo incondicional en todo momento*

*Samanta Lopez, mi motor para seguir adelante y por quien me levanto todos los días*

*A mi madre Carmen Yaned por su apoyo incondicional, por enseñarme a ser una mujer  
guerrera y valiente.*

*A mi mejor amiga Maria Camila por brindarme su amistad incondicional en todo momento*

*A mis padres por su amor y apoyo incondicional, sin ustedes no podría cumplir mis sueños.*

*A mis hermanas y sobrino que llenan mi vida de alegría y a mi familia por estar pendientes  
durante el proceso, ustedes son la fuerza y la motivación para continuar creciendo personal  
y profesionalmente, los amo.*

## **Agradecimientos**

Dios gracias por qué cuando pensábamos que no íbamos a tener trabajo de grado, nos presentaste la oportunidad que exactamente anhelamos, por qué cuando pensamos que no íbamos a ser capaces de lograrlo, lo hiciste posible. Por poner a las personas e instituciones en el momento y lugar adecuado, de esta manera entendimos que no es nuestro tiempo si no el tuyo, que las cosas a veces no pasan como las queremos es por que tienes cosas más grandes para nosotras.

A Colciencias, por permitirnos participar del proyecto financiado “Diversidad funcional de microorganismos asociados al ciclaje de C, N y P en el manglar la Ranchería (La Guajira) mediante un acercamiento de metatranscriptómica” Cod. 1233-659-44129 CT.529/14.

A la Universidad Colegio Mayor de Cundinamarca, Universidad Antonio Nariño, docentes, amigos que encontramos en el camino y familiares que nos apoyaron durante el proceso y lo hicieron posible.

## Tabla de contenido

<b>Abreviaturas</b>	11
<b>Resumen</b>	1
1.	16
2.	18
2.1 Objetivo general	5
2.2 Objetivos específicos	5
3.	19
3.1 Manglares en Colombia	6
3.2 Metagenómica en Colombia	6
3.3 Secuenciación masiva en Manglares	6
3.5 Efecto de la salinidad sobre microorganismos de manglar	9
4.	23
4.1	23
4.1.1	23
4.2	24
4.2.1 Papel de los microorganismos en los ciclos biogeoquímicos	11
4.2.2 Ciclo del Nitrógeno	11
4.2.3 Ciclo del Azufre	13
4.2.4 Ciclo del Carbono	14
4.3 Metagenómica	15
4.3.1 Definición y características	15
4.3.2 Herramientas bioinformáticas de análisis metagenómico	16
4.3.2.1 Megan 5.0	16
4.3.2.2 KEGG	16
4.3.2.3 Microbiome analyst	17
4.3.2.3.1 Lefse	17
4.3.2.3.2 Biomarcador	17
4.3.2.3.3 Metagenomeseq	17
4.3.2.4 STAMP	18
4.3.2.4.1 Análisis de componentes principales PCA	18
4.3.2.4.2 Mapa de calor	18

<b>5.</b>	<b>32</b>	
<b>5.1</b>	Universo, población, muestra	19
<b>5.2</b>	Hipótesis, variables e indicadores	19
<b>5.3</b>	Técnicas y procedimientos	20
<b>3.</b>	<b>36</b>	
<b>6.1</b>	Ciclo del Metano	24
<b>6.2</b>	Ciclo del Nitrógeno	27
<b>6.3</b>	Ciclo del Azufre	29
<b>6.4</b>	Biomarcadores	31
<b>4.</b>	<b>48</b>	
<b>5.</b>	<b>52</b>	
	<b>Referencias Bibliográficas</b>	<b>40</b>
	<b>Anexos</b>	<b>57</b>

## Índice de figuras

<b>Figura 1.</b> Promedio de lecturas de los ciclos biogeoquímicos del Metano, Azufre y Nitrógeno por cada punto de salinidad.....	23
<b>Figura 2.</b> Promedio de lecturas por módulos de los ciclos biogeoquímicos del Metano, Azufre y Nitrógeno por cada punto de salinidad.....	24
<b>Figura 3.</b> Ruta del ciclo del Metano del Manglar del Delta del Río Ranchería, Guajira. Representado por módulos según la base de datos KEGG modules.....	25
<b>Figura 4.</b> Análisis de componentes principales PCA, de módulos del ciclo del Metano.....	26
<b>Figura 5.</b> Mapa de calor de los módulos del ciclo del Metano.....	26
<b>Figura 6.</b> Ruta del ciclo del Nitrógeno del Manglar del Delta del Río Ranchería, Guajira. Representado por módulos según la base de datos KEGG modules.....	27
<b>Figura 7.</b> Análisis de componentes principales PCA, de módulos del ciclo del Nitrógeno.....	28
<b>Figura 8.</b> Mapa de calor de los módulos del ciclo del Nitrógeno.....	28
<b>Figura 9.</b> Ruta del ciclo del Azufre del manglar del Delta del Río Ranchería, Guajira. Representado por módulos según la base de datos KEGG modules.....	29
<b>Figura 10.</b> Análisis de componentes principales PCA, de módulos del ciclo del Azufre.....	30
<b>Figura 11.</b> Mapas de calor de los módulos del ciclo del Azufre.....	30
<b>Figura 12.</b> Marcadores en términos KO del ciclo biogeoquímico del Metano.....	31
<b>Figura 13.</b> Marcadores en términos KO del ciclo biogeoquímico del Nitrógeno.....	32
<b>Figura 14.</b> Marcadores en términos KO del ciclo biogeoquímico del Azufre.....	32

## Índice de tablas

<b>Tabla 1.</b> Microorganismos descritos en los procesos del ciclo del Nitrógeno	12
<b>Tabla 2.</b> Microorganismos descritos en los procesos del ciclo biogeoquímico del azufre	13
<b>Tabla 3.</b> Microorganismos descritos en los procesos del ciclo biogeoquímico del Carbono (metano)	15
<b>Tabla 4.</b> Abundancias normalizadas de términos KO asociados a la producción de osmolitos compatibles y módulos asociados con la respuesta al estrés osmótico.	33



## Índice de Anexos

<b>Anexo 1.</b> Módulos del ciclo del Metano con diferencias significativas entre los tres puntos de salinidad.....	57
<b>Anexo 2.</b> Módulos del ciclo del Nitrógeno con diferencias significativas entre los tres puntos de salinidad.....	58
<b>Anexo 3.</b> Módulos del ciclo del Azufre con diferencias significativas entre los tres puntos de salinidad.....	60
<b>Anexo 4.</b> Géneros de microorganismos asociados al ciclo del Metano con su respectiva abundancia relativa, FDR y <i>p values</i> .....	61
<b>Anexo 5.</b> Géneros de microorganismos asociados al ciclo del Nitrógeno con su respectiva abundancia relativa, FDR y <i>p values</i> .....	62
<b>Anexo 6.</b> Géneros de microorganismos asociados al ciclo del Azufre con su respectiva abundancia relativa, FDR y <i>p values</i> .....	65

## Abreviaturas

<b>Símbolo</b>	<b>Término</b>
<b>N</b>	Nitrógeno
<b>S</b>	Azufre
<b>C</b>	Carbono
<b>KO</b>	Kegg Orthology
<b>LDA</b>	Análisis discriminante lineal
<b>PCA</b>	Análisis de componentes principales
<b>OTU</b>	Unidad taxonómica operativa



## Resumen

Los suelos de manglar albergan una gran variedad de microorganismos claves en el ciclaje de nutrientes que actúan bajo variaciones estacionales y diarias de salinidad. Sin embargo, se desconoce cómo la salinidad influye sobre la actividad funcional de los microorganismos del manglar. El objetivo de este trabajo fue determinar el efecto de la salinidad sobre genes asociados a ciclos biogeoquímicos Nitrógeno, Azufre y Metano en un manglar alterado de la Guajira por medio de un análisis metagenómico. Para esto se muestrearon tres puntos contrastantes en salinidad (H: 61,52 ‰, M: 14,61 ‰, L: 2,80 ‰), se extrajo el ADN total, se secuenció por *Illumina HiSeq*, se anotó con *MEGAN 5* y se asignaron las secuencias con la base de datos *KEGG*. El análisis estadístico se realizó con la página web *Microbiome Analyst* y *STAMP*. Se encontró que los genes asociados al ciclo del Metano tuvieron las mayores abundancias, seguido de los genes del ciclo del N y S. El ciclo del Metano fue favorecido por la salinidad. Se detectaron más marcadores en salinidad alta entre los tres ciclos. Sin embargo, la salinidad baja favoreció la abundancia de glutamina sintetasa (*glnA*) del ciclo del N, la salinidad media de sulfato adeniltransferasa (*sat*) del ciclo del S y la salinidad alta de la piruvato, agua dikinasa (*pps*) del ciclo del Metano. Los resultados revelan la influencia de salinidad sobre los ciclos biogeoquímicos y contribuyen a entender la dinámica funcional de los microorganismos del manglar.

**Palabras claves:** Salinidad, Manglar, Nitrógeno, Azufre, Metano.

## Abstract

*Effect of salinity on genes associated with biogeochemical cycles of the mangrove swamp at the mouth of the Ranchería River, La Guajira.*

Mangrove soils harbor a great variety of microorganisms that are key in the cycling of nutrients that act under seasonal and daily salinity variations. However, it is unknown how salinity influences the functional activity of mangrove microorganisms. The objective of this work was determine the effect of salinity on genes associated to Nitrogen, Sulfur and Methane biogeochemical cycles in an altered mangrove swamp of Guajira by metagenomics. For this, three contrasting salinity points were sampled (H: 61.52 ‰, M: 14.61 ‰, L: 2.80 ‰), the total DNA was extracted, sequenced by *illumina HiSeq*, metagenome annotation with *MEGAN 5* and the sequences were assigned with the *KEGG* database. The statistical analysis was carried out with the *Microbiome Analyst website* and *STAMP*. It was found that genes associated with methane cycle had the highest abundances, followed by the N and S cycle genes. The methane cycle was favored by salinity. In high salinity, more biomarkers were found among the three cycles. However, these indicated that the low salinity favors the abundance of glutamine synthetase (*glnA*) of the N cycle; in medium salinity the sulfate adenytranferase (*sat*) of the S cycle and in high salinity, the pyruvate water dikinase (*pps*) of Methane cycle. The results reveal the influence of salinity on biogeochemical cycles and contribute to understand the functional dynamics of mangrove microorganisms.

**Keywords:** Salinity, Mangrove, Nitrogen, Sulfur, Methane.

## 1. Introducción

Los manglares son ecosistemas ubicados en trópicos y subtrópicos en zonas marinas- costeras <sup>1</sup>, su importancia radica en que son hábitat, alimento y protección para muchos organismos, también reducen el impacto de las mareas, previenen inundaciones y huracanes, desalinizan el suelo a nivel subterráneo y controlan la erosión en la línea costera; en general son un filtro entre la vida marítima y terrestre <sup>2</sup>. Además son base del sustento económico y cultural de comunidades aledañas en cuanto el uso de madera, la pesca, extracción de taninos y sustancias químicas para curtiembre, entre otras <sup>3</sup>.

A pesar de la importancia de los manglares, el área ocupada por estos en todo el mundo, se ha reducido de 1980 al 2005 en un 20 % lo que equivale aproximadamente a 3,6 millones de hectáreas, la tasa de pérdida es mayor que la de otros bosques <sup>4</sup>. Colombia ha perdido más del 50 % de extensión desde los años sesenta, ha pasado de tener 501 300 hectáreas a aproximadamente 213 000 de éstas <sup>5</sup>.

Son ecosistemas expuestos normalmente a cambios estacionales y diarios de salinidad <sup>6</sup>, por ende especies de manglar están adaptadas a los cambios de salinidad diaria limitando la absorción de sal, produciendo solutos osmóticos compatibles <sup>7, 8</sup> y desarrollando estructuras glandulares en sus hojas para expulsar el exceso de sal <sup>9</sup>. La tolerancia de los manglares a la salinidad podría estar asociada a la riqueza de microorganismos rizosféricos <sup>10, 11, 12</sup>, que pueden promover el crecimiento de las plantas bajo condiciones fluctuantes <sup>13</sup>, por lo tanto, la concentración de sales en el agua influye en la abundancia, diversidad y desarrollo del microbioma <sup>14</sup>, como podría pasar con la hipersalinización del suelo que es un problema ambiental creciente causado por actividades tanto naturales como humanas que disminuye la diversidad de especies y altera la composición de las plantas, incluso puede llegar a producir la muerte del mangle <sup>15, 16</sup>.

Se ha evidenciado que los microorganismos participan activamente en el ciclaje de nutrientes, como N, C y S, compensando así la baja disponibilidad de nutrientes, fijando nitrógeno, solubilizando fosfatos y enriqueciendo el detrito resultante de la red trófica que canaliza el flujo de energía y contribuye así al rendimiento del manglar <sup>17</sup>, su funcionamiento y el de ecosistemas aledaños, considerado de esta manera uno de los sistemas con mayor producción

primaria <sup>16, 18, 19, 20</sup>. Por ende el conocimiento de la diversidad taxonómica y funcional de los microorganismos del manglar nos permitiría determinar indicadores de servicios ecosistémicos y de calidad ambiental para fomentar la creación de políticas de conservación del manglar.

Actualmente un importante apoyo en el desarrollo de la investigación biológica son las metodologías basadas en la secuenciación de alto rendimiento de ADN como la metagenómica, la cual reduce cada vez más costos <sup>21</sup>, ofrece independencia de cultivo, por lo que permiten conocer hasta el 99% de la diversidad de una muestra <sup>22</sup>, con mayor precisión y en menor tiempo <sup>23</sup>. Además, permite obtener menor sesgo taxonómico en la secuenciación a diferencia de la amplificación clásica y brinda la capacidad de un análisis simultáneo de una misma comunidad a nivel taxonómico y funcional <sup>24</sup> y son este tipo de herramientas las que han permitido comprender mejor la funcionalidad de muchos microbiomas en los últimos años <sup>14</sup>.

La metagenómica aunque ampliamente utilizada en diferentes campos, se ha utilizado con mayor frecuencia para conocer la diversidad microbiana y el potencial funcional a nivel general presente en manglares <sup>25-30</sup>. Sin embargo, no se ha abordado para conocer cómo funciona el ciclaje de nutrientes de N, S y Metano a través de gradientes de salinidad.

Por ello el objetivo de este trabajo fue determinar el efecto de la salinidad sobre genes asociados a ciclos biogeoquímicos, en suelo rizosférico del manglar de la desembocadura del Río Ranchería, ubicado en el departamento de la Guajira, por medio de análisis metagenómico. Como resultado se logró observar la resiliencia del manglar ante disturbios como la salinidad, ya que en los tres puntos de muestreo la capacidad funcional se mantiene.

## **2. Objetivos**

### **2.1 Objetivo general**

Determinar el efecto de la salinidad sobre genes asociados a ciclos biogeoquímicos del Nitrógeno, Azufre y Carbono (Metano) del manglar de la desembocadura del Río Ranchería, La Guajira; mediante un análisis metagenómico.

### **2.2 Objetivos específicos**

1. Determinar los genes más abundantes asociados a ciclos biogeoquímicos del Nitrógeno, Azufre y Carbono (Metano) del manglar de la desembocadura del Río Ranchería, La Guajira.
2. Detectar las abundancias que difieren significativamente entre los tres puntos de salinidad de los genes asociados a ciclos biogeoquímicos del Nitrógeno, Azufre y Carbono (Metano).
3. Proponer genes marcadores de los ciclos biogeoquímicos en los tres puntos de salinidad.



### 3. Antecedentes

#### 3.1 Manglares en Colombia

En Colombia se ha estudiado la estructura y dinámica vegetal en manglares de la Guajira, en especial los del delta de río Ranchería, donde predominan las especies de *Rhizophora mangle*, *Laguncularia racemosa*, *Avicennia germinans* y *Conocarpus erectus*<sup>31</sup>. Estos manglares presentan alta mortalidad por la baja disponibilidad de agua, por forraje ovino y caprino, deforestación para propagación de urbe, uso de leña, alta irradiación, contaminación por desechos sólidos, y aguas provenientes del casco urbano de Riohacha<sup>32-33</sup>. Por otro lado, *A. germinans* se ha estudiado en especial ya que esta representa mayor biomasa para el delta y un próspero crecimiento en salinidades altas<sup>32, 34</sup>.

#### 3.2 Metagenómica en Colombia

En Colombia los estudios metagenómicos se han venido implementando en los últimos años principalmente en el análisis de suelos. Por ejemplo, a partir de una biblioteca metagenómica de suelo agrícola de cultivo de papa criolla se realizó un ensayo de bioprospección, de una enzima de tipo esterasa<sup>35</sup>. Investigaciones similares se realizaron en el parque “Los Nevados”, en donde se aislaron enzimas de tipo celulasas con la capacidad de producir biocombustibles derivados de compuestos lignocelulósicos<sup>36</sup>. Además, se han caracterizado enzimas lipolíticas y clones metagenómicos con el fin de utilizarlos en bioprospección<sup>37-38</sup>.

#### 3.3 Secuenciación masiva en Manglares

La secuenciación masiva se ha usado para caracterizar la comunidad microbiana total en sedimentos y suelos de manglares por medio de secuenciación tipo *Whole Genome Shotgun*<sup>30, 39</sup>, para comparar con suelo a granel<sup>25</sup>. Además, se ha empleado para definir la diversidad de hongos<sup>40</sup> y de bacterias por medio de la amplificación del gen 16S ARNr<sup>26, 29, 41</sup>. Igualmente,

por medio de *Whole Genome Shotgun* se han buscado moléculas de interés presentes en sedimentos de manglares representadas en genes que codifican proteínas como la proteasa alcalina <sup>42</sup>, familia de glicosil hidrolasa 16  $\beta$ -agarasa <sup>43</sup>, y el descubrimiento de nuevas moléculas como  $\beta$ -N-acetilhexosaminidasa multifuncional <sup>44</sup> con el fin de utilizarlas en bioprospección. Por otro lado se han empleado bibliotecas metagenómicas de suelos publicadas para su comparación, entre estas de manglar a nivel taxonómico y funcional <sup>23</sup>.

En general, el análisis metagenómico de manglares se ha realizado en países como Brasil, China e India. Investigaciones realizadas en India han llegado a determinar que las comunidades bacterianas presentes en suelos y sedimentos de manglar son de gran relevancia en procesos biogeoquímicos <sup>27</sup>.

Cabral y colaboradores <sup>45</sup> realizaron un estudio de metagenómica y metatranscriptómica en sedimento de un manglar contaminado por derrames de petróleo en Brasil, en donde encontraron altas abundancias de enzimas con potencial para degradar hidrocarburos aromáticos. Además, hicieron una comparación con diversos sedimentos de manglar incluidos manglares prístinos.

Imchen y colaboradores <sup>30</sup> compararon los metagenomas y genes involucrados en la resistencia a antimicrobianos y metales pesados en sedimento de manglar de la India, Brasil y Arabia Saudita. Ellos encontraron la proteína causA que le confiere resistencia a los microorganismos contra la plata y el cobre, en cuanto a antimicrobianos la proteína más abundante fue para la resistencia a la acriflavina y fluoroquinolonas. El filo más abundante en los tres metagenomas de manglar fue proteobacterias con 64,28 % <sup>30</sup>.

### **3.4 Avances en la caracterización de los ciclos biogeoquímicos en manglares**

En China, Lin y colaboradores <sup>46</sup>, por medio secuenciación de 16S ARNr y shotgun, estimaron la comunidad microbiana presente en sedimentos de manglar y cómo relacionan funcionalmente ciclos biogeoquímicos de N, S y metano. *Syntrophobacter*, *Sulfurovum*, *Nitrospira* y *Anaerolinea* se encontraron como enlazadores de los tres ciclos biogeoquímicos, al igual, se encontró que para el ciclo del N gran abundancia de amonificación, reducción de nitratos como forma de conservación, reducción de sulfato, producción de polisulfuro para

hacer el S disponible y el metabolismo del metano se encontró como ciclo enlazador de los otros dos.

Por medio de la base de datos FAPROTAX se predijo procesos del ciclo del azufre, nitrógeno y carbono en un manglar del sur de China a partir de muestras de sedimentos superficiales y subterráneas en puntos de marea alta, media y baja a partir de la secuenciación del 16S ARNr, se predijo que para marea alta hay mayor abundancia de nitrificación y oxidación de nitrito, para marea media reducción de nitratos y para marea baja respiración de los compuestos de azufre como sulfato y sulfito <sup>47</sup>.

En Brasil mediante metagenómica se compararon taxonómica y funcionalmente tres ecosistemas de la costa del país, entre estos un manglar, el análisis bioinformático reveló mayor abundancia de secuencias codificantes de los ciclos biogeoquímicos en reducción de sulfito, oxidación de amoníaco y nitrificación <sup>48</sup>. Andreote y colaboradores <sup>28</sup> también revelaron genes de rutas metabólicas relacionadas con los ciclos biogeoquímicos en sedimentos de manglar y describieron las familias más abundantes en este ecosistema como *Burkholderiaceae*, *Planctomycetaceae*, *Rhodobacteraceae* y *Desulfobacteraceae*. Con respecto al ciclo del carbono encontraron genes asociados al metabolismo del metano, formaldehído y el dióxido de carbono. Para el ciclo del nitrógeno hay prevalencia de reducción de nitratos, fijación del nitrógeno y desnitrificación. Para el ciclo del azufre se dan procesos como la producción de adenilsulfato, H<sub>2</sub>S y sulfito.

Rampadarath y colaboradores <sup>49</sup> realizaron el análisis metatranscriptómico de rizosfera de tres regiones de manglares de la costa de Mauritius. Los resultados evidencian genes que codifican enzimas involucradas en el ciclaje de nutrientes, 17 términos asociados con el metabolismo del metano, 14 con el metabolismo del nitrógeno y nueve con el metabolismo del azufre, las familias de microorganismos relacionadas en estos procesos fueron *Burkholderiaceae*, *Planctomycetaceae*, *Rhodobacteriaceae* y *Desulfobacteriaceae* <sup>49</sup>.

La caracterización de los ciclos biogeoquímicos en manglares se ha descrito mediante la actividad de enzimas como la fosfatasa ácida (relacionada con el ciclo del fósforo), ureasa y caseinasa (relacionadas con el ciclo del nitrógeno), y β-glucosidasa (relacionada con el ciclo del carbono) en *Rhizophora mangle* en Venezuela, ellos encontraron que hay disminución de la actividad enzimática en épocas secas y según las características fisicoquímicas del lugar <sup>50</sup>.

Nogueira y colaboradores <sup>51</sup> caracterizaron por metagenómica cuatro manglares, se analizó la diversidad taxonómica y predicción de las rutas metabólicas de las secuencias. El metabolismo de carbohidratos fue el más significativo en comparación con otras rutas de interés como azufre y nitrógeno. El filo más importante relacionado con estas rutas es *Gammaproteobacteria*.

### **3.5 Efecto de la salinidad sobre microorganismos de manglar**

Pocos son los estudios que han evaluado el efecto que tiene la salinidad sobre los microorganismos de manglar, entre esos, un primer acercamiento fue en el manglar de estudio del delta del Río Ranchería, La Guajira que lo hace Figueroa <sup>29</sup> en donde reporta por medio de análisis metagenómico de 16S ARNr que la riqueza microbiana aumenta a medida que disminuye la salinidad, pero a nivel de una salinidad media se presenta menor diversidad microbiana a comparación de salinidades altas y bajas que presentaron mayor diversidad, al igual que hay mayor complejidad en salinidades bajas que quiere decir que hay un gran número de especies con abundancias similares, luego altas y menor en salinidades medias y en cuanto a la presencia de genes relacionados con el estrés salino se pudo evidenciar abundancias significativas en las diferentes concentraciones de salinidad.

Otro acercamiento que apunta a este tipo de análisis lo hace Kimbrel y colaboradores <sup>52</sup> que determinaron el impacto de tres diferentes concentraciones de sal, en la comunidad bacteriana por medio de secuenciación del 16S ARNr y el potencial funcional por secuenciación shotgun, pero en muestras de agua y sedimento de tres estanques de salmuera en San Francisco, California. Obtuvieron “bancos” de microorganismos que permanecen en las diversas concentraciones de sal. Además hallaron alteración de la metanogénesis, metabolismo de aminoácidos y enzimas activas en carbohidratos en cada una de ellas.

## 4. Marco referencial

### 4.1 Ecosistema manglar

#### 4.1.1 Definición

Ecosistemas encontrados hasta en el 70 % de trópicos y subtropicos del mundo, ubicados en medio de tierra y mar por ende son zonas altamente dinámicas y expuestas a la acumulación de compuestos tóxicos derivados de la actividad antropogénica <sup>25</sup>.

El manglar es uno de los ecosistemas con mayor producción primaria en el mundo, debido a la cantidad de nutrientes disponibles provenientes de ríos, escorrentías y materia orgánica que aporta la hojarasca, los cuales son al final mineralizados por los microorganismos <sup>53</sup>. A pesar de la gran cantidad de materia orgánica hay escasez de nutrientes como el N y P, por lo que los microorganismos juegan un papel crucial en el reciclaje de estos <sup>20</sup>.

El mangle es capaz de crecer en suelos con periódicas inundaciones y expuestos a agua con diferentes concentraciones de salinidad que van desde 0‰, hasta hipersalinas 40-90‰, pero su óptimo desarrollo lo obtiene en 15‰ <sup>53</sup>.

La salinidad en suelos y sedimentos de manglar es determinada según la distancia de estos con el mar, entre más cercano se encuentre, la salinidad será mayor debido a que recibe constantemente mayor cantidad de sal, en cambio sí se encuentra alejado, las aguas son salobres ya que reciben más contenido de los ríos y canales; otras variables que pueden afectar la salinidad del ecosistema son las precipitaciones, la marea y los cambios estacionales <sup>4</sup>, así como el clima, la tasa de evaporación del agua, recambio de las mareas y el azolvamiento, se puede llegar a presentar entonces hipersalinidad que es uno de los principales factores de impacto ambiental que causa deterioro en la estructura del manglar llegando a convertirlo en matorral u ocasionarle la muerte <sup>53</sup>.

## 4.2 Ciclos biogeoquímicos

### 4.2.1 Papel de los microorganismos en los ciclos biogeoquímicos

El dominio bacteriano es considerado el de mayor biomasa, diversidad y funcionalidad taxonómica, además que es el causante del cambio atmosférico más importante del planeta, ya que pasó de ser una atmósfera reductora a una oxidante hace miles de años, por lo tanto el estudio de procariotas, espacial y temporalmente, puede ser un indicador de fenómenos ecológicos importantes <sup>24</sup> y es que son los procariotas los facultados para realizar actividades especiales en los procesos del suelo que conllevan a la descomposición de la materia orgánica y la transformación de nutrientes, que junto con C, los almacenan y al morir pueden ser mineralizados por otros microorganismos <sup>14</sup>.

Microorganismos como las arqueas, hongos y bacterias cumplen papeles importantes para el ciclo de nutrientes inorgánicos fundamentales para un suelo productivo, ya que llevan a cabo procesos como la amonificación, fijación de nitrógeno y oxidación entre otros, en donde la materia orgánica se descompone y se liberan nutrientes como nitrato por la nitrificación, sulfato por oxidación del azufre y fosfato por la mineralización del fósforo, al igual que forman sustancias húmicas importantes para la retención de C orgánico en el suelo <sup>14</sup>. Es por ello que el manglar tiene la capacidad de retener nutrientes, regenerarse y mantener una alta productividad primaria debido a la elevada diversidad y actividad microbiana <sup>54</sup>.

### 4.2.2 Ciclo del Nitrógeno

El ciclo del N se da por la interacción de diversas reacciones catalizadas por microorganismos que incluyen al nitrógeno desde su forma oxidada (Nitrato +5) hasta su forma reducida (Amoníaco -3), este proceso es uno de los ciclos de nutrientes más importantes de los ecosistemas terrestres y se da por diferentes vías <sup>55</sup>, como la fijación de nitrógeno que requiere de un medio rico en fuentes de carbono disponibles para reducir  $N_2$  en  $2NH_4^+$  por medio de la enzima nitrogenasa que es codificada por los genes *nifH*, *nifD* y *nifK* o *AnfG* de procariotas fijadores y diazotrofos en ecosistemas acuáticos o terrestres <sup>56, 57</sup>. La actividad enzimática puede verse afectada por fuentes insuficientes de carbono y sensibilidad al oxígeno, además, requiere de elementos como hierro, molibdeno y de un alto costo energético de los

microorganismos que solo es activado cuando el medio es deficiente en nitrógeno <sup>15,18</sup>; finalmente el amoníaco resultante de esta reacción se integra al metabolismo de aminoácidos <sup>55</sup>.

La nitrificación es un proceso realizado por un amplio rango de bacterias con la capacidad de oxidar el NH<sub>3</sub> o reducir el nitrógeno de compuestos orgánicos a nitrato, nitrito e hidroxilamina por medio de enzimas oxidativas que catalizan la reacción de NH<sub>4</sub><sup>+</sup> a NO<sub>2</sub><sup>-</sup> <sup>58</sup>, algunos de los genes marcadores implicados en este proceso son *amoCAB*, *Hao*, *nirK*, *Nir*, *NorB*, *nirS* y *nosZ* <sup>59</sup>.

Procesos como la reducción asimilatoria y la reducción desasimilatoria de nitratos utilizadas para la conversión a NH<sub>3</sub> así como para la desnitrificación cuentan con genes que codifican para enzimas implicadas en los procesos como *NarB*, *NR*, *NasAB* y *NarGHI*, *NapAB* respectivamente <sup>55, 57</sup>.

La desnitrificación continúa con la reducción de NO<sub>3</sub><sup>-</sup> por medio del NO<sub>2</sub><sup>-</sup> a óxido nítrico (NO), óxido nitroso (N<sub>2</sub>O) y N<sub>2</sub>, estos óxidos son producto de los procesos de nitrificación, desnitrificación y están relacionadas con el efecto invernadero y el deterioro de la capa de ozono, en esta fase la concentración de oxígeno es importante debido a que generalmente sucede en ambientes anaeróbicos con la presencia de intermediarios que garantiza la expresión genética, *nirS*, *NarG*, *NapA*, *nrfA*, *nirK*, *norBCZ* y *nosZ* son genes que codifican para enzimas implicados en la desnitrificación <sup>56-59</sup>.

La nitrificación completa (Anammox) es la oxidación anaeróbica del amonio, encargada de convertir el amonio y el nitrito directamente en gas dinitrógeno en anaerobiosis (NH<sub>4</sub><sup>+</sup> + NO<sub>2</sub><sup>-</sup> => N<sub>2</sub> + 2H<sub>2</sub>O), *AmoCAB*, *hzsA*, *hsh* son genes marcadores implicados <sup>56, 58</sup>.

**Tabla 1.** Microorganismos descritos en los procesos del ciclo del Nitrógeno. Consultado de: <sup>15,58</sup>.

Fijación de nitrógeno	Nitrificación	Desnitrificac ión	Reducción asimilatoria de nitratos	Reducción desasimilatoria de nitratos
<i>Azospirillum sp</i>	<i>Nitrosococcus</i>	<i>Nitrobacter</i>	<i>Rhizobium sp</i>	<i>Bacillus sp</i>

	<i>sp</i>	<i>sp</i>		
<i>Azotobacter sp</i>	<i>Nitrospira sp</i>	<i>Paracoccus sp</i>	<i>Azotobacter sp</i>	<i>Bradyrhizobium sp</i>
<i>Bradyrhizobium sp</i>	<i>Nitrobacter sp</i>	<i>Pseudomonas sp</i>	<i>Acinetobacter sp</i>	
<i>Pseudomonas sp</i>	<i>Nitrospina sp</i>	<i>Agrobacteriu m</i>	<i>Klebsiella sp</i>	

### 4.2.3 Ciclo del Azufre

El azufre es un elemento importante para el metabolismo y en general para la vida, sus compuestos orgánicos son de gran relevancia en el ciclo biogeoquímico del azufre, este elemento cuenta con diversos estados de oxidación que van desde +6 sulfato a -2 H<sub>2</sub>S<sup>60</sup>. El ciclo del azufre cuenta con tres procesos uno de ellos es la reducción asimilatoria del sulfato este inicia con la reducción de sulfato a sulfito y finalmente reduce el sulfito a sulfuro, los genes marcadores implicados en este proceso son *sat*, *apr*, *dsr*, *mccA*, *asr*<sup>61</sup>. por otra parte la reducción asimilatoria empieza con el adenosinfosulfato APS que se transforma en PAPS, este se reduce a sulfito y finalmente a sulfuro<sup>60</sup>. Estas vías de reducción del azufre comparten la vía del APS que implica adenosina-5-fosfosulfato como intermediario, el gen marcador de esta etapa es el *apsA* este indica la presencia de procariontes reductores de sulfito y oxidantes del azufre<sup>62, 63</sup>.

Por último la oxidación del azufre es realizada por el sistema SOX, siendo un proceso vital en el ciclaje del azufre, este comprende la oxidación de los compuestos reducidos del azufre hasta SO<sub>4</sub>, para que el complejo SOX sea totalmente funcional debe contar con los siguientes genes *soxA*, *soxYZ*, *soxCD*, *rdsr*, *sqr* y *soxB* el principal marcador de este proceso<sup>62, 63</sup>.



**Tabla 2.** Microorganismos descritos en los procesos del ciclo biogeoquímico del azufre.

Consultado de <sup>61-63</sup>.

Reducción asimilatoria/desasimilatoria de sulfato		Sistema sox
<i>Desulfococcus</i>	<i>Desulfomicrobium bacylatum</i>	<i>Thiobacillus sp</i>
<i>Desulfarculus</i>	<i>Desulfobulbus sp</i>	<i>Paracoccus pantotrophus</i>
<i>Desulfatibacillum</i>	<i>Desulfococcus olearans</i>	<i>Allochromatium minutissimum</i>
<i>Desulfatiglans</i>	<i>Desulfovibrio giganteus</i>	<i>Corynebacterium</i>
<i>Las clases como Deltaproteobacterias, Gammaproteobacterias, firmicutes, Actinobacteria, Spirochaetes y fusobacterium, también han sido descritas en procesos del ciclo del azufre.</i>		

#### 4.2.4 Ciclo del Carbono

El ciclo del carbono es el más importante en el ciclaje de nutrientes, debido a que este elemento es un componente vital de los organismos <sup>64</sup>, los autótrofos tienen la capacidad de utilizar el carbono inorgánico y proporcionar nuevamente carbono orgánico al medio, que posteriormente será utilizado por los organismos heterótrofos, estos lo oxidarán de nuevo a carbono inorgánico completando el ciclo, este balance regula la concentración de CO<sub>2</sub> y O<sub>2</sub> en la atmósfera <sup>65</sup>.

El metabolismo del carbono es complejo e incluye diversos procesos entre estos principalmente la fijación del dióxido de carbono, metabolismo de carbohidratos, lípidos, nucleótidos, aminoácidos, ácido carboxílico, Acyl Co-A y el metabolismo del metano <sup>66</sup>.

El metabolismo del metano es un proceso esencial en el ciclo global del carbono principalmente porque este gas (CH<sub>4</sub>) está catalogado como actor en el efecto invernadero, algunos microorganismos son capaces de oxidar el metano en presencia de oxígeno por tanto, son indispensables en la captura del metano <sup>67</sup>. Los microorganismos metanótrofos y metanogénicos son los más activos en este proceso, los primeros utilizan el CH<sub>4</sub> como única fuente de carbono, en cambio los metanogénicos a partir de los procesos metabólicos que llevan

a cabo sintetizan como un subproducto el metano <sup>66</sup>, la transformación de la materia orgánica a metano está dada por procesos como la hidrólisis, acidogénesis, acetogénesis y metanogénesis esta última puede tomar tres vías de CO<sub>2</sub> a metano, de metanol a metano o de acetato a metano, posteriormente el metano se oxida hasta formaldehído que será asimilado para la biosíntesis por la vía de la serina, ribulosa y xilulosa monofosfato, o hasta llegar a CO<sub>2</sub> como fuente de energía <sup>66, 68</sup>. Algunos de los genes implicados en el metabolismo del metano son *fmdABCDEFGH*, *mtrABCDEFGH*, *mcrABCDG*, *hdrCDE*, *cdhABCDE*, *acd* <sup>69</sup> el gen *pmoA* se ha utilizado como un importante marcador de esta ruta <sup>67, 68</sup>.

**Tabla 3.** Microorganismos descritos en los procesos del ciclo biogeoquímico del Carbono (metano). Consultado de <sup>67, 68, 70</sup>

<b>Metanogénicos</b>	<b>Metanotróficos</b>
<i>Methanobacteria</i>	<i>Methylomonas sp</i>
<i>Methanococci</i>	<i>Methylocystis sp</i>
<i>Methanomicrobiota</i>	<i>Methylobacter sp</i>
<i>Methanopyri</i>	<i>Methanosaeta sp</i>

## 4.3 Metagenómica

### 4.3.1 Definición y características

La metagenómica se define según Bonilla-Rosso G. *et al* <sup>24</sup> como “el análisis funcional y taxonómico de secuencias de los genomas microbianos colectivos contenidos en una muestra ambiental, basándose ya sea en expresión o secuenciación”.

La metagenómica se deriva de la genómica microbiana la diferencia principal es que la primera no requiere de la obtención de cultivos puros para realizar secuenciación una ventaja que promete revelar el genoma de microorganismos no cultivables, esta herramienta puede obtener hasta aproximadamente 1Gb de información dependiendo de la plataforma de secuenciación,

crea hipótesis acerca de las interacciones de la comunidad microbiana además, de facilitar la comprensión de la ecología y la evolución de los ecosistemas microbianos <sup>71</sup>.

El análisis metagenómico requiere de un proceso que comprende recolección de la muestra, extracción de ADN, elaboración de la biblioteca, secuenciación, procesamiento de lecturas, ensamblaje y anotación, para realizar un análisis de datos pertinente <sup>71</sup>.

### **4.3.2 Herramientas bioinformáticas de análisis metagenómico**

#### **4.3.2.1 Megan 5.0**

Es una herramienta de software para análisis interactivo de gran capacidad para datos de metagenómica, disponible gratuitamente, con posibilidad de ser ejecutado en múltiples sistemas operativos. Asigna lecturas, hace alineamientos múltiples y ensamblaje contra secuencias de referencia. Los metadatos de muestra son compatibles. Ofrece asesoría y soporte a través de la página y correo electrónico. Disponible en: <http://ab.inf.uni-tuebingen.de/software/megan6/whats-new/> <sup>72</sup>.

Además, permite análisis funcional con la base de datos KEGG donde intentará poner a cada lectura un gen con un término KO (Kegg orthology) válido y por ende a una o más vías, para esto, MEGAN utiliza un mapeo de números GI para grupos KO. Si se desea entonces un tipo de análisis con KEGG, la base de datos que se usa en la alineación BLAST debe ser números GI <sup>73</sup>.

#### **4.3.2.2 KEGG**

Enciclopedia de Kioto de genes y genomas, es una base de datos que contiene información sobre diferentes vías entre estas las rutas metabólicas. Asigna a cada gen una función de orden superior ubicada en la base de datos *Ruta (Pathway)* en donde están representadas gráficamente vías de procesos celulares <sup>74</sup>, a su vez esta base de datos está complementada con una base de grupos *KO (Kegg Orthology)* que hace referencia a funciones moleculares representadas en ortólogos funcionales por tanto son importantes para predecir la función génica.

También se encuentra disponible una colección de unidades funcionales definidas de forma manual que se denominan *Módulos (Modules)* que están compuestos por términos KO, estos son utilizados en la interpretación biológica y la ampliación de genomas secuenciados. Disponible en: <https://www.genome.jp/kegg/> <sup>75</sup>.

#### **4.3.2.3 Microbiome analyst**

Es una herramienta fundamentada en la web para metanálisis estadístico y gráfico de datos de microbioma. Contiene cuatro módulos entre ellos SDP (Shotgun Data Profiling) que permite explorar perfiles funcionales y visualizar redes metabólicas de metagenómica shotgun, el cual requiere entrada de datos de genes anotados por KEGG *Orthology* (KO) <sup>76</sup>. Disponible en: <http://www.microbiomeanalyst.ca/>

##### **4.3.2.3.1 Lefse**

Es un método estadístico basado en la matriz de abundancia relativa normalizada. Utiliza la prueba de *kruskal-wallis* para obtener características con abundancias significativamente diferentes entre las muestras y emplea análisis discriminante lineal (LDA) para estimar el tamaño del efecto de cada función y así determina los potenciales marcadores <sup>76, 77</sup>.

##### **4.3.2.3.2 Biomarcador**

Se definen como mediciones (organismos, clados, OTUs-Unidad Taxonómica Operacional, funciones o genes) que pueden explicar las diferencias entre clases, su consistencia biológica y relevancia de su efecto. Estas características afirman que hay diferencias entre clases <sup>77, 78</sup>.

##### **4.3.2.3.3 Metagenomeseq**

Test estadístico que muestra diferencias significativas entre abundancias de clases del microbioma, integrando el método de normalización de datos escala de suma acumulativa (CSS) y como modelo estadístico la distribución Gaussian (ZIG) inflada en cero <sup>76</sup>.

#### **4.3.2.4 STAMP**

STAMP es un paquete de software gráfico utilizado para el análisis de perfiles taxonómicos o metabólicos, suministrando pruebas de hipótesis, gráficos exploratorios, medidas de tamaño efecto e intervalos de confianza, que determinan la importancia de las características biológicas de un perfil metagenómico, este emplea pruebas estadísticas y gráficos como Análisis de componentes principales (PCA), boxplot, mapas de calor, gráficos de barras, dispersión etc, para determinar diferencias entre dos o más muestras, por ejemplo para muestras agrupadas en tres o más emplea el test de ANOVA y *Kruskal-Wallis* H. Además, halla características significativas en grupos que se diferencian entre si utilizando la prueba de Tukey-Kramer <sup>79, 80</sup>. Disponible en: <http://kiwi.cs.dal.ca/Software/STAMP>

##### **4.3.2.4.1 Análisis de componentes principales PCA**

Gráfica que señala patrones dados por la variación de un conjunto de datos <sup>61</sup>. El objetivo del gráfico es representar la información importante como un conjunto de nuevas variables ortogonales denominadas componentes principales mostrando el patrón de similitud tanto de las observaciones como de las variables como puntos en un mapa <sup>81</sup>.

##### **4.3.2.4.2 Mapa de calor**

Muestra patrones relativos de datos con gran abundancia, menor o ausente <sup>61</sup>, mediante una matriz de colores rectangular que indica la cantidad (intensidad) de la variable dependiente. Permite una visualización rápida y general de los datos de manera cuantitativa <sup>82</sup>.

## 5. Diseño metodológico

### 5.1 Universo, población, muestra

La investigación que se realizará tiene un alcance investigativo de tipo Descriptivo.

**Universo:** Manglar de la desembocadura del Río Ranchería, Guajira.

**Población:** Microorganismos del manglar.

**Muestra:** Comunidad bacteriana asociada al suelo rizosférico de *Avicennia germinans*.

**Tamaño de la muestra:** Tres puntos con gradientes de salinidad contrastantes.

### 5.2 Hipótesis, variables e indicadores

**Hipótesis:** La salinidad influye sobre los genes asociados a ciclos biogeoquímicos del N, S y metano de la rizosfera de *Avicennia germinans* en un manglar semiárido.

**Variable dependiente:** Gradiente de salinidad.

**Variable independiente:** Abundancia de genes.

**Indicador:** Agrupaciones de genes presentes en cada muestra.

### 5.3 Técnicas y procedimientos

Este trabajo parte del muestreo realizado y descrito por Figueroa <sup>29</sup>. El muestreo se realizó en una región semiárida del brazo Riito del río Ranchería, en La Guajira, Colombia. Esté presenta precipitaciones promedio de 50,7 mm.a-1, temperatura anual de mínimo 24,1 y máximo de 33,3 °C con una media de 28,2 °C, irradiación global horizontal de 5,25 kWh m-2d-1 y un brillo solar medio de 7,5 horas diarias anuales <sup>83</sup>. Se recolectaron nueve muestras de suelo rizosférico de *Avicennia germinans* de tres puntos con gradientes de salinidad contrastantes elegidas por el nivel de conductividad del agua intersticial. Las muestras se clasificaron por nivel de salinidad alta 4A, 4B, 4C (N 11°33'12.0'' W 72°54'03.9''), 61,52 ‰ de salinidad, CE 38,64 mS cm<sup>-1</sup>; baja 3A, 3b, 3C (N 11°33'08.4'' W 72°53'59.6''), 2,80 ‰ de salinidad y CE 5,27 mS cm<sup>-1</sup>; media 2A, 2B, 2C (N 11°33'11.4'' W 72°54'03.5''), 14,61 ‰ de salinidad y CE 20.136 mS cm<sup>-1</sup>. Para categorizar el manglar, a todas las muestras se les realizaron las siguientes pruebas y mediciones utilizando el método de relación suelo: agua 1:1 p/v, con el método semi-micro Kjeldahl se determinó el contenido de nitrógeno total, los niveles de amonio y nitratos por medio de la extracción de 2 N KCl, destilación con MgO y aleación de devarda, utilizando extracción con acetato de amonio 1N se determinaron los contenidos de Ca, K, Mg y Na <sup>29</sup>.

De cada réplica del muestreo se realizó extracción de ADN genómico total, utilizando el kit PowerLyzer PowerSoil DNA isolation (MoBio Laboratories, Inc, Carlsbad, CA, USA) siguiendo las instrucciones proporcionadas por el fabricante. La concentración de ADN extraído se evaluó con el fluorómetro Qubit invitrogen (Life Technologies, CA), la integridad de ADN se observó por medio de electroforesis en gel de agarosa al 0.8%. Finalmente se obtuvo un aproximado de 50 µl de ADN genómico a 40 ng/µl <sup>29</sup>. La secuenciación de las muestras se realizó en la plataforma Illumina HiSeq 2500 2x150pb paired-end (UWBC Bioinformatics Resource Center, wisconsin) <sup>84</sup>.

Un total de 294 130 516 lecturas fueron secuenciadas, en promedio 32 681 168 para cada una de las nueve muestras. Utilizando el programa FastQC V 0.11.2 se evaluó la calidad de las secuencias, con el software Trimmomatic V 0.36 se retiraron los primers y adaptadores <sup>85</sup>, los parámetros con lo que se realizó fueron los siguientes LEADING:15, TRAILING:15, SLIDINGWINDOW:4:20 y MINLEN:100, después de tener las secuencias limpias se

analizaron en DIAMOND v 0.9 <sup>86</sup>, este realiza el alineamiento, comparándolo con la base de datos de proteínas no redundantes del NCBI, mediante el algoritmo BLASTx se determinó un porcentaje de identidad del 80 % (e- valor  $10^{-5}$ ). Se diseñó un script con Python (*in house*) para cambiar los códigos de acceso *id* por *gi* arrojados por DIAMOND debido a que el software MEGAN 5 que se usó para realizar la anotación de las lecturas obtenidas no identifica este código <sup>84</sup>.

### **1. Determinar los genes más abundantes asociados a ciclos biogeoquímicos del N, S y Metano del manglar de la desembocadura del Río Ranchería, La Guajira.**

Se utilizó el software MEGAN 5 para realizar la anotación funcional de las secuencias en términos de KEGG <sup>86</sup> y la anotación taxonómica basada en algoritmo del ancestro en común más bajo LCA, con los parámetros min-support: 25, min-score:80, top-percent:10, Max Expected: $10^{-5}$ .

El archivo obtenido en MEGAN 5 se subió a la plataforma web *Microbiome Analyst* para realizar el análisis funcional y taxonómico. En donde las abundancias de los términos KEGG se filtraron para eliminar los términos KO con conteos bajos (menos de 2 conteos en el 20% de la muestra) y los términos KO de baja varianza (se eliminó el 10% de los términos KO en el rango inter-cuantil de la varianza). Los recuentos fueron normalizados utilizando el algoritmo Cumulative Sum Scaling.

Cada término de KEGG se asoció a las respectivas rutas de metabolismo de nitrógeno (map00910), metabolismo del azufre (map00920) y metabolismo del metano (map00680), al igual los términos KO se agruparon en los módulos de cada ciclo de acuerdo a la base de datos de KEGG, utilizando las lecturas normalizadas. Además, se completaron las rutas de cada ciclo con las secuencias relacionadas que no fueron involucradas en los módulos, para plantear una posible ruta del ciclo en general del manglar. Así mismo se buscaron términos KO relacionados con la respuesta al estrés osmótico. Los términos KEGG que se utilizaron fueron los arrojados por esta base de datos en, agosto 2018.

Para el análisis taxonómico los datos igualmente fueron ingresados a la página web *Microbiome Analyst*, las abundancias de cada taxón se filtraron para remover los recuentos bajos (menos de 10 conteos en el 20% de la muestra) y los taxones de baja varianza (remover el 10% de los taxones en el rango inter-cuartil de la varianza), los conteos se normalizaron



utilizando el método algoritmo Cumulative Sum Scaling. Los microorganismos obtenidos se relacionaron para cada proceso de cada ciclo biogeoquímico por medio de literatura utilizando la base de datos curada *Uniprot*.

## **2. Detectar las abundancias que difieren significativamente entre los tres puntos de salinidad de los genes asociados a ciclos biogeoquímicos del Nitrógeno, Azufre y Carbono (Metano).**

Las abundancias con diferencias significativas entre los puntos de salinidad de los términos KEGG y de cada taxón se obtuvieron utilizando la plataforma web *Microbiome Analyst*, con la función MetagenomeSeq usando parámetros predeterminados y un valor de  $p < 0,05$ . Usando las abundancias de cada módulo se realizaron mapas de calor y PCA con el software STAMP V 2.1.3 con Anova y Tukey- Kramer como pruebas estadísticas

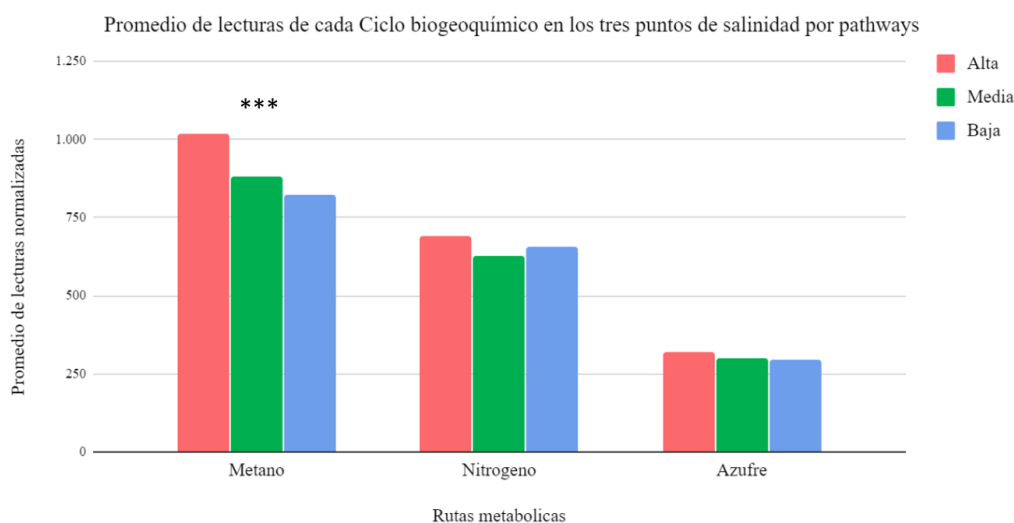
## **3. Proponer genes marcadores del efecto de la salinidad en los ciclos biogeoquímicos.**

Para determinar los términos KEGG con potencial para ser marcador se utilizó la función Lefse de la página web *Microbiome Analyst* usando los parámetros predeterminados, con un valor LDA score 1,0 y  $p < 0,05$ .

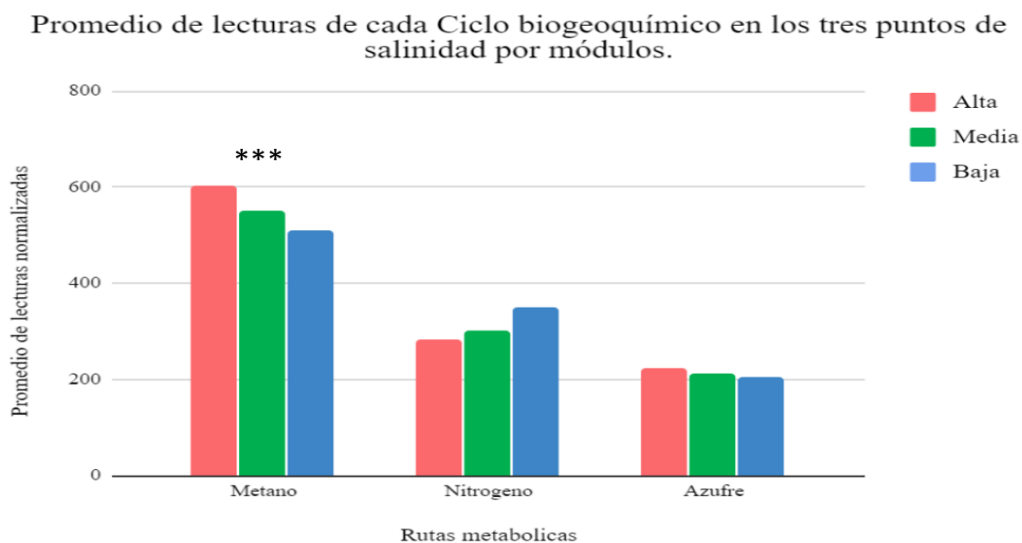
### 3. Resultados

De las secuencias obtenidas de cada muestra, se asignaron 9 731 528 lecturas de los cuales se anotaron 3832 términos KEGG. La clasificación taxonómica permitió asignar 4 877 017 lecturas al dominio de Bacteria, en promedio se clasificaron 270 945 lecturas para cada muestra, con el conteo de lecturas más bajo y más alto de 135 192 (4H) y 367 073 (3L) respectivamente. Después de eliminar las OTU con una abundancia baja (3942) y una varianza baja (329), se conservaron 2958 OTUs, que se clasificaron en 35 filios diferentes.

El ciclo biogeoquímico del metano presentó las mayores abundancias de secuencias relacionadas con genes que codifican para alguna enzima implicada en el ciclo biogeoquímico, seguido del ciclo del N y el S, en las tres salinidades tanto por módulos como por ruta completa, que incluye secuencias encontradas que no pertenecen a ningún módulo pero que al igual participan en el ciclo; Se observó que la salinidad únicamente influyó en el ciclo del metano, presentando las mayores abundancias en salinidad alta (Figura 1- 2).



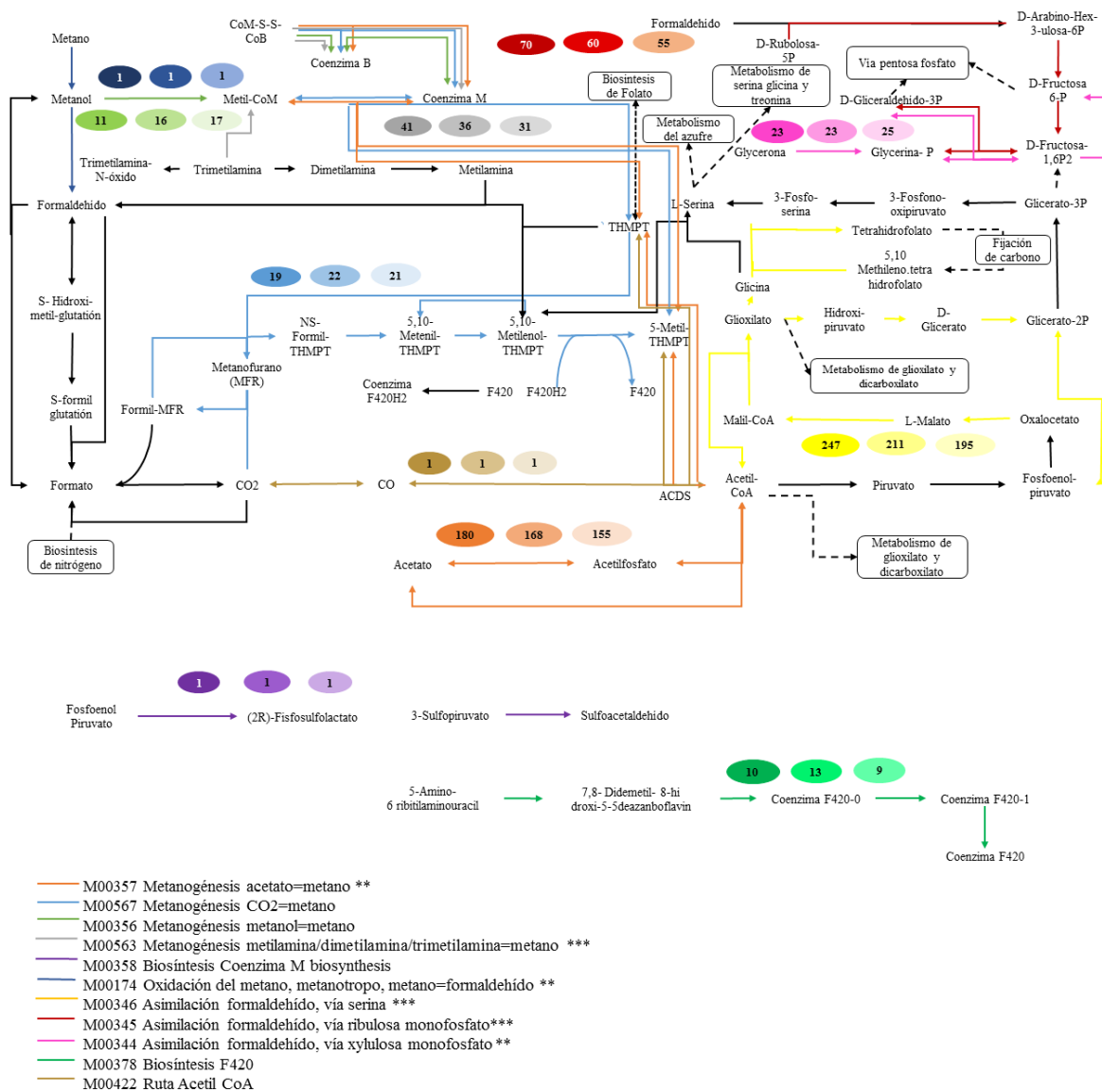
**Figura 1.** Promedio de lecturas de los ciclos biogeoquímicos del Metano, S y N por cada punto de salinidad H (alta), M (media), L (baja). Valor de significancia entre las abundancias de los tres puntos de muestreo (\*\*\*)  $p \leq 0,001$ .



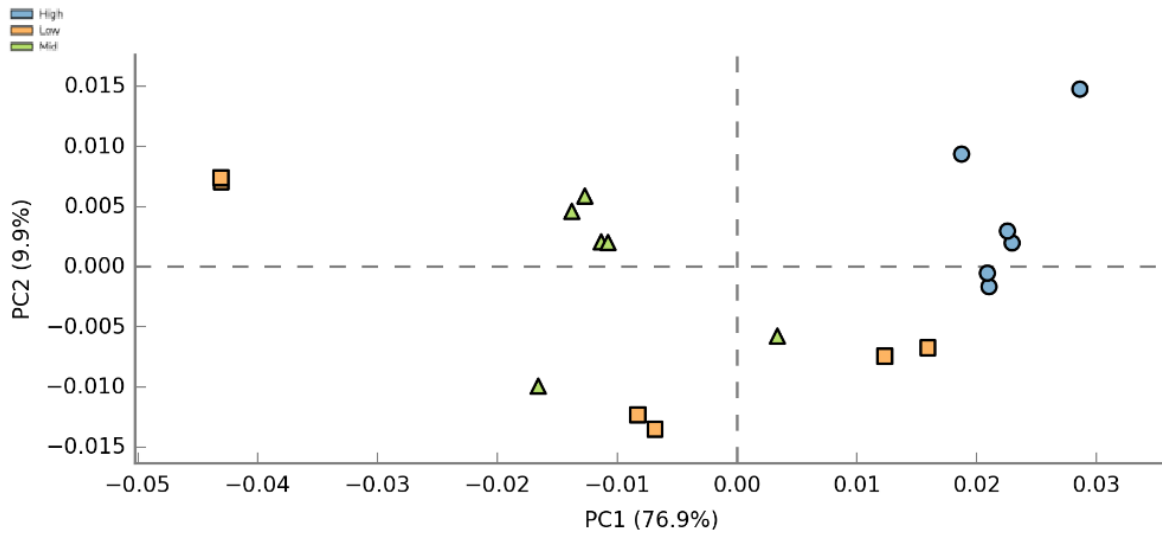
**Figura 2.** Promedio de lecturas por módulos de los ciclos biogeoquímicos del Metano, S y N por cada punto de salinidad H (alta), M (media), L (baja). Valor de significancia entre las abundancias de los tres puntos de muestreo (\*\*\*)  $p \leq 0,001$ .

### 6.1 Ciclo del Metano

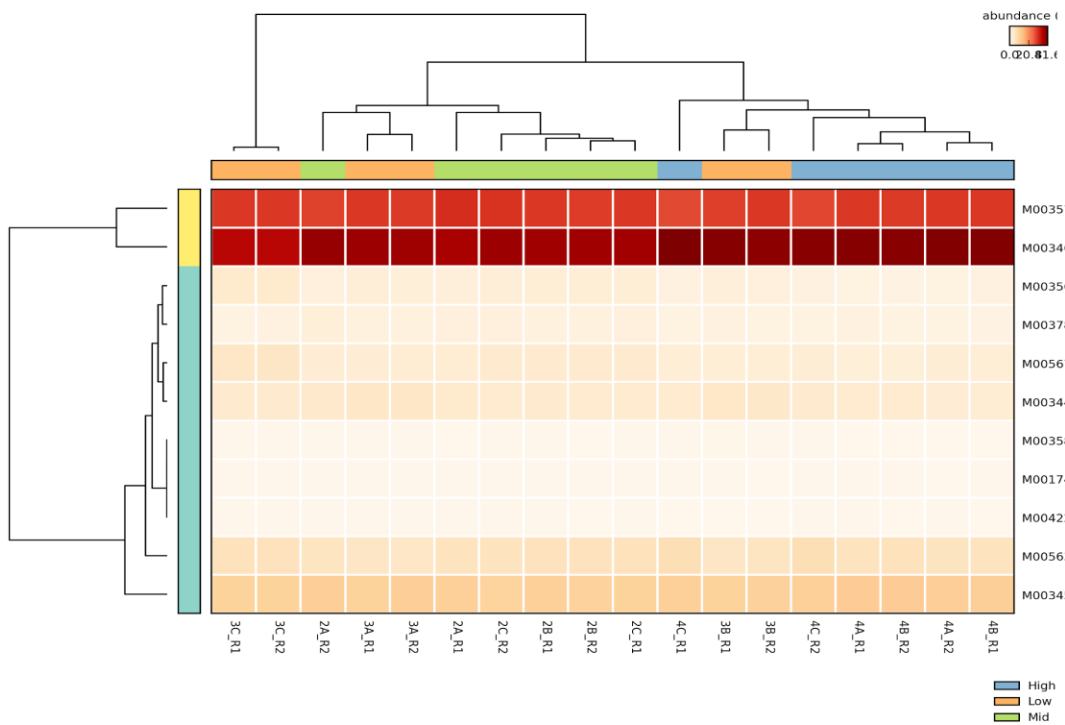
El 3,1% de las lecturas se encontraron asociadas al ciclo del metano. De los 180 términos de KEGG del ciclo del metano, 110 (61,1%) fueron identificados. El PCA para este ciclo separó la salinidad alta de las demás salinidades con una representatividad del 86,8% (Figura 4). Se detectaron todos los 11 módulos de KEEG asociados al ciclo biogeoquímico a excepción de Extensión de la cadena del ácido 2-Oxocarboxílico (M00608). De estos 11 módulos seis presentaron diferencias significativas entre los tres puntos de salinidad cinco sobrerrepresentados en salinidad alta y uno en baja (Figura 3, 5) (Anexo 1). A pesar de haber encontrado módulos relacionados con la metanogénesis no se encontraron genes involucrados en la última reacción para la formación del metano (*mcr*ABCDG) ni microorganismos metanogénicos. Por otro lado, se relacionaron 29 géneros metilótrofos, nueve (31%) fueron influenciados por la salinidad como: *Methylocystis*, *Methyloversatilis* y *Methylibium* sobrerrepresentados en salinidad baja (Anexo 4)



**Figura 3.** Ruta del ciclo del Metano del Manglar del Delta del Río Ranchería, Guajira. Representado por módulos según la base de datos KEGG modules. Se encuentran las respectivas abundancias en degradé de colores de los tres puntos de salinidad Alta (oscuro), Media (medio) y Baja (claro). Las líneas en color negro representan las secuencias halladas que codifican para otros procesos que no se agrupan en ningún módulo.



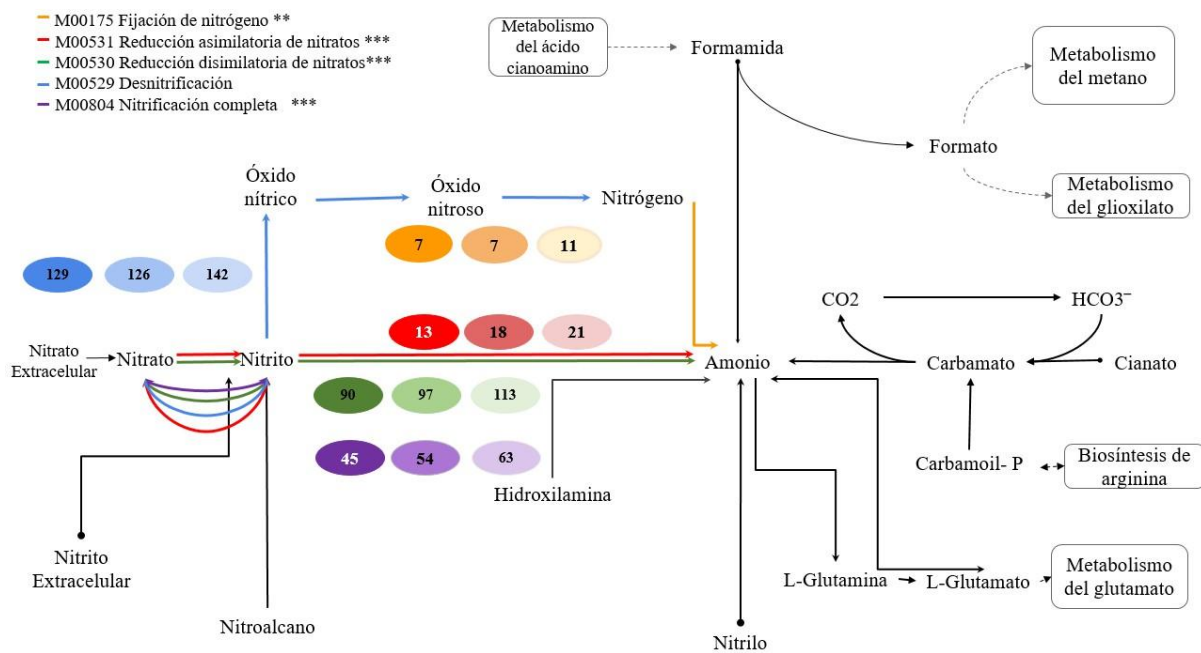
**Figura 4.** Análisis de componentes principales PCA, de módulos del Ciclo del Metano agrupado en los tres puntos de salinidad alta (azul), media (verde) y baja (naranja). Grafico extraído con STAMP.



**Figura 5.** Mapa de calor. Módulos del ciclo Metano con un número de secuencias correspondientes a cada punto de salinidad. H (alta), M (media), L (baja). Grafico extraído con STAMP.

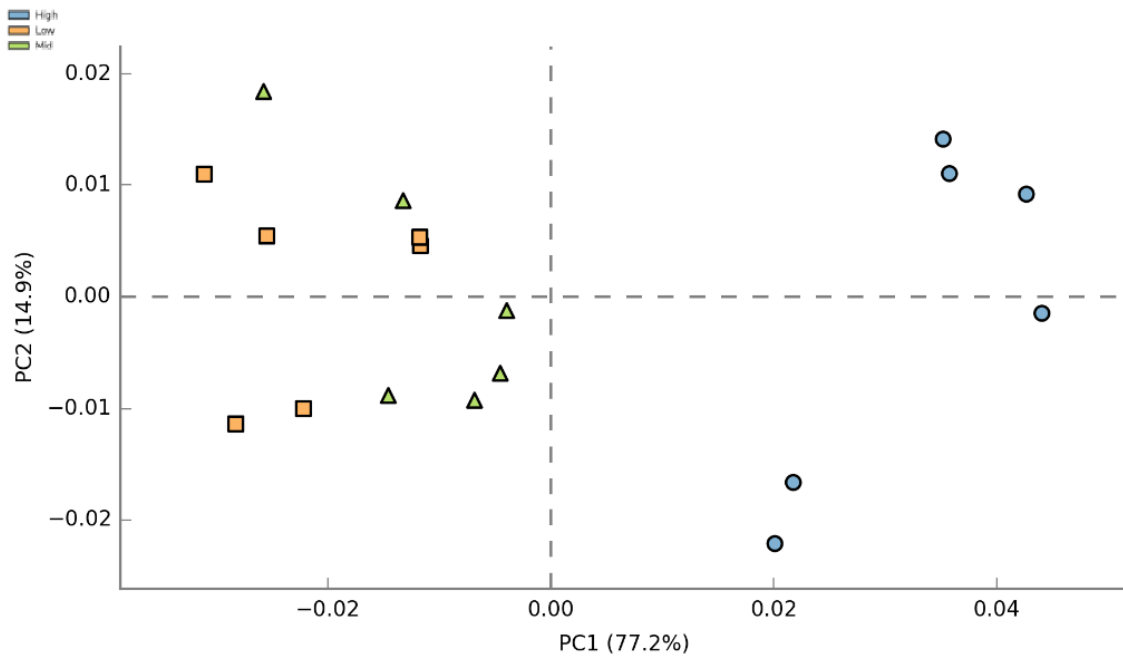
## 6.2 Ciclo del Nitrógeno

Para el ciclo del N se asignó el 2,4% de las lecturas obtenidas y se identificaron 46 (76,6%) de los 60 términos de KEGG de este ciclo. El PCA para este ciclo separó la salinidad alta de las demás salinidades con una representatividad de 92,1% (Figura 7). Todos los módulos presentaron mayor abundancia en baja salinidad y tuvieron diferencias significativas (Anexo 2), a excepción de la desnitrificación que resultó ser el módulo más abundante junto con la reducción desasimilatoria de nitratos. El módulo de fijación de nitrógeno fue el menos abundante y la nitrificación (M00528) no fue detectada (Figura 6, 8). Se relacionaron por literatura 38 géneros bacterianos con el ciclo del N, de los cuales 22 (57,8%) fueron influenciados por la salinidad. Diazotrofos como *Azospirillum*, *Rhodospirillum* y *Pseudomonas* y nitrificadores como *Nitrospira*, *Nitrosococcus* y *Nitrospina* obtuvieron mayores abundancias en salinidad alta (Anexo 5).

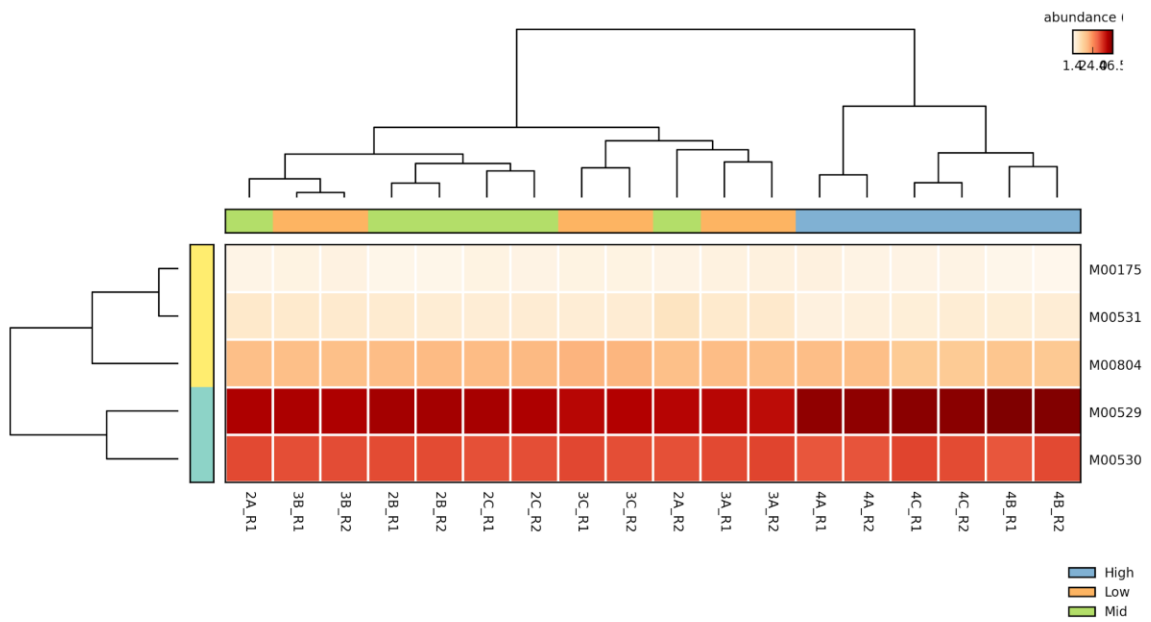


**Figura 6.** Ruta del ciclo del N del Manglar del Delta del Río Ranchería, Guajira. Representado por módulos según la base de datos KEGG modules. Se encuentran las respectivas abundancias en degradé de colores de los tres puntos de salinidad Alta (oscuro), Media (medio) y Baja

(claro). Las líneas de color negro representan las secuencias halladas que codifican para otros procesos que no se agrupan en ningún módulo.



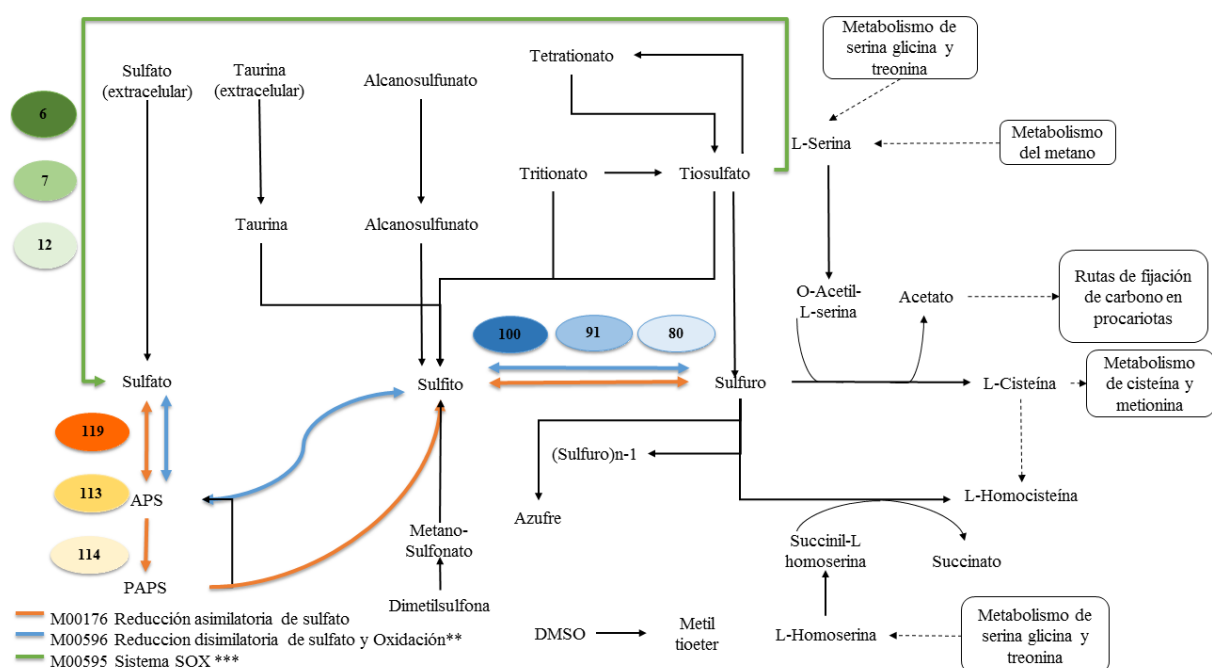
**Figura 7.** Análisis de componentes principales PCA, de módulos del ciclo del N agrupado en los tres puntos de salinidad alta (azul), media (verde) y baja (naranja). Grafico extraído con STAMP.



**Figura 8.** Mapa de calor. Módulos del ciclo del N con un número de secuencias correspondientes a cada punto de salinidad. H (alta), M (media), L (baja). Grafico extraído con STAMP.

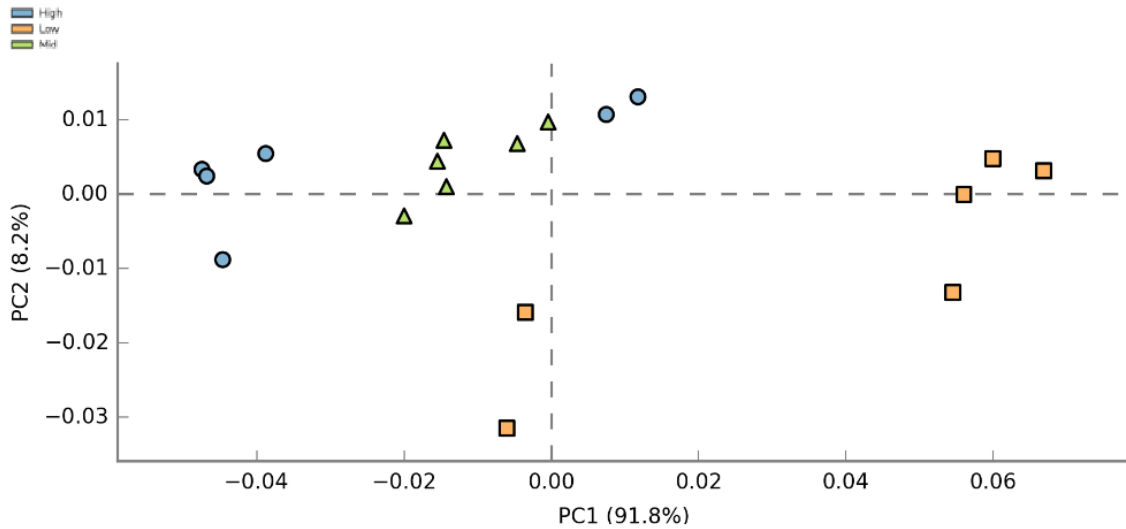
### 6.3 Ciclo del Azufre

Al ciclo del azufre se asignaron aproximadamente el 1.0 % de las lecturas y se identificaron 62 (62%) de los 100 términos de la vía metabólica del S. El PCA para este ciclo separó la salinidad baja de las demás salinidades con una representatividad de 100% (Figura 10). Los módulos de reducción desasimilatoria de sulfatos (M00596) y oxidación del tiosulfato por el complejo SOX (M00595) presentaron diferencias significativas por salinidad (Anexo 3). El módulo oxidación del tiosulfato por el complejo SOX presentó mayores abundancias en salinidad baja, mientras que el módulo reducción desasimilatoria del sulfato en salinidad alta. El módulo reducción asimilatoria del (M00176) fue el más abundante (Figura 9, 11). De 70 géneros relacionados con el ciclo del S, 44 (62,44%) fueron influenciados por la salinidad. La reducción de sulfatos se relacionó con *Desulfobulbus*, *Desulfosarcina* y *Desulfatiglans*, mientras que la oxidación del S con *Thioalkalivibrio*, *Thioploca* y *Thermithiobacillus* sobrerrepresentados en salinidad alta (Anexo 6).

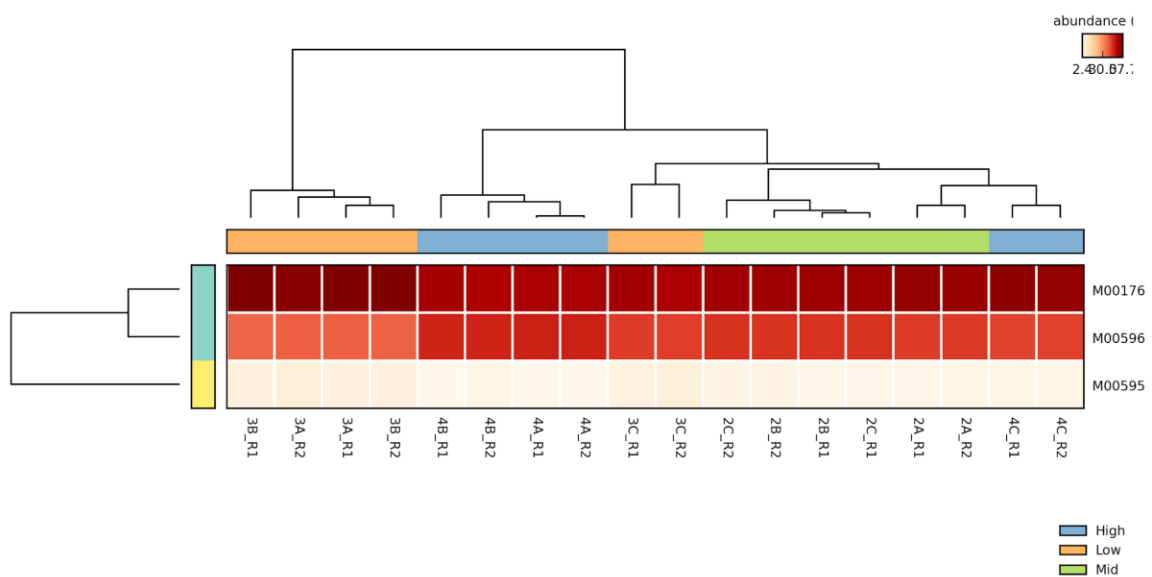




**Figura 9.** Ruta del ciclo del S del manglar del Delta del Río Ranchería, Guajira. Representado por módulos según la base de datos KEGG modules. Se encuentran las respectivas abundancias en degradé de colores de los tres puntos de salinidad Alta (oscuro), Media (medio) y Baja (claro). Las líneas en color negro representan las secuencias halladas que codifican para otros procesos que no se agrupan en ningún módulo.



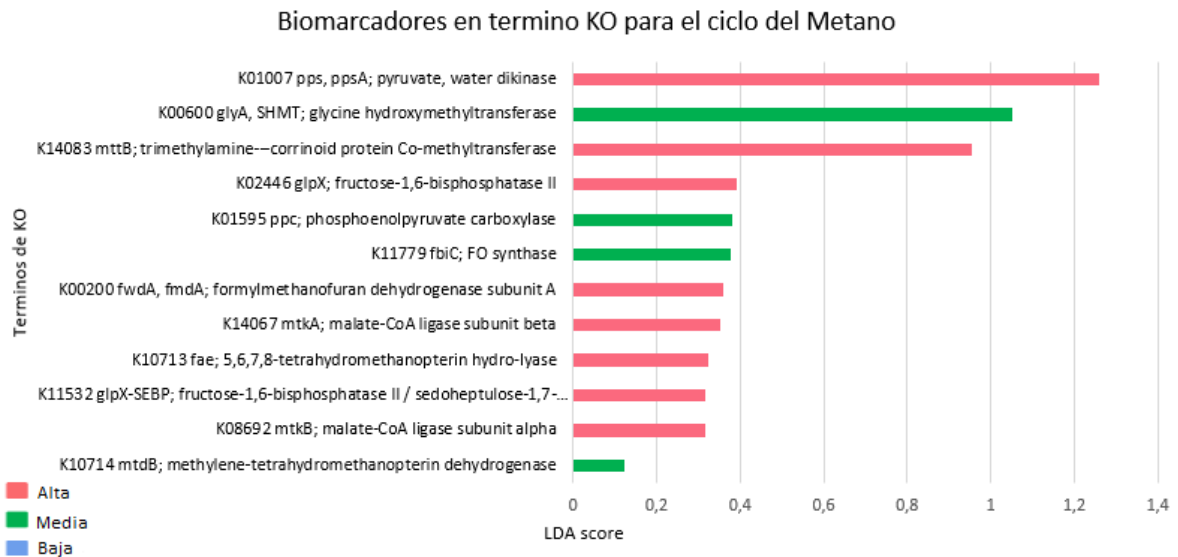
**Figura 10.** Análisis de componentes principales PCA, de módulos del ciclo del S agrupado en los tres puntos de salinidad alta (azul), media (verde) y baja (naranja). Grafico extraído con STAMP.



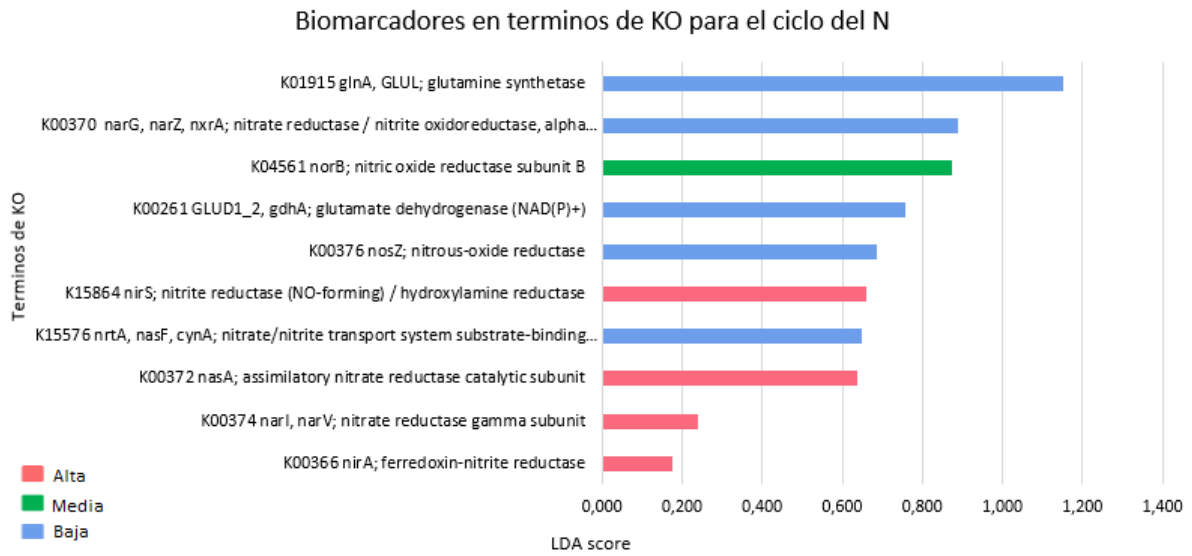
**Figura 11.** Mapas de calor. Módulos del ciclo del S con un número de secuencias correspondientes a cada punto de salinidad. H (alta), M (media), L (baja). Grafico extraído con STAMP.

## 6.4 Biomarcadores

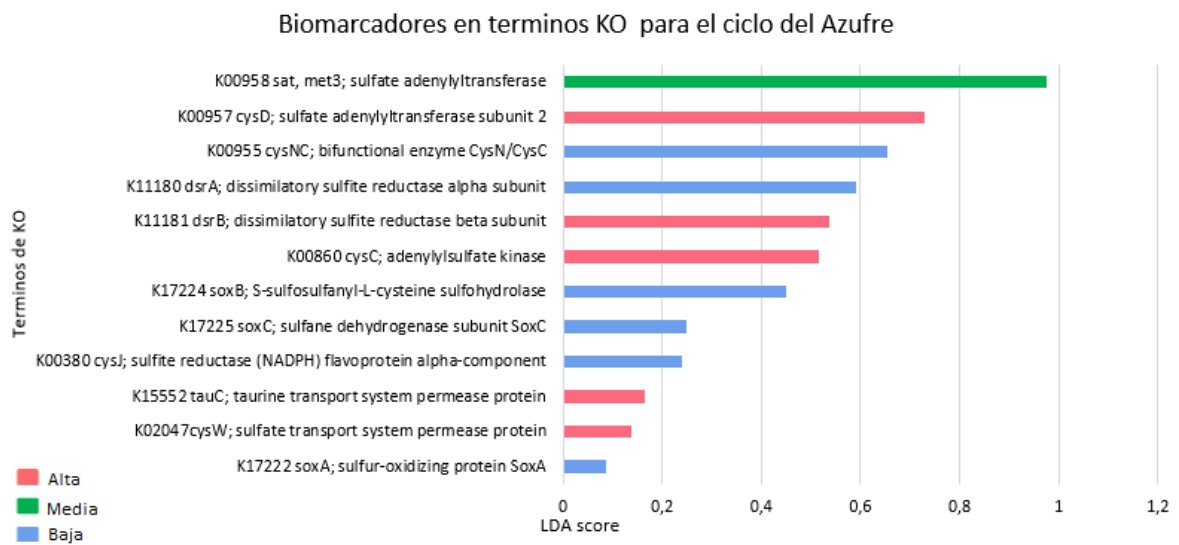
Se obtuvieron 34 marcadores asociados a los ciclos biogeoquímicos 17 para salinidad alta, seis para media y 11 para baja (Figura 12-14). Para el ciclo del Metano en salinidad baja no se encontraron genes marcadores, para salinidad media K00600 (*glyA*) y para salinidad alta K01007 (*pps*) (Figura 12). Para el ciclo del N para salinidad baja con mayor LDA score se detectó K01915 (*glnA*), para salinidad media K04561 (*norB*), y para salinidad alta K15864 (*nirS*) (Figura 13). Para el ciclo del S para salinidad baja se encuentra K00955 (*cysNC*), para salinidad media K00958 (*sat*), y para salinidad alta K00957 (*cysD*) (Figura 14).



**Figura 12.** Términos KO marcadores del ciclo biogeoquímico del metano en los tres puntos de salinidad,



**Figura 13.** Términos KO marcadores del ciclo biogeoquímico del N en los tres puntos de salinidad.



**Figura 14.** Términos KO marcadores del ciclo biogeoquímico del S en los tres puntos de salinidad.

Al evaluar la respuesta al estrés osmótico, se identificaron 16 términos KO asociados a la producción de osmolitos como prolina, betaína, glutamina y glutamato. La abundancia de estos genes aumentó en la medida que la salinidad fue mayor, a diferencia de los dos módulos

afectados negativamente por la salinidad M00461 (MtB-MtrA) y M00445 (EnvZ-OmpR) implicados en el estrés osmótico (Table 4).

**Tabla 4.** Abundancias normalizadas de términos KO asociados a la producción de osmolitos compatibles y módulos asociados con la respuesta al estrés osmótico.

FUNCIÓN	KO/MÓDULO	GEN	ALTA	MEDIA	BAJA	p-value	FDR
Biosíntesis de prolina	K00147	<i>proA</i> glutamato-5-semialdehído deshidrogenasa [EC:1.2.1.41]	35	28	26	1,06E-01	0,0002561 2
	K00931	<i>proB</i> ; glutamato 5-quinasa [EC:2.7.2.11]	9	9	9	0,017271	0,041755
	K00286	<i>proC</i> ; pirrolina-5-carboxilato reductasa [EC:1.5.1.2]	5	5	4	0,11468	0,19317
Biosíntesis de ectoína	K06718	<i>ectA</i> ; L-2,4-ácido diaminobutírico acetiltransferasa [EC:2.3.1.178]	0	0	0	0,72008	0,79246
	K00836	<i>ectB</i> , <i>dat</i> ; diaminobutirato - 2-oxoglutarato transaminasa [EC:2.6.1.76]	25	16	12	2,05E-02	9,56E-01
	K06720	<i>ectC</i> ; L-ectoína sintasa [EC:4.2.1.108]	2	2	2	0,58419	0,67488
	K10674	<i>ectD</i> ; ectoína hidroxilasa [EC:1.14.11.55]	6	4	4	0,0001066 2	0,0009868 4
Biosíntesis de trehalosa	K00697	<i>otsA</i> ; trehalosa 6-fosfato sintasa [EC:2.4.1.15 2.4.1.347]	7	8	8	0,22337	0,32595
	K01087	<i>otsB</i> ; trehalose 6-fosfato fosfatasa [EC:3.1.3.12]	0	0	0	0,050768	0,099155
Biosíntesis Glucosilglicero 1	K03692	E2.4.1.213; glucosilglicero1-Fosfato sintasa [EC:2.4.1.213]	0	0	0	0,0045366	0,014858

Transporte de prolina y betaína	K05847	opuA; Sistema de transporte osmoprotector, proteína de unión a ATP	8	8	5	0,0003132 9	0,0020712
Síntesis de betaína	K00108	betA, CHDH; colina deshidrogenasa [EC:1.1.99.1]	21	20	18	0,0045304	0,014851
	K00130	betB, gbsA; betaína-aldehído deshidrogenasa [CE: 1.2.1.8]	10	12	10	0,72581	0,79598
Síntesis de glutamato	K15371	GDH2; glutamato deshidrogenasa [EC:1.4.1.2]	39	33	29	0,0002603	0,0018496
Síntesis de glutamina	K01915	glnA, GLUL; glutamina sintetasa [EC:6.3.1.2]	131	111	104	0,0001358 7	0,0011889
ACC desaminasa	K01505	E3.5.99.7; 1-aminociclopropano-1-carboxilato desaminasa [CE: 3.5.99.7]	4	4	3	0,081043	0,14498
Respuesta al estrés osmotico		MtrB-MtrA Sistema de regulación de dos componentes (respuesta al estrés osmótico).[PATH:map02020] [BR:ko02022]	0	2	1	0,00002	0,00016
	M00461	EnvZ-OmpR Sistema de regulación de dos componentes (respuesta al estrés osmótico)[PATH:map02020] [BR:ko02022]	5	5	7	0,00058	0,00205

#### 4. Discusión

La salinidad influyó significativamente en las abundancias de algunas funciones bioquímicas, sin alterar el potencial funcional en general de cada punto. Esto sugiere una adaptación de las comunidades bacterianas a la fluctuación de la salinidad en los manglares, o que los niveles de salinidad medidos no son extremos para llegar a afectar estos ecosistemas <sup>87</sup>.

En general los módulos de cada ciclo biogeoquímico se identificaron en cada punto de salinidad pero con diferencias en las abundancias, posiblemente por qué en el manglar habitan banco de semillas que son microorganismos que se activan metabólicamente cuando encuentran condiciones ideales, lo que explicaría el mantenimiento de los servicios ecosistémicos de los manglares <sup>50,52,88</sup> y garantizan alta resiliencia del ecosistema ante disturbios <sup>89</sup>

El ciclo más abundante fue el metano, seguido del N y S. Esto está asociado posiblemente a que este ciclo está compuesto de una mayor cantidad de genes a comparación de los otros dos ciclos, al igual que a las altas abundancias de genes del metabolismo de pequeños compuestos orgánicos, como el formaldehído, acetato, CO<sub>2</sub> y las metilaminas. Estos últimos son compuestos no competitivos bien asimilados por los microorganismos metilótrofos y metanógenos, contrario a las bacterias reductoras del azufre, que no tienen la capacidad de asimilarlos ya que únicamente utilizan hidrógeno eficientemente en su actividad metabólica <sup>90</sup>.

A pesar de la ausencia de genes involucrados en la metanogénesis, no se descarta que pudiese haber producción directa de metano, ya que los manglares se consideran emisores significativos de CH<sub>4</sub>, como lo reportaron Andreote <sup>28</sup> y Rampadarath <sup>49</sup>. Sin embargo, Lin <sup>46</sup> reportaron una disminución en genes *mcr* asociados a la metanogénesis y presencia de metanótrofos en manglar. Por otra parte, las concentraciones de metales pesados en el manglar de estudio (Pb de 46,6 µg g<sup>-1</sup>, Ni de 42,8 µg g<sup>-1</sup> y baja concentración de Cu y Zn) <sup>91</sup> podrían ser inhibitorias para la metanogénesis <sup>38</sup>. Igualmente, la metanogénesis puede ser inhibida por el 2-bromoetanosulfonato, 2-cloroetanosulfonato, 2-mercaptoetanosulfonato y lumazina, análogos de la coenzima M, importante en la reducción de metilo a metano <sup>92</sup>. Estos compuestos no han sido identificados en los manglares de la Guajira. Incluso, el H<sub>2</sub>S es un inhibidor de la metanogénesis <sup>93</sup>, característico y favorecido en los manglares. Por el contrario, en el manglar

predominaron los microorganismos metanotrofos como *Methylocystis*, *Methyloversatilis* y *Methylibium* sobrerrepresentados en salinidad baja. Los microorganismos D-AMO importantes en la oxidación anaeróbica del metano, se ha evidenciado, son afectados por altos niveles de salinidad <sup>94</sup>, contrario a nuestros resultados.

Todos los módulos del ciclo del N fueron detectados, a excepción de la nitrificación (M00528), proceso que es favorecido por condiciones aeróbicas y afectado por ambientes hipersalinos <sup>50, 87, 95</sup>. No obstante, se registraron lecturas de la nitrificación completa y bacterias nitrificantes como *Nitrospira*, *Nitrosococcus* y *Nitrospina*, con mayores abundancias en alta salinidad que aumentan la producción de nitritos para desnitrificación <sup>95</sup>. La desnitrificación y reducción desasimilatoria de nitratos fueron los módulos con mayor abundancia en todas las salinidades (Fig. 6), tal como lo encontrado en manglares de Brasil <sup>28, 39</sup>. Esto indica ingreso de nitratos al manglar, condiciones anaeróbicas o mínimas de oxígeno, en donde estos procesos se han reportado como posibles causantes de la pérdida de nitrógeno, participando en la descomposición de la materia orgánica <sup>96</sup> y la utilización de nitratos como aceptor final de electrones al haber escasez de oxígeno en la respiración microbiana <sup>47, 96</sup>.

La desnitrificación no fue afectada por la salinidad, lo que contrasta con evidencias de que el aumento de la salinidad disminuye la abundancia de *nirK* y *nosZ* <sup>17</sup>. La baja fijación de N sugiere contaminación del agua por fuentes ricas en N como aguas residuales agrícolas y domésticas <sup>91</sup> que pueden inhibir la actividad nitrogenasa <sup>15</sup>. En ecosistemas no contaminados la fijación de N suele ser elevada y puede prevalecer incluso sobre la desnitrificación <sup>97</sup>, todos estos resultados coinciden con lo encontrado en manglares de Brasil contaminados como prístinos <sup>28,39</sup>. Aquí se detectaron importantes diazotrofos como *Azospirillum*, *Rhodospirillum* y *Pseudomonas*, que se asocian con plantas de manglar <sup>98</sup> y podrían contribuir a promover el crecimiento o mitigar el estrés salino <sup>99, 100</sup>.

Todos los módulos del ciclo del S se detectaron. Predominó la reducción del sulfato a H<sub>2</sub>S sobre la oxidación de tiosulfato a sulfato (Fig. 9), dadas las condiciones anaeróbicas de los manglares <sup>25,28</sup> por inundación y el ingreso de sulfatos por agua de mar <sup>101</sup>. La reducción del sulfato está asociada a la descomposición de la materia orgánica en ambientes anaeróbicos <sup>102</sup> y la degradación de compuestos xenobióticos cíclicos <sup>103</sup>. Varón-López y colaboradores <sup>104</sup> hallaron aumento de bacterias sulfatorreductoras (SRB), asociado a prevalencia del gen *aprA* (adenosine-5-phosphosulphate reductase) en manglares contaminados con petróleo y aguas

residuales. Entre SRB predominantes en manglares alterados se encuentran los órdenes Desulfobacterales y Desulfovibrionales <sup>104</sup>. Este trabajo detectó Desulfobacterales representadas por los géneros *Desulfobulbus*, *Desulfosarcina* y *Desulfatiglans*, favorecidos por salinidad alta.

La reducción del sulfato aumentó con la salinidad (Fig. 9). En lagos hipersalinos predominan los microorganismos con actividad reductora de sulfatos capaces de mantener la concentración de sal intracelular igual a la externa por el uso de  $K^+$ , una estrategia de menor costo frente a la acumulación de solutos orgánicos compatibles <sup>87, 105</sup>. Por otra parte, la oxidación de tiosulfato fue detectada en bajas abundancias y afectada por las salinidades medias y altas (Fig. 9). Este proceso es desempeñado por bacterias oxidantes del azufre (SOB) como las bacterias púrpura del azufre y quimiotróficas en lagos de soda <sup>106</sup>, mientras en manglares se han registrado SOB como *Thiobacillus* <sup>104</sup>. Nosotros detectamos SOB como *Thioalkalivibrio*, *Thioploca* y *Thermithiobacillus* favorecidas por la salinidad alta.

Los módulos que obtuvieron mayores abundancias en salinidad baja pudieron deberse a que los microorganismos no adaptados a salinidades altas disminuyen su actividad y crecimiento en esta, por el alto costo energético asociado a la producción de osmolitos el estrés osmótico produce <sup>14, 25</sup>. Además, que los dos módulos relacionados con la respuesta al estrés osmótico fueron abundantes en salinidad baja; La alta abundancia de microorganismos de manglar podría obedecer a la contribución de microorganismos de agua dulce y del agua de mar <sup>107</sup>, las cuales reaccionan positivamente ante bajas y altas salinidades lo que podría explicar que la salinidad media presente las menores abundancias en algunos módulos; Mientras que las altas abundancias en salinidad alta está dada por los microorganismos halotolerantes y en ambientes donde hay baja concentración de sales se afecta su crecimiento <sup>52</sup> y según los resultados se caracterizaron por presentar los mayores recuentos de genes para la síntesis de osmolitos tipo glutamato, prolina, glutamina y betaína.

Según el análisis de componentes principales la salinidad media a comparación de los otros dos puntos de salinidad no se encuentra agrupada aparte de las otras dos salinidades posiblemente por qué a salinidad de aproximadamente de 15‰, los microorganismos halófilos tienen mejor supervivencia lo que concuerda con un estudio realizado en tres estanques de sal con porcentaje de salinidad diferentes <sup>52</sup>.



En algunos módulos de los ciclos biogeoquímicos no se detectaron todas las enzimas involucradas. Esto cuestiona la capacidad de los microorganismos para desarrollar estas actividades. No obstante, abordar los ciclos biogeoquímicos por módulos presenta un menor sesgo que la descripción de un proceso metabólico basado en un solo gen marcador. Esto sugiere que las aproximaciones de metagenómica se deberían correlacionar con actividades enzimáticas específicas, mediciones analíticas o datos de metatranscriptómica.

En los genes marcadores, se detectaron genes que aumentaron su abundancia en cada nivel de salinidad. La mayoría de marcadores se obtuvieron para salinidad alta y menos para salinidad media. Para el ciclo del N para salinidad baja el gen *glnA*, involucrado en la asimilación del amonio <sup>108</sup>, y síntesis de aminoácidos <sup>109</sup>. Para salinidad media *norB*, este reduce de NO a N<sub>2</sub>O como parte de la desnitrificación completa <sup>110</sup>, para salinidad alta *nirS*, un importante gen en el proceso de desnitrificación, encontrado en proteobacterias aisladas de suelos con diferentes tratamientos de fertilizantes, en donde se detectó una mayor cantidad de este gen en suelo con fertilizante <sup>111</sup>, lo que indica que la contaminación por aguas residuales de agricultura que afecta el manglar puede aumentar la población de desnitrificadores. Para el ciclo del S en salinidad media *sat* es un gen encargado de la captación del azufre y la respiración con sulfato, sin embargo, sus funciones son diversas dependiendo del organismo <sup>112</sup>; en salinidad baja el gen marcador fue *cysNC*, es un complejo encontrado en análisis metagenómico de sedimentos marinos a una profundidad de cinco mil metros por debajo del mar, actuando en la reducción asimilatoria de sulfatos <sup>47</sup>, este complejo en conjunto con *CysD* gen marcador en salinidad alta se asociaron a la producción de H<sub>2</sub>S en un cultivo con condiciones mínimas de agua <sup>113</sup>. Esto podría simular el funcionamiento de la microbiota en las condiciones semiáridas del manglar. Para el metabolismo del metano en salinidad alta *pps*, este interviene en la transferencia de un fosfato de ATP => piruvato + H<sub>2</sub>O <sup>114</sup> y para salinidad media *glyA*, este fue encontrado en *Arthrobacter* sp un microorganismo metilotrofo productor de la enzima serina hidroximetiltransferasa involucrada en la producción de serina <sup>115</sup>. Ambos genes marcadores del metabolismo del metano están involucrados en la asimilación de formaldehído por la ruta serina. Por otro lado, el no encontrar marcadores en baja salinidad puede deberse a que ningún gen en el metabolismo del metano es influenciado significativamente por estas condiciones.

## 5. Conclusiones

Los manglares son ecosistemas diversos que presentan comunidades bacterianas adaptadas a la fluctuación de la salinidad. En el manglar predominó el ciclo del metano sobre los demás ciclos debido al gran número de genes que lo componen, predominaron las bacterias metanotrofas. Para el ciclo del N abundó la desnitrificación y la inhibición de la fijación de N. En el ciclo del S prevalecieron los procesos de reducción, representados por las Desulfobacterales. Los módulos del ciclo del N tienden a disminuir su abundancia por la salinidad, mientras los módulos del ciclo del S y metano tienden aumentar.

El metabolismo del metano fue el único que tuvo un efecto significativo en abundancia entre las tres salinidades. Sin embargo, la salinidad no afectó las categorías funcionales de ningún ciclo, lo que indica la tolerancia de los manglares para mantener la actividad microbiana ante cambios de salinidad que en este caso se relacionó con el aumento de osmolitos tipo glutamato, prolina, glutamina y betaína.

La salinidad alta representó el punto en donde se puede encontrar mayor abundancia de genes marcadores de los ciclos, como transferencia de moléculas de ATP a piruvato, sin embargo la salinidad media favoreció los que intervienen en la producción de H<sub>2</sub>S y la baja en la asimilación del amonio.

## Referencias Bibliográficas

- <sup>1</sup> Giri C, Ochieng E, Tieszen LL, Zhu Z, Singh A, Loveland T, et al. Status and distribution of mangrove forests of the world using earth observation satellite data. *Global Ecol. Biogeogr* [Internet]. 2011 [Accessed 2019 April 01]; 20:154-159. Available from: <https://doi.org/10.1111/j.1466-8238.2010.00584.x>
- <sup>2</sup> Samper-Villarreal J, Silva-Benavides AM. Complejidad estructural de los manglares de Playa Blanca, Escondido y Rincón de Osa, Golfo Dulce, Costa Rica. *Revista de Biología Tropical* [Internet]. 2015 [Consultado 2018 Abril 23]; 63(1):199-208. Disponible en: <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=44943930012>
- <sup>3</sup> User S. Manglares | Ministerio de Ambiente y Desarrollo Sostenible [Internet]. Minambiente.gov.co. 2018 [Consultado 2018 Abril 11]. Disponible en: <http://www.minambiente.gov.co/index.php/component/content/article?id=412:plantilla-bosques-biodiversidad-y-servicios-ecosistematicos-14>
- <sup>4</sup> Fao. La desaparición de manglares alcanza un nivel alarmante [Internet]. Fao.org. 2018 [Consultado 2018 Abril 11]. Disponible en: <http://www.fao.org/newsroom/es/news/2008/1000776/index.html>
- <sup>5</sup> López-Angarita J, Roberts CM, Tilley A, Hawkins JP, Cooke RG. Mangroves and people: Lessons from a history of use and abuse in four Latin American countries. *Forest Ecology and Management* [Internet]. 2016 [Accessed 2018 November 15]; 368: 151-162. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.foreco.2016.03.020>
- <sup>6</sup> Olguín E, Hernández M, Sánchez-Galván G. Contaminación de manglares por hidrocarburos y estrategias de biorremediación, fitorremediación y restauración. *Rev. Int. Contam. Ambient* [Internet]. 2007 [Consultado 2018 Abril 23]; 23(3): 139-154. Disponible en: [http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0188-49992007000300004&lng=es](http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0188-49992007000300004&lng=es).

- <sup>7</sup>Lovelock CE, Krauss KW, Osland MJ, Reef R, Ball MC. The physiology of mangrove trees with changing climate. *Tropical Tree Physiology* [Internet]. 2016 [Accessed 2018 November 15]; 149-179. Available from: [https://doi.org/10.1007/978-3-319-27422-5\\_7](https://doi.org/10.1007/978-3-319-27422-5_7)
- <sup>8</sup>Popp M, Polania J, Weiper M. Physiological adaptations to different salinity levels in mangrove. In *Towards the rational use of high salinity tolerant plants* [Internet]. 1993 [Accessed 2018 November 15]; 27: 217-224. Available from: [https://doi.org/10.1007/978-94-011-1858-3\\_22](https://doi.org/10.1007/978-94-011-1858-3_22)
- <sup>9</sup>Garcia JDS, Dalmolin C, França MGC, Mangabeira PAO. Different salt concentrations induce alterations both in photosynthetic parameters and salt gland activity in leaves of the mangrove *Avicennia schaueriana*. *Ecotoxicol environ saf* [Internet]. 2017 [Accessed 2018 November 15]; 141: 70-74. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2017.03.016>
- <sup>10</sup>Rossiana N, Miranti M, Kosmita K. Antibacterial Activity Test of Endophytic Fungus from Mangrove Plant (*Rhizophora apiculata* L.) and (*Bruguiera gymnorizha* (L.) Lamk). Against *Klebsiella pneumoniae* ATCC 700603. *KnE Life Sciences* [Internet]. 2017 [Accessed 2018 November 15]; 2(6): 146-157. Available from: <https://doi.org/10.18502/kls.v2i6.1031>
- <sup>11</sup>Wu J, Qiu C, Ren Y, Yan R, Ye X, Wang G. Novel Salt-Tolerant Xylanase from a Mangrove-Isolated Fungus *Phoma* sp. MF13 and Its Application in Chinese Steamed Bread. *ACS Omega* [Internet]. 2018 [Accessed 2018 November 15]; 3(4): 3708-3716. Available from: <https://doi.org/10.1021/acsomega.8b00345>
- <sup>12</sup>Zhang M, Luo Y, Lin LA, et al. Molecular and stable isotopic evidence for the occurrence of nitrite-dependent anaerobic methane-oxidizing bacteria in the mangrove sediment of Zhangjiang Estuary, China. *Appl microbiol biotechnol* [Internet]. 2018 [Accessed 2018 November 15]; 102(5): 2441-2454. Available from: <https://doi.org/10.1007/s00253-017-8718-2>
- <sup>13</sup>Mapelli F, Marasco R, Rolli E, et al. Potential for plant growth promotion of rhizobacteria associated with *salicornia* growing in tunisian hypersaline soils. *BioMed Research*

- international [Internet]. 2013 [Accessed 2018 November 15]; 1-13. Available from: <https://doi.org/10.1155/2013/248078>
- <sup>14</sup> Yan N, Marschner P, Cao W, Zuo C, Qin W. Influence of salinity and water content on soil microorganisms. *International Soil and Water Conservation Research* [Internet]. 2015 [Accessed 2018 September 14]; 3(4):316-323. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.iswcr.2015.11.003>
- <sup>15</sup> Lovelock CE, Reef R. Isotopic signatures of stem water reveal differences in water sources accessed by mangrove tree species. *Hydrobiologia* [Internet]. 2017 [Accessed 2018 November 15]; 803(1):133-145. Available from: <https://doi.org/10.1007/s10750-017-3149-8>.
- <sup>16</sup> Ashis Kr. P, Ratnadip R, Amrit K, Subrata J. Mangrove Degradation in the Sundarbans. *Coastal Wetlands: Alteration and Remediation* [Internet]. 2017 [Accessed 2018 November 15]; 357-392. Available from: [https://doi.org/10.1007/978-3-319-56179-0\\_11](https://doi.org/10.1007/978-3-319-56179-0_11)
- <sup>17</sup> Polanía J, Vanegas GJ, Galindo T, Pérez Á, Campos S, Sánchez J, et al. Grupos funcionales de microorganismos asociados al manglar del Caribe colombiano. *Red de Estudios del Mundo Marino, Remar Investigación en Ciencias del Mar: Aportes de la Universidad Nacional de Colombia* [Internet]. 1st ed. Bogotá: Digiprint editores e.u.; 2013 [Consultado 13 April 2018]. p. 9-36. Disponible en: [https://www.researchgate.net/publication/259297930\\_Investigacion\\_en\\_Ciencias\\_del\\_Mar\\_Aportes\\_de\\_la\\_Universidad\\_Nacional\\_de\\_Colombia](https://www.researchgate.net/publication/259297930_Investigacion_en_Ciencias_del_Mar_Aportes_de_la_Universidad_Nacional_de_Colombia)
- <sup>18</sup> Holguin G, Vazquez P, Bashan Y. The role of sediment microorganisms in the productivity, conservation, and rehabilitation of mangrove ecosystems: an overview. *Biol Fertil Soils* [Internet]. 2001 [Accessed 2018 November 15]; 33: 265-278. Available from: <https://doi.org/10.1007/s003740000319>
- <sup>19</sup> Wang H, Gilbert JA, Zhu Y, Yang X. Salinity is a key factor driving the nitrogen cycling in the mangrove sediment. *Sci Total Environ* [Internet]. 2018 [Accessed 2018 November 15]; 631: 1342-1349. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2018.03.102>

- <sup>20</sup> Ferrera-Cerrato R, Alarcón A. Microbiología agrícola. México: Editorial Trillas; 2007. pp.233-245.
- <sup>21</sup> Ghurye J, Cepeda Espinoza V, Pop M. Metagenomic Assembly: Overview, Challenges and Applications. Yale Journal of Biology and Medicine [Internet]. 2015 [Accessed 2018 April 21]; 89(3). Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5045144/?report=classic>
- <sup>22</sup> Terrón González L. Desarrollo de sistemas de expresión para análisis metagenómicos funcionales e identificación de enzimas de interés [Doctorado]. Sevilla, Universidad Pablo de Olavide. Dpto. Biología molecular e Ingeniería Bioquímica; 2014.
- <sup>23</sup> Xu Z, Hansen M, Hansen L, Jacquiod S, Sørensen S. Bioinformatic Approaches Reveal Metagenomic Characterization of Soil Microbial Community. PLoS ONE [Internet]. 2014 [Accessed 12018 April 21]; 9(4): e93445. Available from: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0093445>
- <sup>24</sup> Bonilla-Rosso G, Souza V, Eguiarte L. Metagenómica, Genómica y Ecología Molecular: La nueva ecología en el bicentenario de Darwin. Revista especializada en ciencias biológicas [Internet]. 2008 [Consultado 2018 September 14]; 11(1):42-51. Disponible en: <http://www.medigraphic.com/pdfs/revespiequibio/cqb-2008/cqb081e.pdf>
- <sup>25</sup> Alzubaidy H, Essack M, Malas T, Bokhari A, Motwalli O, Kamanu F et al. Rhizosphere microbiome metagenomics of gray mangroves (*Avicennia marina*) in the Red Sea. Gene [Internet]. 2016 [Accessed 2018 April 26]; 576(2):626-636. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.gene.2015.10.032>
- <sup>26</sup> Basak P, Pramanik A, Roy R, Chattopadhyay D, Bhattacharyya M. Cataloguing the bacterial diversity of the Sundarbans mangrove, India in the light of metagenomics. Genomics Data [Internet]. 2015 [Accessed 2018 April 12]; 4(7):90-92. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.gdata.2015.03.014>
- <sup>27</sup> Basak P, Pramanik A, Sengupta S, Nag S, Bhattacharyya A, Roy D, et al. Bacterial diversity assessment of pristine mangrove microbial community from Dhulibhashani,

- Sundarbans using 16S rRNA gene tag sequencing. *Genomics Data* [Internet]. 2016 [Accessed 2018 April 12]; 7:76-78. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.gdata.2015.11.030>
- <sup>28</sup> Andreote F, Jiménez D, Chaves D, Dias A, Luvizotto D, Dini-Andreote F, et al. The Microbiome of Brazilian Mangrove Sediments as Revealed by Metagenomics. *PLoS ONE* [Internet]. 2012 [Accessed 2018 April 12]; 7(6):e38600. Available from: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0038600>
- <sup>29</sup> Figueroa Galvis IP. Caracterización de la diversidad y predicción del potencial genético funcional de las comunidades microbianas asociadas a la rizosfera del mangle negro (*Avicennia germinans*) en un gradiente de salinidad de La Guajira. [Maestra en Ciencias-Microbiología]. Bogotá D.C: Universidad Nacional de Colombia; 2017.
- <sup>30</sup> Imchen M, Kumavath R, Barh D, Vaz A, Góes-Neto A, Tiwari S, et al. Comparative mangrove metagenome reveals global prevalence of heavy metals and antibiotic resistome across different ecosystems. *Scientific Reports* [Internet]. 2018 [Accessed 2018 September 14]; 8(1):1-15. Available from: <https://doi.org/10.1038/s41598-018-29521-4>
- <sup>31</sup> Ramos Castañeda Y, Galván Ayala D, Pitre Ruiz L. Carbono Biomásico en suelos de manglar en el delta del río Ranchería-brazo el Riño, la Guajira, Colombia. *Revista de la asociación Colombiana de ciencias biológicas* [Internet]. 2016 [Consultado 2018 Abril 11]; 1(28). Disponible en: <http://www.ojs.asociacioncolombianadecienciasbiologicas.org/index.php/accb/article/view/126>
- <sup>32</sup> Lema Vélez L, Polanía J. Estructura y dinámica del manglar del delta del río Ranchería, Caribe colombiano. *Revista de Biología Digital* [Internet]. 2007 [Consultado 2018 Abril 11]; 55(1). Disponible en: [http://www.scielo.sa.cr/scielo.php?pid=S0034-77442007000100003&script=sci\\_arttext](http://www.scielo.sa.cr/scielo.php?pid=S0034-77442007000100003&script=sci_arttext)
- <sup>33</sup> Garcés Ordoñez O, Castellanos Martínez M. Supervivencia de propágulos de *Rhizophora* Mangle bajo tenses ambientales en el brazo Calanca del Río Ranchería, Caribe

- Colombiano. Boletín de Investigaciones Marinas y Costeras - INVEMAR [Internet]. 2016 [Consultado 2018 Abril 11]; 45(2). Disponible en: [http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci\\_abstract&pid=S0122-97612016000200345&lng=en&nrm=iso&tlng=es](http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_abstract&pid=S0122-97612016000200345&lng=en&nrm=iso&tlng=es)
- <sup>34</sup> Orjuela Rojas A, Villamil C, Sanjuan Muñoz A. Cobertura y estructura de los bosques de mangle en la Baja Guajira, Caribe colombiano. Boletín de Investigaciones Marinas y Costeras - INVEMAR [Internet]. 2011 [Consultado 2018 Abril 11]; 40(2). Disponible en: [http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci\\_abstract&pid=S0122-97612011000200009](http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_abstract&pid=S0122-97612011000200009)
- <sup>35</sup> Villamil C, Del Portillo P, Monguí A. Clonación, expresión y caracterización de una nueva esterasa derivada de metagenomas de suelos agrícolas colombianos. Revista Colombiana de Biotecnología [Internet]. 2016 [Consultado 2018 Abril 11]; 18(2):48. Disponible en: [http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci\\_abstract&pid=S0123-34752016000200007&lng=en&nrm=iso&tlng=es](http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_abstract&pid=S0123-34752016000200007&lng=en&nrm=iso&tlng=es)
- <sup>36</sup> Palma L, Ardila D, Zambrano M, Restrepo S, González A. In vitro and in silico characterization of metagenomic soil-derived cellulases capable of hydrolyzing oil palm empty fruit bunch. Biotechnology Reports [Internet]. 2017 [Accessed 2018 April 11];15:55-62. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.btre.2017.06.003>
- <sup>37</sup> Florez Vasquez D. Caracterización de clones lipolíticos provenientes de una biblioteca metagenómica de bosque Altoandino Colombiano [Microbióloga agrícola y veterinaria]. Bogotá D.C: Pontificia Universidad Javeriana Facultad de ciencias 2012.
- <sup>38</sup> Montaña-Lara JP. Aproximación metagenómica para la identificación de enzimas lipolíticas en suelo de bosque alto andino del parque nacional natural Los Nevados. [Doctor en Ciencias Biológicas]. Bogotá D.C: Pontificia Universidad Javeriana; 2015.
- <sup>39</sup> Thompson C, Beys-da-Silva W, Santi L, Berger M, Vainstein M, Guimarães J, et al. A potential source for cellulolytic enzyme discovery and environmental aspects revealed through metagenomics of Brazilian mangroves. AMB Express [Internet]. 2013 [Accessed 2018 April 12]; 3(1):65. Available from: <https://doi.org/10.1186/2191-0855-3-65>



- <sup>40</sup> Simões M, Antunes A, Ottoni C, Amini M, Alam I, Alzubaidy H et al. Soil and Rhizosphere Associated Fungi in Gray Mangroves (*Avicennia marina*) from the Red Sea — A Metagenomic Approach. *Genomics, Proteomics & Bioinformatics* [Internet]. 2015 [Accessed 2018 April 12]; 13(5):310-320. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.gpb.2015.07.002>
- <sup>41</sup> Ullah R, Yasir M, Khan I, Bibi F, Sohrab S, Al-Ansari A et al. Comparative bacterial community analysis in relatively pristine and anthropogenically influenced mangrove ecosystems on the Red Sea. *Can J Microbiol.* [Internet]. 2017 [Accessed 2018 April 12]; 63(8):649-660. Available from: <https://doi.org/10.1139/cjm-2016-0587>
- <sup>42</sup> Pessoa T, Rezende R, Marques E, Pirovani C, dos Santos T, dos Santos Gonçalves A, et al. Metagenomic alkaline protease from mangrove sediment. *Journal of Basic Microbiology* [Internet]. 2017 [Accessed 2018 April 12]; 57(11):962-973. Available from: <https://doi.org/10.1002/jobm.201700159>
- <sup>43</sup> Mai Z, Su H, Zhang S. Isolation and Characterization of a Glycosyl Hydrolase Family 16  $\beta$ -Agarase from a Mangrove Soil Metagenomic Library. *International Journal of Molecular Sciences* [Internet]. 2016 [Accessed 2018 April 12]; 17(8):1360. Available from: <https://doi.org/10.3390/ijms17081360>
- <sup>44</sup> Lino Soares F, Marcon J, Pereira e Silva M, Khakhum N, Teixeira Cerdeira L, Ronzella Ottoni J et al. A Novel Multifunctional  $\beta$ -N-Acetylhexosaminidase Revealed through Metagenomics of an Oil-Spilled Mangrove. *Bioengineering* [Internet]. 2017 [Accessed 2018 april 12]; 4(4):62. Available from: <https://doi.org/10.3390/bioengineering4030062>
- <sup>45</sup> Cabral L, Pereira de Sousa S, Júnior G, Hawley E, Andreote F, Hess M, et al. Microbial functional responses to long-term anthropogenic impact in mangrove soils. *Ecotoxicology and Environmental Safety* [Internet]. 2018 [Accessed 2018 September 14]; 160:231-239. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2018.04.050>
- <sup>46</sup> Lin X, Hetharua B, Lin L, Xu H, Zheng T, He Z, Tian Y. Mangrove sediment microbiome: Adaptive microbial assemblages and their routed biogeochemical processes

- in yunxiao mangrove national nature reserve, china. *Microb Ecol* [Internet]. 2018 [Accessed 2018 September 14]; 1-13. Available from: <https://doi.org/10.1007/s00248-018-1261-6>
- <sup>47</sup> Zhang X, Hu B, Ren H, Zhang J. Composition and functional diversity of microbial community across a mangrove-inhabited mudflat as revealed by 16S rDNA gene sequences. *Science of The Total Environment* [Internet]. 2018 [Accessed 2018 April 14]; 633:518-528. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2018.03.158>
- <sup>48</sup> Mendes L, Tsai S. Distinct taxonomic and functional composition of soil microbiomes along the gradient forest-restinga-mangrove in southeastern Brazil. *Antonie van Leeuwenhoek* [Internet]. 2017 [Accessed 2018 April 15]; 111(1):101-114. Available from: <https://doi.org/10.1007/s10482-017-0931-6>
- <sup>49</sup> Rampadarath S, Bandhoa K, Puchooa D, Jeewon R, Bal S. Metatranscriptomics analysis of mangroves habitats around Mauritius. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* [Internet]. 2018 [Accessed 2018 September 17]; 34(4):1-11. Available from: <https://doi.org/10.1007/s11274-018-2442-7>
- <sup>50</sup> Sánchez-Arias L, Paolini J, Paul Rodríguez J. Dinámica de las propiedades del suelo en bosques de *Rhizophora mangle* L. (Rhizophoraceae) en Isla de Margarita, Venezuela. *Revista de Biología Tropical* [Internet]. 2010 [Consultado 2018 Abril 12]; 58(2):547-564. Disponible en: [http://www.scielo.sa.cr/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0034-77442010000200002&lng=en](http://www.scielo.sa.cr/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0034-77442010000200002&lng=en)
- <sup>51</sup> Nogueira V, Rocha L, Colares G, Angelim A, Normando L, Cantão M et al. Microbiomes and potential metabolic pathways of pristine and anthropized Brazilian mangroves. *Regional Studies in Marine Science* [Internet]. 2015 [Accessed 2018 September 14]; 2:56-64. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.rsma.2015.08.008>
- <sup>52</sup> Kimbrel JA, Ballor N, Wu YW, et al. Microbial community structure and functional potential along a hypersaline gradient. *Front. Microbiol* [Internet]. 2018 [Accessed 2018 September 14]; 9:1492. Available from: <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.01492>

- <sup>53</sup> Sánchez O, Herzig M, Peters E, Zambrano L. Perspectivas sobre conservación de ecosistemas acuáticos en México. [Internet]. Estados Unidos: 1st ed, 2007 [Consultado 2018 September 14]. Disponible en:  
[https://www.researchgate.net/publication/288653766\\_Perspectivas\\_sobre\\_conservacion\\_de\\_ecosistemas\\_acuaticos\\_en\\_Mexico](https://www.researchgate.net/publication/288653766_Perspectivas_sobre_conservacion_de_ecosistemas_acuaticos_en_Mexico)
- <sup>54</sup> Vanegas J. Bacterias fijadoras de nitrógeno y solubilizadoras de fosfato en la rizosfera del manglar de San Andrés Isla. Cuad Caribe [Internet]. 2004 [Consultado 2018 Septiembre 14];1(5):67-70. Disponible en:  
<https://revistas.unal.edu.co/index.php/ccaribe/article/view/41762/43453>.
- <sup>55</sup> Kanehisa Laboratories. KEGG PATHWAY: Nitrogen metabolism - Reference pathway [Internet]. Genome.jp. 2018 [Accessed 2018 September 14]. Available from:  
[https://www.genome.jp/kegg-bin/show\\_pathway?map=map00910&show\\_description=show](https://www.genome.jp/kegg-bin/show_pathway?map=map00910&show_description=show)
- <sup>56</sup> Reyes C, Schneider D, Lipka M, Thürmer A, Böttcher M, Friedrich M. Nitrogen Metabolism Genes from Temperate Marine Sediments. Marine Biotechnology [Internet]. 2017 [Accessed 2018 September 14]; 19(2):175-190. Available from:  
<https://doi.org/10.1007/s10126-017-9741-0>
- <sup>57</sup> Albright M, Timalina B, Martiny J, Dunbar J. Comparative Genomics of Nitrogen Cycling Pathways in Bacteria and Archaea. Microbial Ecology [Internet]. 2018 [Accessed 2018 September 14]. Available from: <https://doi.org/10.1007/s00248-018-1239-4>
- <sup>58</sup> Hayatsu M, Tago K, Saito M. Various players in the nitrogen cycle: Diversity and functions of the microorganisms involved in nitrification and denitrification. Soil Science and Plant Nutrition [Internet]. 2008 [Accessed 2018 September 14]; 54(1):33-45. Available from: <https://doi.org/10.1111/j.1747-0765.2007.00195.x>
- <sup>59</sup> Jetten M. The microbial nitrogen cycle. Environmental Microbiology [Internet]. 2008 [Accessed 2018 September 14]; 10(11):2903-2909. Available from:  
<https://doi.org/10.1111/j.1462-2920.2008.01786.x>

- <sup>60</sup> Kanehisa Laboratories. KEGG PATHWAY: Sulfur metabolism - Reference pathway [Internet]. Genome.jp. 2018 [Accessed 2018 September 14]. Available from: [https://www.genome.jp/kegg-bin/show\\_pathway?map=map00920&show\\_description=show](https://www.genome.jp/kegg-bin/show_pathway?map=map00920&show_description=show)
- <sup>61</sup> Anantharaman K, Hausmann B, Jungbluth S, Kantor R, Lavy A, Warren L et al. Expanded diversity of microbial groups that shape the dissimilatory sulfur cycle. The ISME Journal [Internet]. 2018 [Accessed 2018 September 14]; 12(7):1715-1728. Available from: <https://doi.org/10.1038/s41396-018-0078-0>
- <sup>62</sup> He Y, Feng X, Fang J, Zhang Y, Xiao X. Metagenome and Metatranscriptome Revealed a Highly Active and Intensive Sulfur Cycle in an Oil-Immersed Hydrothermal Chimney in Guaymas Basin. *Frontiers in Microbiology* [Internet]. 2015 [Accessed 2018 September 14]; 6:1-11. Available from: <https://doi.org/10.3389/fmicb.2015.01236>
- <sup>63</sup> Yousuf B, Kumar R, Mishra A, Jha B. Unravelling the Carbon and Sulphur Metabolism in Coastal Soil Ecosystems Using Comparative Cultivation-Independent Genome-Level Characterisation of Microbial Communities. *PLoS ONE* [Internet]. 2014 [Accessed 2018 September 14]; 9(9):e107025. Available from: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0107025>
- <sup>64</sup> Mahowald, N. (2018). Atmospheric Biogeochemistry. In: R. Leemans, ed., *Ecological Systems*, 1st ed. New York, pp.7-12.
- <sup>65</sup> Hügler M, Sievert S. Beyond the Calvin Cycle: Autotrophic Carbon Fixation in the Ocean. *Annual Review of Marine Science* [Internet]. 2011 [Accessed 2018 September 14]; 3(1):261-289. Available from: <https://doi.org/10.1146/annurev-marine-120709-142712>
- <sup>66</sup> Kanehisa Laboratories. KEGG PATHWAY: Methane metabolism - Reference pathway [Internet]. Genome.jp. 2018 [Accessed 2018 September 14]. Available from: [https://www.genome.jp/keggbin/show\\_pathway?map=map00680&show\\_description=show](https://www.genome.jp/keggbin/show_pathway?map=map00680&show_description=show)

- <sup>67</sup> Shen L, Liu S, Zhu Q, Li X, Cai C, Cheng D et al. Distribution and Diversity of Nitrite-Dependent Anaerobic Methane-Oxidising Bacteria in the Sediments of the Qiantang River. *Microbial Ecology* [Internet]. 2013 [Accessed 2018 September 14]; 67(2):341-349. Available from: <https://doi.org/10.1007/s00248-013-0330-0>
- <sup>68</sup> Su X, Zhao W, Xia D. The diversity of hydrogen-producing bacteria and methanogens within an in situ coal seam. *Biotechnology for Biofuels* [Internet]. 2018 [Accessed 2018 September 14]; 11(1):2-18. Available from: <https://doi.org/10.1186/s13068-018-1237-2>
- <sup>69</sup> Hallam S. Reverse Methanogenesis: Testing the Hypothesis with Environmental Genomics. *Science* [Internet]. 2004 [Accessed 2018 September 14]; 305(5689):1457-1462. Available from: <https://doi.org/10.1126/science.1100025>
- <sup>70</sup> Xu K, Tang Y, Ren C, Zhao K, Wang W, Sun Y. Activity, distribution, and abundance of methane-oxidizing bacteria in the near surface soils of onshore oil and gas fields. *Applied Microbiology and Biotechnology* [Internet]. 2012 [Accessed 2018 September 14]; 97(17):7909-7918. Available from: <https://doi.org/10.1007/s00253-012-4500-7>
- <sup>71</sup> Kunin V, Copeland A, Lapidus A, Mavromatis K, Hugenholtz P. A Bioinformatician's Guide to Metagenomics. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* [Internet]. 2008 [Accessed 2018 September 14]; 72(4):557-578. Available from: <http://doi.org/10.1128/MMBR.00009-08>
- <sup>72</sup> Huson D. MEGAN — Algorithms in Bioinformatics [Internet]. *Ab.inf.uni-tuebingen.de*. 2016 [Accessed 2018 September 14]. Available from: <http://ab.inf.uni-tuebingen.de/software/megan/>
- <sup>73</sup> Huson D. User Manual for MEGAN V6.10.13. 2018.
- <sup>74</sup> Kanehisa M, Goto S. KEGG: Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes. *Nucleic Acids Res* [Internet]. 2018 [Accessed 2018 September 14]; 28(1). Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC102409/>

- <sup>75</sup> Kanehisa Laboratories. KEGG: Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes [Internet]. Genome.jp. 2018 [Accessed 2018 September 14]. Available from: <https://www.genome.jp/kegg/>
- <sup>76</sup> Dhariwal A, Chong J, Habib S, King I, Agellon L, Xia J. MicrobiomeAnalyst: a web-based tool for comprehensive statistical, visual and meta-analysis of microbiome data. *Nucleic Acids Research* [Internet]. 2017 [Accessed 2018 September 14]; 45(W1):W180-W188. Available from: <https://doi.org/10.1093/nar/gkx295>
- <sup>77</sup> Segata N, Izard J, Waldron L, Gevers D, Miropolsky L, Garrett W et al. Metagenomic biomarker discovery and explanation. *Genome Biology* [Internet]. 2011 [Accessed 2018 September 14]; 12(6):R60. Available from: <https://doi.org/10.1186/gb-2011-12-6-r60>
- <sup>78</sup> Strimbu K, Tavel J. What are biomarkers? *Current Opinion in HIV and AIDS* [Internet]. 2010 [Accessed 2018 September 14]; 5(6):463-466. Available from: <https://doi.org/10.1097/COH.0b013e32833ed177>
- <sup>79</sup> Parks D, Tyson G, Hugenholtz P, Beiko R. STAMP: statistical analysis of taxonomic and functional profiles. *Bioinformatics* [Internet]. 2014 [Accessed 2018 September 14]; 30(21):3123-3124. Available from: <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btu494>
- <sup>80</sup> Parks DH, Tyson GW, Hugenholtz P, Beiko RG. STAMP - Bioinformatics Software [Internet]. Kiwi.cs.dal.ca. 2018 [Accessed 2018 September 14]. Available from: <http://kiwi.cs.dal.ca/Software/STAMP>
- <sup>81</sup> Abdi H, Williams LJ. Principal component analysis. *Wiley interdisciplinary reviews: computational statistics* [Internet]. 2010 [Accessed 2018 September 14]; 2(4):433-459. Available from: <https://doi.org/10.1002/wics.101>
- <sup>82</sup> Pleil JD, Stiegel MA, Madden MC, Sobus JR. Heat map visualization of complex environmental and biomarker measurements. *Chemosphere* [Internet]. 2011 [Accessed 2018 September 14]; 84(5): 716-723. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2011.03.017>

- <sup>83</sup> Polanía J, Orozco- Toro CA, Angel IF. Delta del río ranchería (La Guajira Colombia): caudal, salinidad y transporte de sólidos y sobre composición y estructura de los manglares. *Actual Biol (Colombia)* [Internet]. 2006 [Consultado 2018 Noviembre 15]; 28(84): 27-37. Disponible en: <https://aprendeenlinea.udea.edu.co/revistas/index.php/actbio/article/download/329400/20785862>
- <sup>84</sup> Muñoz-García A, Mestanza O, Isaza JP, Figueroa-Galvis I, Vanegas J. Influence of salinity on the degradation of xenobiotic compounds in rhizospheric mangrove soil. *Environmental pollution* [Internet]. 2019 [Accessed 2019 March 29]; 84(5): 716-723. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2019.03.056>
- <sup>85</sup> Bolger AM, Lohse M, Usadel B. (2014). Trimmomatic: A flexible trimmer for Illumina Sequence Data. *Bioinformatics*, btu170.
- <sup>86</sup> Huson DH, Auch AF, Qi J, Schuster SC. MEGAN analysis of metagenomic data. *Genome Research* [Internet]. 2007 [Accessed 2018 November 18]; 17(3): 377-386. Available from: <https://doi.org/10.1101/gr.5969107>
- <sup>87</sup> Sorokin DY, Berben T, Melton ED, Overmars L, Vavourakis CD, Muyzer G. Microbial diversity and biogeochemical cycling in soda lakes. *Extremophiles* [Internet]. 2014 [Accessed 2018 November 18]; 18(5): 791-809. Available from: <https://doi.org/10.1007/s00792-014-0670-9>
- <sup>88</sup> Lennon JT, Jones E. Microbial seed banks: the ecological and evolutionary implications of dormancy .*Nature Reviews Microbiology* [Internet]. 2011 [Accessed 2018 November 18]; 9: 119-130. Available from: <https://doi.org/10.1038/nrmicro2504>
- <sup>89</sup> Jeffries TC, Seymour JR, Gilbert JA, Dinsdale EA, Newton K, Leterme SS, Roudnew B, Smith RJ, Seuront L, Mitchell JG. Substrate type determines metagenomic profiles from diverse chemical habitats. *PLoS One* [Internet]. 2011 [Accessed 2018 November 18]; 6(9). Available from: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0025173>

- <sup>90</sup> Hongmei J, Shunyan C, Zhi Z, Chen W, Sanjay N, Hongbin L. Spatial variations of the methanogenic communities in the sediments of tropical mangroves. *PLoS One* [Internet]. 2016 [Accessed 2018 November 18]; 11(9). Available from: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0161065>
- <sup>91</sup> INVEMAR. 2017. Diagnóstico y evaluación de la calidad de las aguas marinas y costeras en el Caribe y Pacífico colombianos. Garcés O, L Espinosa (Eds.). Red de vigilancia para la conservación y protección de las aguas marinas y costeras de Colombia – REDCAM: INVEMAR, MADS y CAR costeras. Informe técnico 2016. Serie de Publicaciones Periódicas No. 4 (2017) del INVEMAR, Santa Marta. 260 p. <https://doi.org/10.21239/V9HW3X>
- <sup>92</sup> Liu H, Wang J, Wang A, Chen J. Chemical inhibitors of methanogenesis and putative applications. *Appl Microbiol Biotechnol* [Internet]. 2011 [Accessed 2018 November 18]; 89: 1333-1340. Available from: <https://doi.org/10.1007/s00253-010-3066-5>
- <sup>93</sup> Karhadkar PP, Audic JM, Faup GM, Khanna P. Sulfide and sulfate inhibition of methanogenesis. *Water Research* [Internet]. 1987 [Accessed 2018 November 18]; 21(9): 1061-1066. Available from: [https://doi.org/10.1016/0043-1354\(87\)90027-3](https://doi.org/10.1016/0043-1354(87)90027-3)
- <sup>94</sup> Shen, L., Hu, B., Liu, S. et al. Distribution and Diversity of Nitrite-Dependent Anaerobic Methane-Oxidising Bacteria in the Sediments of the Qiantang River. *Appl Microbiol Biotechnol* [Internet]. 2016 [Accessed 2019 April 01]; 100: 7171. Available from: <https://doi.org/10.1007/s00253-016-7627-0>
- <sup>95</sup> Monroy FL, Ghinaglia LT, Poblete E, González LV. Dinámica de los nutrientes en una laguna costera tropical hipersalina (Las Marites, Isla de Margarita, Venezuela). *Revista Bio Ciencias*, [Internet]. 2017 [Accessed 2018 November 18]; 4(6). Available from: <https://doi.org/10.15741/revbio.04.06.04>
- <sup>96</sup> Lüke C, Speth DR, Kox MA, Villanueva L, Jetten MS. Metagenomic analysis of nitrogen and methane cycling in the Arabian Sea oxygen minimum zone. *PeerJ*, [Internet]. 2016 [Accessed 2018 November 18]; 4, e1924. Available from: <https://doi.org/10.7717/peerj.1924>



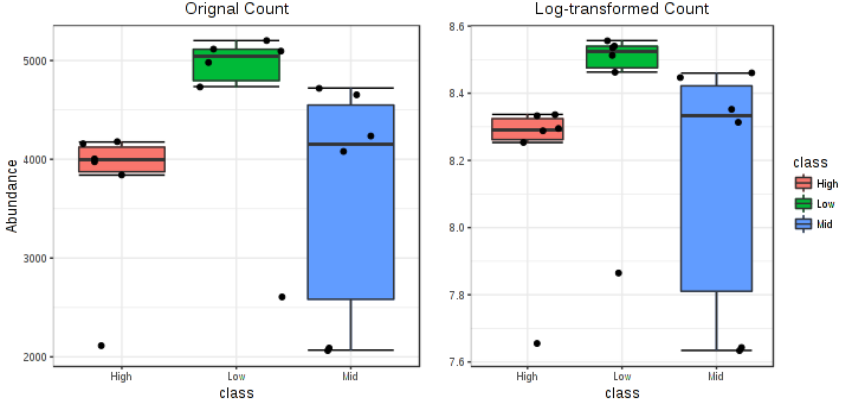
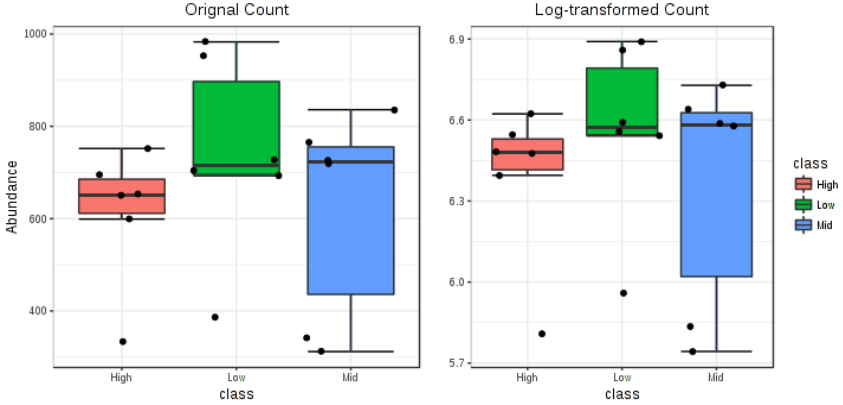
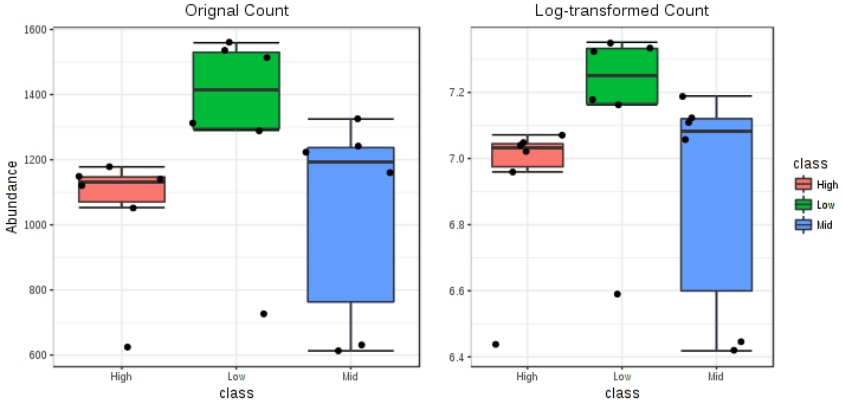
- <sup>97</sup> Dias ACF, Pereira e Silva, Michele de Cassia, *et al.* Abundance and genetic diversity of *nifH* gene sequences in anthropogenically affected Brazilian mangrove sediments. *Applied and Environmental Microbiology*. [Internet]. 2012 [Accessed 2018 November 18]; 78(22): 7960-7967. Available from: <https://doi.org/10.1128/AEM.02273-12>
- <sup>98</sup> Puente EM, Holguin G, Glick BR, Bashan Y. Root-surface colonization of black mangrove seedlings by *Azospirillum halopraeferens* and *Azospirillum brasilense* in seawater. *FEMS Microbiology Ecology*. [Internet]. 1999 [Accessed 2018 November 18]; 29(3): 283–292, Available from: <https://doi.org/10.1111/j.1574-6941.1999.tb00619.x>
- <sup>99</sup> Vareeket R, Soyong K. Screening of Photosynthetic Bacteria, *Rhodospirillum rubrum* for Stimulation of Rice Seed Germination. *International Journal of Agricultural Technology* [Internet]. 2016 [Accessed 2018 November 18]; 12(7.1): 1451-1455. Available from: [http://www.aatsea.org/images/conference\\_publications/pdf/v12\\_n7\\_1\\_2016\\_DecemberSpecialissue/Agricultural%2012no7.1%20\(1451-1456\)%201.pdf](http://www.aatsea.org/images/conference_publications/pdf/v12_n7_1_2016_DecemberSpecialissue/Agricultural%2012no7.1%20(1451-1456)%201.pdf)
- <sup>100</sup> Ahmad Maqshoof, Zahir A, Nazli Farheen, Akram Fareeha, Arshad Muhammad, Khalid Muhammad. Effectiveness of halo-tolerant, auxin producing *Pseudomonas* and *Rhizobium* strains to improve osmotic stress tolerance in mung bean (*Vigna radiata* L.). *Braz. J. Microbiol* [Internet]. 2013 [Accessed 2018 November 18]; 44 (4): 1341-1348. Available from: <http://dx.doi.org/10.1590/S1517-83822013000400045>
- <sup>101</sup> Chuang PC, Young MB, Dale AW, Miller L, Herrera-Silveira JA, Paytan A. Methane and sulfate dynamics in sediments from mangrove-dominated tropical coastal lagoons, Yucatan, Mexico. *Biogeosciences (BG)* [Internet]. 2016 [Accessed 2018 November 18]; 13(10):2981-3001. Available from: <http://dx.doi.org/10.5194/bg-13-2981-2016>
- <sup>102</sup> Kristensen E, Bouillon S, Dittmar T, Marchand C. Organic carbon dynamics in mangrove ecosystems: A review. *Aquatic Botany* [Internet]. 2008 [Accessed 2018 November 18]; 89: 201-219. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.aquabot.2007.12.005>

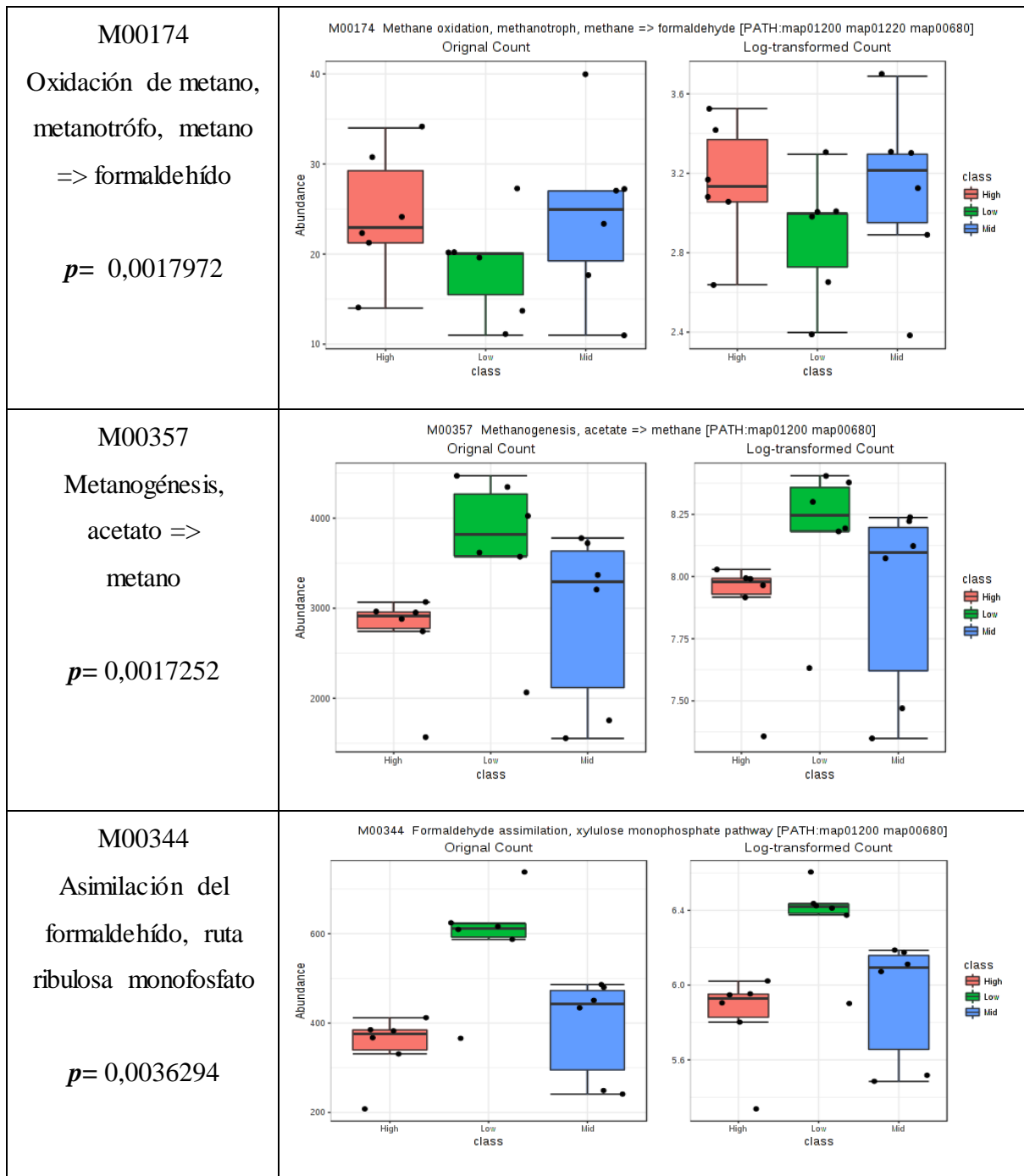
- <sup>103</sup> Muyzer G, Stams AJ. The ecology and biotechnology of sulphate-reducing bacteria. *Nature reviews microbiology* [Internet]. 2008 [Accessed 2018 November 18]; 6(6): 441-454. Available from: <https://doi.org/10.1038/nrmicro1892>
- <sup>104</sup> Varon- Lopez M, Dias ACF, Fasanella CC, Durrer A, Melo IS, Kuramae EE, Andreote FD. Sulphur- oxidizing and sulphate- reducing communities in Brazilian mangrove sediments. *Environmental microbiology* [Internet]. 2014 [Accessed 2018 November 18]; 16(3): 845-855. Available from: <https://doi.org/10.1111/1462-2920.12237>
- <sup>105</sup> Foti M., Sorokin DY, Lomans B, *et al.* Diversity, activity, and abundance of sulfate-reducing bacteria in saline and hypersaline soda lakes. *Applied and environmental microbiology* [Internet]. 2007 [Accessed 2018 November 18]; 73(7): 2093-2100. Available from: <https://doi.org/10.1128/AEM.02622-06>
- <sup>106</sup> Tatjana P. Tourova, Natalija V. Slobodova, Boris K. Bumazhkin, Tatjana V. Kolganova, Gerard Muyzer, Dimitry Y. Sorokin. Analysis of community composition of sulfur-oxidizing bacteria in hypersaline and soda lakes using *soxB* as a functional molecular marker. *FEMS Microbiology Ecology* [Internet]. 2013 [Accessed 2018 November 18]; 84 (2): 280–289. Available from: <https://doi.org/10.1111/1574-6941.12056>
- <sup>107</sup> Alongi DM. Present state and future of the world's mangrove forests. *Environmental Conservation* [Internet]. 2002 [Accessed 2018 November 18]; 29(3): 331-349. Available from: <https://doi.org/10.1017/S0376892902000231>
- <sup>108</sup> Masalkara PD, Roberts DM. Glutamine synthetase isoforms in nitrogen-fixing soybean nodules: Distinct oligomeric structures and thiol-based regulation. *FEBS Letters* [Internet]. 2015 [Accessed 2018 November 18]; 589 (2): 215–221. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2014.11.048>
- <sup>109</sup> Balotf S, Kavooosi G, Kholdebarin B. Nitrate reductase, nitrite reductase, glutamine synthetase, and glutamate synthase expression and activity in response to different nitrogen sources in nitrogen- starved wheat seedlings. *Biotechnology and applied biochemistry*, [Internet]. 2016 [Accessed 2018 November 18]; 63(2), 220-229. Available from: <https://doi.org/10.1002/bab.1362>

- <sup>110</sup> Suzuki M, Arai M, Ishii M, Igarashi Y. Gene Structure and Expression Profile of Cytochrome bc Nitric Oxide Reductase from *Hydrogenobacter thermophilus* TK-6. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry* [Internet]. 2006 [Accessed 2018 November 18]; 70(7): 1666–1671. Available from: <https://doi.org/10.1271/bbb.60018>
- <sup>111</sup> Yu Z, Liu J, Li Y, Jin J, Liu X, Wang G. Impact of land use, fertilization and seasonal variation on the abundance and diversity of nirS-type denitrifying bacterial communities in a Mollisol in Northeast China. *European Journal of Soil Biology* [Internet]. 2018 [Accessed 2018 November 18]; 85: 4-11. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.ejsobi.2017.12.001>
- <sup>112</sup> Stoeva MK, Coates JD. Specific inhibitors of respiratory sulfate reduction: towards a mechanistic understanding. *Microbiology* [Internet]. 2019 [Accessed 2019 March 18]; 165(3):254-269. Available from: <https://dx.doi.org/10.1099/mic.0.000750>
- <sup>113</sup> Gumiere T, Gumiere SJ, Matteau JP, Constant P, Letourneau G, Rousseau AN. Soil bacterial community associated with high potato production and minimal water use. *Frontiers in Environmental Science*. [Internet]. 2018 [Accessed 2018 November 18]; 6:161. Available from: <https://doi.org/10.3389/fenvs.2018.00161>
- <sup>114</sup> Mikkelsen R, Baunsgaard L, Blennow A. Functional characterization of alpha-glucan, water dikinase, the starch phosphorylating enzyme. *Biochem J* [Internet]. 2004 [Accessed 2018 November 18]; 377(2):525-532. Available from: <https://dx.doi.org/10.1042%2FBJ20030999>
- <sup>115</sup> Huang J, Chen L, Hu N, et al. Characterization of a novel serine hydroxymethyltransferase isolated from marine bacterium *Arthrobacter* sp. and its application on L-serine production. *Ann Microbiol* [Internet]. 2015 [Accessed 2018 November 18]; 65:1689. Available from: <https://doi.org/10.1007/s13213-014-1008-7>

## Anexos

**Anexo 1.** Módulos del ciclo del Metano con diferencias significativas en los tres puntos de salinidad Alta (H), Baja (L) y Media (M) analizadas mediante Metagenomic seq.

Genes	Detalles
<p>M00346</p> <p>Asimilación del formaldehído, ruta serina</p> <p><math>p= 1,4176e-05</math></p>	<p>M00346 Formaldehyde assimilation, serine pathway [PATH:map01200 map00680]</p>  <p>The figure for M00346 consists of two box plots. The left plot, titled 'Original Count', shows abundance on the y-axis (2000 to 5000) for three salinity classes: High (red), Low (green), and Mid (blue). The Low class shows the highest median abundance (~5000), followed by High (~4000) and Mid (~4200). The right plot, titled 'Log-transformed Count', shows abundance on the y-axis (7.6 to 8.6). The Low class has the highest median (~8.5), followed by High (~8.3) and Mid (~8.35). A legend indicates High (red), Low (green), and Mid (blue).</p>
<p>M00563</p> <p>Metanogénesis, metilamina/dimetilamina/trimetilamina =&gt; metano</p> <p><math>p= 3,6441e-05</math></p>	<p>M00563 Methanogenesis, methylamine/dimethylamine/trimethylamine =&gt; methane [PATH:map01200 map00680]</p>  <p>The figure for M00563 consists of two box plots. The left plot, titled 'Original Count', shows abundance on the y-axis (400 to 1000) for three salinity classes: High (red), Low (green), and Mid (blue). The Low class shows the highest median abundance (~700), followed by High (~650) and Mid (~700). The right plot, titled 'Log-transformed Count', shows abundance on the y-axis (5.7 to 6.9). The Low class has the highest median (~6.6), followed by High (~6.45) and Mid (~6.6). A legend indicates High (red), Low (green), and Mid (blue).</p>
<p>M00345</p> <p>Asimilación del formaldehído, ruta ribulosa monofosfato</p> <p><math>p= 6,9263e-05</math></p>	<p>M00345 Formaldehyde assimilation, ribulose monophosphate pathway [PATH:map01200 map00680]</p>  <p>The figure for M00345 consists of two box plots. The left plot, titled 'Original Count', shows abundance on the y-axis (600 to 1600) for three salinity classes: High (red), Low (green), and Mid (blue). The Low class shows the highest median abundance (~1400), followed by High (~1100) and Mid (~1150). The right plot, titled 'Log-transformed Count', shows abundance on the y-axis (6.4 to 7.2). The Low class has the highest median (~7.15), followed by High (~7.0) and Mid (~7.1). A legend indicates High (red), Low (green), and Mid (blue).</p>



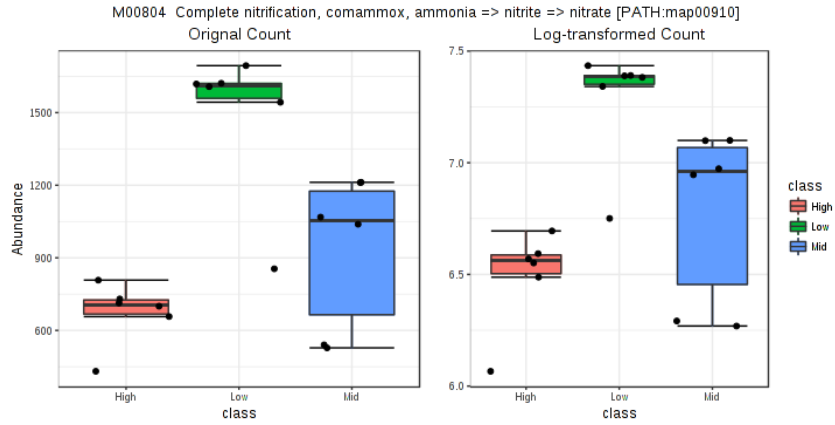
**Anexo 2.** Módulos del ciclo del Nitrógeno con diferencias significativas en los tres puntos de salinidad Alta (H), Baja (L) y Media (M) analizadas mediante Metagenomic seq.

Gen	Detalles
-----	----------

M00804

Nitrificación completa,  
comammox, amonio  
=> nitrito => nitrato

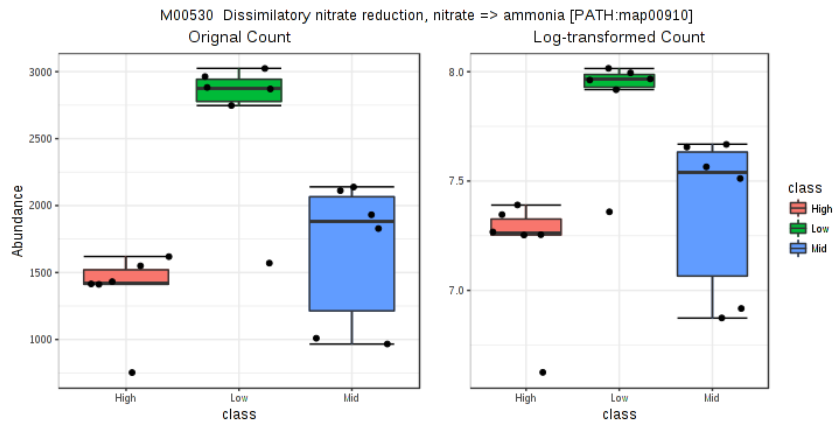
$p = 4,2288e-06$



M00530

Reducción  
disimilatoria de  
nitratos, nitrato =>  
amonio

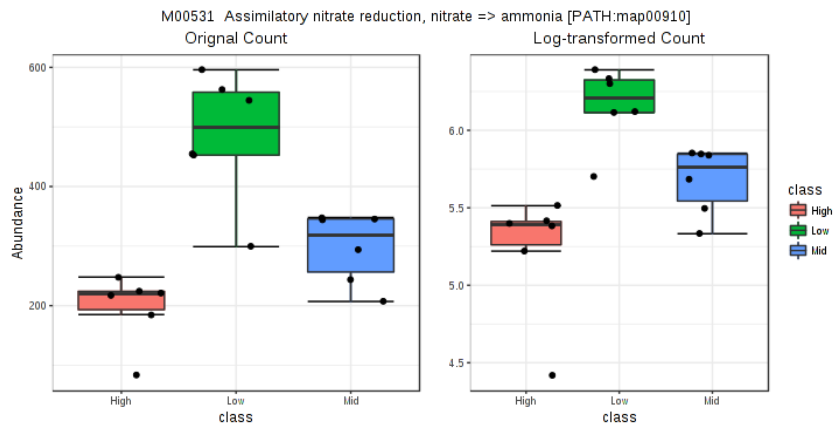
$p = 4,2535e-05$

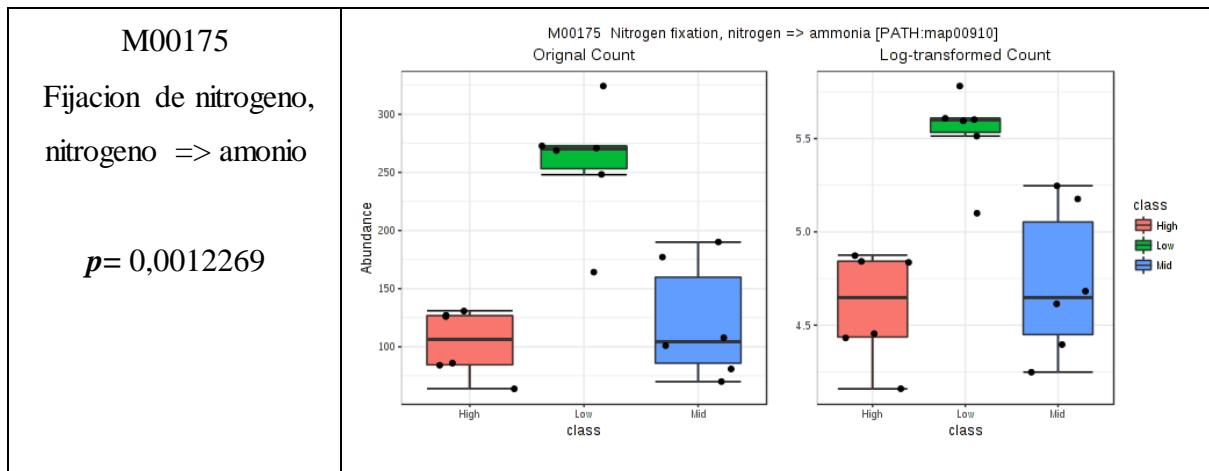


M00531

Reducción asimilatoria  
de nitratos, nitrato =>  
amonio

$p = 8,8921e-05$





**Anexo 3.** Módulos del ciclo del Azufre con diferencias significativas en los tres puntos de salinidad Alta (H), Baja (L) y Media (M) analizadas mediante Metagenomic seq.

Modulos	Detalles
<p><b>M00595</b></p> <p>Oxidación de tiosulfato por el complejo SOX, tiosulfato =&gt; sulfato</p> <p><math>p= 2,6456e-06</math></p>	<p>M00595 Thiosulfate oxidation by SOX complex, thiosulfate =&gt; sulfate [PATH:map00920]</p>
<p><b>M00596</b></p> <p>Reducción disimilatoria de sulfato, sulfato =&gt; H2S</p> <p><math>p=0,001298</math></p>	<p>M00596 Dissimilatory sulfate reduction, sulfate =&gt; H2S [PATH:map00920]</p>

**Anexo 4.** Géneros asociados al ciclo biogeoquímico del metano con su respectiva abundancia relativa, FDR y *p values*

	<b>p values</b>	<b>FDR</b>	<b>ALTA</b>	<b>MEDIA</b>	<b>BAJA</b>
<b>Metanotrofos</b>					
Clostridium	0,0016625	0,0053788	0,0002	0,0001	0,0001
Methylacidiphilum	0,048442	0,085541	0,0002	0,0001	0,0001
Methylibium	0,0002248	0,001172	0,0006	0,0007	0,0009
Methylobacillus	0,12069	0,17724	0,0002	0,0002	0,0003
Methylobacter	2,15E-03	6,38E-02	0,0016	0,0013	0,0009
Methylobacterium	0,54524	0,61767	0,0021	0,0022	0,0023
Methylocaldum	8,18E-04	1,89E-01	0,0016	0,0011	0,0009
Methylocapsa	0,088734	0,13862	0,0004	0,0005	0,0005
Methyloceanibacter	0,058666	0,10052	0,0173	0,0631	0,0222
Methylocella	0,0036146	0,010041	0,0002	0,0002	0,0002
Methylococcaceae	5,52E-02	7,50E-01	0,0009	0,0007	0,0006
Methylococcus	2,38E-03	6,72E-02	0,0010	0,0007	0,0006
Methylocystis	0,015961	0,033506	0,0008	0,0009	0,0009
Methyloferula	0,42398	0,50364	0,0002	0,0003	0,0003
Methylogaea	0,0096751	0,022511	0,0002	0,0001	0,0001



Methyloglobulus	2,02E-03	6,36E-02	0,0003	0,0002	0,0002
Methylohalobius	4,76E-05	4,76E-03	0,0022	0,0012	0,0009
Methylomarinum	1,17E-02	2,48E-01	0,0008	0,0004	0,0004
Methylomicrobium	5,03E-03	1,23E-01	0,0005	0,0004	0,0003
Methylomonas	1,95E-01	0,00017288	0,0014	0,0009	0,0009
Methylophaga	0,14716	0,21172	0,0036	0,0020	0,0029
Methylophilaceae	0,55926	0,63031	0,0001	0,0001	0,0001
Methylophilus	0,8691	0,89672	0,0000	0,0000	0,0000
Methylopila	0,0049115	0,013406	0,0006	0,0006	0,0007
Methylosarcina	0,00019173	0,0010238	0,0011	0,0011	0,0007
Methylosinus	0,63747	0,70474	0,0003	0,0002	0,0003
Methylotenera	0,82952	0,86327	0,0003	0,0003	0,0003
Methyloversatilis	0,00010682	0,00064364	0,0005	0,0007	0,0009
Methylovulum	1,50E-01	0,00014354	0,0003	0,0002	0,0002

**Anexo 5.** Géneros asociados al ciclo biogeoquímico del nitrógeno con su respectiva abundancia relativa, FDR y *p values*.

	<b>p values</b>	<b>FDR</b>	<b>ALTA</b>	<b>MEDIA</b>	<b>BAJA</b>
<b>Diazotrofos</b>					
Azorhizobium	2,09E-02	3,71E-01	0,0004	0,0005	0,0007
Azoarcus	0,068973	0,11459	0,0017	0,0016	0,0016
Azohydromonas	1,07E-01	0,00011631	0,0003	0,0004	0,0006
Azonexus	0,022691	0,044572	0,0001	0,0002	0,0002
Azospira	0,0023274	0,0069606	0,0003	0,0004	0,0005
Azospirillum	0,00010443	0,00063939	0,0059	0,0051	0,0044
Azotobacter	0,0013497	0,0046689	0,0004	0,0003	0,0003
Azovibrio	0,013681	0,029278	0,0002	0,0003	0,0003
Bradyrhizobium	0,0079732	0,019404	0,0088	0,0099	0,0113
Clostridium	0,0016625	0,0053788	0,0002	0,0001	0,0001
Cyanothece	0,0003789	0,0017572	0,0007	0,0006	0,0005
Klebsiella	0,005322	0,014269	0,0001	0,0001	0,0001
Pseudomonas	0,0013351	0,0046327	0,0063	0,0052	0,0052
Rhodobacter	3,77E-04	2,18E-02	0,0005	0,0006	0,0012
Rhodospirillum	0,00066881	0,0028172	0,0028	0,0023	0,0020
Sinorhizobium	0,079533	0,12668	0,0016	0,0016	0,0018
<b>Desnitrificantes</b>					
Pseudomonas	0,0013351	0,0046327	0,0063	0,0052	0,0052

Agrobacterium	0,00032011	0,0015243	0,0006	0,0006	0,0008
Alcaligenes	0,020059	0,040486	0,0001	0,0001	0,0001
Bacillus	0,00026478	0,0013239	0,0020	0,0035	0,0036
Burkholderia	0,27306	0,34804	0,0053	0,0053	0,0051
Mesorhizobium	0,073643	0,11966	0,0052	0,0054	0,0057
Nitrobacter	4,51E-04	1,13E-01	0,0005	0,0005	0,0008
Paracoccus	3,49E-01	0,00026445	0,0013	0,0012	0,0019
Rhizobium	0,00037499	0,0017509	0,0031	0,0031	0,0039
<b>Nitrificantes</b>					
Arthrobacter	0,071997	0,11803	0,0003	0,0005	0,0003
Aeromonas	0,12698	0,1855	0,0001	0,0001	0,0001
Bradyrhizobium	0,0079732	0,019404	0,0088	0,0099	0,0113
Nitrobacter	4,51E-04	1,13E-01	0,0005	0,0005	0,0008
Nitrococcus	0,069068	0,11459	0,0024	0,0016	0,0019
Nitrolancea	0,11805	0,17407	0,0009	0,0009	0,0008
Nitrosococcus	2,10E-03	6,38E-02	0,0071	0,0042	0,0029
Nitrosomonas	0,15996	0,22616	0,0021	0,0021	0,0020
Nitrospira	0,010079	0,023195	0,0011	0,0015	0,0017
Nitrospina	1,32E-05	1,81E-03	0,0016	0,0009	0,0007

Nitospira	0,00016081	0,00088892	0,0238	0,0107	0,0090
Nitrospirillum	0,47504	0,55354	0,0003	0,0003	0,0003
<b>Reductores asimilatorios de nitratos</b>					
Acinetobacter	0,39975	0,48068	0,0002	0,0001	0,0002
Azotobacter	0,0013497	0,0046689	0,0004	0,0003	0,0003
Bacillus	0,00026478	0,0013239	0,0020	0,0035	0,0036
Klebsiella	0,005322	0,014269	0,0001	0,0001	0,0001
Serratia	0,016872	0,035151	0,0001	0,0001	0,0000
<b>Reductores disimilatorios de nitratos</b>					
Bacillus	0,00026478	0,0013239	0,0020	0,0035	0,0036
Bradyrhizobium	0,0079732	0,019404	0,0088	0,0099	0,0113

**Anexo 6.** Géneros asociados al ciclo biogeoquímico del azufre con su respectiva abundancia relativa, FDR y *p values*.

	<b>p values</b>	<b>FDR</b>	<b>ALTA</b>	<b>MEDIA</b>	<b>BAJA</b>
<b>Reductores asimilatorios/disimilatorios de sulfato</b>					
Desulfococcus	9,33E-03	2,09E-01	0,0036	0,0028	0,0013

Desulfarculus	0,00014789	0,00083635	0,0012	0,0009	0,0008
Desulfatibacillum	7,94E-01	0,00052292	0,0002	0,0002	0,0001
Desulfatiglans	0,015575	0,032759	0,0015	0,0011	0,0011
Desulfatirhabdium	0,091634	0,14197	0,0008	0,0006	0,0006
Desulfatitalea	0,32703	0,40556	0,0018	0,0014	0,0015
Desulfitibacter	2,45E-01	0,00020768	0,0002	0,0001	0,0001
Desulfitobacterium	0,031618	0,059555	0,0002	0,0002	0,0002
Desulfobacca	0,48154	0,55815	0,0010	0,0008	0,0018
Desulfobacter	8,02E-01	0,00052292	0,0007	0,0005	0,0004
Desulfobacterium	0,00011934	0,00069825	0,0005	0,0003	0,0003
Desulfobacula	0,00075706	0,0030685	0,0007	0,0006	0,0005
Desulfobulbus	0,0011828	0,0042003	0,0024	0,0019	0,0015
Desulfocapsa	0,00073747	0,0030497	0,0010	0,0008	0,0005
Desulfocarbo	0,00095783	0,0035753	0,0007	0,0005	0,0005
Desulfocurvus	0,021253	0,042368	0,0003	0,0003	0,0002
Desulfohalobium	0,0020739	0,006408	0,0003	0,0002	0,0002
Desulfomicrobium	0,096121	0,14726	0,0004	0,0003	0,0003
Desulfomonile	0,31199	0,38955	0,0014	0,0012	0,0013
Desulfonatronospira	7,37E-01	0,00049707	0,0003	0,0002	0,0002

Desulfonatronovibrio	3,82E-01	0,00028611	0,0004	0,0003	0,0002
Desulfonatrum	0,00075223	0,0030685	0,0008	0,0006	0,0006
Desulforegula	0,24102	0,31675	0,0003	0,0002	0,0002
Desulfosarcina	0,0013741	0,0046992	0,0021	0,0017	0,0012
Desulfospira	0,0008364	0,0032742	0,0007	0,0006	0,0004
Desulfosporosinus	0,014112	0,030025	0,0004	0,0004	0,0003
Desulfotalea	0,019666	0,04006	0,0004	0,0003	0,0003
Desulfotignum	0,0010163	0,0037389	0,0004	0,0003	0,0002
Desulfotomaculum	0,0082484	0,019898	0,0012	0,0012	0,0010
Desulfovermiculus	0,0057016	0,015004	0,0005	0,0003	0,0003
Desulfovibrio	0,98328	0,98507	0,0052	0,0041	0,0052
Desulfoviregula	0,032252	0,060541	0,0004	0,0003	0,0003
Desulfuripirillum	0,02415	0,047017	0,0002	0,0002	0,0002
Desulfurispora	0,053267	0,091983	0,0002	0,0002	0,0002
Desulfurivibrio	0,00015208	0,00085352	0,0007	0,0006	0,0004
Desulfurobacterium	0,0013565	0,0046776	0,0002	0,0001	0,0001
Desulfuromonas	0,0066119	0,016836	0,0239	0,0247	0,0520
Thermodesulfatator	0,00063823	0,0027285	0,0005	0,0003	0,0003
Thermodesulfobacterium	0,008168	0,019747	0,0002	0,0001	0,0001

Thermodesulfobium	0,011495	0,025441	0,0001	0,0001	0,0001
Thermodesulfovibrio	0,016404	0,034305	0,0005	0,0004	0,0004
<b>Oxidantes del azufre</b>					
Corynebacterium	0,0020431	0,0063307	0,0001	0,0002	0,0001
Allochromatium	0,00091024	0,0034526	0,0006	0,0004	0,0004
Chlorobaculum	0,0069699	0,017464	0,0003	0,0002	0,0002
Paracoccus	3,49E-01	0,00026445	0,0013	0,0012	0,0019
Rhodococcus	0,30871	0,38632	0,0006	0,0011	0,0007
Rhodovulum	2,08E-09	2,29E-06	0,0012	0,0019	0,0043
Thioploca	9,64E-07	3,12E-04	0,0017	0,0009	0,0006
Thioalkalivibrio	7,19E-06	1,32E-03	0,0123	0,0076	0,0046
Thioflavicoccus	3,06E-04	1,90E-02	0,0015	0,0011	0,0008
Thiobacillus	0,10113	0,15259	0,0026	0,0026	0,0024
Thiorhodococcus	6,20E-04	2,73E-02	0,0013	0,0009	0,0007
Thiohalorhabdus	1,01E-04	3,83E-02	0,0014	0,0009	0,0007
Thiolapillus	2,22E-03	6,42E-02	0,0009	0,0005	0,0005
Thioclava	1,22E-02	2,53E-01	0,0005	0,0006	0,0009
Thiomicrospira	1,27E-02	2,58e-05	0,0007	0,0005	0,0004
Thiorhodovibrio	1,43E-02	2,86E-01	0,0008	0,0006	0,0005

Thiothrix	1,54E-02	2,98E-02	0,0015	0,0010	0,0010
Thiocystis	3,79E-02	5,55E-01	0,0006	0,0004	0,0004
Thiorhodospira	7,70E-02	9,11E-01	0,0005	0,0003	0,0003
Thiohalocapsa	1,34E-01	0,00013278	0,0013	0,0009	0,0008
Thermithiobacillus	0,00011096	0,00065978	0,0016	0,0011	0,0011
Acidithiobacillus	0,00038458	0,00177	0,0008	0,0006	0,0006
Thiocapsa	0,00060644	0,0026472	0,0010	0,0007	0,0007
Halothiobacillus	0,0050186	0,013631	0,0002	0,0002	0,0002
Thioalkalimicrobiu m	0,0085623	0,020488	0,0001	0,0000	0,0000
Dethiobacter	0,046497	0,082761	0,0002	0,0002	0,0001
Thiomonas	0,071709	0,11773	0,0005	0,0005	0,0006
Thiobacillus	0,10113	0,15259	0,0026	0,0026	0,0024
Dethiosulfovibrio	0,50534	0,58085	0,0001	0,0001	0,0001



