

Universidad de Concepción

Escuela de Graduados

Doctorado en Oceanografía



Importancia de la comunidad desnitrificante en el reciclamiento del N_2O en la zona de mínimo oxígeno frente al norte de Chile

Maribeb Castro González

Concepción, Chile, Diciembre de 2004

Universidad de Concepción

Escuela de Graduados

La Tesis Doctoral en Oceanografía “Importancia de la comunidad desnitrificante en el reciclamiento del N₂O en la zona de mínimo oxígeno frente al norte de Chile” de la Sra. Maribeb Castro González, realizada en el Departamento de Oceanografía, Facultad de Ciencias Naturales y Oceanográficas, Universidad de Concepción, ha sido aprobada por la siguiente Comisión de Evaluación:

Dr. Osvaldo Ulloa
Director de Tesis
Universidad de Concepción

Dra. Laura Farías
Profesor Guía
Universidad de Concepción

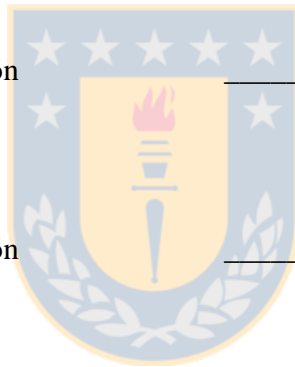
Dr. Homero Urrutia
Miembro Comité de Tesis
Universidad de Concepción

Dra. Fidelina González
Miembro Comité de Tesis
Universidad de Concepción

Dra. Margarita Carú
Evaluador Externo
Universidad de Chile

Dr. Wolfgang Schneider
Director de Programa
Universidad de Concepción

Diciembre, 2004



Dedicada a mi hijo, Daniel Mauricio
a mi esposo, René
a mis padres, Bela y Misael
a mis hermanos, Luz Dary y John
y a mi guía en esta aventura, Dios



Índice de Contenidos

| | |
|-----------------------|------|
| Agradecimientos..... | vi |
| Curriculum Vitae..... | viii |
| Resumen..... | ix |
| Abstract..... | xi |

Parte A

| | |
|---|----|
| 1.- INTRODUCCIÓN..... | 14 |
| 1.1.- El N ₂ O, su origen y reciclamiento en el océano..... | 14 |
| 1.2.- Importancia global de las áreas deficientes en oxígeno y caracterización de la ZMO del Pacífico Sur oriental..... | 16 |
| 1.3.- Factores reguladores del reciclamiento del N ₂ O oceánico..... | 18 |
| 1.4.- Diversidad de bacterias desnitrificantes en el océano..... | 22 |
| 2.- MATERIALES Y METODOS..... | 25 |
| 2.1.- Área de estudio..... | 25 |
| 2.2.- Cruceros oceanográficos y enfoque metodológico..... | 25 |
| 2.2.1.- Determinación de la proporción de N ₂ O que se recicla por desnitrificación bajo diferentes condiciones ambientales..... | 26 |
| 2.2.2.- Análisis de la diversidad genética de bacterias desnitrificantes en la ZMO..... | 27 |
| 3.- RESULTADOS..... | 29 |
| 3.1.- Influencia del O ₂ y disponibilidad de sustratos sobre el reciclaje del N ₂ O por desnitrificación a lo largo de la oxiclina superior frente al norte de Chile..... | 29 |
| 3.2.- Reciclamiento del N ₂ O en el núcleo de la zona de mínimo oxígeno frente al norte de Chile..... | 29 |
| 3.3.- Comunidades de desnitrificadores tipo <i>nirS</i> en la columna de agua de la ZMO del Pacífico Sur oriental..... | 30 |
| 4.- DISCUSIÓN..... | 32 |
| 4.1.- Tasas de desnitrificación en el área..... | 32 |
| 4.2.- Efecto del O ₂ sobre el reciclamiento del N ₂ O por desnitrificación..... | 35 |
| 4.3.- Efecto de la disponibilidad de sustratos sobre el reciclamiento del N ₂ O..... | 38 |

| | |
|---|----|
| 4.4.- Las comunidades desnitrificantes en el PSO..... | 41 |
| 4.5.- Consideraciones globales y perspectivas..... | 43 |
| 5.- REFERENCIAS..... | 45 |

Parte B

| | |
|----------------------------------|----|
| Publicaciones y manuscritos..... | 54 |
|----------------------------------|----|

1.- Castro-González M & L Farías. Influence of O₂ and substrate on the N₂O cycling along the upper oxycline off northern Chile. Enviado a Marine Ecology Progress Series el 14 de Octubre de 2004.

2.- Castro-González M & L Farías 2004. N₂O cycling at the core of the oxygen minimum zone off northern Chile. Marine Ecology Progress Series 280:1-11.

3.- Castro-González M, G Braker, L Farías, O Ulloa. Communities of *nirS*- type denitrifiers in the water column of the oxygen minimum zone in the eastern South Pacific. Enviado a Environmental Microbiology el 12 de Octubre de 2004.



Agradecimientos

Quiero agradecer a todas aquellas personas que han colaborado de diversas maneras en la realización de esta tesis. A Laura Farías por su gran apoyo, verdadera guía y amistad durante mi paso por esta Universidad; ya que gracias a su generosidad, entusiasmo y positivismo, así como a su punto de vista crítico y de su compromiso con mi desarrollo científico, siempre contribuyó a mantener mi motivación para continuar. También quiero agradecer a Osvaldo Ulloa por sus valiosos comentarios y críticas desde los inicios de esta tesis, así como por su acogida y por el apoyo logístico que me brindó como director del PROFC. También a Fidelina González y Homero Urrutia por su colaboración y aporte de ideas para el despegue del estudio molecular, el cual se inició en sus laboratorios. En este sentido agradezco también al Dr. Ralf Conrad y todo su equipo de trabajo en el laboratorio de biogeoquímica del Instituto Max-Planck de microbiología terrestre en Marburg, que muy generosamente contribuyeron con el total desarrollo del análisis molecular presentado en esta tesis y de manera especial a la Dra. Gesche Braker, porque sin su dirección esto no habría sido posible, así como por su fundamental apoyo y hospitalidad durante mi estadía en Alemania. Agradezco también a Ricardo Galleguillo, Rolando Montoya y Lilian Troncoso por su colaboración y amistad durante los inicios de mi trabajo de investigación en esta universidad, a los docentes del Programa en Oceanografía Dante Figueroa, Ciro Oyarzún, Tarsicio Antezana y Renato Quiñones, y a las tripulaciones de las embarcaciones Kay-Kay, Abate Molina y Vidal Gormaz por toda su colaboración a bordo durante los largos embarques que compartí con ellos.

En lo personal quiero empezar por agradecer a todos los compañeros de la cabina siete con quienes compartí los últimos 3 años: Gadiel, Gabriel, Marcela, Cecilia, Salvador, Marcel, Aldo, Oscar, Mauro, Ricardo, Pancho, José, Morín, Cesar, Víctor, Lucy, Saudi, Ule y Alexis por su afecto y su colaboración en uno u otro momento, pero especialmente a Verónica y Michelle por hacer de nuestro sitio de trabajo un lugar muy agradable, con su calor humano, amistad y alegría. También quiero agradecer a mis compañeros de la “generación 2000”, Beatriz Yannicelli, Samuel Nuñez, Pamela Hidalgo, Luis Hückstädt y Joshua Yaikin por su compañía durante largas horas de estudio y también de esparcimiento, pero en especial a Klaudia Hernández con quien compartí momentos difíciles y con quien

tengo una linda amistad. También a Luisa Fernanda Espinosa, Jorge Páramo, Luis Orlando Duarte, Angela Guzmán, Sara Purca, Milton Pedraza, Mónica Barros, Efraín Rodríguez, Alan Giraldo, Gloria Sánchez, Javier Díaz, Natalia Trabal y Rodolfo Vogler con quienes siempre puede tomar un café y conversar; a Fabiola Gaete por su amistad y constante colaboración y a todos los demás compañeros del programa en Oceanografía con quienes compartí gratos momentos. Además, a toda la colonia Colombiana en Concepción, y en especial a Ana María Gómez, Jaime Salazar y Mónica Valenzuela que siempre nos acogieron con cariño en su casa al son de una rumba.

Sin embargo, el mayor y más importante agradecimiento es para René Mauricio ya que gracias a él y a su constante apoyo en el ámbito personal, familiar y profesional, pude permanecer en Chile, culminar mis estudios de Doctorado y ver crecer a Daniel Mauricio en su compañía. También, a mi gran familia en Colombia tanto la Sánchez Vega, como la Castro González, por su incesante estímulo, apoyo y aliento desde la distancia.

Finalmente quiero agradecer al Instituto Alemán de Intercambio Académico DAAD el generoso patrocinio para el desarrollo de mi Postgrado en Oceanografía en la Universidad de Concepción y mi permanencia en Chile durante Marzo 2000 - Febrero 2004 y Junio -Agosto 2004, así como por apoyar y financiar mi estadía de tres meses en el Instituto Max-Planck de Microbiología en Marburg, Alemania, entre Julio-Septiembre 2003. También agradezco a la Escuela de Graduados de la Universidad de Concepción y al FONDAP-COPAS su patrocinio durante los meses de Marzo-Mayo y Septiembre-Diciembre 2004, que permitieron la culminación de esta investigación.

Resumen

Importancia de la comunidad desnitrificante en el reciclamiento del N_2O en la zona de mínimo oxígeno frente al norte de Chile

Maribeb Castro González.

Programa de Doctorado en Oceanografía

Universidad de Concepción, 2004

Dr. Osvaldo Ulloa, Director de Tesis

Dra. Laura Farías, Profesor Guía

La desnitrificación es uno de los procesos microbiológicos que participan más activamente del reciclamiento de N_2O en las zonas de mínimo oxígeno (ZMO) subyacentes a áreas de surgencia, como la encontrada frente a las costas de Chile. Las ZMO tienen gran significancia global para el presupuesto radiativo del planeta, dado que pueden contribuir hasta en un 70% a la producción de N_2O oceánico. Esta tesis tuvo como objetivo establecer la importancia de la desnitrificación en el reciclaje del N_2O , así como la influencia de factores ambientales sobre dicho reciclaje y sobre la composición de las comunidades desnitrificantes en la ZMO frente a Iquique (20°S) y Antofagasta (23°S). Para esto, se determinaron las tasas de producción (N_2O_{pd}) y consumo (N_2O_{cd}) de N_2O a través de la desnitrificación, en muestras de agua tomadas en la oxiclina superior (entre 40 y 90 m de profundidad) y en el núcleo de la ZMO, NZMO (a 100 y 200 m) bajo diferentes condiciones de O_2 (*in situ*, anoxia [0 μM] e hipoxia [$\sim 22.3 \mu M$]) y disponibilidad de dadores (carbono orgánico disuelto, COD) y aceptores de electrones (NO_3^- , NO_2^- y N_2O). Dichas tasas fueron estimadas a partir de experimentos que involucraron el uso combinado de inhibidores de la desnitrificación (acetileno), de la nitrificación (alitiourea ó anoxia) y de la síntesis proteica (cloranfenicol). La composición de la comunidad desnitrificante, fue analizada a través del gen funcional de la reductasa de nitrito-*cd₁* (*nirS*), que cataliza la reducción de NO_2^- a NO , un paso clave en la desnitrificación, usando técnicas de reacción en cadena de la polimerasa (PCR), polimorfismo de los fragmentos largos de restricción

terminal (PFLRT) y clonamiento del ADN bacterial. Los resultados mostraron que la desnitrificación parcial del N_2O a N_2 (o $N_2O_{pd} - N_2O_{cd} > 0$), tuvo lugar en la oxiclina (40 m, $48.5 \mu M O_2$) a tasas de $0.47 \mu M d^{-1}$, contribuyendo en parte a la formación del máximo de N_2O subsuperficial usualmente observado en el área y cuyo origen se ha atribuido principalmente a la nitrificación. La desnitrificación total del N_2O a N_2 (o $N_2O_{pd} - N_2O_{cd} \leq 0$) tuvo lugar en la base de la oxiclina, BO (80 m, $14.2 \mu M O_2$) y en el NZMO (100-200m $4.4-6.9 \mu M O_2$) a tasas de hasta $3.4 \mu M d^{-1}$, manteniendo los bajos niveles de N_2O observados a esas profundidades. La anoxia disminuyó en un 75% la tasa de N_2O_{pd} tanto en la BO como en el NZMO frente a Iquique. Contrariamente, incrementos en los niveles de O_2 a $\sim 22.3 \mu M$, doblaron la tasa de N_2O_{pd} en dicha estación. La adición de aceptores y dadores de electrones limitó levemente, la tasa de reciclamiento neto del N_2O ($N_2O_{pd} + N_2O_{cd}$) en la BO (a través del NO_2^- y COD) y en el NZMO (a través del COD, N_2O y NO_3^-). Los resultados nos permiten concluir que, el reciclamiento de N_2O es regulado principalmente por el O_2 y, en menor grado, por la disponibilidad de sustratos; siendo la reducción de NO_2^- , el paso más sensible a las fluctuaciones de dichos factores en esta área.

Los niveles de O_2 , NO_2^- , NO_3^- y N_2O determinaron la composición de la comunidad desnitrificante en el área de estudio. La presencia de genes-*nirS* comunes a la BO y el NZMO, sugirió la participación de los mismos grupos desnitrificantes en la producción y consumo de N_2O . El análisis filogenético arrojó nuevas secuencias de organismos desnitrificantes en la ZMO chilena, indicando que la desnitrificación marina es llevada a cabo por una comunidad bacteriana más diversificada que la considerada previamente, y que condiciones ambientales similares entre la ZMO del Pacífico Sur oriental y Mar de Arabia permitieron el desarrollo de desnitrificadores con genotipos *nirS* semejantes a pesar de las distancias geográficas.

Palabras claves: Reciclamiento del N_2O , desnitrificación, zonas de mínimo oxígeno, disponibilidad de sustratos, genes de nitrito reductasa (*nirS*).

Abstract

Importance of denitrifying community on the N₂O cycling at the oxygen minimum zone off northern Chile

Maribeb Castro González
Oceanography Ph.D. Program
University of Concepción, 2004

Dr. Osvaldo Ulloa, Thesis director

Dra. Laura Farías, Thesis advisor

Denitrification is one of the microbiological processes that participate more actively on the N₂O cycling in oxygen minimum zones (OMZ) underlying upwelling areas, like to these found off Chilean coast. OMZ have global significance for the planet's radiative budget because they can contribute up to 70% of the oceanic N₂O production. The goals of this thesis were to determine the importance of denitrification on the N₂O cycling, and the role of environmental factors on such cycling and on the denitrifying communities composition at the OMZ off Iquique (20°S) and Antofagasta (23°S). N₂O production (N₂O_{pd}) and consumption (N₂O_{cd}) rates through denitrification were measured in seawater samples taken from the upper oxycline (between 40 - 90 m depth) and the OMZ core (to 100 and 200 m depth) under different conditions of O₂ (*in situ*, anoxia [0μM] e hypoxia [~22.3 μM]) and electron's acceptors (NO₃⁻, NO₂⁻ and N₂O) and donors (organic carbon) availability. Such rates were estimated from assays that combined the use of denitrification (acetylene), nitrification (allylthiourea) and protein synthesis (cloramphenicol) inhibitors. Denitrifying community composition was analyzed through of cytochrome *cd₁*-nitrite reductase functional gene, which catalyzes the reduction of nitrite to nitric oxide, a key step in denitrification. The terminal restriction fragment length polymorphism analysis(T-RFLP) and cloning of PCR amplified *nirS* genes from bacterial DNA extracts obtained from seawater samples of study area were used.

The results showed that at the mid-oxyclyne (40 m depth, 48.5 $\mu\text{M O}_2$), partial denitrification of N_2O to N_2 (or $\text{N}_2\text{Opd} - \text{N}_2\text{Ocd} > 0$), took place to rates of 0.47 $\mu\text{M d}^{-1}$, contributing in part, to the formation of subsurface N_2O maximum observed usually in the area, and whose origin has been attributed principally to nitrification. Whereas, at the oxyclyne base (80 m depth, 14.2 $\mu\text{M O}_2$) and the OMZ core (100-200 m depth, 4.4 - 6.9 $\mu\text{M O}_2$), total denitrification rates of N_2O to N_2 (or $\text{N}_2\text{Opd} - \text{N}_2\text{Ocd} \leq 0$), took place to rates up to 3.4 $\mu\text{M d}^{-1}$, maintaining the low N_2O levels observed in this layer. A decrease of 75% in the fraction of N_2Opd in the mid-oxyclyne and in the OMZ core off Iquique was produced under anoxia. Conversely, increasing O_2 levels to $\sim 22.3 \mu\text{M O}_2$ doubled the N_2Opd into the OMZ core in such station. The net N_2O recycling rates ($\text{N}_2\text{Opd} + \text{N}_2\text{Ocd}$) were slightly limited with the electron's acceptor and donors addition at the BO (through NO_2^- and CO) and the OMZ core (through CO, N_2O and NO_3^-). These results indicated that the N_2O cycling is principally regulated by the O_2 ; and in minor degree by substrates availability, where NO_2^- reduction to appear, is the most sensitive denitrification's step to fluctuations of such factors in this area.

The O_2 , NO_2^- and NO_3^- levels determined the denitrifying community composition in the study area. *NirS* genes common to the oxyclyne base and the OMZ core, suggested the participation of the same denitrifiers groups in the N_2O production and consumption. The phylogenetic analysis indicated that novel sequences of denitrifiers in the Chilean OMZ are present, suggesting that marine denitrification is carried out by a microbial community more diverse than it was previously believed, and that similar environmental conditions between the OMZ's of eastern South Pacific and Arabian sea triggering the development of denitrifiers with related *nirS* genotypes despite large geographic distances.

Key words: N_2O cycling, denitrification, oxygen minimum zones, substrates availability, nitrite reductase genes (*nirS*).

Influence of O₂ and substrate availability on N₂O cycling by denitrification along the upper oxycline off northern Chile

Maribeb Castro-González*, Laura Farías

Departamento de Oceanografía y Centro de investigación oceanográfica (COPAS),
Universidad de Concepción, Chile, Casilla 160-C, Concepción, Chile

*corresponding author: e-mail maribcas@udec.cl; telephone (56-41) 203742; fax (56-41) 239900

ABSTRACT

Denitrification is one of the most active microbiological processes participating in N₂O cycling in the ocean's oxygen minimum zones (OMZ). In order to assess the importance of denitrification in N₂O cycling and to determine the factors regulating N₂O cycling along the upper oxycline off northern Chile, rates of N₂O production and consumption by denitrification were measured with the acetylene blockage method, either under *in situ* O₂ conditions and anoxia, or after the addition of NO₂⁻ or NO₃⁻ plus electron donors. Partial denitrification to N₂O took place within the middle oxycline waters (~48.5 μM O₂), whereas complete denitrification (total N₂O reduction, up to 1 μM d⁻¹) was observed at the base of the oxycline (~14.2 μM O₂ and anoxia). NO₂⁻ and not NO₃⁻ availability slightly limited N₂O cycling at the oxycline base. At this depth, active NO₂⁻ uptake by several microorganisms seems to be responsible for its very low levels, unlike at the OMZ core, where a high NO₂⁻ accumulation is typically observed. Our results suggest that O₂ fluctuations along the upper oxycline, more than substrate availability, could greatly impact the proportion of N₂O/N₂ that is cycled through denitrification and could be effluxed into the atmosphere.

KEY WORDS: Nitrous oxide cycling, oxygen minimum zones, denitrification, O₂.

INTRODUCTION

Oxygen minimum zones (OMZ's) contribute 25–70% of the global N_2O coming from the ocean (Nevison et al. 2004) which is considered to be one of the principal natural sources of N_2O . The N_2O is a greenhouse gas with important climatological effects on both the troposphere and the stratosphere (Crutzen 1970). N_2O cycling in the OMZ occurs through nitrification and denitrification processes (Codispoti & Christensen 1985). Although N_2O is consumed in the core of suboxic zones, denitrifiers might be net producers at the boundaries, since slight increases in O_2 concentrations favor higher N_2O yields (Firestone & Tiedje 1979, Betlach & Tiedje 1981, Bonin et al. 1989, Wrage et al. 2001). Each reduction step in the denitrification process is also known to be carried out by several bacteria and independent enzymes, which are differentially sensitive to O_2 (Payne et al. 1971). Bonin & Gilewicz (1991) and Betlach & Tiedje (1981) have used cultures of marine denitrifiers to show that O_2 concentrations between 8 and 60 μM inhibit N_2O reduction more than NO_3^- or NO_2^- reduction, since the N_2O reductase is strongly, and in some cases, irreversibly inhibited. Although the composition of gaseous and ionic denitrification products depends on O_2 levels, nitrogen oxide acceptors, and organic carbon availability (Körner & Zumft 1989, Michotey & Bonin 1997), the way that these environmental factors contribute to N_2O cycling through denitrification is not yet clear.

In the eastern South Pacific's OMZ, particularly off northern Chile, a subsurface N_2O maximum (up to 0.4 μM) has been recorded (Castro-González & Farías, in press, Farías et al. unpubl. data) in association with the pycnocline, the nutricline (NO_3^-), and a marked oxycline (20-70 m) in which dissolved O_2 declined from 250 to 20 μM . The N_2O maximum varies with time but these high, sharp and quasi-permanent peak constitute a large N_2O source for the atmospheric pool. On the contrary, at the base of the upper oxycline (with $<15 \mu M O_2$) and in the core of the OMZ, N_2O consumption or depletion of $<0.01 \mu M$ has been observed; this is believed to result from the denitrification process (Elkins et al. 1978, Castro-González & Farías, in press). Likewise, a secondary fluorescence peak (SFP) dominated by photosynthetic cyanobacteria and abundant unidentified bacteria (Ulloa et al. 2003), as well as genetically diverse uncultured

denitrifiers (Castro-González et al. unpubl. data) and nitrifiers (Molina et al. unpubl. data) has been observed at the oxycline's base, which altogether could be participating actively in C and N cycling at this depth. All these biogeochemical features enhance the area's importance in the global N₂O budget and raise questions about the role of the denitrifying community in N₂O production/consumption. The goals of this study were to analyze the role of denitrification in N₂O cycling along the upper oxycline and to study the effects of decreasing O₂ levels and substrate availability on this process. These results are compared with previously collected N₂O cycling data from the same area of the OMZ core.

METHODS

Study area and sampling

This study was carried out during the December 2002 Dormido cruise (R/V Purihaalar) off Antofagasta (23°S) and during the March 2003 Chups Cruise (R/V Abate Molina) off Iquique (20°S); both study sites are well-known centers of persistent coastal upwelling off northern Chile. Two stations were located within 30 km of the coast (CHBGQ and ABGQ) and a third was 200 km offshore (CH120). The location and biogeochemical (BGC) characteristics of this study area were described previously by Castro-González & Farías (in press); however, relevant BGC data for each studied station are shown in Table 1. Seawater samples were collected from the upper oxycline with 5 l Niskin bottles attached to a rosette sampler, and then dispensed – avoiding oxygenation – into 1 l bottles.

Determination of N₂O cycling rates through denitrification (N₂O_d)

Experimental design: A combination of 15% (v/v) acetylene (Firestone & Tiedje 1979), 250 mM Allylthiourea, ATU (Ginestet et al. 1998), and anoxia were used for these assays. The acetylene, an inhibitor of N₂O reductase, and ammonium monooxygenase (AMO) avoided N₂O production by nitrification and its reduction by denitrification. Therefore, the rate of N₂O produced by denitrification (N₂O_{pd}) in all the experiments corresponded to the rate of N₂O accumulated after inhibition with acetylene. ATU and anoxia both ammonium oxidation inhibitors, were used to evaluate net N₂O cycling of denitrification (net N₂O_d),

-which equaled production minus consumption by denitrifiers-, under *in situ* O₂ levels and anoxia, respectively. The rate of N₂O consumed by denitrification (N₂O_{cd}) was estimated from the rates measured in experiments with acetylene (N₂O_{pd}) minus those quantified in the ATU experiment (under *in situ* O₂) or in the experiment without acetylene (under anoxia).

For the “potential experiments”, DOC (sodium acetate, 1mM and glucose, 1mM), NaNO₂ (5μM) or KNO₃ (1mM), and cloramphenicol (0.1g l⁻¹) were added. Although the control experiments were denominated “natural”, cloramphenicol was added to prevent *de novo* synthesis in both experiments, assuring that the activity observed reflected the *in situ* metabolic rate with the enzymes present at the time of sampling (Murray & Knowles 1999). N₂O_{pd}, net N₂O_d, and N₂O_{cd} rates were measured under *in situ* O₂ levels and anoxia in waters from the middle (40m) and the base (80 m depth) of the oxycline at CHBGQ. Potential N₂O_{pd}, net N₂O_d, and N₂O_{cd} rates, on the other hand, were quantified in waters from the base of oxycline at CH120 (90 m depth) and ABGQ (50 m depth), where, respectively, NO₂⁻ and NO₃⁻ levels were very low.

Sample manipulation: The seawater samples (11) were maintained under a N₂ atmosphere to avoid altering the O₂ content of the “*in situ*” experiment set. Bubbling with N₂ (20 minutes) was used to maintain O₂ levels at ~0 μM within the anoxic experiment set; these were then left to re-equilibrate for another 30 minutes. Thereafter, all the samples were distributed in 50 ml bottles, which were sealed with a rubber stopper and metallic caps. After this, acetylene or N₂ (in the controls) was slowly injected into the flasks, which were placed in the dark at the *in situ* temperature (11°C). Three bottles were collected for analysis at 0, 6, and 12 h. After incubation, N₂ was used to displace 5 ml of water from each flask; these subsamples were filtered and frozen for NO₂⁻ and NO₃⁻ analyses. The rest of the sample (40 ml) was treated with a HgCl₂ solution and N₂O was measured from the headspace at the laboratory. For the “potential experiments”, substrates were added to 1 l bottles before dispensing into 50 ml bottles for incubation.

Chemical and statistical analysis: N₂O analysis was achieved by Helium equilibration in the vial (McAulliffe 1971), followed by N₂O quantification with a gas chromatograph Varian 3380 using an electron capture detector maintained at 350°C (Castro-González &

Fariás, in press). The dissolved N_2O concentration was calculated in accordance with Weiss and Price (1980) and the dissolved NO_3^- and NO_2^- was measured by standard colorimetric methods following the procedure described by Grasshoff & Koroleff (1983). Production/consumption rates of N_2O , NO_3^- , and NO_2^- were calculated by a lineal regression analysis of the concentration change measured in three replicates at each sampling time (0, 6, and 12 h). The rates ($\mu\text{M d}^{-1}$) were calculated from the slope and the rate uncertainties (\pm) were calculated from the errors in the linear regression estimation. Positive values represented N_2O or nutrient accumulation through time, whereas negative values indicated their consumption. Student's *t*-test was used to evaluate the significant differences between the slopes.

RESULTS AND DISCUSSION

Effect of O_2 level changes on N_2O d cycling along the upper oxycline

Table 2 shows the results of experiments carried out at 40 (mid-oxycline) and 80 m (oxycline base) depth under *in situ* O_2 levels (48.5 μM) and anoxia at CHBGQ. Under *in situ* O_2 levels, N_2O was produced by denitrification to a rate of 0.6 $\mu\text{M d}^{-1}$; only 21.5% of the N_2O d was reduced by denitrification. When O_2 levels became anoxic, the same community increased N_2O production by denitrification (N_2O d) fivefold ($t_{\alpha(2)}: 0.05$), reaching rates up to 2.9 $\mu\text{M d}^{-1}$. In this case, 77% of the N_2O should have been reduced to N_2 . Although similar net N_2O d rates were observed for both conditions, the ratio between N_2O production/consumption decreased from a value near 5 (*in situ* O_2) to a value near 1.3 (anoxia), (Fig. 1).

The experiments carried out at 80 m depth under *in situ* O_2 conditions (14.2 μM) did not show significant differences in the N_2O d rates with respect to those observed at 40 m depth. Nonetheless, 100% of the N_2O d was reduced by denitrification, which led to an 89% decrease in the N_2O production/consumption ratio at this depth (Fig. 1). When this community was subject to anoxia, both N_2O d and N_2O c decreased fourfold ($t_{\alpha(2)}: 0.05$) with respect to those observed at *in situ* O_2 levels. Although this allowed less negative net

N₂O_d rates, the N₂O production/consumption ratio (~0.5) was similar to that observed under *in situ* O₂ at this depth (Fig. 1).

The data show O₂ levels differentially regulating N₂O cycling through denitrification in the upper oxycline. In this sense, laboratory studies have shown O₂ to be the principal regulator of denitrifying reductases (Körner & Zumft 1989), as the N₂O reductase is the most sensitive to O₂ (Betlach & Tiedje 1981). Bonin & Gilewicz (1991) found that, in pure cultures changes in the O₂ levels above ca. 16 μM can inhibit N₂O reductase, producing incomplete denitrification. Later, Bonin et al. (2002) found partial denitrification to be the main source of N₂O in oxygenated estuarine waters. In suboxic areas, only have been reported N₂O production through incomplete denitrification to ca. 22 μM O₂ in the Baltic Sea (Rönner & Sörensson 1985) and the Indian Shelf (Naqvi et al. 2000). In our case, N₂O production through partial denitrification took place at O₂ levels of ca. 48.5 μM in the upper oxycline of the Chilean OMZ. This result indicate that denitrifiers in the OMZ can produce higher N₂O/N₂ ratios when the O₂ levels increase, like to reported with pure cultures (Bonin et al. 1989, Wrage et al. 2001). However, the O₂ inhibition of N₂O reductase in this case was reversible, and complete denitrification took place when O₂ levels decreased to anoxia. Thus, a quasi balance is maintained between the production and consumption of N₂O under anoxia, with only a small surplus (30%) at this depth.

The high (up to 314 nM) and quasi permanent, although very time-variable, N₂O peak observed in the oxycline at the study area (Farías et al. unpubl. data, Castro-González & Farías, in press) can be explained by partial denitrification, but doubtless also by nitrification at the same depth. In fact, active nitrification (rates up to 0.62 μM d⁻¹) has been measured in the same area (Molina et al. unpubl. data) and in the Peruvian OMZ (Ward et al. 1989). Likewise, geochemical approaches (Farías et al. unpubl. data, Nevison et al. 2003), theoretical models (Codispoti et al. 1989), and isotopic measurements (Kim & Craig 1990) herald nitrification as the principal source of N₂O in low-oxygen regions. These results support the idea of a tight coupling between nitrifying and denitrifying communities participating in N₂O production to low oxygen levels (Naqvi & Noronha 1991, Naqvi et al. 1998).

In contrast with net N_2O production observed at mid-oxycline, the results also suggest that the principal fate of N_2O at the oxycline base could be its reduction to N_2 , as was observed in the OMZ core during the same cruise (Castro-González & Farías in press). This partially explains the N_2O depletion usually observed between 100-400 m depth in the studied area (Castro-González & Farías in press) and support the idea that N_2O is used as electron acceptor in low oxygen waters (Codispoti & Christensen 1985, Elkins et al. 1978). In fact, the denitrification rates measured at the oxycline base and at the OMZ core were similar between them ($0.09\text{-}1.0 \mu\text{M d}^{-1}$), and to those reported for other suboxic areas: the Arabian Sea, $0.11 \mu\text{M d}^{-1}$ (Naqvi et al. 1993), the Indian Shelf, $0.3 \mu\text{M d}^{-1}$ (Naqvi et al. 2000), and the Baltic Sea, $0.14 \mu\text{M d}^{-1}$ (Brettar & Rheinheimer 1992).

Effect of O_2 level changes on NO_3^- reduction along the upper oxycline

The data shown in Table 2 indicate that the *in situ* O_2 levels of the upper oxycline were responsible for NO_3^- reduction rates up to $29.5 \mu\text{M d}^{-1}$, resulting in higher NO_2^- accumulation rates at 80 m depth ($0.8 \mu\text{M d}^{-1}$) than at 40 m depth. On the contrary, although the NO_3^- reduction rates under anoxia were not significantly different from those observed under *in situ* O_2 levels, no NO_2^- accumulation was produced. Likewise, the results showed that, under anoxia, NO_2^- reduction to rates of $0.7 \mu\text{M d}^{-1}$ favored N_2O pd at 40 m depth, but significantly ($t_{\alpha(2)}: 0.05$) higher rates of NO_2^- reduction (up to $5.3 \mu\text{M d}^{-1}$) did not lead to greater N_2O pd at 80 m depth. Both these results suggest that the process of NO_2^- reduction in the upper oxycline is very sensitive to O_2 fluctuations, as previously was observed in the OMZ core in the same area (Castro-González & Farías in press) and as has been reported within experiments with pure cultures (Firestone & Tiedje 1979, Körner & Zumft 1989). Likewise, the strong nitrate reducing activity could be partially responsible for the presence of a subsurface NO_2^- peak (up to $10 \mu\text{M}$) between 70-400 m depth in the area (Castro-González & Farías in press). Additionally, rapid NO_2^- cycling would explain the low rates observed in our experiments despite high NO_3^- reduction rates. Similarly, additional assimilative or dissimilative microbial pathways that use NO_3^- or NO_2^- could also be in place at the base of upper oxycline, maintaining low NO_2^- levels, unlike the high NO_2^- accumulation observed in the OMZ core. For example, these pathways can be used as

electron acceptors under anaerobic conditions for nitrifier denitrification (Wrage et al. 2001) or nitrate ammonification [also reported in Baltic (Samuelsson & Rönner 1982, Rönner & Sörensson 1985) and Mediterranean Sea (Michotey & Bonin 1997) waters] as well as for anammox reaction [only reported for anoxic ecosystems such as the Black Sea (Kuypers et al. 2003) and Costa Rica's Golfo Dulce (Dalsgaard et al. 2003)]. At any rate, we must take into account that the differential response among communities in the upper oxycline can also depend on the bacteria's physiological status as well as its composition (Firestone & Tiedje 1979). In fact, the genetic diversity of some denitrifiers has recently been found to change in relationship to the chemical gradient in the Chilean OMZ (Castro-González et al. unpubl. data).

Effects of substrate addition on N₂O_d cycling along the upper oxycline

Effect of NO₂⁻ plus DOC addition: The results of these experiments, done under anoxia at the base of oxycline at CH120, are shown in Table 3. These data show that the N₂O_{pd} and N₂O_{cd} rate increased threefold ($t_{\alpha(2)}: 0.05$) with the addition of NO₂⁻ and DOC. Although significantly ($t_{\alpha(2)}: 0.2$) higher net N₂O_d rates were quantified with substrate addition, the N₂O production/consumption ratio only varied by 20% between natural (controls) versus potential assays (Fig. 2). However, a N₂O surplus of ~30% was maintained at the lower oxycline with respect to that observed in the OMZ core during the same cruise (Castro-González & Farías in press), where 100% of the N₂O was reduced within potential experiments (with NO₃⁻). This data support in part the major N₂O consumption in the OMZ core than in the base of oxycline observed into the study area (Fig. 2). These results hint at a differential limitation between NO₃⁻, NO₂⁻, or N₂O reducing communities along the water column in this oceanic station due by electron donors and acceptors. This situation was also observed in suboxic areas where the occurrence, rate, and composition of denitrification's gaseous products depended on substrate availability (Brettar & Rheinheimer 1992, Naqvi et al. 2000, Bonin et al. 2002). In such cases have been reported that the NO₃⁻ or COD can differentially limit the denitrification at distinct areas of the Baltic sea (Rönner & Sörensson 1985) and that the COD not the NO₃⁻ can either, to regulate the abundance of denitrifiers producing N₂O in the column water (Brettar & Rheinheimer 1992) or the nitrogen transformations in the hipoxic areas (Lipschultz et al. 1990). However, our results

indicate that the NO_2^- as electrons acceptor also limit the N_2O cycling through denitrification in this OMZ, at the base of oxycline (offshore station) specifically. Perhaps active NO_2^- uptake by cyanobacteria (Ulloa O. 2003), denitrifiers (Castro-González et al. unpubl. data), and nitrifiers (Molina et al. unpubl. data), identified recently through molecular approaches, could be responsible for maintaining the very low NO_2^- levels observed at this depth. Likewise, it is possible that the energetically more favorable N_2O production through reduction of NO_2^- than NO_3^- as electrons acceptor, permit the growth of specific bacteria reducing NO_2^- to N_2O as final product to this depth, like to observed in water-sediment interface at estuarine areas (Dong et al. 2002).

The results obtained at CH120's oxycline base, located on the edge of the coastal denitrifying area (Codispoti & Packard 1980), indicated that denitrifiers inhabiting this place can produce more N_2O pd ($t_{\alpha(2)}$: 0.2) and maintain a greater net N_2O pd rate ($t_{\alpha(2)}$: 0.05) than those at the coastal station's oxycline base, even under anoxia (Table 2). Differences in the flux of organic matter from the surface or from the coast as well as differences in the observed coast-ocean NO_3^- and NO_2^- availability (Castro-González & Farías in press) may lead to changes in the presence and abundance of anaerobic microenvironments within macro-particles as well as the activity and composition of diverse microbial communities, including denitrifiers. Recent molecular studies have shown differences in the genetic composition of denitrifiers in both places (Castro-González et al. unpubl. data). Likewise, on board analyses showed that, in the oceanic station alone, a SFP indicative of abundant cyanobacteria (Table 1) was observed, possibly leading differential ocean-coast N and C cycling as well.

Effect of NO_3^- plus DOC addition: The results of these experiments, developed under *in situ* O_2 levels at the base of oxycline (ABGQ) are shown in Table 4. The data, contrary to expectations, showed high N_2O consumption rates (between 1.05 and 2.11 $\mu\text{M d}^{-1}$) in all experiments (even with acetylene), which did not allow us to analyze the effect of NO_3^- plus additional DOC on N_2O d cycling. However, the results in Table 4 indicated that, under *in situ* O_2 levels, the active NO_3^- reduction (up to 26 $\mu\text{M d}^{-1}$) within acetylene experiments led to NO_2^- accumulation rates of up to 0.5 $\mu\text{M d}^{-1}$. Furthermore, the results suggest that substrate addition may slightly activate NO_3^- reducers (to rates of 10.8 $\mu\text{M d}^{-1}$), overcoming

the possible NO_2^- oxidizing process that allows NO_3^- accumulation (up to $8.9 \mu\text{M d}^{-1}$) in natural conditions. In this sense, potential nitrification rates of $1.34 \mu\text{M d}^{-1}$ have been measured at ABGQ (Molina et al. unpubl. data), suggesting that this process could also participate in N_2O cycling in this area.

The unexpected results, however, raise the question of whether N_2O can be actively taken up by other, non-denitrifying communities, which would thereby also participate in the area's N_2O cycling. In spite of reports of N_2O reduction to N_2 or NH_4^+ through the nitrogenase present in some nitrogen fixers (Coyne & Focht 1987) and cyanobacterium as *Azotobacter sp.* (Yamazaki et al. 1987), it is not yet known if N_2O fixation can take place in the ocean (where the $\text{N}_2/\text{N}_2\text{O}$ ratio is very high) as an alternative metabolic or respiratory pathway, or if the cyanobacteria present in the OMZ conserve the genetic and enzymatic potential for N_2 or N_2O fixation. Therefore, this is alone speculation, requiring many more studies in order to answer these questions.

The potential problems of the acetylene technique, which could affect the assays, cannot be discarded. Although problems with N_2O reductase inhibition are possible to NO_3^- levels $<10 \mu\text{M}$ (Slater & Capone 1989), N_2O consumption rates remained high even after NO_3^- addition (potential assays). Moreover, metabolism by unknown communities using acetylene as their sole carbon and energy source (Klemmedtsson & Hansson 1990) would alleviate N_2O reductase inhibition and stimulate NO_3^- and N_2O reduction (as seen only in the acetylene experiments, Table 4). Acetylene reduction through nitrogenase (Flett et al. 1976) in the cyanobacteria present at this depth (see Table 1 as SFP) could be another additional factor contributing to decreased optimum inhibition levels.

N_2O cycling and temporal variability in the eastern South Pacific Ocean

The stronger variations observed in the N_2O production/consumption ratio and net N_2O cycling through denitrification change more in relationship with the O_2 level than with NO_2^- and DOC availability, suggesting that the fraction of N_2O pd in the upper oxycline susceptible to efflux to the atmosphere depends strongly on the temporal variability of such factors. Such observations are very important if we consider that, in this area, the upper oxycline is always associated with the thermocline (Morales et al. 1999), a layer subject to

continuous shoaling, driven both remotely and locally (equatorial waves and wind). For example, an elevated thermocline during active upwelling or the cold ENSO phase places low O₂ and high nutrient waters near the surface; whereas a depressed thermocline during upwelling relaxation and the warm ENSO phase push this water away (Codispoti et al. 1986, 1988, Ulloa et al. 2001). In addition, important seasonal and inter-annual inshore-offshore changes in the levels of primary production, bacterial secondary production, and the flux of organic matter reported previously (González et al. 1998, Ulloa et al. 2001, Troncoso et al. 2003) could determine the fate of NO₃⁻ and NO₂⁻ used in the upper oxycline and, accordingly, the magnitude of N lost to the atmosphere in the form of N₂O or N₂ from this area.

Our results indicate that N₂O cycling through denitrification along the upper oxycline off northern Chile is active and principally regulated by O₂ levels, which determine the partial or total N₂O reduction at different depths. Therefore, changes in the O₂ levels produced by seasonal (upwelling) or inter-annual (ENSO event) oceanographic processes could lead to differences in the ratio of N₂O cycled through denitrification. However, the importance of the biological interaction between microbial assemblages mustn't be overlooked, since we observed that the NO₂⁻ availability could become a potential factor limiting N₂O cycling in the water column. Our results show the importance of some environmental factors that must be taken into account for global estimations of N₂O flux, especially those from the oxygen minimum zones.

Acknowledgements. This research was financed by FONDECYT Grant #1030741 and vessel availability was procured by FONDAP-COPAS. The above article is partly based on the Ph.D. work of M.C.G., who was supported by a DAAD grant. We thank the captains and crews of the research vessels who facilitated our observations and sample collections as well as O. Ulloa and V. Molina for assisting with the critical review of this manuscript.

LITERATURE CITED

Betlach MR, Tiedje JM (1981) Kinetic explanation for accumulation of nitrite, nitric oxide, and nitrous oxide during denitrification. *Appl Environ Microbiol* 42(6):1074-1084.

Bonin P, Gilewicz M (1991) A direct demonstration of corespiration of oxygen and nitrogen oxides by *Pseudomonas nautica*: some spectral and kinetic properties of the respiratory components. FEMS Microbiol Lett 80:183-8.

Bonin P, Gilewicz M, Bertrand JC (1989) Effects of oxygen on each step of denitrification on *Pseudomonas nautica*. Can J Microbiol 35:1061-1064.

Bonin P, Tamburini C, Michotey V (2002) Determination of the bacterial processes which are sources of nitrous oxide production in marine samples. Water Res 36(3):722-732.

Brettar I, Rheinheimer G (1992) Influence of carbon availability on denitrification in the central Baltic Sea. Limnol Oceanogr 37(6):1146-1163.

Castro-González M, Farías L (2004) N₂O cycling at the core of the oxygen minimum zone off northern Chile. Mar Ecol Prog Ser 280:1-11.

Codispoti LA, Christensen JP (1985) Nitrification, denitrification and nitrous oxide cycling in the Eastern Tropical South Pacific Ocean. Mar Chem 16:277-300.

Codispoti LA, Packard TT (1980) Denitrification rates in the eastern tropical South Pacific. J Mar Res 38: 453-477.

Codispoti LA, Friederich GE, Packard TT, Glover HE, Kelly PJ, Spinrad RW, Barber RT, Elkins JW, Ward BB, Lipschultz F, Lostaunau N (1986) High nitrite levels off northern Peru: a signal of instability in the marine denitrification rate. Science 233:1200-1202.

Codispoti LA, Friederich GE, Packard TT (1988) Remotely driven thermocline oscillations and denitrification in the eastern South Pacific: the potential for high denitrification rates during weak coastal upwelling. The Sci Tot Environ 75:301-318.

Codispoti LA, Barber RT, Friederich GE (1989) Do nitrogen transformations in the poleward undercurrent off Peru and Chile have a globally significant influence? In: Neshyba SJ, Mooers ChNK, Smith RL, Barber RT (eds) Coastal and Estuarine Studies. Poleward flows along eastern ocean boundaries. Springer-Verlag, Berlin, p 281-310.

Coyne MS, Focht DD (1987) Nitrous oxide reduction in nodules: denitrification or N₂ fixation? *Appl Environ Microbiol* 53(5):1168-1170.

Crutzen PJ (1970) The influence of nitrogen oxides on the atmospheric ozone content. *J Royal Meteor Soc* 96:320-325.

Dalsgaard T, Canfield DE, Petersen J, Thamdrup B, Acuña-González J (2003) N₂ production by the anammox reaction in the anoxic water column of Golfo Dulce, Costa Rica. *Nature* 422:606-608.

Dong LF, Nedwell DB, Underwood GJC, Thornton DCO, Rusmana I (2002) Nitrous oxide formation in the Colne Estuary, England: the central role of nitrite. *Appl Environ Microbiol* 68(3):1240-1249.

Elkins JW, Wofsy SC, McElroy MB, Kolb CE, Kaplan WA (1978) Aquatic sources and sinks for nitrous oxide. *Nature* 275:602-606.

Firestone MK, Tiedje JM (1979) Temporal change in nitrous oxide and dinitrogen from denitrification following onset of anaerobiosis. *Appl Environ Microbiol* 38(4):673-679.

Flett RJ, Hamilton RD, Campbell ER (1976) Aquatic acetylene-reduction techniques: solutions to several problems. *Can J Microbiol* 22:43-51.

Ginestet P, Audic JM, Urbain V, Block JC (1998) Estimation of nitrifying bacterial activities by measuring oxygen uptake in the presence of the metabolic inhibitors allylthiourea and azide. *Appl Environ Microbiol* 64(6):2266-2268.

González HE, Daneri G, Figueroa D, Iriarte JL, Lefevre N, Pizarro G, Quiñonez R, Sobarzo M, Troncoso A (1998) Primary production and its fate in the pelagic food web and deep sea and ocean-atmosphere CO₂ exchange in the northern Humbolt Current (23°S): Possible effects of the 1997-1998 El Niño in Chile. *Rev Chil Hist Nat* 71:429-458.

Grasshoff K, Koroleff F (1983) Determination of nutrients. In: Grasshoff K, Ehrhardt M, Kremling K (eds) *Methods of Seawater Analysis*. Verlag Chemie, Weinheim, p 125-187.

Kim KR, Craig H (1990) Two-isotope characterization of N₂O in the Pacific Ocean and constraints on its origin in deep water. *Nature* 347:58-61.

Klemetsson L, Hansson G (1990) The use of acetylene for the quantification of N₂ and production from biological processes in soil. In: Revsbech P & Sørensen J (eds) *Denitrification in soil and sediment*. Plenum Press, New York, p 151-166.

Körner H, Zumft WG (1989) Expression of denitrification enzymes in response to the dissolved oxygen level and respiratory substrate in continuous culture of *Pseudomonas stutzeri*. *Appl Environ Microbiol* 55(7):1670-1676.

Kuypers MMM, Sliemers AO, Lavik G, Schmid M, Jørgensen BB, Kuenen JG, Damsté JSS, Strous M, Jetten MSM (2003) Anaerobic ammonium oxidation by anammox bacteria in the Black Sea. *Nature* 422:608-611.

Lipschultz F, Wofsy SC, Ward BB, Codispoti LA, Friedrich G, Elkins JW (1990) Bacterial transformations of inorganic nitrogen in the oxygen deficient waters of the Eastern Tropical South Pacific Ocean. *Deep-Sea Res* 37:1513-1541.

McAulliffe L (1971) GC determination of solutes by multiple phase equilibration. *Chem Technol* 1:46-51.

Michotey V, Bonin P (1997) Evidence for anaerobic bacterial processes in the water column: denitrification and dissimilatory nitrate ammonification in the northwestern Mediterranean Sea. *Mar Ecol Prog Ser* 160:47-56.

Morales CE, Hormázabal SE, Blanco JL (1999) Interannual variability in the mesoscale distribution of the depth of the upper boundary of the oxygen minimum layer off northern Chile (18-24°S): implications for the pelagic system and biogeochemical cycling. *J Mar Res* 57:909-932.

Murray RE, Knowles R (1999) Chloramphenicol inhibition of denitrifying enzyme activity in two agricultural soils. *Appl Environ Microbiol* 65(8):3487-3492.

Naqvi SWA, Noronha RJ (1991) Nitrous oxide in the Arabian Sea. *Deep-Sea Res Part A* 38:871-890.

Naqvi SWA, Kumar MD, Narvekar PV, De Sousa SN, George MD, D'silva C (1993) An intermediate layer associated with high microbial metabolic rates and denitrification in the Northwestern Indian Ocean. *J Geophys Res* 98:469-479.

Naqvi SWA, Yoshinari T, Jayakumar DA, Altabet MA, Narvekar PV, Devol AH, Brandes JA, Codispoti LA (1998) Budgetary and biogeochemical implications of N₂O isotope signatures in the Arabian Sea. *Nature* 394:462-464.

Naqvi SWA, Jayakumar DA, Narvekar PV, Naik H, Sarma VVSS, D'Souza W, Joseph S, George MD (2000) Increased marine production of N₂O due to intensifying anoxia on the Indian continental shelf. *Nature* 408:346-349.

Nevison CD, Butler JH, Elkins JW (2003) Global distribution of N₂O and the N₂O-AOU yield in the subsurface ocean. *Global Biogeochem Cycles* 17(4), 1119, doi:10.1029/2003GB002068.

Nevison CD, Lueker TJ, Weiss RF (2004) Quantifying the nitrous oxide source from coastal upwelling. *Global Biogeochem Cycles* 18, GB1018, doi: 10.1029/2003 GB002068

Payne WJ, Riley PS, Cox JrCP (1971) Separate nitrite, nitric oxide and nitrous oxide reducing fractions from *Pseudomonas perfectomarinus*. *J Bacteriol* 106:356-361.

Rönner U, Sörensson F (1985) Denitrification rates in the low-oxygen waters of the Stratified Baltic Proper. *Appl Environ Microbiol* 50(4): 801-806.

Samuelsson M-O, Rönner U (1982) Ammonium production by dissimilatory nitrate reducers isolated from Baltic Sea water, as indicated by ¹⁵N study. *Appl Environ Microbiol* 44(5):1241-1243.

Slater JM & Capone DG (1989) Nitrate requirement for acetylene inhibition of nitrous oxide reduction in marine sediments. *Microbial Ecol* 17:143-146.

Troncoso VA, Daneri G, Cuevas LA, Jacob B, Montero P (2003) Bacterial carbon flow in the Humbolt Current System off Chile. *Mar Ecol Prog Ser* 250:1-12.

Ulloa O (2003) Photosynthesis in the oxygen minimum zone of the eastern South Pacific. In: Abstracts of NATO Advanced Research Workshop, Past and present water column anoxia. Crimea, Ukraina, p. 103.

Ulloa O, Escribano R, Hormazabal S, Quiñones RA, González RR, Ramos M (2001) Evolution and biological effects of the 1997-98 El Niño in the upwelling ecosystem off northern Chile. *Geophys Res Lett* 28(8):1591-1594.

Ward BB, Glover HE, Lipschultz F (1989) Chemoautotrophic activity and nitrification in the oxygen minimum zone off Peru. *Deep Sea Res* 36:1031-1051.

Weiss RE, Price BA (1980) Nitrous oxide solubility in water and seawater. *Mar Chem* 8:347-359.

Wrage N, Velthof GL, Van Beusichem ML, Oenema O (2001) Role of nitrifier denitrification in the production of nitrous oxide. *Soil Biol Biochem* 33:1723-1732.

Yamazaki T, Yoshida N, Wada E, Matsuo S (1987) N₂O reduction by *Azotobacter vinelandii* with emphasis on kinetic nitrogen isotope effects. *Plant Cell Physiol* 28:263-271.



FIGURE LIST

Fig. 1. N_2O and O_2 vertical distribution and N_2O production/consumption ratio under *in situ* O_2 levels and anoxia conditions at CHBGQ Station.

Fig. 2. N_2O and O_2 vertical distribution and N_2O production/consumption ratio under unamended (natural) and amended (potential) experiments at CH120 Station.



Table 1. Location (latitude and longitude) and biogeochemical characteristics of seawater in the middle (m) and base (b) of the oxycline at the sampling stations. SFP: Secondary Fluorescence Peak, present (+), absent (-)

| Station | CHBGQ | | CH120 | ABGQ |
|-----------------------------------|------------------------|-----------------|------------------------|------------------------|
| Location | 20°19.0'S 70°36.9'W | | 20°16.1'S 72°17.2'W | 22°51.0'S 70°32.6'W |
| Depth (m) | 40 ^m | 80 ^b | 90 ^b | 50 ^b |
| O ₂ (μM) | 48.5 | 14.2 | 9.4 | 14.7 |
| N ₂ O (μM) | 0.26 | 0.22 | 0.06 | 0.09 |
| NO ₃ ⁻ (μM) | 17.8 | 8.9 | 11.3 | 5.8 |
| NO ₂ ⁻ (μM) | 1.5 | 4.8 | 0.2 | 0.4 |
| SFP | - | - | + | + |



Table 2. N₂O recycling rates (mean ± typical error) obtained under *in situ* O₂ levels and anoxia at CHBGQ. N₂Opd: N₂O production by denitrification; N₂Ocd: N₂O consumption by denitrification; Net N₂Od: net N₂O by denitrification. ATU: Allylthiourea.

| Depth (m) | O ₂ level | Treatment | Process | N ₂ O (μM d ⁻¹) | NO ₃ ⁻ (μM d ⁻¹) | NO ₂ ⁻ (μM d ⁻¹) |
|-----------|---------------------------|----------------|-----------------------|---|--|--|
| 40 m | <i>in situ</i> 48.5 μM | Control (+ATU) | Net N ₂ Od | 0.47 ± 0.27 (p < 0.20, r ² =0.4) | -20.6 ± 21.6 | 0.1 ± 0.1 |
| | | Acetylene | N ₂ Opd | 0.60 ± 0.24 (p < 0.13, r ² =0.6) | | |
| | | Estimated | N ₂ Ocd | -0.13 ± 0.03 | | |
| | Anoxic | Control | Net N ₂ Od | 0.67 ± 0.51 (p < 0.25, r ² =0.1) | -10.2 ± 26.9 | -0.7 ± 0.3 |
| | | Acetylene | N ₂ Opd | 2.90 ± 0.31 (p < 0.01, r ² =0.9) | | |
| | | Estimated | N ₂ Ocd | -2.23 ± 0.19 | | |
| 80 m | <i>in situ</i> 14.2 μM | Control (+ATU) | Net N ₂ Od | -0.65 ± 0.25 (p < 0.04, r ² =0.4) | -29.5 ± 17.6 | 0.8 ± 0.7 |
| | | Acetylene | N ₂ Opd | 0.71 ± 0.33 (p < 0.07, r ² =0.4) | | |
| | | Estimated | N ₂ Ocd | -1.36 ± 0.08 | | |
| | Anoxic | Control | Net N ₂ Od | -0.20 ± 0.12 (p < 0.15, r ² =0.2) | -18.5 ± 16.8 | -5.3 ± 5.0 |
| | | Acetylene | N ₂ Opd | 0.18 ± 0.09 (p < 0.10, r ² =0.3) | | |
| | | Estimated | N ₂ Ocd | -0.38 ± 0.03 | | |

Table 3. N₂O recycling rates (mean ± typical error) by denitrification in experiments amended with chloramphenicol, NO₂⁻, and DOC (potential activity) and its controls (natural activity) under anoxia at CH120. N₂O_{pd}: N₂O production by denitrification; N₂O_{cd}: N₂O consumption by denitrification; Net N₂O_d: net N₂O by denitrification; ND: not determined.

| Activity | Treatment | Process | N ₂ O (μM d ⁻¹) | P | R ² |
|-----------|-----------|-----------------------------------|--|------|----------------|
| Natural | Control | Net N ₂ O _d | 0.28 ± 0.18 | 0.20 | 0.3 |
| | Acetylene | N ₂ O _{pd} | 0.88 ± 0.41 | 0.15 | 0.5 |
| | Estimated | N ₂ O _{cd} | -0.60 ± 0.23 | ND | ND |
| Potential | Control | Net N ₂ O _d | 0.64 ± 0.27 | 0.07 | 0.5 |
| | Acetylene | N ₂ O _{pd} | 2.52 ± 1.67 | 0.20 | 0.2 |
| | Estimated | N ₂ O _{cd} | -1.88 ± 1.40 | ND | ND |



Table 4. N₂O, NO₃⁻, and NO₂⁻ reduction rates (mean ± typical error) in experiments amended with cloramphenicol, NO₃⁻, and DOC (potential activity) and its controls (natural activity) under *in situ* O₂ levels (14.7 μM) at ABGQ. ATU: Allylthiourea.

| Activity | Treatment | Process | N ₂ O | P | R ² | NO ₃ ⁻ | NO ₂ ⁻ |
|-----------|----------------|--------------------|------------------|------|----------------|------------------------------|------------------------------|
| Natural | Control(+ATU) | Net | -1.37 ± 1.12 | 0.27 | 0.1 | 8.9 ± 3.8 | -0.2 ± 0.3 |
| | | N ₂ Od | | | | | |
| | Acetylene | N ₂ Opd | -2.08 ± 0.28 | 0.00 | 0.9 | -24.6 ± 7.9 | 0.3 ± 0.1 |
| Potential | Control (+ATU) | Net | -1.05 ± 0.36 | 0.02 | 0.5 | -10.8 ± 9.4 | -0.3 ± 0.1 |
| | | N ₂ Od | | | | | |
| | Acetylene | N ₂ Opd | -2.11 ± 1.04 | 0.09 | 0.4 | -25.9 ± 7.6 | 0.5 ± 0.8 |



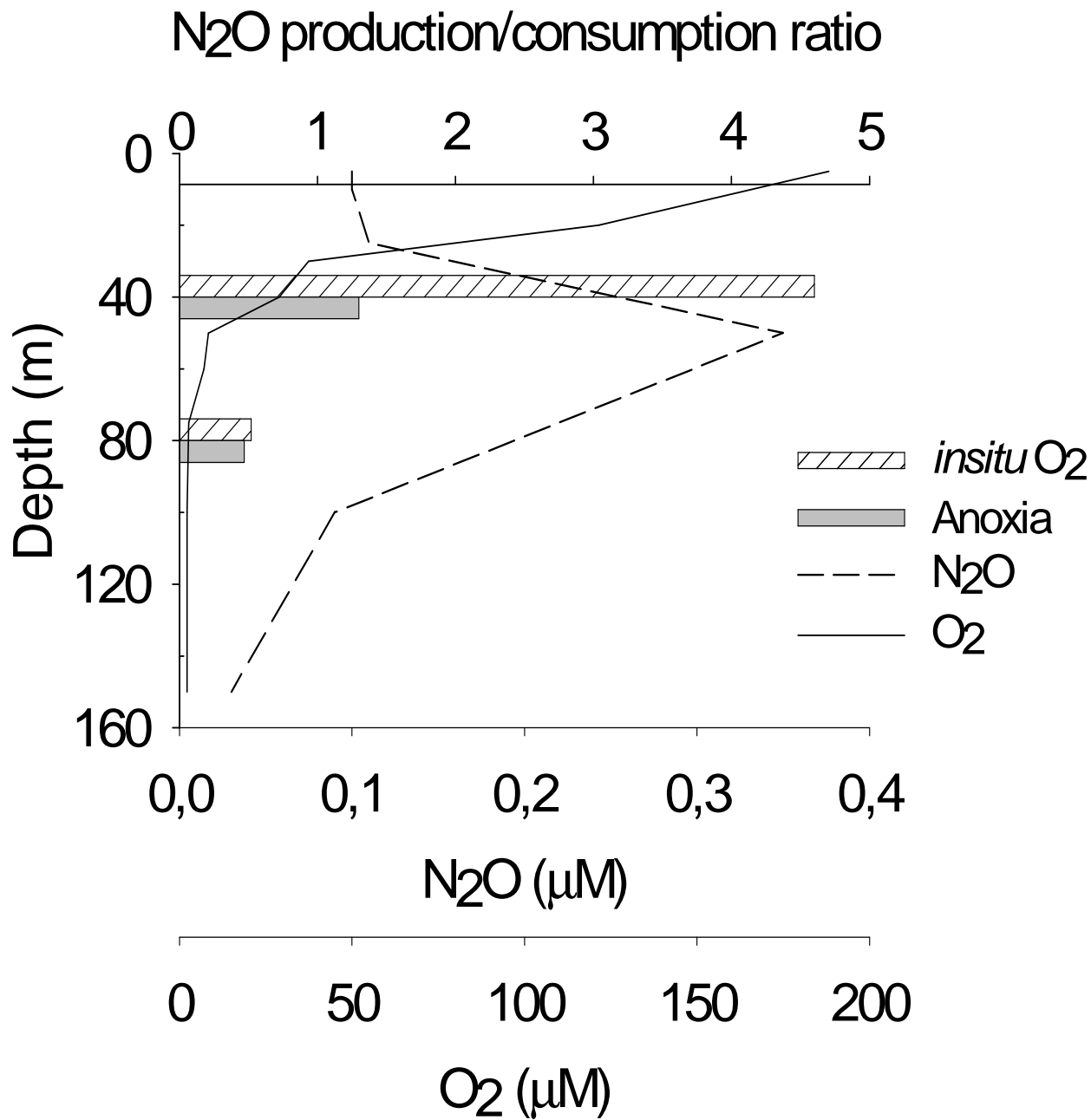


Figure 1.

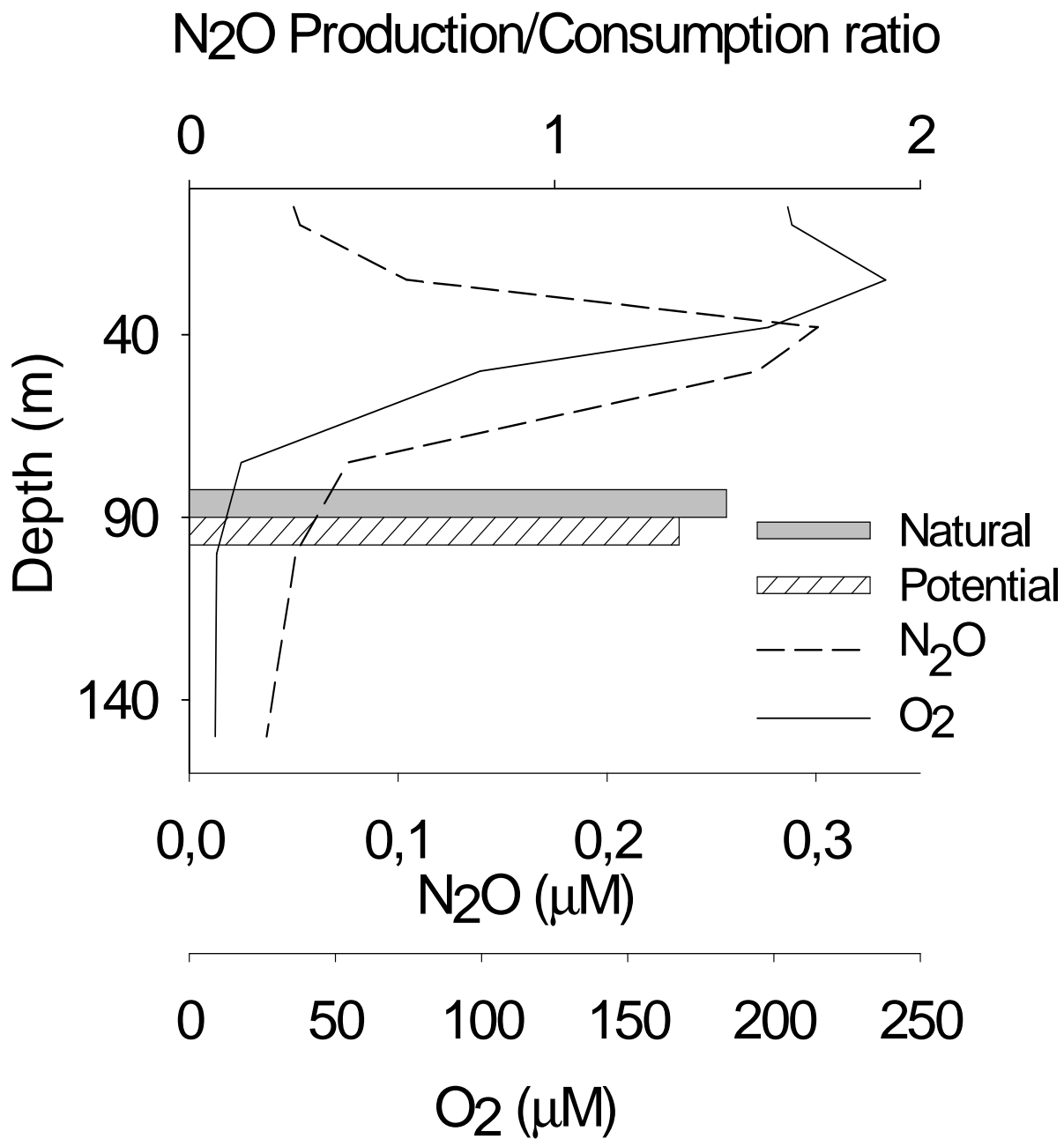


Figure 2.

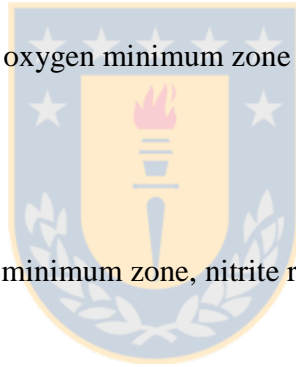
Communities of *nirS*-type denitrifiers in the water column of the oxygen minimum zone in the eastern South Pacific

Maribeb Castro-González¹, Gesche Braker^{2*}, Laura Farías¹, and Osvaldo Ulloa¹

¹Department of Oceanography and Center for Oceanographic Research COPAS, University of Concepción, PO 160-C, Concepción, Chile;

²Max Planck Institute for terrestrial Microbiology, Karl-von-Frisch-Strasse, D-35043 Marburg, Germany.

Running title: Denitrifiers in the oxygen minimum zone off Chile



Key words: Denitrifiers, oxygen minimum zone, nitrite reductase (*nirS*) genes, T-RFLP

*For correspondence. Email: braker@staff.uni-marburg.de. Tel. +49-6421-178 740. Fax: +49-6421-178 999

Summary

The major sites of water column denitrification in the ocean are oxygen minimum zones (OMZ), such as one in the eastern South Pacific (ESP). To understand denitrifying communities in the OMZ off Chile, the community structure of denitrifiers at two sites in the Chilean OMZ (Antofagasta and Iquique) and at different water depths was explored by terminal restriction fragment length polymorphism analysis and cloning of PCR amplified *nirS* genes. *NirS* is a functional marker gene for denitrification encoding cytochrome *cd₁*-containing nitrite reductase, which catalyzes the reduction of nitrite to nitric oxide, the key step in denitrification. Major differences were found between communities from the two geographic locations. Shift in community structure occurred along a biogeochemical gradient at Antofagasta. Canonical correspondence analysis indicated that O₂, NO₃⁻, and NO₂⁻ were key factors governing these communities along the biogeochemical gradient in the water column. Phylogenetic analysis grouped the majority of clones from the ESP in distinct clusters of genes from presumably novel and yet uncultivated denitrifiers. These *nirS* clusters were distantly related to those found in the water column of the Arabian Sea but the phylogenetic distance was even higher to environmental sequences from marine sediments or any other habitat. This finding suggests similar environmental conditions triggering the development of denitrifiers with related *nirS* genotypes despite large geographic distances.

Introduction

The eastern Tropical North Pacific (ETNP), the eastern South Pacific (ESP), and the Arabian Sea have been identified as the major sites of water column denitrification in the ocean (Cline and Richards, 1972; Codispoti and Packard, 1980; Anderson et al., 1982; Naqvi, 1994; Bange et al., 2000), accounting for approximately 30% of oceanic denitrification (Codispoti et al., 2001). In a previous study exploring N₂O cycling at the OMZ core in the ESP, denitrification rates of 13 g N m³ y⁻¹ under *in situ* O₂ levels (Castro-González and Farías, in press) were found, which are two orders of magnitude higher than those estimated previously (Codispoti et al., 1989, 2001). Denitrification in the OMZ core

accounted for 30 to 40 % of the NO_3^- -reduction, suggesting a highly active denitrifier community (Castro-González and Farías, in press). During denitrification, combined nitrogen is converted to nitrogen gases such as NO, N_2O , and N_2 . The ocean is a net source of N_2O to the atmosphere, contributing to the greenhouse effect (Lashof and Ahuja, 1990) and playing a role in the destruction of the stratospheric ozone layer (Andreae and Crutzen, 1997). In the ESP, the co-occurrence of an oxygen minimum zone (OMZ) between 40 to 400 m depth with high fluxes of organic matter (produced by strong surface primary production) enhances O_2 consumption by microorganisms at intermediate depths (Codispoti and Packard, 1980; Ward et al., 1989) converting the OMZ off Chile into one of the most shallow and oxygen-deficient zones ($< 11 \mu\text{M O}_2 \text{ l}^{-1}$) in the ocean (Hill et al., 1998). Under these conditions, the denitrifying community in the OMZ is very active at the expense of high levels of organic carbon and NO_3^- as an electron acceptor, allowing the generation of a NO_3^- deficit and a secondary NO_2^- maximum (Lipschultz et al., 1990). However, despite the importance of the region in the global nitrogen cycle, little is known about the extant denitrifier communities, which would permit comparisons with those found in other oceanic regions, and the influence of environmental factors on distribution and diversity of denitrifying communities in an area with strong gradients of nutrients (NO_3^- , NO_2^-) and gases (N_2O , O_2) within the water column and between coast and ocean (Codispoti and Packard, 1980; Castro-González and Farías, in press) .

Cultivation-independent molecular techniques allow the analysis of the genetic diversity of functional groups in environmental samples. Denitrifying bacteria are phylogenetically very diverse, thus a 16S rDNA based approach is inappropriate to explore the structure and diversity of this physiological group. Functional marker genes such as the nitrite reductase genes *nirS* and *nirK*, which code for copper and cytochrome *cd₁* containing nitrite reductase, respectively, the key enzymes in the denitrification process (Zumft, 1997), had been targeted to study denitrifier communities in a variety of habitats. These include groundwater (Yan et al., 2003), soils (Priemé et al., 2002; Rösch et al., 2002), river sediments (Taroncher-Oldenburg et al., 2003), estuarine sediments (Nogales et al., 2002), marine sediments (Braker et al., 2000; Braker et al., 2001; Liu et al., 2003), and seawater (Jayakumar et al., 2004). However, only some of them have suggested a link between

functional diversity and ecosystem biogeochemistry (Liu et al., 2003; Jayakumar et al., 2004).

Since our primer sets more readily detected *nirS* genes from marine habitats (Braker et al., 2000) rather than *nirK*, our study focused on exploring the molecular diversity and community structure of *nirS*-type denitrifiers in the OMZ off Chile in an attempt to analyze the relationship between community structure and environmental parameters. Our results indicate that the denitrifying, *nirS*-containing community is unique and diverse, and that its structure is related to the prevailing chemical and physical variables.

Experimental procedures

Study area and water sampling. Seawater samples were collected from two centers of the persistent coastal upwelling zone off northern Chile: on board the R/V 'Purihaalar' off Antofagasta (December 2003) and on board the 'Abate Molina' off Iquique (March 2003) (Table 1). Sample names refer to the sampling location (I= Iquique, A= Antofagasta), the coastal (C) or offshore (O) station, and sampling depth (e.g. sample IO82 = Iquique, offshore station, sampling depth 82 m). Seawater samples were collected in 5 l Niskin bottles attached to a CTDO rosette sampler. To collect cells for DNA extractions, 5 to 8 liters of seawater were filtered consecutively through 20, 5, and 0.45 or 0.2 μm pore size membrane filters (Durapore, diameter 47 mm). The membrane filters (0.45 or 0.2 μm) were immediately immersed in 4.5 ml of autoclaved DNA lysis buffer (20 mM Tris-HCl, pH 7.5 – 8.2, 50 mM EDTA, 20 mM NaCl), and stored in liquid nitrogen until DNA extraction.

DNA extraction. DNA extraction followed the previously described procedure (Madrid et al., 2001) with the following modifications. The thawed membranes were cut into small pieces and 4 ml of lysis buffer with lysozyme (1mg ml^{-1}) were added, followed by an incubation at 37°C for one hour and subsequent freezing at -20°C for 15 min. Finally, the DNA was dissolved in 100 μl of Tris-EDTA (10 mM, 0.1 mM; pH 8.0) and stored at -20°C. DNA was quantified and analyzed spectrophotometrically by taking point measurements at 230, 260, and 280 nm.

PCR conditions. PCR amplifications of *nirS* genes from total environmental DNA extracts (1 µl of a 1:10 dilution) were performed with primers nirS1F-nirS6R using conditions described previously (Braker et al., 2000) with the following modifications. In a 25 µl reaction, each primer concentration was reduced to 0.16 µM and 1.25 U RedAccuTaq™ LA DNA Polymerase (Sigma, Taufkirchen, Germany) in 1× reaction buffer provided with the enzyme were added. Annealing temperatures during the first ten touchdown cycles started with 58°C and were kept at 56°C during the following 20 cycles. Amplification products (890 bp) were analyzed by electrophoresis on 2 % (wt/vol) agarose gels (Biozym Diagnostik, Hess. Oldendorf, Germany) followed by staining with ethidium bromide (0.5 mg l⁻¹). Bands were visualized by UV excitation.

Products of three replicate PCRs were combined. PCR products from Iquique samples were purified by elution from an agarose gel (2 % wt/vol) using the QIAquick gel extraction kit (Qiagen, Hilden, Germany) as specified by the manufacturer, whereas PCR products from Antofagasta were purified with the QIAquick PCR purification kit (Qiagen).

***nirS* T-RFLPs.** Purified *nirS* PCR products (100 ng) were digested for 3 hours at 37°C in separate reactions with *MspI* and *HhaI* (New England Biolabs, Frankfurt/Main, Germany) and at 65°C with *TaqI* (New England Biolabs) using 5 U of each tetrameric restriction enzyme in the manufacturer's recommended reaction buffers. Digested products were cleaned with Autoseq G-50 columns (Amersham Biosciences) according to the manufacturer's recommendations. Aliquots (2 µl) of the digest were mixed with 12 µl of deionized formamide (Applera, Darmstadt, Germany) and 0.2 µl of an internal DNA length standard (X-Rhodamine MapMarker® 50-1000 bp; BioVentures, Murfreesboro, TN). T-RFs were separated with an automated DNA sequencer 310 (Applied Biosystems, Darmstadt, Germany). The lengths of fluorescently labeled terminal restriction fragments (T-RFs) were determined by comparison with the internal standard using GeneScan 3.71 software (Applied Biosystems).

Analysis of T-RFLPs. Peaks were analyzed by peak height and peaks of ≥ 50 fluorescence units were included in the analysis. Patterns from different samples were normalized to identical total fluorescence units by an iterative standardization procedure (Dunbar et al., 2001). Relative abundance of T-RFs in percent was determined by

calculating the ratio between height of a given peak and the normalized total peak height of each sample.

Cloning and sequencing. *nirS* PCR products (3 μ l) were cloned using the TOPO TA cloning kit (Invitrogen) according to the manufacturer's instructions. Clones were screened for inserts of the proper size and these inserts were sequenced as described above (Avarahami et al., 2002).

Phylogenetic analysis. *nirS* sequences were aligned to sequences from the EMBL database with the ARB Fast aligner feature (<http://www.arb-home.de>). For phylogenetic analysis, a filter was applied, including 186 deduced amino acid positions but omitting insertions or deletions due to ambiguous positional homology. Phylogenetic analyses were performed with ARB and the PHYLIP software package version 3.6a2.1 (Felsenstein, 1993). Trees were reconstructed with the distance matrix-based method neighbor joining (ARB and PHYLIP), with the parsimony method PROTPARS (PHYLIP), and with the maximum likelihood method PROTML (PHYLIP). Statistical evaluation of tree topologies was performed by bootstrap analysis (PHYLIP) with 100 resamplings for neighbor joining and PROTPARS. Sequences were digested *in silico* with the three restriction endonucleases using TRF-CUT (Ricke et al., submitted) for comparison of theoretical and experimental T-RFs.

Nucleotide sequence accession numbers. *NirS* gene sequences from environmental samples have been deposited in the EMBL nucleotide sequence database under accession numbers AJ811467 through AJ811535.

Statistical methods. Species diversity was measured using the total number and the relative abundance of T-RFs in the community profile. Species diversity was estimated using the Simpson's reciprocal index, calculated as $1/D = 1/\sum(p_i)^2$, where D is Simpson's index and p_i = proportion of species *i* in the community. To visualize similarities between profiles, pairwise similarities were calculated using the Jaccard coefficient; these considered the presence (1) or absence (0) of T-RFs, the number of T-RFs common to two communities, and the total number of T-RFs observed. The dendrogram was constructed using the Group Average algorithm from the BioDiversity Pro program version 2.0 (<http://www.sams.ac.uk/sams/projects/benthic/bdpro/index.htm>). Peaks generated by

hydrolysis with three restriction enzymes were included in the analysis. Biogeochemical variables were linked to T-RFLP patterns by canonical correspondence analysis (CCA), which was performed using the PCord program version 4.01 (MjM Software, Gleneden Beach, OR). CCA was used to (i) see patterns between *nirS* gene composition within the gradient based on relative abundance of T-RFs, (ii) with respect to the biogeochemical properties prevalent at station AC (NH_4^+ , NO_3^- , NO_2^- , N_2O , O_2), and (iii) to determine which biogeochemical parameters contributed to the differences among stations.

Results

T-RFLP analysis of *nirS* genes. Denitrifier community structure and biogeochemical parameters were analyzed comparatively for samples from the water column along a gradient off Antofagasta (AC), in the oxygen minimum zone (OMZ) off Iquique (IC), and from an offshore sampling station at Iquique (IO), Chile. Prevalent biogeochemical parameters (Table 1) were recently described in detail for this area (Castro-González and Farías, in press). Amplicons of *nirS* were obtained from all samples that were analyzed. Profiles of *nirS* in the water column were dominated by up to nine T-RFs obtained from *MspI* digests that provided the highest level of resolution. Hydrolysis with *HhaI* and *TaqI*, on the other hand yielded ≤ 4 peaks, thus not completely resolving the diversity of *nirS* genotypes. Simpson's diversity index revealed that the diversity of *nirS* genotypes at Antofagasta was higher than at Iquique (IC and IO) (Fig. 1). The highest *nirS* diversity was found in sample AC100 (100, sampling depth 100 m), and the lowest diversity level was observed in sample IC100.

The denitrifying community at station AC showed T-RFLP profiles from 50 to 100 m depth with common T-RFs of relatively stable relative abundance, e.g. the 43-, 97-, and 139-bp T-RFs (Fig. 2). However, fragments unique to given depths also occurred, e.g. the 62-bp T-RF was present only in samples AC50 and AC55, whereas fragments of 118, 132, 134, and 227 bp were present only in the OMZ core (AC100). The IC samples shared T-RFs of 62, 97, 139, 165, 167 and 169-bp with at least some of the AC samples, albeit in different proportions. Profiles from sampling locations off Iquique (IC and IO) shared less fragments, and characteristic T-RFs were observed, e.g. of 143 and 304 bp and 105 and 413

bp for samples IC100 and IC200, respectively; one 271-bp T-RF was unique to station IO82.

T-RFLP profiles compared by presence/absence of T-RFs showed a clustering according to sampling site and depth (Fig. 3). The first dichotomy separated Antofagasta's T-RFLPs from Iquique's. For the Antofagasta branch, the AC100 T-RFLP was separated from those of all other depths, which cluster in two branches, one comprising patterns from samples AC50 and AC55 and the other patterns from samples AC60 and AC75. Thus, the patterns were grouped according to the upper boundary layer of the oxygen minimum zone (UBLOMZ; AC50, AC55), a transition zone within the OMZ (AC60 and AC75), and the core of the OMZ (OMZC; AC100). For sampling stations off Iquique, the IO82 (UBLOMZ) T-RFLP branched off separately from IC samples (OMZC; IC100, IC200), which clustered together.

Ordination techniques (canonical correspondence analysis) were applied to reveal an underlying structure to the T-RFLP profiles and to indicate an influence of biogeochemical parameters on the development of denitrifier communities along the gradient at sampling station AC. In a scatter plot representing communities by T-RFLP profiles and arranging more similar communities more closely to each other, the data profiles were grouped according to the UBLOMZ, the transition zone, and the OMZC similar to the grouping by cluster analysis. Biogeochemical parameters NO_3^- , NO_2^- , N_2O , NH_4^+ , and O_2 at these sampling depths were also included in this analysis (Fig. 4). Canonical correspondence analysis (CCA) results indicated that higher NO_2^- -concentrations correlated with the separation of the OMZC sample (AC100) from the UBLOMZ and the transition zone samples. The separation of the UBLOMZ samples (AC50 and AC55) from those of the transition zone (AC60 and AC75) was mainly driven by higher oxygen concentrations while transition zone samples were influenced by lower NO_3^- concentrations than the samples of the UBLOMZ and OMZC.

Phylogenetic analysis of *nirS* sequences. A total of 69 clones obtained from sampling stations AC50, AC100, and IC200 were sequenced. All *nirS* clones were identified as *nirS* sequences by BLAST search, and a chimera check (<http://foo.maths.uq.edu.au/~huber/>) detected no chimera. The pairwise nucleotide identities of these *nirS* sequences ranged from 66 to 100 %. The majority of *nirS* sequences obtained from marine habitats that are

available from public databases were included in our analysis (Fig. 5). Our *nirS* sequences could be grouped into four subclusters (I to IV). Except for two clones in subcluster IIc and those in cluster III, all sequences were only distantly related to database sequences and clustered on separate branches. All sequence clusters from water column samples off Chile branch off in the vicinity of sequences obtained from the water column from the Arabian Sea (Jayakumar et al., 2004). Environmental sequences from marine sediments were found only in the same clusters with our subclusters III and IV. One sediment sequence from the ETNP (Liu et al., 2003) was the sister group to cluster I.

Sequences from sample AC50 were found almost exclusively in the three subclusters of cluster II and only two clones clustered in cluster I. Sequences from sample AC100 clustered within clusters I and III and those from subcluster III were closely related to *Pseudomonas fluorescens* Mi32 (96 to 97 % amino acid identity). Sequences from sample IC200 clustered within clusters II and IV. Cluster IV comprises sequences only distantly related to *nirS* genes cloned from the Arabian Sea (61 to 71 % identity) and from sediment from the ETNP (60 to 75 % identity). The closest cultivated relatives with a similar *nirS* genotype are *Paracoccus denitrificans* and *Roseobacter denitrificans*. Sequences from samples AC50 and IC200 in subcluster II clustered with isolates C10-1 (82 to 93 % identity) and B9-12 (77 to 80 % identity). Both isolates were obtained from sediments of the Pacific Northwest and were phylogenetically related to *Marinobacter* sp. and *Halomonas variabilis*, respectively (Braker et al., 2000).

Assignment of *nirS* clones to T-RFs. An *in silico* digest of our *nirS* sequences showed that sequences could be assigned to dominant T-RFs (Figs. 2 and 5). For samples AC50 and IC200, clones could be assigned to several T-RFs comprising 65 and 73% of the total peak height respectively, whereas clones could be assigned to only two T-RFs comprising 50% of the total peak height for sample AC100. T-RFs from *in silico* hydrolysis differed from the respective T-RFs obtained experimentally by up to 6 bp (Fig. 2). Therefore, the 68-bp T-RF of the *in silico* analysis using *MspI* corresponded to the experimental 62-bp T-RF. Likewise, the 102-, 110-, 144-, and 172-bp T-RF calculated by *in silico* analysis corresponded to experimental T-RFs of 97, 105, 139, and 167 bp, respectively. Digests with only one enzyme yielded T-RFs that were not generally unique to a single cluster in the tree (except for cluster IV) and therefore could not resolve the *nirS* genotypes occurring

in the water column off Chile. Subcluster II represented sequences from samples AC50 and IC200 with several T-RFs of 68, 102, 144, and 172 bp. On the other hand, shared T-RFs occurred for phylogenetically distinct clusters of sequences, e.g. the 102-bp T-RF (AC50/AC100, subcluster I; IC200, subcluster II) and the 144-bp T-RF (AC100, subcluster III; AC50/IC200, subcluster II).

Discussion

We studied denitrifying communities at two geographically distinct sites of the Chilean OMZ with different biogeochemical parameters (Table 1). PCR detection of *nirS* type denitrifiers agreed with the activity of denitrifiers demonstrated previously for all sampling sites (Castro-González and Farías, in press). Shifts in denitrifier community structure were explored in samples taken in 5 to 25 m sampling intervals along a gradient at Antofagasta which covered three distinct zones with specific biogeochemical parameters, i.e. an upper boundary layer (UBLOMZ; 50 to 55 m sampling depth), a transition zone (60 to 75 m), and the core of the oxygen minimum zone (OMZC; 100 m). The UBLOMZ is mainly characterized by high oxygen content, whereas the OMZC exhibits the highest nitrite concentrations. Denitrifier communities from the gradient at Antofagasta were compared to those in the OMZC off Iquique, which showed biogeochemical properties similar to those of the OMZC at Antofagasta. A sample taken from the UBLOMZ of an offshore station off Iquique was also included.

Denitrifier communities off Antofagasta were more diverse than those off Iquique (Fig.1). Patterns in denitrifier community structure along the gradient were visualized by cluster analysis (Fig. 3) and ordination (canonical correspondence analysis) of T-RFLP profiles (Fig. 4). Both analyses showed that denitrifier communities were characteristic for the three zones within the gradient of biochemical parameters at Antofagasta. Profiles of denitrifier communities within the UBLOMZ were composed of identical T-RFs albeit in different proportions (Fig. 2). For the transition zone two characteristic fragments occurred (46 and 377 bp). The profile from the upper 60-m sample was more similar to those of the UBLOMZ. On the other hand, one additional fragment (169 bp) in the 75 m-sample shared with the OMZC (AC100) profile indicates a transition towards the community

characteristic for the OMZC. The denitrifier community in the OMZC at Antofagasta was the most diverse with the highest number of characteristic T-RFs hinting on a unique denitrifier community, which had developed under unique environmental conditions. Denitrifier communities from the OMZC at Iquique were very dissimilar despite more similar biogeochemical parameters (NO_3^- and NO_2^-) within the OMZC at both stations than within the gradient at Antofagasta (Table 1). Diversity was lowest at Iquique's OMZC (Fig. 1) and the profiles shared more T-RFs with those from the UBLOMZ than with the OMZC at Antofagasta (Fig. 3).

Within this study, clones could be assigned to T-RFs comprising up to 73% of the total peak height, suggesting that most of the phylogenetic diversity of *nirS* of these samples was displayed within the tree. The majority of the *nirS* genes from the ESP were found in subclusters distinct from *nirS* clones and genes from isolates obtained from earlier studies, thus probably representing novel and yet uncultivated groups of denitrifiers (Fig. 5). Sequence clusters from the Arabian Sea branch off in the vicinity of those from the ESP but most of them were only distantly related. In contrast, no environmental *nirS* gene from the PNW and few sequences from the ETNP branch as sister groups to those from the ESP, whereas *nirS* genes from the PNW and the ETNP clustered together. Our data suggest that similar conditions within an OMZ trigger the development of sister denitrifier communities despite large geographic distances. The significance of geographic distance and environmental conditions on the composition of denitrifying communities also has been explored through analysis of *nosZ* (Scala and Kerkhof, 1999) and *nirS* genes (Braker et al., 2001; Liu et al., 2003) in marine sediments as well as in the water column of the Arabian Sea (Jayakumar et al., 2004).

Some ESP clones clustered with isolates, e.g. AC100 clones in subcluster III were closely related to *Pseudomonas fluorescens* Mi32 and clones from subcluster II grouped as sister groups to *nirS* from the PNW isolates C10-1 (*Marinobacter* sp.) and B9-12 (*Halomonas variabilis*). Cultivation work would have to show that these genes retrieved in the present study from the ESP were derived from phylogenetically related organisms but that they were not acquired through horizontal gene transfer.

Our results suggest that the denitrifier community structure in this OMZ could be associated, at least in part, with the prevalent biogeochemical properties within the study

area. CCA of *nirS* genes and biochemical parameters along the water column at station AC indicates that the denitrifier community composition is mainly influenced by O₂, NO₃⁻ and NO₂⁻ gradients. O₂, NO₃⁻ (Liu et al., 2003), DOC, inorganic nitrogen, and salinity gradients (Taroncher-Oldenburg et al., 2003) have all been reported to be key factors governing the composition of denitrifier communities. The highest diversity of T-RFs was found at depths with high NO₂⁻ levels (6.7-7.3 μM) considered to be zones of high denitrification activity, similar to what was reported by Jayakumar et al., (2004) for the Arabian Sea. However, high diversity was also observed in the UBLMZ (AC50), with very low levels of NO₂⁻ but high levels of O₂ (Table 1), suggesting that if denitrifiers are active to this depth, they would have to compete for NO₂⁻ with other bacterial groups such as nitrifiers (Molina V., pers. com.) and cyanobacteria (Ulloa O., pers. com.), also present in this area, as in other OMZs (Ward et al., 1989; Goericke et al., 2000). This implies that the interaction and competition for resources with other microorganisms could be an additional factor influencing the diversity and composition of denitrifiers in the Chilean OMZ. Higher levels of NH₄⁺ at station IC than at AC could account for differences among coastal stations, whereas high levels of NO₃⁻ and very low levels of NO₂⁻ present at station IO82 could determine the establishment of a characteristic community (Fig. 2) located at the limit of the coastal denitrifying area (Codispoti and Packard, 1980).

Although the organisms with the novel *nirS* genotype inhabiting the OMZC off Northern Chile and those inhabiting the Arabian Sea were exposed to similar environmental conditions (e.g. very low O₂ and high NO₂⁻ level) and clustered as sister groups, they were only distantly related. This implies that factors other than those studied here are influencing the structure of denitrifier communities, as much among OMZs as within them. It is well known that the development and activity of denitrifiers also depend on trace metal availability. Iron and copper, for example, are necessary for the activity of nitrite reductases NirS and NirK, respectively (Zumft, 1997). All these factors combined could differentially affect the distribution of these communities in the Chilean OMZ, taking into account that this OMZ lies beneath a coastal upwelling area considered actually under iron limitation (Hutchins et al., 2002; Dezileau et al., 2004).

The effects of spatial and temporal changes of biogeochemical properties (including DOC, iron, and copper availability) on denitrifier community composition and the activity

of denitrification genes (through mRNA analysis or enzymatic activity) will be addressed in future studies which would help to understand the role of these factors in the trace gas production and nitrogen cycling of the ESP.

Acknowledgements

This work was supported by The Chilean National Commission of Science and Technology (CONICYT) with the Grant #1030741, the FONDAP-COPAS Center, and the German Federal Ministry for Education and Research within the BIOLOG Biodiversity Program (01LC0021). This article is part of the doctoral work of MCG, who was supported by a DAAD fellowship at the MPI. We thank F. González and H. Urrutia for their orientation in laboratory work, G. Alarcón for help on board, and the captains and crews of the research vessels for help with sampling. Ralf Conrad is gratefully acknowledged for critically reading of this manuscript.

References

- Anderson, J.J., Okubo, A., Robbins, A.S., and Richards, F.A. (1982) A model for nitrite and nitrate distributions in oceanic oxygen minimum zones. *Deep-Sea Res Part A* **29**: 1113-1140.
- Andreae, M.O. and Crutzen, P.J. (1997) Atmospheric aerosols: Biogeochemical sources and role in atmospheric chemistry. *Science* **276**: 1052-1058.
- Avarahami, S., Conrad, R., and Braker, G. (2002) Effect of soil ammonium concentration on N₂O release and on the community structure of ammonia oxidizers and denitrifiers. *Appl Environ Microbiol* **68**: 5685-5692.
- Bange, H.W., Rixen, T., Johansen, A.M., Siefert, R.L., Ramesh, R., Ittekkot, V., Hoffmann, M.R., and Andreae, M.O. (2000) A revised nitrogen budget for the Arabian Sea. *Global Biogeochem Cycles* **14**: 1283-1297.

Braker, G., Zhou, J., Wu, L., Devol, A.H., and Tiedje, J.M. (2000) Nitrite reductase genes (*nirK* and *nirS*) as functional markers to investigate diversity of denitrifying bacteria in Pacific Northwest marine sediment communities. *Appl Environ Microbiol* **66**: 2096-2104.

Braker, G., Ayala del Río, H.L., Devol, A.H., Fesefeldt, A., and Tiedje, J.M. (2001) Community structure of denitrifiers, *Bacteria*, and *Archaea* along redox gradients in Pacific Northwest marine sediments by terminal restriction fragment length polymorphism analysis of amplified nitrite reductase (*nirS*) and 16S rRNA genes. *Appl Environ Microbiol* **67**: 1893-1901.

Castro-González, M. and Farías, L. (2004) N₂O cycling at the core of the oxygen minimum zone off northern Chile. *Mar Ecol Prog Ser* **280**:1-11.

Cline, J.D., and Richards, F.A. (1972) Oxygen deficient conditions and nitrate reduction in the eastern tropical North Pacific Ocean. *Limnol Oceanogr* **17**: 885-900.

Codispoti, L.A., and Packard, T.T. (1980) Denitrification rates in the eastern tropical South Pacific. *J Mar Res* **38**: 453-477.

Codispoti, L.A., Barber, R.T., Friederich, G.E. (1989) Do nitrogen transformations in the poleward undercurrent off Peru and Chile have a globally significant influence? In: *Coastal and Estuarine Studies. Poleward flows along eastern ocean boundaries*. Neshyba, S.J. et al. (eds). Springer-Verlag, Berlin, pp 281-310.

Codispoti, L.A., Brandes, J.A., Christensen, J.P., Devol, A.H., Naqvi, S.W.A., Paerl, H.W., and Yoshinari, T. (2001) The oceanic fixed nitrogen and nitrous oxide budgets: moving targets as we enter the anthropocene? *Sci Mar* **65** (suppl.2): 85-105.

Dezileau, L., Ulloa, O., Hebbeln, D., Lamy, F., Reyss, J-L., and Fontugne, M. (2004) Iron control of past productivity in the coastal upwelling system off the Atacama Desert, Chile. *Paleoceanography* **19**(3),PA3012 10.1029/2004PA001006.

Dunbar, J., Ticknor, L.O., and Kuske, C.R. (2001) Phylogenetic specificity and reproducibility and new method for analysis of terminal restriction fragment profiles of 16S rRNA genes from bacterial communities. *Appl Environ Microbiol* **67**:190-197.

Felsenstein, J. (1993) PHYLIP: phylogeny inference package (version 3.5c). Department of Genetics, University of Washington, Seattle, Washington.

Goericke, R., Olson, R.J., Shalapyonok, A. (2000) A novel niche for *Prochlorococcus* sp. in low-light suboxic environments in the Arabian Sea and the eastern Tropical North Pacific. *Deep-Sea Res I* **47**: 1183-1205.

Hill, A.E., Hickey, B.M., Shillington, F.A., Strub, P.T., Brink, K.H., Barton, E.D., and Thomas, A.C. (1998) Eastern Ocean boundaries, Coastal segment. In *The global Coastal Ocean: regional studies and synthesis*. The Sea Volume 11. Robinson, A.R., and Brink, K.H. (eds). New York, John Wiley and Sons, Inc., pp. 29-67.

Hutchins, D.A., Hare, C.E., Weaver, R.S., Zhang, Y., Firme, G.F., DiTullio, G.R., Alm, M.B., Riseman, S.F., Maucher, J.M., Geesey, M.E., Trick, C.G., Smith, G.J., Rue, E.L., Conn, J., and Bruland, K.W. (2002) Phytoplankton iron limitation in the Humboldt Current and Peru upwelling. *Limnol Oceanogr* **47**: 997-1011.

Jayakumar, D.A., Francis, C.A., Naqvi, S.W.A., and Ward, B.B. (2004) Diversity of nitrite reductase genes (*nirS*) in the denitrifying water column of the coastal Arabian Sea. *Aq Microbiol Ecol* **34**: 69-78.

Lashof, D.A., and Ahuja, D. (1990) Relative contributions of greenhouse gas emissions to the global warming. *Nature* **344**: 529-531.

Lipschultz, F., Wofsy, S.C., Ward, B.B., Codispoti, L.A., Friedrich, G., and Elkins, J.W. (1990) Bacterial transformations of inorganic nitrogen in the oxygen deficient waters of the Eastern Tropical South Pacific Ocean. *Deep-Sea Res* **37**: 1513-1541.

Liu, X., Tiquia, S.M., Holguín, G., Wu, L., Nold, S.C., Devol, A.H., Luo, K., Palumbo, A.V., Tiedje, J.M., and Zhou, J. (2003) Molecular diversity of denitrifying genes in continental margin sediments within the oxygen-deficient zone off the Pacific coast of México. *Appl Environ Microbiol* **69**: 3549-3560.

Madrid, V.M., Taylor, G.T., Scranton, M.I., and Chistoserdov, A.Y. (2001) Phylogenetic diversity of bacterial and archaeal communities in the anoxic zone of the Cariaco Basin. *Appl Environ Microbiol* **67**: 1663-1674.

Naqvi, S.W.A. (1994) Denitrification processes in the Arabian Sea. In *The Biogeochemistry of the Arabian Sea*. Lal, D. (ed). Bangalore, Indian Acad. of Sci., pp. 181-202.

Nogales, B., Timmis, K.N., Nedwell, D.B., and Osborn, A.M. (2002) Detection and diversity of expressed denitrification genes in estuarine sediments after reverse transcription-PCR amplification from mRNA. *Appl Environ Microbiol* **68**: 5017-5025.

Priemé, A., Braker, G., and Tiedje, J.M. (2002) Diversity of nitrite reductase (*nirK* and *nirS*) gene fragments in forested upland and wetland soils. *Appl Environ Microbiol* **68**: 1893-1900.

Ricke, P., Kolb, S., and Braker, G. Application of a newly developed ARB-integrated *in silico* T-RFLP tool reveals the dominance of a novel *pmoA* cluster in a forest soil. Submitted.

Rösch, C., Mergel, A., and Bothe, H. (2002) Biodiversity of denitrifying and dinitrogen-fixing bacteria in an acid forest soil. *Appl Environ Microbiol* **68**: 3818-3829.

Scala, D.J., and Kerkhof, L.J. (1999) Diversity of nitrous oxide reductase (*nosZ*) genes in continental shelf sediments. *Appl Environ Microbiol* **65**: 1681-1687.

Taroncher-Oldenburg, G., Griner, E.M., Francis, C.A., and Ward, B.B. (2003) Oligonucleotide microarray for the study of functional gene diversity in the nitrogen cycle in the environment. *Appl Environ Microbiol* **69**: 1159-1171.

Ward, B.B., Glover, H.E., Lipschultz, F. (1989) Chemoautotrophic activity and nitrification in the oxygen minimum zone off Perú. *Deep-Sea Res* **36**: 1031-1051.

Yan, T., Fields, M.W., Wu, L., Zu, Y., Tiedje, J.M., and Zhou, J. (2003) Molecular diversity and characterization of nitrite reductase gene fragments (*nirK* and *nirS*) from nitrate and uranium contaminated groundwater. *Environ Microbiol* **5**: 13-24.

Zumft, W.G. (1997) Cell biology and molecular basis of denitrification. *Microbiol Mol Biol Rev* **61**: 533-616.



Legends

Figure 1. Simpson's Diversity Index (SDI) based on *nirS* T-RFs calculated for each sampling station. Sampling locations; I, off Iquique; A, off Antofagasta; C, coastal or O, offshore station; numbers indicate sampling depth.

Figure 2. T-RFLP analysis of amplified *nirS* genes hydrolyzed with *MspI*. Peak size in base pairs is shown in the legend. *, samples for which a *nirS* clone library was constructed. Sizes of T-RFs after *in silico* analysis of clones are given by numbers on the respective experimental T-RF; roman numbers give the subcluster in the phylogenetic tree. x-axis: samples; A, off Antofagasta; I, off Iquique; C, coastal or O, offshore station; numbers indicate sampling depth; y-axis: relative abundance of T-RFs in % of total peak height.

Figure 3. Cluster diagram based on presence/absence of *nirS* T-RFs. Similarity values of T-RFs from *nirS* genes digested with three restriction enzymes (*MspI*, *HhaI*, and *TaqI*) are given as % values. The dendrogram was constructed using the Jaccard coefficient and the Group Average algorithm from the BioDiversity Pro program version 2.0.

Figure 4. Canonical correspondence analysis based on *nirS* T-RFLP patterns and biogeochemical parameters. Eigenvalues (500 runs), 0.326 and 0.178 for dimensions 1 and 2, respectively. Squares, sampling stations; stars, biogeochemical parameters.

Figure 5. Phylogenetic analysis of *nirS* sequences. Neighbor joining tree (Jones-Taylor-Thornton model of amino acid exchange) based on partial *nirS* amplicons (186 amino acids). A consensus tree was constructed from tree calculation methods neighbor joining, parsimony, and maximum likelihood by introducing multifurcations (dashed lines) where the tree topology was not consistently resolved. Bootstrap values were generated by 100 replicates of neighbor joining and parsimony analysis. •, bootstrap values >90%; ◦, bootstrap values 50 to 90%; bootstrap values below 50% were omitted. Clones obtained

from costal stations off Antofagasta and Iquique are designated AC and IC, respectively; numbers indicate sampling depths. PNW, Pacific Northwest; ETNP, eastern Tropical North Pacific. Roman numbers indicate sequence clusters from the ESP. The respective size of T-RFs after *in silico* analysis with restriction enzymes *MspI*, *HhaI*, and *TaqI* are shown. The scale bar represents 10 mutations per 100 sequence positions.



Table 1. Location (latitude and longitude) and biogeochemical characteristics of the sampling stations in the OMZ off northern Chile.

| Station | Antofagasta (AC) | | | | | Iquique (IC, IO) | | |
|-----------------------------------|----------------------------|-------|-------|-------|-------|----------------------------|----------------------------|-------|
| Location | 22°51'00''S 70°32'59''W | | | | | 20°16'00''S 70°32'59''W | 20°16'00''S 72°17'59''W | |
| Sample | AC50 | AC55 | AC60 | AC75 | AC100 | IC100 | IC200 | IO82 |
| Depth (m) | 50 | 55 | 60 | 75 | 100 | 100 | 200 | 82 |
| O ₂ (μM) | 14.70 | 10.31 | 5.92 | 5.83 | 6.90 | 5.34 | 4.45 | 9.37 |
| N ₂ O (μM) | 0.09 | 0.14 | 0.18 | 0.11 | 0.10 | 0.09 | 0.06 | 0.05 |
| NO ₂ ⁻ (μM) | 0.38 | 2.33 | 1.82 | 2.61 | 6.71 | 6.85 | 7.51 | 0.17 |
| NO ₃ ⁻ (μM) | 5.83 | 8.42 | 5.59 | 0.32 | 8.21 | 9.75 | 11.4 | 14.10 |
| NH ₄ ⁺ (μM) | 0.10 | 0.03 | 0.05 | 0.02 | 0.03 | 0.11 | 0.13 | 0.14 |
| Salinity | 34.85 | 34.86 | 34.86 | 34.86 | 34.87 | 34.89 | 34.83 | 34.85 |
| Temperature(°C) | 13.19 | 13.16 | 13.15 | 13.10 | 12.89 | 13.14 | 12.11 | 13.22 |



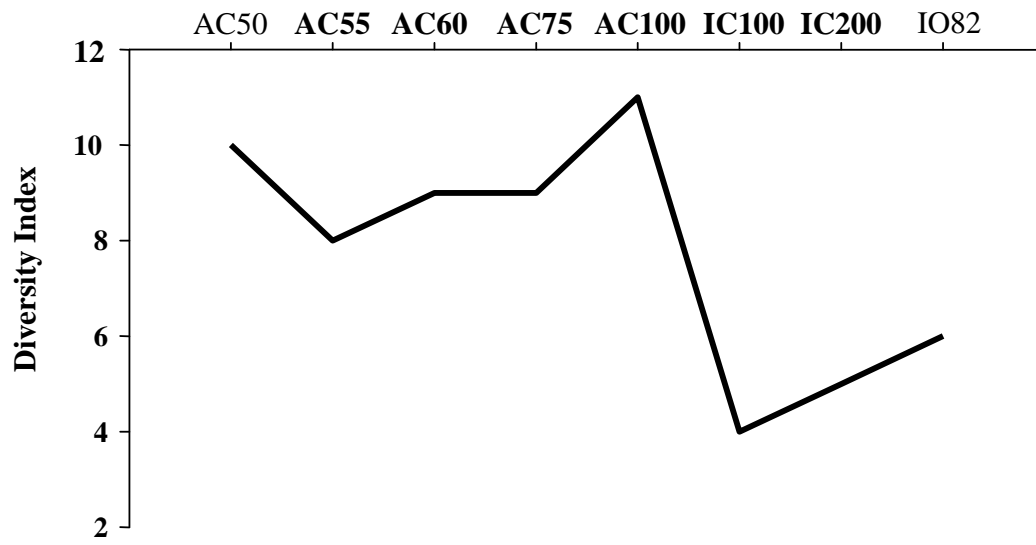


Figure 1



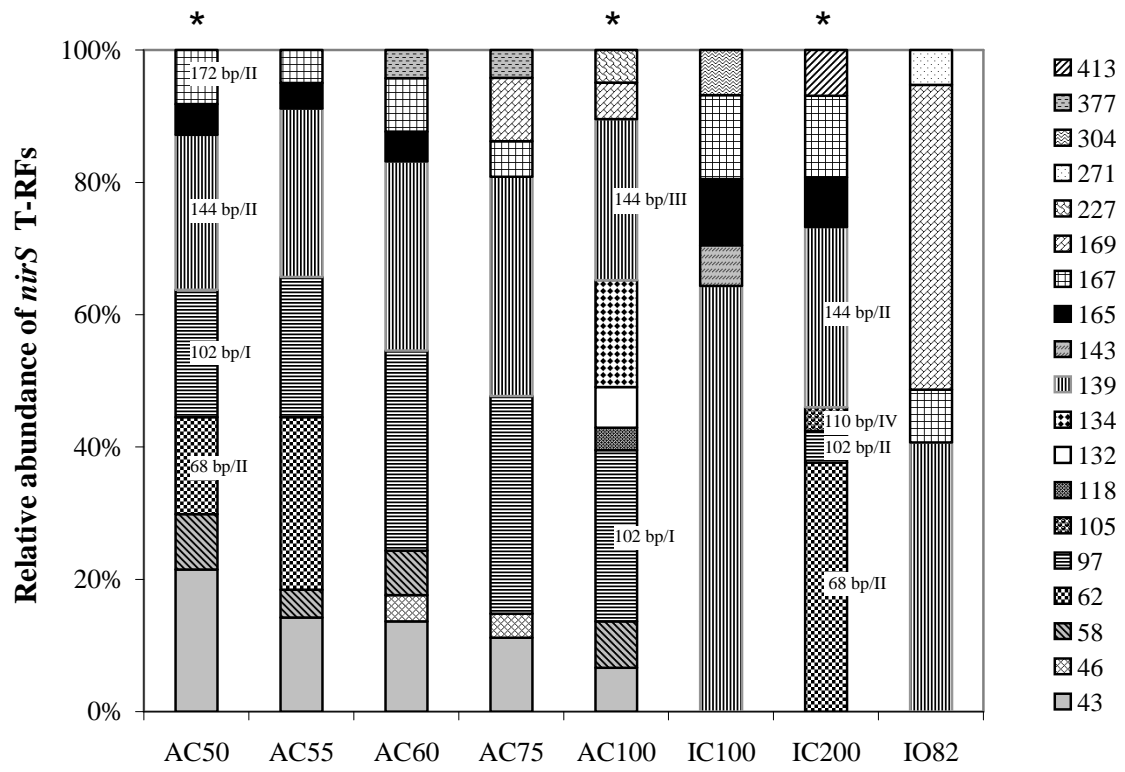


Figure 2



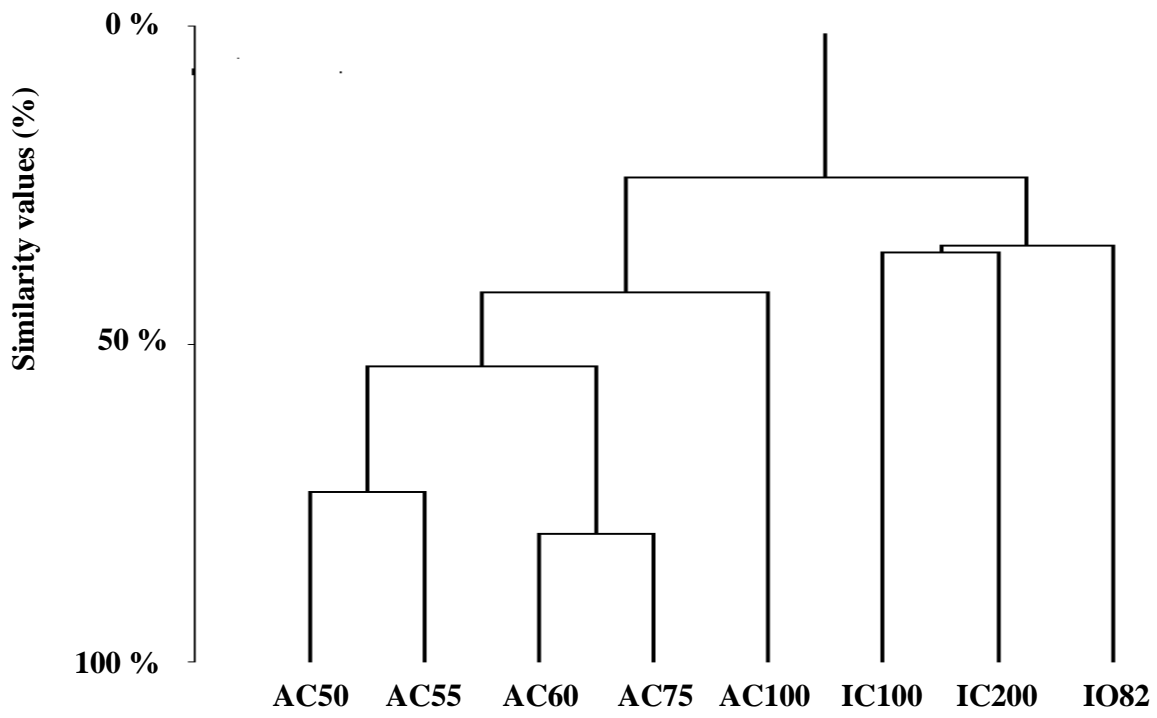


Figure 3

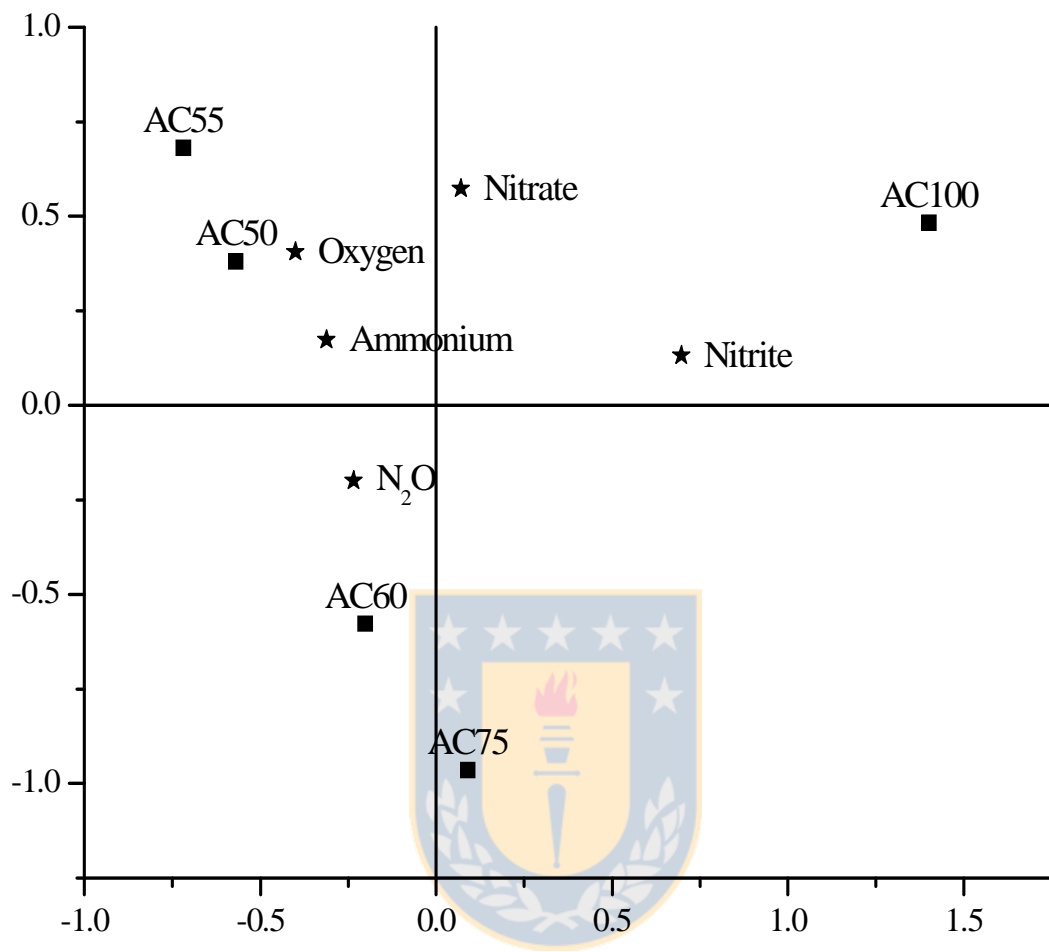


Figure 4

PARTE A



1.- INTRODUCCIÓN

1.1.- El N_2O , su origen y reciclamiento en el océano

El N_2O es un gas traza con fuerte influencia sobre el clima y la química atmosférica. Este es considerado como uno de los más importantes gases invernadero después del CO_2 y el CH_4 , con un potencial de calentamiento por molécula 200-300 veces mayor que el CO_2 (Houghton *et al.* 1995). El N_2O es producido principalmente por la actividad microbiana en

la biosfera y destruido principalmente por reacciones fotoquímicas en la estratosfera (McElroy *et al.* 1976) en donde contribuye a la destrucción del ozono (Crutzen 1970). La concentración de N₂O en la atmósfera ha incrementado en un 9.4% en la última centuria (Khalil *et al.* 2002) aportando con cerca de 6% al forzamiento radiativo global antropogénico. El océano es considerado como una de las mayores fuentes naturales de N₂O, con un flujo neto estimado de ~4 Tg N₂O por año, aproximadamente un 25% de la emisión de N₂O global (Nevison *et al.* 2003). Las regiones costeras, aunque ocupan sólo un 18% del área oceánica total, contribuyen con ~60% al flujo neto de N₂O marino, principalmente por el aporte que hacen los estuarios y las áreas de surgencia (Bange *et al.* 1996). De hecho, se estima que las áreas de surgencia bajo las cuales subyacen ZMO contribuyen desde un 5 hasta un 70% al flujo neto de N₂O oceánico total (Capone 1991, Nevison *et al.* 2004).

A pesar de que se ha avanzado respecto de las estimaciones globales del flujo de N₂O desde las áreas oceánicas, es poco lo que se conoce respecto de su origen y de los mecanismos de reciclamiento del N₂O en el océano. Hasta ahora se han sugerido varios mecanismos de producción de N₂O marino; entre ellos los más importantes son la nitrificación y la desnitrificación (Figura 1). Durante la nitrificación, las bacterias autotróficas que oxidan el NH₄⁺ producen el N₂O como un subproducto de la nitrificación o como un intermediario de la desnitrificación nitrificante. En la nitrificación, el N₂O es formado durante la descomposición espontánea u oxidación incompleta de intermediarios de la oxidación de NH₄⁺ como la hidroxilamina, NH₂OH, (Goreau *et al.* 1980, Wrage *et al.* 2004). Sin embargo, se considera que sólo una pequeña fracción (0.1 - 0.4%) del NH₄⁺ es convertido a N₂O en vez de NO₂⁻ (Butler *et al.* 1987, Najjar 1992) por un mecanismo que aún no ha sido bien dilucidado.

Desnitrificación

Nitrificación

Reducción de nitrato
asimilativa o

desasimilativa

Desnitrificación

nitrificante

vía poco conocida

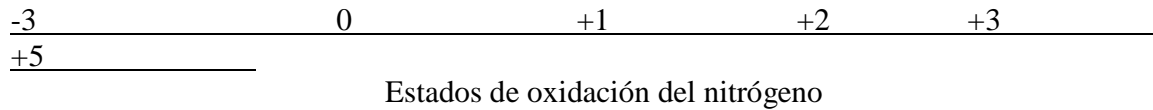


Figura 1. Transformaciones microbianas del nitrógeno involucradas dentro del reciclamiento del N₂O marino. Adaptado de Capone (1991).

En la desnitrificación nitrificante o desnitrificación autotrófica, las bacterias nitrificantes oxidan el NH₄⁺ a NO₂⁻, el cual es subsecuentemente reducido a N₂. En este caso, el N₂O puede ser liberado como un intermediario de la reducción de NO₂⁻ a N₂ (Wrage *et al.* 2001). Durante la desnitrificación, el N₂O se produce como un intermediario directo de la reducción secuencial de NO₃⁻ a N₂; teniendo así una mayor significancia para el ciclo del N marino. Sin embargo, el N₂O puede a su vez ser consumido por la misma desnitrificación a través de su reducción a N₂ (Payne 1971); de ahí que dicho proceso pueda convertirse tanto en reservorio como en fuente de N₂O en el océano, dependiendo de si la desnitrificación es total o parcial. El N₂O también es producido en menor cantidad a través de la reducción desasimilativa de NO₃⁻ a NH₄⁺ como se ha reportado a través de estudios con bacterias aisladas desde aguas subóxicas (Samuelsson & Rönner 1982) y suelos (Smith & Zimmerman 1981, Tiedje 1988); así como a través de la oxidación de amonio anaeróbica (anamosis), observado sólo en experimentos de laboratorio (Ward 2003). Igualmente, se cree que la reducción asimilativa de NO₃⁻ por el fitoplancton marino podría liberar N₂O como un subproducto (Delwiche 1981, Oudot *et al.* 1990), sin embargo, aún no hay evidencia directa al respecto.

Con base en lo anterior, se ha postulado que la nitrificación y la desnitrificación pueden ser fuente de N₂O, en la interfase eufótica-afótica y en la interfase óxica-subóxica de las áreas oceánicas deficientes en O₂ (Nevison *et al.* 2003, Yoshinari *et al.* 1997). Para esto se han usado modelos conceptuales (Codispoti *et al.* 1989) y numéricos (Deutsch *et al.* 2001, Nevison *et al.* 2003, Suntharalingam *et al.* 2000), así como aproximaciones empíricas a gran escala (Patra *et al.* 1999, Yoshinari 1976) y análisis isotópicos duales (N y O) del N₂O y otros aceptores (Kim & Craig 1990, Naqvi 1991, Naqvi *et al.* 1998, Yoshida *et al.* 1989). Sin embargo, varios de los resultados presentan discrepancias a bajos niveles de O₂, por lo que se han sugerido complejos mecanismos de reciclamiento del N₂O en los límites óxicos/subóxicos de las ZMO que involucran el uso de productos

intermediarios comunes a ambos procesos, tales como el NO y el NO_2^- (Naqvi & Noronha 1991, Yoshinari *et al.* 1997). No obstante, existe incertidumbre acerca de la contribución de cada uno de estos procesos al flujo de N_2O oceánico que permita establecer si las áreas oceánicas deficientes en oxígeno son fuente o sumidero de dicho gas.

1.2.- Importancia global de las áreas deficientes en oxígeno y caracterización de la ZMO del Pacífico Sur oriental

Las ZMO presentes a profundidades intermedias en algunos de los océanos aunque abarcan sólo ~0.1% del volumen oceánico total, tienen un papel predominante dentro del ciclo global del nitrógeno. Las ZMO proveen un área importante para la desnitrificación pelágica y para otros procesos relacionados con el ciclo del nitrógeno que requieren condiciones subóxicas y/o anóxicas, tales como la desnitrificación autotrófica, la oxidación de amonio anaeróbica (anamos) y la nitrato-amonificación. A escala global, la desnitrificación en la columna de agua representa una pérdida significativa de nitrógeno combinado desde el océano, a través de formas gaseosas como el NO , N_2O y N_2 . Estimaciones recientes sugieren que la desnitrificación en la columna de agua genera un flujo de nitrógeno fuera del océano de al menos $150 \text{ Tg N año}^{-1}$ (Codispoti *et al.* 2001). De ahí, que este proceso contribuya en forma significativa a regular la proporción O:N en la atmósfera y la bomba biológica en el océano, a través de la cual se secuestra gran parte del CO_2 atmosférico, dependiendo de la disponibilidad de NO_3^- y Fe para la producción primaria (Falkowski 1997).

En los océanos existen tres importantes áreas de desnitrificación, Océano Indico, en particular el Mar Árabe (Deuser *et al.* 1978), Pacífico Tropical Nor-Oriental (Brandhorst 1959) y Pacífico Tropical Sur Oriental (Wooster *et al.* 1965). Este último, se caracteriza por tener una de las áreas deficientes en O_2 más severas, $<22.3 \mu\text{M}$ (Kamykowski & Zentara 1990) y someras del océano (Morales *et al.* 1999, Tsuchiya 1975) asociada a la masa de agua Ecuatorial Subsuperficial (AESS) que fluye a lo largo de la costa en dirección al polo entre los 9 y 45°S, como parte de la contracorriente Perú-Chile (Wooster & Gilmartin 1960). El AESS se caracteriza por su alta salinidad, alto contenido de nutrientes y baja concentración de O_2 (Tsuchiya 1975, Wyrski 1963). El déficit de O_2 se produce por una combinación de factores físicos y biológicos. Entre los factores físicos

están los bajos niveles de O₂ preexistentes en el AESS desde su formación en el Pacífico occidental, su lenta ventilación y el alto tiempo de residencia de esta masa de agua a profundidades intermedias (Reid 1962). Mientras que entre los factores biológicos el de mayor importancia corresponde a la respiración aeróbica, a través de la cual se oxidan grandes flujos de materia orgánica producto de la alta producción primaria superficial; seguido por procesos de nitrificación y de oxidación de metales (Fe, Mn) que en conjunto pueden conducir a niveles de O₂ <2.2 μM (Farías, datos no publicados).

El Pacífico Sur oriental (PSO) se caracteriza además por poseer propiedades biogeoquímicas distintivas, que sugieren una activa participación e interacción de diversos procesos microbiológicos en las transformaciones del nitrógeno y del carbono en la columna de agua. Es así como en los bordes superior e inferior de la ZMO, con niveles de O₂ >22.3 μM, se observan altas concentraciones de N₂O y de NO₃⁻, mientras que a niveles de O₂ <11 μM, propios del núcleo de la ZMO se produce un consumo aparente de N₂O (Codispoti & Christensen 1985, Elkins *et al.* 1978, Farías *et al.* en revisión) y un déficit de NO₃⁻ asociado a la formación de un máximo de NO₂⁻ secundario subsuperficial (Brandhorst 1959, Goering & Dugdale 1966, Lipschultz *et al.* 1990, Silva & Konow 1975, Wooster *et al.* 1965). En particular en el límite superior de la ZMO Chilena (entre 50 y 90 m de profundidad) se ha observado, además, un máximo de fluorescencia secundario producto de la dominancia de bacterias fotosintéticas: *Prochlorococcus sp.* y *Synechococcus sp.*, así como la alta abundancia de procariontes no fluorescentes (Ulloa 2003), que participan activamente del reciclamiento del N y C en la base de la capa fótica. Asimismo se ha trazado una amplia área de desnitrificación en la región a través del análisis del déficit de NO₃⁻ y de los valores Redfield N:P anómalos, que se extiende entre los 100 y 400 m de profundidad a más de 300 millas de la costa y hasta los 45°S (Davies & Morales 1998, Fedele 1993, Silva 1987).

Por dichas características es que las ZMO han sido consideradas como sitios de gran actividad biológica y biogeoquímica (Wishner *et al.* 1995). En el caso de la ZMO Chilena, se ha observado, que su borde superior está sujeto a una fuerte variabilidad estacional e interanual (Morales *et al.* 1999) que afecta la distribución vertical y diversidad de especies planctónicas, micronectónicas y béntónicas (Avaria & Muñoz 1987, Morales *et al.* 1996), así como la abundancia y tasas de crecimiento del zooplancton (Escribano *et al.* 2002,

Ulloa *et al.* 2001), la fertilización de la capa fótica, la biomasa y producción secundaria bacteriana (González *et al.* 1998), las tasas de respiración microplanctónica y la proporción fotosíntesis/respiración en la capa fótica (Eissler & Quiñones 1999), entre otros. Se ha observado, además, que los bajos niveles de O₂ facilitan la actividad de la reductasa de NO₃⁻ y del sistema de transporte de electrones (González 2002).

1.3.- Factores reguladores del reciclamiento de N₂O oceánico

Como se indicó anteriormente, la desnitrificación es un proceso que puede ser muy susceptible a los cambios en los factores ambientales producto de la fuerte variabilidad en los procesos oceanográficos. De ahí que las estimaciones de la desnitrificación y del reciclamiento del N₂O en el océano, estén sujetas a variación ambiental, heterogeneidad espacial e interacción entre los diferentes factores que regulan de manera conjunta la velocidad de dichos procesos a lo largo de la columna de agua.

En este aspecto, se conoce que el O₂ es uno de los principales factores que regula la desnitrificación y por ende el reciclamiento de N₂O por esta vía, ya que el O₂ compite activamente con el NO₃⁻ como aceptor de electrones durante el metabolismo energético de la célula (Knowles 1982). A nivel celular se han observado cambios en la expresión de cada una de las enzimas reductasas (Bonin *et al.* 1989, Knowles 1982, Körner & Zumft 1989, Otte *et al.* 1996) a medida que los niveles de O₂ se incrementan. Es así como se ha observado que la reducción de NO₃⁻ en bacterias marinas se inhibe a concentraciones mayores de 250 μM O₂, siendo este paso, el menos sensible a incrementos en los niveles de O₂ (Bonin *et al.* 1989). En otros casos, las reductasas de N₂O y de NO₂⁻ son inhibidas irreversiblemente por el O₂, produciendo fuerte acumulación de esos iones en el medio (Bonin *et al.* 1989, Firestone & Tiedje 1979, Krause & Nealson 1997). Por el contrario, se ha observado que en la nitrificación, la oxidación de NO₂⁻, es más sensible a la disminución en los niveles de O₂ que la oxidación de NH₄⁺ (Helder & DeVries 1983). Por ende, la producción de N₂O a través de la oxidación de NH₄⁺ puede llegar a ser hasta de un 10% si los niveles de O₂ se reducen a ~11.5 μM (Hynes & Knowles 1984).

Ahora bien, en condiciones naturales se ha reportado que dependiendo del nivel de O₂ se puede observar incremento en la abundancia de bacterias desnitrificantes productoras de N₂O en la interfase óxica-anóxica (Brettar & Höfle 1993), consumo de N₂O por

desnitrificación en aguas subóxicas y anóxicas (Elkins *et al.* 1978, Rönner & Sörensson 1985), producción de N_2O por desnitrificación y/o oxidación de NH_4^+ en aguas hipóxicas y óxicas (Bonin *et al.* 2002, Naqvi *et al.* 2000, Rönner & Sörensson 1985) y desnitrificación dentro de microambientes en aguas oxigenadas (Bonin *et al.* 2002, Yoshinari & Koike 1994). De hecho, la distribución de N_2O en el océano es poco uniforme debido a que el reciclamiento de N_2O está ligado a factores ambientales, en especial, la distribución de O_2 a muy bajos niveles (Codispoti *et al.* 1989). Al respecto, se ha reportado que en los límites superior e inferior de las ZMO se encuentran concentraciones de N_2O de hasta $0.4 \mu M$, probablemente como producto de nitrificación y/o desnitrificación (Pierotti & Rasmussen 1980), mientras que en su núcleo con niveles de $O_2 < 4.5 \mu M$, los niveles de N_2O descienden a $< 0.01 \mu M$ producto de la fuerte desnitrificación (Elkins *et al.* 1978, Liu & Kaplan 1982). Naqvi *et al.* (2000) sugieren, además, que en áreas oceánicas donde existen fuertes gradientes de O_2 que oscilan entre niveles hipóxicos y anóxicos la desnitrificación puede ser “activada o desactivada” ambientalmente, generando fuertes cambios en el reciclamiento del N_2O , que en algunos casos llevan a saturaciones de N_2O superficial $> 8000\%$.

La concentración de O_2 también controla las condiciones redox que regulan la especiación de los metales traza en el ambiente (Chester 1996). De ahí que el cambio en los niveles de O_2 a lo largo de la columna de agua de las ZMO pueda afectar el estado de oxidación de dichos elementos traza, convirtiéndolos en un factor regulador potencial de la desnitrificación; si se considera que cada reacción de reducción es catalizada por metaloenzimas separadas dentro de la cadena respiratoria bacteriana. La desnitrificación requiere de Mo en la reductasa de NO_3^- ; Fe, Cd o Cu en la reductasa de NO_2^- ; Fe en la reductasa del NO y Cu en la reductasa de N_2O (Page & Ferguson 1997, Zumft 1997). Últimamente, se ha reportado que tanto el Cu como el Fe pueden regular el crecimiento y la producción de diferentes óxidos de nitrógeno producto de la desnitrificación (Granger & Ward 2004). Así que, dependiendo de la concentración relativa de dichos metales traza en el ambiente, pueden depender las tasas de desnitrificación y la producción relativa de sus productos iónicos o gaseosos, que pueden llevar a altas concentraciones de NO_3^- , NO_2^- o N_2O en el agua. En este sentido, se ha observado que la limitación por Cu es responsable de la acumulación de N_2O en cultivos puros (Granger & Ward 2004). De tal forma que,

mientras altas concentraciones de Fe biodisponible en las ZMO (Hong & Kester 1986, Lewis & Landing 1991) pueden facilitar la formación de algunos productos intermediarios dentro de la desnitrificación; las bajas concentraciones de Cu disuelto, en cambio, podrían tener un efecto limitante. Además de las diferencias en la especiación química en áreas subóxicas, también existen diferencias en el aporte externo de metales traza al océano, que han llevado a considerar a las áreas de surgencia costera como ambientes limitados por Fe (Dezileau *et al.* 2004, Hutchins *et al.* 2002), lo que por ende podría restringir tanto la productividad primaria en la superficie, como la desnitrificación en la ZMO subyacente.

Otro de los factores limitantes de la desnitrificación es la disponibilidad de aceptores y dadores de electrones (Knowles 1982). En cultivos puros se ha podido determinar que la desnitrificación requiere de la presencia secuencial de NO_3^- , NO_2^- , NO y N_2O para que el proceso completo de reducción tenga lugar; convirtiéndolos a su vez en factores limitantes de su propia reducción (Körner & Zumft 1989, Ye *et al.* 1994, Vollack & Zumft 2001). También se ha observado que la producción de N_2O es regulada a través del efecto diferencial que sobre las reductasas bacterianas tienen diferentes compuestos orgánicos oxidados (Knowles 1982); y que la reducción de N_2O es regulada por el uso de aceptores de electrones más oxidados cuando el carbono orgánico (CO) es limitante (Betlach & Tiedje 1981).

En el caso de las áreas oceánicas, la disponibilidad de aceptores y dadores de electrones para la desnitrificación depende de una combinación de procesos físicos y biológicos. Es así como el suministro de NO_3^- dependerá de la concentración de nutrientes preformados en la masa de agua, de su advección horizontal ó vertical, del aporte antropogénico a través de los ríos, y de los procesos de nitrificación, reducción asimilativa y desasimilativa que tengan lugar (Codispoti *et al.* 1989, Cohen & Gordon 1978, Deutsch *et al.* 2001, Lipschultz *et al.* 1990, Wooster *et al.* 1965); mientras que la provisión de CO está sujeta al flujo del material particulado desde la superficie y de su eficiente remineralización en la columna de agua bajo condiciones subóxicas (Pantoja *et al.* 2003, Van Mooy *et al.* 2002). En el PSO no existen estudios sobre la variabilidad temporal y efecto de diversos factores ambientales sobre la desnitrificación, pero en otros ambientes hipóxicos se ha reportado que el suministro de NO_3^- antropogénico puede incrementar la producción de N_2O por desnitrificación en áreas costeras (Naqvi *et al.* 2000) y que la desnitrificación

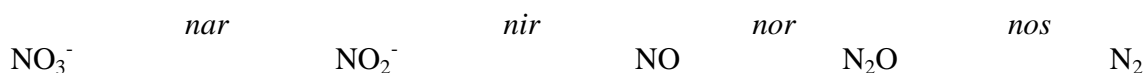
puede estar limitada por la disponibilidad de NO_3^- o por la proporción N/C en el ambiente, determinando la dominancia de la desnitrificación o de la nitrato amonificación en la columna de agua (Rönnner & Sörensson 1985). Ahora bien, con respecto al efecto de la disponibilidad de CO, se ha observado que la ocurrencia, tasas y composición de los productos gaseosos de la desnitrificación (N_2O y N_2), así como la abundancia de bacterias desnitrificantes en la haloclina y en la interfase óxica-anóxica puede ser regulada por su suministro (Brettar & Höfle 1993, Brettar & Rheinheimer 1992). De tal forma que el suministro de CO puede llegar a ser tan o más importante que el suministro de NO_3^- y/o los niveles de O_2 , a la hora de modular las tasas de transformación de nitrógeno en áreas hipóxicas (Lipschultz *et al.* 1990). Se ha estimado que pequeñas variaciones en el suministro de NO_3^- , CO y O_2 ocasionados por cambios en circulación, estratificación u otros factores, pueden duplicar la tasa de desnitrificación regional en el PSO (Codispoti *et al.* 1989). Dichos cambios oceanográficos pueden asociarse principalmente a perturbaciones intra-estacionales (ondas atrapadas a la costa) e interanuales (El Niño) generadas en el ecuador (Enfield *et al.* 1987, Shaffer *et al.* 1997) que afectan comúnmente al PSO y cuya frecuencia parece haber sido incrementada por la actividad antropogénica, alterando aún más el clima del planeta (Codispoti *et al.* 2001).

1.4.- Diversidad de bacterias desnitrificantes en el océano

En principio es muy poco lo que se conoce respecto de la diversidad de las bacterias desnitrificantes en el océano y particularmente en áreas deficientes en oxígeno. Además, la relación entre los procesos medidos y parámetros como diversidad y abundancia de grupos bacterianos responsables de los mismos en el océano, es uno de los aspectos más pobremente analizados debido a las dificultades técnicas para la manipulación de microorganismos en campo y en laboratorio.

En las últimas décadas se han desarrollado diversas técnicas de biología molecular, reemplazando los métodos tradicionales de aislamiento y cultivo, que permiten analizar la diversidad bacteriana en muestras ambientales. Por ejemplo, la amplificación de regiones del ADN ribosomal 16S en combinación con la electroforesis en geles con gradiente y denaturantes (Muyzer *et al.* 1996), han permitido estudiar la presencia y abundancia relativa de bacterioplancton en áreas subóxicas, incluidas las *Archaea*, las bacterias

reductoras de SO_4^- y las nitrificantes (Muyzer *et al.* 1993, Teske *et al.* 1996). Sin embargo, como las bacterias desnitrificantes son filogenéticamente diversas, la única forma de analizarlas es a través del uso de los genes funcionales que codifican para la producción de las enzimas desnitrificantes o reductasas de NO_2^- , NO y N_2O , denominados genes *nir* (*nirS* y *nirK*), *nor* (*norB*) y *nos* (*nosZ*) respectivamente (Zumft 1997), como se muestra en el diagrama siguiente.



Los genes *nir* y *nos* son los mejor conocidos y más usados hasta ahora para estudiar la comunidad desnitrificante en muestras ambientales. De hecho, estos genes han sido usados para cuantificar bacterias desnitrificantes en aguas dulces y sedimentos (Michotey *et al.* 2000) y para analizar la diversidad de comunidades desnitrificantes en aguas subterráneas (Yan *et al.* 2003), suelos (Priemé *et al.* 2002, Rösch *et al.* 2002), agregados de cianobacterias (Toumainen *et al.* 2003), sedimentos de lagos y ríos (Braker *et al.* 1998, Grüntzig *et al.* 2001, Taroncher-Oldenburg *et al.* 2003) y sedimentos estuarinos (Nogales *et al.* 2002). Particularmente, la diversidad del gen *nirS* se ha explorado en sedimentos marinos del Pacífico noroeste (Braker *et al.* 2000, 2001) y Pacífico mexicano (Liu *et al.* 2003), así como en la columna de agua del mar Árabe (Jayakumar *et al.* 2004). De igual forma este tipo de estudios han permitido determinar que la composición de bacterias desnitrificantes en diferentes áreas, está relacionada con factores ambientales, como O_2 , NO_2^- , NO_3^- , CO, y salinidad (Jayakumar *et al.* 2004, Liu *et al.* 2003, Taroncher-Oldenburg *et al.* 2003). Tales estudios refuerzan observaciones previas que muestran que la diversidad de bacterias desnitrificantes varía en relación con cambios en los niveles de O_2 y disponibilidad de sustratos (Betlach & Tiedje 1981, Bonin *et al.* 1989, Devol 1978, Firestone & Tiedje 1979, Zumft 1997) y que de la distribución y abundancia de las comunidades desnitrificantes, dependerán las tasas de desnitrificación que regulan la producción de N_2O en áreas subóxicas (Brettar & Höfle 1993).

Desde esta perspectiva que describe tanto, la estrecha relación entre los factores ambientales y aspectos como diversidad, abundancia y actividad de bacterias desnitrificantes, así como, las peculiaridades biogeoquímicas de la ZMO del PSO que la caracterizan como un área de fuerte desnitrificación y flujo de N_2O hacia la atmósfera; es

que se generan las preguntas base para el desarrollo de este trabajo: ¿Cuál es la importancia de la desnitrificación en el reciclaje de N_2O en ésta área?, ¿Está el reciclaje de N_2O controlado por factores ambientales? y ¿Varía la diversidad genética de las bacterias desnitrificantes, consideradas las principales responsables del reciclaje del N_2O , en relación con los factores ambientales?

Las hipótesis de trabajo que serán contrastadas son:

H1: El reciclaje de N_2O en la zona de mínimo oxígeno frente al norte de Chile está dominado principalmente por el proceso de desnitrificación.

H2: El gradiente de O_2 dentro de la zona de mínimo oxígeno determina la presencia de diferentes grupos de bacterias desnitrificantes en la columna de agua, cada uno con capacidad limitada para metabolizar determinados aceptores de electrones, regulando así las tasas de producción y consumo neto de N_2O .

El objetivo general de este trabajo es: Determinar la contribución de la desnitrificación a la producción y/o consumo de N_2O y su relación con la diversidad genética de bacterias desnitrificantes en la ZMO del norte de Chile.

Los objetivos específicos son:

- Determinar la proporción de N_2O que se recicla por desnitrificación en la ZMO a través de técnicas indirectas que involucran el uso de inhibidores específicos de la actividad enzimática. (ver manuscrito 1: Influencia del O_2 y disponibilidad de sustratos sobre el reciclaje de N_2O por desnitrificación a lo largo de la oxiclina superior frente al norte de Chile y manuscrito 2: Reciclamiento del N_2O en el núcleo de la zona de mínimo oxígeno frente al norte de Chile).

- Estudiar el efecto de diferentes aceptores de electrones y niveles de O_2 sobre las tasas de consumo y/o producción neta de N_2O . (Ver manuscrito 1 y 2).

- Determinar si la distribución de N_2O en la columna de agua se relaciona con cambios en la diversidad genética de la comunidad bacteriana desnitrificante por medio del estudio de los genes funcionales *nirS* y/o *nosZ*. (Ver manuscrito 3: Comunidades de desnitrificadores tipo *nirS* en la columna de agua de la zona de mínimo oxígeno del Pacífico Sur oriental).

2.- MATERIALES Y METODOS

2.1.- Área de estudio

La ZMO frente al norte de Chile, se encuentra bajo un área costera muy productiva donde se reportan valores de producción primaria de 0.5 a 3 g C m⁻² día⁻¹ (Daneri *et al.* 2000). Dicha productividad es causada por eventos de surgencia costera, en los cuales asciende el AECS a la zona fótica y fertiliza la zona a lo largo del año con máxima intensidad durante el verano y mínima intensidad durante el invierno (Blanco *et al.* 2001). Entre los principales focos de surgencia en el área, se encuentran Iquique (21°S) y Antofagasta (23°S) (Fonseca & Farías 1987), que fueron escogidos como los lugares de estudio por presentar ZMO subyacentes intensas y someras, donde se han observado además, fuertes gradientes en sus características físico-químicas.

Para el desarrollo de los experimentos se trabajó con muestras de agua tomadas de la oxiclina superior y del núcleo de la ZMO (NZMO), debido al contraste en la distribución de nutrientes (NO₃⁻, NO₂⁻) y gases (N₂O y O₂) observado entre ellas. En la oxiclina superior se observa un fuerte gradiente en los niveles de O₂ que van desde 50 a 9 μM entre los 40 y 80 m de profundidad y la formación de un máximo de N₂O subsuperficial de hasta 0.4 μM (Farías *et al.* en revisión); de tal forma que la ZMO está inmersa dentro de la capa fótica. En la base de dicha oxiclina (BO) surge un máximo de NO₂⁻ subsuperficial, asociado a un déficit de NO₃⁻. La presencia permanente de estas dos últimas características en la BO permiten delimitar el borde superior del NZMO (Farías *et al.* en revisión, Morrison *et al.* 1999). Además, a esta profundidad es usual encontrar una alta abundancia de cianobacterias (*Prochlorococcus sp.* y *Synechococcus sp.*) y de procariontes no fluorescentes (Uilooa 2003). Por otra parte, el denominado NZMO se

extiende entre los 100 y ~400 m de profundidad y se caracteriza porque los niveles de O_2 pueden descender hasta $<2.2 \mu M$. A esta profundidad se observan los mayores niveles de NO_2^- ($12-20 \mu M$) y los más bajos niveles de NO_3^- ($<4 \mu M$) y de N_2O ($<0.01 \mu M$), (Farías *et al.* en revisión).

2.2. - Cruceros oceanográficos y enfoque metodológico

Los muestreos fueron realizados en dos estaciones costeras (ABGQ y CHBGQ) y una estación oceánica (CH120) durante el verano 2002-2003. Durante el crucero DORMIDO (Diciembre 2002) se muestreó en la estación ABGQ frente a Antofagasta a bordo de la embarcación R/V Purihaalar y durante el crucero CHUPS (Marzo 2003) se muestreó en las estaciones CHBGQ y CH120 frente a Iquique a bordo del R/V Abate Molina (Figura 2). Durante los muestreos se hicieron perfiles verticales de O_2 , temperatura y salinidad a través de un sensor o CTDO, ajustado a una roseta de muestreo con 10 botellas Niskin de 5 litros que fue usada para tomar las muestras de agua de mar requeridas para el análisis de nutrientes (NO_3^- , NO_2^- , PO_4), gases (O_2 y N_2O) y ADN bacterial, así como para el desarrollo de los experimentos de incubación en laboratorio.

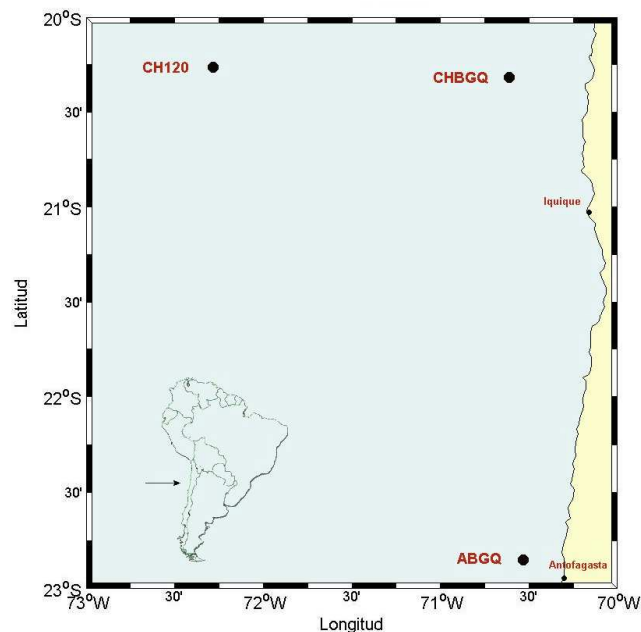


Figura 2. Ubicación de las estaciones de muestreo.

2.2.1.- Determinación de la proporción de N₂O que se recicla por desnitrificación bajo diferentes condiciones ambientales

En este caso, el diseño experimental incluyó técnicas indirectas que involucraron el uso de inhibidores enzimáticos que permitieron determinar:

- La cantidad de N₂O que es reciclado a niveles de O₂ *in situ*, en la parte media de la oxiclina, la BO (Manuscrito 1) y en el NZMO (Manuscrito 2).
- El efecto tanto del descenso en los niveles de O₂ hasta anoxia (0 μM), como de su ascenso a condiciones hipóxicas (22.3 μM) sobre dicho reciclamiento, en la parte media de la oxiclina, la BO (Manuscrito 1) y en el NZMO (Manuscrito 2).
- El efecto de la adición de aceptores (NO₃⁻, N₂O ó NO₂⁻) y dadores (materia orgánica disuelta) de electrones sobre la producción y consumo de N₂O en la BO (Manuscrito 1) y en el NZMO (Manuscrito 2).

Para determinar las tasas de producción (N₂O_{pd}) y consumo (N₂O_{cd}) de N₂O por desnitrificación, así como su producción por nitrificación (N₂O_{pn}), se combinó el uso del acetileno (Firestone & Tiedje 1979) y la aliltiúrea o ATU (Ginestet *et al.* 1998) en los experimentos, dado que éstos son inhibidores específicos, o de la reducción de N₂O (caso del acetileno) o de su producción vía amonio mono-oxigenasa (caso del acetileno y ATU). Los experimentos se realizaron bajo atmósfera de N₂ para no alterar los niveles de O₂ *in situ*. El burbujeo con N₂ o con una mezcla de O₂-N₂ fue usado para inducir la anoxia o para mantener un 8% (~22.3 μM) de saturación de O₂ (considerando la temperatura y salinidad del agua de mar). Las tasas de producción y consumo de N₂O, NO₃⁻ y NO₂⁻ fueron estimadas a partir del análisis de regresión lineal de los cambios en la concentración de cada ión durante 12 horas de incubación.

2.2.2.- Análisis de la diversidad genética de bacterias desnitrificantes en la ZMO

En primera instancia y para poder estudiar la composición (riqueza y abundancia) de las comunidades desnitrificantes en el área, se requirió del uso de varias técnicas de biología molecular que incluyeron:

- La extracción del ADN bacteriano desde muestras que fueron colectadas sobre filtros de membrana durante el trabajo de campo.

- La estandarización del método de amplificación a través de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), del gen funcional *nirS* en muestras de la columna de agua.

- El análisis del polimorfismo de los fragmentos largos de restricción terminal fluorescente (PFLRT), obtenidos luego de la digestión con las enzimas MspI, HhaI y TaqI, en un secuenciador de ADN automático.

De acuerdo con la altura de cada fragmento y el número de fragmentos observados en los electroforogramas, se pudo determinar la abundancia relativa y riqueza del gen *nirS*, en diferentes profundidades y estaciones de muestreo. Ambos parámetros fueron usados para estimar la diversidad de especies a través del Índice de Simpson, analizar la similaridad entre comunidades usando el coeficiente de Jaccard y estudiar la relación entre la composición de los genes *nirS* y los parámetros ambientales prevalentes en la columna de agua, a través del análisis de correspondencia canónica (Manuscrito 3).

En paralelo y para determinar la filiación genética y similaridad de los genes *nirS* presentes en la ZMO Chilena, con aquellos reportados en otras áreas y aquellos reconocidos como organismos desnitrificantes, se hizo un análisis filogenético de las secuencias obtenidas a partir de experimentos de clonamiento de los amplicones *nirS*, con muestras procedentes de la BO y el NZMO (Ver Manuscrito 3).

3.- RESULTADOS

3.1.- Influencia del O₂ y disponibilidad de sustratos sobre el reciclaje del N₂O por desnitrificación a lo largo de la oxiclina superior frente al norte de Chile (Manuscrito 1).

La ZMO frente a Chile es considerada como una importante área de producción y flujo de N₂O hacia la atmósfera, con un impacto global potencial. Para estimar la importancia de la desnitrificación en el reciclaje de N₂O y determinar el papel del O₂ y de la disponibilidad de sustratos sobre dicho reciclaje, se midieron tasas de N₂O_{pd} y N₂O_{cd} a lo largo de la oxiclina superior frente al norte de Chile. Dichas tasas se midieron bajo condiciones de O₂ *in situ* y anoxia; así como, después de la adición de aceptores (NO₂⁻ o NO₃⁻) y dadores de electrones (glucosa y acetato de sodio), usando el método de inhibición con acetileno. La desnitrificación parcial de N₂O a N₂ (o N₂O_{pd} – N₂O_{cd} > 0), tuvo lugar en aguas de la oxiclina media (~48.5 μM O₂), a tasas de 0.47 μM d⁻¹, mientras que la desnitrificación total medida a través de la reducción completa del N₂O (o N₂O_{pd} – N₂O_{cd} ≤ 0), fue observada en la BO (a ~14.2 μM O₂ y anoxia) a tasas de hasta 1 μM d⁻¹. La disponibilidad de NO₂⁻ más CO y no del NO₃⁻, limitó levemente el reciclamiento de N₂O en la BO. Al parecer, la toma activa de NO₂⁻ por varios microorganismos, puede ser la responsable de los muy bajos niveles observados a esta profundidad; a diferencia del NZMO, donde una fuerte acumulación de NO₂⁻ es observada típicamente. Nuestros resultados sugieren que las fluctuaciones de O₂ más que la disponibilidad de sustratos a lo largo de la oxiclina superior, podrían impactar fuertemente tanto la proporción de N₂O/N₂ que es reciclada a través de la desnitrificación, así como la magnitud del flujo de N₂O oceánico hacia la atmósfera.

3.2.- Reciclamiento del N₂O en el núcleo de la zona de mínimo oxígeno frente al norte de Chile (Manuscrito 2).

La ZMO del PSO es una de las más importantes áreas de desnitrificación en el océano. Dicho proceso a su vez, es considerado como uno de los más relevantes en el reciclamiento del N₂O en esta región. El objetivo de este estudio fue determinar cómo

diferentes niveles de O_2 y la disponibilidad de aceptores y dadores de electrones afectan el reciclamiento del N_2O en el NZMO. Las tasas de N_2O_{pd} (tratamientos con acetileno) y de N_2O_{pn} (tratamientos con ATU), así como las tasas de N_2O_{cd} fueron determinadas bajo condiciones de O_2 *in situ*, anoxia ($\sim 0 \mu M O_2$) e hipoxia ($\sim 22.3 \mu M O_2$) y condiciones experimentales potenciales (con adición de sustratos). La tasa de producción de N_2O total ($N_2O_{pd} + N_2O_{pn}$) fue de $\sim 2.62 \mu M d^{-1}$ a niveles de O_2 *in situ* ($\sim 4.6 \mu M$). La desnitrificación fue responsable de más del 92% de la producción de N_2O total y la nitrificación de al menos un 8%. Prácticamente el 100% del N_2O producido fue a su vez consumido por desnitrificación. El NO_3^- fue reducido dos veces más rápido que el NO_2^- . Las tasas de N_2O_{pd} y N_2O_{cd} decrecieron en más de 90% bajo anoxia. En esta condición, se estimó una tasa de desnitrificación de $0.2 \mu M d^{-1}$. La reducción de NO_3^- fue similar a la cuantificada a niveles de O_2 *in situ*, mientras que una alta tasa de acumulación de NO_2^- fue observada bajo anoxia. Contrariamente, incrementos en los niveles de O_2 ($\sim 22.3 \mu M$) duplicaron las tasas de N_2O_{pd} . En consecuencia, la producción de N_2O_{pd} a través de la reducción de NO_2^- parece ser el proceso más sensible a las fluctuaciones de O_2 . La adición de CO y NO_3^- incrementaron levemente las tasas de N_2O_{pd} y N_2O_{cd} , mientras que la adición de N_2O incrementó abruptamente las tasas de N_2O_{cd} . El destino del NO_3^- reducido dentro del NZMO fue controlado principalmente por la concentración de O_2 e indirectamente por la disponibilidad de CO. Los resultados indican que el reciclamiento de N_2O en el NZMO podría depender de la dinámica oceanográfica del PSO que involucre cambios en los factores ambientales (O_2 y disponibilidad de NO_3^- y CO), como los observados en el área durante los ciclos de Oscilación del Sur–El Niño.

3.3.- Comunidades de desnitrificadores tipo *nirS* en la columna de agua de la zona de mínimo oxígeno del Pacífico Sur oriental.

Aunque la desnitrificación en la columna de agua subóxica es uno de los procesos de mayor relevancia en las ZMO, muy poco es lo que se sabe respecto de las comunidades involucradas en dicho proceso. Con el objetivo de conocer las comunidades desnitrificantes presentes en la ZMO frente a Chile y de analizar su distribución en relación con el gradiente químico observado en el área, se analizó su composición (riqueza y abundancia) a diferentes profundidades y en dos sitios de la ZMO Chilena (Antofagasta e Iquique) por

PFLRT, y análisis filogenético de las secuencias obtenidas a través del clonamiento del gen *nirS* amplificado por PCR. El *nirS* es un gen funcional, que codifica para la reductasa de nitrito-citocromo *cd1*, la cual cataliza la reducción de NO_2^- a NO , un paso clave de la desnitrificación. Las comunidades presentes en las dos localidades geográficas presentaron diferencias entre ellas a través de ambos análisis; y cambios en la composición genética (riqueza y abundancia de PFLRT) de la comunidad, fueron observados a lo largo de un gradiente biogeoquímico en Antofagasta. Dichos cambios, al parecer se relacionan con la distribución de O_2 , NO_3^- y NO_2^- en la columna de agua, como se indicó en el análisis de correspondencia canónica. De ahí que tales factores sean claves en determinar la distribución de la comunidad desnitrificante a lo largo del gradiente químico característico de esta ZMO. El análisis filogenético agrupó la mayoría de clones del PSO en clusters de genes distintos de esos considerados como desnitrificadores nuevos y aún no cultivados. Esos clusters *nirS* estuvieron relacionados distantemente con esos encontrados en la columna de agua del mar de Arabia, pero la distancia filogenética fue aún mayor con secuencias ambientales de sedimentos marinos o de algún otro hábitat. Estos hallazgos sugieren que condiciones ambientales similares en la ZMO del PSO y mar de Arabia provocaron el desarrollo de desnitrificadores con genotipos *nirS* semejantes a pesar de las grandes distancias geográficas.

4.- DISCUSION

4.1.- Tasas de desnitrificación en el área.

La ZMO frente a la costa Chilena se caracteriza por tener fuertes gradientes de O_2 , NO_3^- , NO_2^- y N_2O a lo largo de la columna de agua (descrita en los manuscritos 1 y 2) producto del fuerte reciclamiento biogeoquímico del nitrógeno y del carbono en el área. En términos generales, la distribución de O_2 presenta una fuerte oxiclina (50 a 9 μM de O_2) entre los 40 y 80 metros de profundidad que está asociada con un máximo de N_2O subsuperficial (de hasta 0.4 μM); mientras que en la BO a niveles de $O_2 < 15 \mu M$, se observa el incremento de NO_2^- y la disminución de NO_3^- , que permiten delimitar el NZMO (Morrison *et al.* 1999). En el NZMO, la nitrato reducción consume la mayor parte del NO_3^- conduciendo a la formación de un máximo subsuperficial de NO_2^- (9-12 μM) y a un déficit de NO_3^- (<10 μM) que se extiende con el AESS hasta los 45°S (Fedele 1993). En el NZMO se observa también la disminución aparente de N_2O (<0.01 μM) que junto con valores Redfield N:P anómalos reportados previamente (Davies & Morales 1998) han sido atribuidos a procesos de desnitrificación en esta ZMO. Tales distribuciones de NO_3^- , NO_2^- y N_2O , son consideradas como indicadores biogeoquímicos de las condiciones hipóxicas, típicas de ambientes desnitrificantes como se ha observado en el PSO (Codispoti *et al.* 1989, Elkins *et al.* 1978), en el Pacífico nororiental (Castro *et al.* 2001, Cohen & Gordon 1978) y en el mar de Arabia (Naqvi 1987, Patra *et al.* 1999, Yoshinari *et al.* 1997). Sin embargo, estas características son únicas para el PSO dado que en la ZMO del mar de Arabia y del Pacífico norte los niveles de O_2 no descienden a menos de 4.5 y 13 μM O_2 respectivamente, y se encuentran entre los 200 y 1000 metros de profundidad, donde se reportan niveles de NO_3^- (>15 μM) y de N_2O (0.02-0.04 μM) por encima de los encontrados en el PSO con máximos de NO_2^- secundario que sólo algunas veces exceden los 6 μM en el mar de Arabia (Morrison *et al.* 1999), a diferencia de lo reportado en esta área, donde se han cuantificado niveles de NO_2^- de hasta 23 μM (Codispoti *et al.* 1986).

En esta tesis reportamos las primeras cuantificaciones directas de desnitrificación en el PSO entre 20-23°S. Dichas estimaciones muestran que la desnitrificación es un proceso anaeróbico facultativo, activo a concentraciones de O_2 de hasta 48.5 μM , al contrario de lo reportado clásicamente, donde se consideraba que la desnitrificación era un proceso activo a <4 μM O_2 en ambientes naturales (Devol 1978). En esta área la desnitrificación total de

N_2O a N_2 se cuantificó a diferentes niveles de O_2 entre la BO ($<14.2 \mu\text{M O}_2$) y el NZMO ($4.4 \mu\text{M O}_2$) a tasas de hasta 1.0 y $3.6 \mu\text{M d}^{-1}$, respectivamente. Aunque estas tasas fueron estimadas sólo en dos estaciones, las estimaciones provienen de dos de las más importantes áreas de surgencia costera frente a Chile, durante el período estival, haciéndolas muy representativas para el área.

A niveles de O_2 *in situ*, se cuantificaron tasas de nitrato reducción mayores (entre 10 y $29 \mu\text{M d}^{-1}$ en el NZMO y la BO, respectivamente) que las reportadas previamente en el PSO ($<0.5 \mu\text{M d}^{-1}$, Lipschultz *et al.* 1990) que conllevaron a una acumulación de NO_2^- a ambas profundidades. Por su parte, las tasas de desnitrificación (estimadas a través de los experimentos con acetileno) mostraron que, en la BO la desnitrificación sucede a menores tasas ($0.4 - 1.0 \mu\text{M d}^{-1}$) que las medidas en el NZMO ($1.6 - 3.6 \mu\text{M d}^{-1}$). Estas diferencias en actividad desnitrificante pueden obedecer a una variación en factores ambientales como el O_2 y la disponibilidad de aceptores y dadores de electrones a lo largo de la columna de agua, que pueden haber determinado cambios en la abundancia bacteriana y la actividad desnitrificante, al igual que se ha observado en otras áreas subóxicas (Brettar & Rheinheimer 1992, Naqvi *et al.* 1993, Rönner & Sörensson 1985). Las tasas determinadas en la BO son similares a esas reportadas en otras áreas subóxicas (usando también la técnica de inhibición con acetileno) tales como el Mar de Arabia con $0.11 \mu\text{M d}^{-1}$ (Naqvi *et al.* 1993), aguas de la plataforma India con $0.3 \mu\text{M d}^{-1}$ (Naqvi *et al.* 2000) y el mar Báltico con $0.14 \mu\text{M d}^{-1}$ (Brettar & Rheinheimer 1992). Por el contrario, las tasas de desnitrificación determinadas en el NZMO bajo condiciones de O_2 *in situ* (hasta de $3.6 \mu\text{M d}^{-1}$) distan en dos órdenes de magnitud ($13 \text{ g N m}^3 \text{ año}^{-1}$) de esas estimadas para el PSO por Codispoti *et al.* (1989) entre $10-25^\circ\text{S}$ ($0.17 \text{ g N m}^3 \text{ año}^{-1}$).

La gran diferencia entre estas estimaciones puede obedecer a varios factores; uno de ellos es que las tasas de desnitrificación medidas durante nuestro estudio (a través de la acumulación de N_2O generada por la inhibición de la N_2O reductasa por el acetileno) pueden haber sido sobreestimadas en el caso de contaminación de las muestras con O_2 , lo que puede conllevar a una mayor producción de N_2O por desnitrificación como ha sido observado en experimentos con cultivos puros (Bonin *et al.* 1989). Es por esto que para propósitos comparativos tomamos las tasas de desnitrificación medidas bajo condiciones subóxicas (cercasas al límite de detección), eliminando así el posible artefacto ocasionado

por la presencia de O_2 . Tales tasas oscilaron entre $0.2-0.5 \mu M d^{-1}$, lo cual equivale a $1.0 - 2.5 g N m^3 \text{ año}^{-1}$. Estas tasas, sin embargo, difieren en un orden de magnitud respecto de las estimaciones previas para el PSO, probablemente por diferencias entre los métodos de estimación. Es así como las tasas de desnitrificación medidas en la ZMO del Perú, que hasta ahora ha sido el sitio más estudiado en el PSO, fueron determinadas a través de valores de integración del déficit de NO_3^- en la columna de agua por Codispoti *et al.* (1989). Al parecer este método puede subestimar la remoción de NO_3^- por desnitrificación en un factor de dos, dado que se pueden excluir reacciones e interacciones en el ciclo del nitrógeno importantes, como lo discute Codispoti *et al.* (2001). Tal es el caso de la nitrificación, proceso a través del cual se provee de aceptores de electrones a la desnitrificación. Además, las estimaciones de la desnitrificación en la columna de agua han sido escasas y cubren una limitada escala espacio-temporal, que hace difícil su comparación. También debemos tener en cuenta que las tasas de desnitrificación reportadas en este trabajo fueron determinadas durante un período de surgencia costera en el norte de Chile que pudo determinar un mayor flujo de materia orgánica al fondo y por ende mayor actividad desnitrificante. Por otra parte, tales diferencias también pueden deberse a cambios en la oxigenación de las AESS que han llevado a incrementos en las condiciones hipóxicas/subóxicas en las últimas décadas y por ende a una aceleración de las tasas de desnitrificación, como ya se observó en la ZMO Peruana en 1985 (Codispoti *et al.* 1986) y como se ha reportado también en la columna de agua de otras áreas hipóxicas como la plataforma India (Naqvi *et al.* 2000) y el Mar Báltico (Shaffer & Rønner 1984). El impacto de la actividad antropogénica sobre el cambio climático del planeta, que ha llevado a alteraciones en la circulación oceánica y atmosférica traducidas por ejemplo, en incrementos en la frecuencia de los ciclos El Niño y la Niña en el Pacífico Sur (Codispoti *et al.* 1986), así como en el aumento del ingreso de PO_4 y de NO_3^- terrígeno y eólico al océano (Codispoti *et al.* 2001), pueden ser los principales responsables de los cambios en las tasas de desnitrificación marina, sobre todo en las áreas costeras.

Nuestros resultados indican que la estimación más conservativa de desnitrificación en la columna de agua del PSO entre $20-25^\circ S$ (considerando un volumen de $3 \times 10^{13} m^3$) bordearía los $30 Tg N \text{ año}^{-1}$. Dicha estimación, sin embargo, es alta con respecto a las estimaciones realizadas recientemente para el PSO considerando el área involucrada.

(Tabla 1). Con estos resultados, es claro que, a pesar de las sobre o subestimaciones en que se haya incurrido a través de los diferentes métodos de evaluación, en la ZMO del PSO existe un gran potencial de desnitrificación en la columna de agua, que puede incrementar aún más el desbalance del nitrógeno combinado en el océano (Codispoti & Christensen 1985) y por ende el presupuesto global del nitrógeno.

Tabla 1. Estimaciones de desnitrificación en la columna de agua de las ZMO oceánicas

| Ubicación | Tg N año ⁻¹ | Autor |
|--|------------------------|-----------------------|
| Pacífico Norte y Pacífico Sur oriental (10-25°S) | 75 | Codispoti et al. 2001 |
| Mar de Arabia | 65 | Codispoti et al. 2001 |
| Mar Báltico, Mar Negro y Fosa de Cariaco | 10 | Codispoti et al. 2001 |
| Plataforma India occidental | 5 | Codispoti et al. 2001 |
| Otras áreas | 5 | Codispoti et al. 2001 |
| PSO entre (20-25°S) | 30 | Este estudio |

4.2.- Efecto del O₂ sobre el reciclamiento del N₂O por desnitrificación.

Este estudio muestra que la desnitrificación es un proceso regulado principalmente por el O₂, y que de él depende estrechamente el reciclamiento de N₂O y en parte, su distribución a lo largo de la columna de agua hipóxica (ver manuscrito 2). Es así como se observó que en la parte media de la oxiclina (40 metros) niveles de O₂ de 48.5 μM permiten la producción de N₂O a través de la reducción de NO₂⁻, pero inhiben gran parte (78%) de la reducción de N₂O, generando así, tasas de desnitrificación parcial del orden de 0.47 μM d⁻¹. Por otro lado, en la BO y en el NZMO (a 80 y 200 metros de profundidad) con 14.2 y 4.4 μM O₂ respectivamente, la desnitrificación es total (0.2-2.6 μM d⁻¹); sugiriendo una completa reducción del N₂O a N₂. Esto implica que, tanto el máximo como el mínimo de N₂O, presentes en el área de estudio, pueden ser explicados en parte por desnitrificación parcial y total respectivamente (ver manuscrito 1 y 2). Sin embargo, aunque la desnitrificación contribuye en parte a dicho máximo, sin duda la activa nitrificación (0.62 μM d⁻¹) en la BO, estaría participando también, en el reciclaje de N₂O en la ZMO (Molina *et al.* en prensa). De hecho, se ha atribuido a la nitrificación como la principal fuente de N₂O subsuperficial, a través de modelos teóricos (Codispoti *et al.* 1989), análisis isotópicos

(Kim & Craig 1990) y aproximaciones geoquímicas (Nevison *et al.* 2003). El hecho de que también en el NZMO se cuantificó la producción de N_2O a través de la nitrificación (8%), permite apoyar la idea propuesta previamente por Law & Owens (1990), Naqvi & Noronha (1991) y Naqvi *et al.* (1998) respecto de un acople entre las comunidades desnitrificantes y nitrificantes que participan en la producción de N_2O a niveles subóxicos. A la luz de los nuevos hallazgos, no se debe desconocer la probable contribución a la producción de N_2O en el área por parte de procesos como la nitrificación desnitrificante (Wrage *et al.* 2001), la nitrato amonificación (Omnes *et al.* 1996, Samuelsson & Rönner 1982) y la oxidación de amonio anaeróbica (Kuypers *et al.* 2003, Ward 2003) que han sido ya cuantificados en otras áreas subóxicas y/o anóxicas.

A través de estudios de laboratorio con cultivos puros se ha podido determinar el efecto de cambios en los niveles de oxigenación sobre la desnitrificación. Dichos estudios muestran que el O_2 regula la actividad de las reductasas desnitrificantes de manera secuencial a través de cambios en los niveles de expresión genética (Körner & Zumft 1989), que la reductasa de N_2O puede ser inhibida irreversiblemente a niveles de $O_2 >16 \mu M$ (Betlach & Tiedje 1981, Bonin & Gilewicz 1991) y que el N_2O puede ser producido por desnitrificación a concentraciones de O_2 de entre 22 y 111 μM (Lloyd *et al.* 1987, Otte *et al.* 1996, Takaya *et al.* 2003). También se ha reportado a través de estudios de laboratorio que el N_2O no es reducido totalmente en condiciones anaeróbicas (Firestone & Tiedje 1979, Körner & Zumft 1989), que la reductasa de NO_2^- es muy sensible a las fluctuaciones del O_2 , acarreado acumulación de NO_2^- y N_2O (Kester *et al.* 1997, Körner & Zumft 1989) y que la reducción de NO_3^- sucede aún en presencia del O_2 (Kester *et al.* 1997). Varias de estas observaciones fueron notadas también durante nuestro estudio como se recopila en la Tabla 2. En dicha tabla se muestra cómo el incremento en los niveles de O_2 (de 4.4 a 48.5 μM) a lo largo de la ZMO (entre el NZMO y el borde superior de la misma) regula el aumento en la reducción de NO_3^- hasta un máximo (200%), a 14 $\mu M O_2$. La reducción de NO_3^- permanece activa aún en condiciones óxicas (48.5 $\mu M O_2$), bajo la cual por el contrario, la reducción del N_2O es fuertemente inhibida (90%). Los resultados mostraron además que la anoxia no llevó a reducción total del N_2O y que la respuesta de las comunidades a dicho efecto es muy variable en el área, al igual como se ha reportado en suelos y cultivos puros (Firestone & Tiedje 1979). El NO_2^- por su parte, se acumuló en

diferente proporción a todos los niveles de O₂ (excepto a 22.3 μM) llevando a grandes variaciones (<67 a >300%) en sus tasas de acumulación y en las tasas de producción de N₂O (<70 a >1200%) sobre

Tabla 2. Tasas de reducción (-) de NO₃⁻, NO₂⁻ y N₂O, producción (+) de N₂O y fracción (%) de cambio de dichas tasas ante el incremento en los niveles de O₂ naturales o inducidos (*) en el laboratorio, en muestras agua provenientes de la ZMO frente al norte de Chile.

** valores comparados con respecto a 14.2 μM O₂.

| Proceso (μM d ⁻¹) | Nivel de O ₂ (μM) | | | | | |
|--|------------------------------|-----------------------|---------------|----------------|---------------|----------------|
| | Anoxia* | Suboxia | Hipoxia | | | Oxia** |
| | 0 | 4.4 | 6.9 | 14.2 | 22.3* | 48.5 |
| NO ₃ ⁻ reducción | -18.5 a -7.0 | -9.1 <51%, >30% | -9.8 >8% | -29.5 >200% | -45.6 >55% | -20.6 <55% |
| NO ₂ ⁻ reducción | -2.4 a +3.6 | +1.2 <67%, >150% | +3.6 >200% | +0.8 <78% | -1.7 <300% | +0.1 <87.5% |
| N ₂ O producción | 0.2 a 2.9 | 2.61 >1200%, <10% | 2.40 <9% | 0.71 <70% | 5.16 >600% | 0.60 <18% |
| N ₂ O reducción | -0.2 a -2.23 | -3.21 >1500%, >44% | -2.52 <21% | -1.36 <46% | Nd | -0.1 <90% |

todo en el cambio de la anoxia a la suboxia. Dichos resultados sugieren que la reducción de NO₃⁻, NO₂⁻ y N₂O en condiciones naturales muestran una respuesta diferencial en su expresión ante las fluctuaciones en O₂, y que la reducción de NO₂⁻ en la columna de agua hipóxica/subóxica puede ser el paso más sensible de la desnitrificación a las oscilaciones en O₂; características que son similares a las observadas previamente con cultivos puros (Firestone & Tiedje 1979, Kester *et al.* 1997, Körner & Zumft 1989). Sin embargo, la fuerte variación en las tasas de NO₂⁻ también puede estar enmascarada por su rápido reciclamiento en la columna de agua a través de procesos que llevan a la producción de N₂O por desnitrificación y desnitrificación nitrificante, la producción de NH₄⁺ por vía desasimilativa o asimilativa, la producción de NO₃⁻ por NO₂⁻ oxidación y la producción de N₂ vía oxidación de amonio anaeróbica.

Los resultados sugieren además que condiciones de anoxia, así como incrementos

en los niveles de $O_2 > 22.3 \mu M$ (dentro del NZMO), podrían llevar a fuertes alteraciones en el reciclamiento del N_2O en la columna de agua, principalmente a través de la reducción del NO_2^- (Manuscrito 2). Es así como la anoxia podría acarrear un fuerte descenso en la producción neta y en la fracción de N_2O que es producido por desnitrificación en la parte media de la oxiclina, así como una mayor acumulación de NO_2^- en el NZMO, quizá con efectos nocivos para las comunidades planctónicas. Mientras que un cambio de condiciones subóxicas ($< 4 \mu M$) a hipóxicas ($22 \mu M$) en el NZMO podría ocasionar que el N_2O en vez de ser consumido en su totalidad por desnitrificación como es observado usualmente, sea producido por desnitrificación a muy altas tasas (Tabla 2).

Aunque son pocos los estudios desarrollados en relación con el efecto de cambios en los niveles de O_2 sobre la desnitrificación en áreas subóxicas se ha reportado producción de N_2O a través de la desnitrificación parcial en el Mar Báltico (Rönner & Sörensson 1985), en aguas de la plataforma India (Naqvi *et al.* 2000) y en un estuario del Mediterráneo (Bonin *et al.* 2002). En tales casos, la reductasa de N_2O fue también inhibida a niveles de $O_2 > 22 \mu M$, a diferencia de lo observado en este estudio donde la desnitrificación parcial tiene lugar aún a $48.5 \mu M O_2$ (Manuscrito 1), corroborando que muchos desnitrificadores y quizá nitrificadores autotróficos con capacidad desnitrificante, pueden producir mayores proporciones de N_2O que de N_2 en la medida que la tensión de O_2 incrementa y que la reductasa de N_2O es inhibida (Bonin *et al.* 1989, Takaya *et al.* 2003, Wrage *et al.* 2001).

Por otra parte, en condiciones naturales las comunidades desnitrificantes pueden responder de manera diferencial a la fluctuación del O_2 dependiendo también de su estatus fisiológico, composición y abundancia; factores que a su vez estarán regulados por la disponibilidad de sustratos en cada ambiente en particular (Firestone & Tiedje 1979).

4.3.- Efecto de la disponibilidad de sustratos sobre el reciclamiento del N_2O .

En este sentido, la disponibilidad de aceptores y dadores de electrones ha sido generalmente aceptada como otro factor que regula las tasas y ocurrencia de la desnitrificación (Hattori 1983). Los resultados indican que las comunidades que reducen NO_3^- , NO_2^- o N_2O a lo largo de la columna de agua en el área de estudio, pueden estar limitados diferencialmente por dadores y aceptores de electrones como se ha observado en

otras áreas subóxicas, donde la ocurrencia, tasas y composición de los productos gaseosos e iónicos de la desnitrificación depende de su disponibilidad (Bonin *et al.* 2002, Brettar & Rheinheimer 1992, Naqvi *et al.* 2000). Es así como diferencias en la disponibilidad de NO_3^- y carbono orgánico (CO) entre estaciones pueden ser responsables de los cambios observados en la proporción producción/consumo de N_2O reciclado a través de la desnitrificación, que pueden incrementar al doble la fracción de N_2O producida por desnitrificación en el NZMO frente a las costas de Iquique, o disminuirla totalmente en el NZMO a 200 km de la costa (Manuscrito 2). De otra parte, los resultados mostraron que también los bajos niveles de N_2O presentes en el NZMO, están limitando la desnitrificación a esta profundidad (Manuscrito 2), corroborando su uso como aceptor de electrones, como se ha observado con cultivos de bacterias (Körner & Zumft 1989) y como se ha propuesto previamente para las áreas subóxicas (Codispoti & Christensen 1985, Elkins *et al.* 1978, Lipschultz *et al.* 1990). De hecho, se sabe que la reducción de N_2O es más favorable energéticamente (-81.6 kcal) que la reducción de óxidos de nitrógeno menos reducidos (Thauer *et al.* 1977) y que dicha reacción es favorecida en ambientes deficientes en O_2 y limitados por CO (Brettar & Rheinheimer 1992).

Los resultados también sugieren que en la BO, a diferencia de lo observado en el NZMO, es el NO_2^- y no el NO_3^- el que está limitando la desnitrificación, reforzando la idea de reoxidación de NO_2^- en el borde superior de la ZMO como propuso Lipschultz *et al.* (1990) y que de hecho se ha cuantificado en el área de estudio, a una tasa de $0.67 \mu\text{M d}^{-1}$ (Molina *et al.* en prensa). Adicionalmente, la probable asimilación de NO_2^- por parte de las cianobacterias, *Prochlorococcus* y *Synechococcus* (Moore *et al.* 2002) que a veces se observan a esta profundidad (Ulloa 2003) podrían contribuir con dicha limitación. Ahora bien, el incremento en la producción de N_2O luego de la adición de NO_2^- puede deberse también a que la formación de N_2O a partir de la reducción de NO_2^- es más favorable energéticamente (-73.2 kcal) que la producción de N_2O desde el NO_3^- (-46.7 kcal) como aceptor de electrones (Thauer *et al.* 1977). Estos resultados sugieren además que pueden existir bacterias en la BO que son capaces de reducir NO_2^- a N_2O como producto final, al igual como se ha observado en la interfase agua-sedimento de estuarios eutrofizados (Dong *et al.* 2002). En otras áreas hipóxicas también se ha reportado que diferencias en la disponibilidad de sustratos en la columna de agua inciden sobre la desnitrificación. Es

así como en el oeste del Mar Báltico se ha reportado que el NO_3^- limita la desnitrificación y que la adición conjunta de NO_3^- y CO conduce al predominio de la nitrato amonificación por sobre la desnitrificación (Rönner & Sörensson 1985), mientras que en la parte este del Mar Báltico se ha observado que la disponibilidad de CO y no la de NO_3^- incide sobre las tasas de desnitrificación y sobre la abundancia de desnitrificadores que producen N_2O a lo largo de la columna de agua (Brettar & Höfle 1993, Brettar & Rheinheimer 1992). En la ZMO Peruana también se ha reportado a través de estimaciones directas que la disponibilidad de CO es más importante que la concentración de O_2 para las transformaciones del nitrógeno en el área (Lipschultz *et al.* 1990), mientras que Codispoti *et al.* (1989) han calculado a través de estimaciones teóricas que variaciones de tan solo 5% y 10% en el suministro de CO y O_2 respectivamente, podrían doblar la tasa de desnitrificación en el PSO. Sin embargo, dichas apreciaciones son un tanto contrarias a lo observado a través de este estudio, dado que los resultados sugieren que aunque la disponibilidad de CO y aceptores de electrones afecta la desnitrificación y el reciclamiento de N_2O en el PSO, su efecto es menor al que puede ocasionar la fluctuación del O_2 .

Ahora bien, las diferencias observadas en la ZMO Chilena con respecto a las observaciones realizadas en otras áreas subóxicas pueden deberse a una variedad de procesos oceanográficos y biológicos que afectan diferencialmente a cada área oceánica. Entre estos está el hecho de que la ZMO frente a Chile se adentra en la zona fótica y fertiliza el área con NO_3^- durante la surgencia de AESS, haciendo de esta área una zona muy productiva; y donde el reciclamiento del carbono y del nitrógeno es muy activo. Además son varios los factores físicos, químicos y biológicos los que determinan la disponibilidad de aceptores y dadores de electrones en esta área que deben ser tenidos en cuenta. Es así como la disponibilidad de NO_3^- y NO_2^- varía en razón de los niveles preexistentes en el agua, de la entremezcla de masas de agua con diferentes niveles de nutrientes (Friederich & Codispoti 1987), de procesos de advección horizontal y vertical (Codispoti *et al.* 1989) y de la actividad conjunta de comunidades microbianas que lo utilizan en sus procesos metabólicos asimilativos o desasimilativos, o que lo remineralizan en la columna de agua.

De otro lado, la disponibilidad de CO, depende del flujo de material particulado desde la superficie o desde la costa y de su eficiente remineralización en la columna de

agua subóxica (Pantoja *et al.* 2003); mientras que la concentración de N_2O depende de las tasas de reducción de NO_2^- y N_2O , de los niveles preexistentes en el agua y de su suministro por advección horizontal y vertical, así como por difusión turbulenta o molecular a través de las oxiclina (Codispoti *et al.* 1989). Adicionalmente, existen diferencias a escala espacial (superficie-fondo, costa-océano, latitudinales) y temporal (diaria, estacional, interanual) reportadas para el área (González *et al.* 1998, Iriarte & González 2004, Morales *et al.* 1999, Morales *et al.* 2001, Pantoja *et al.* 2003, Troncoso *et al.* 2003, Ulloa *et al.* 2001) que determinan diferencias en la disponibilidad de O_2 y de sustratos, y por ende en la composición y actividad de las comunidades microbianas a lo largo de la columna de agua y entre localidades.

4.4.- Las comunidades desnitrificantes en el PSO.

En este sentido los resultados del estudio de la composición y diversidad de la comunidad desnitrificante, a través del gen funcional de la reductasa de NO_2^- -citocromo *cd1* ó *nirS*, muestran que ciertamente la composición genética de dicha comunidad (analizada a través de la riqueza y abundancia de los fragmentos largos de restricción terminal o FLRT) varía en relación con el gradiente químico observado entre la BO y el NZMO, así como entre estaciones de estudio (Manuscrito 3). En ambos casos se observó que de acuerdo con los niveles de O_2 , NO_2^- y NO_3^- presentes, varía la composición de genes *nirS* en el área de estudio. El efecto de diferencias en condiciones ambientales sobre la composición genética de comunidades desnitrificantes ha sido observado previamente en sedimentos marinos (Braker *et al.* 2001, Liu *et al.* 2003, Scala & Kerkhof 1999) y en la columna de agua del mar de Arabia (Jayakumar *et al.* 2004). Algunos de estos estudios han mostrado que factores como O_2 , NO_3^- (Liu *et al.* 2003), CO , nitrógeno inorgánico, salinidad (Taroncher-Oldenburg *et al.* 2003) y NO_2^- (Jayakumar *et al.* 2004) determinan la composición de las comunidades desnitrificantes en cada ambiente.

Los resultados sugieren que incrementos en la diversidad de genes *nirS*, en la ZMO del PSO pueden asociarse con incrementos en los niveles de NO_2^- hacia el NZMO, al igual como se ha reportado para las aguas subóxicas del Mar de Arabia (Jayakumar *et al.* 2004); no obstante, los datos también indican que la interacción de microorganismos que compiten por la toma activa de NO_2^- en la BO (manteniéndolo a niveles $<0.38 \mu M$) también están determinando la diversidad de genes *nirS* de la comunidad desnitrificante a dicha

profundidad. De ahí, que tanto factores biológicos como químicos deban ser tenidos en cuenta en este tipo de análisis.

Por otro lado, los datos muestran que así como hay FLRT-*nirS*, específicos para cada profundidad o estación, existe del mismo modo un predominio de ciertos FLRT en la columna de agua que incrementan su abundancia hacia el NZMO; sugiriendo la existencia de adaptación fisiológica de las comunidades ante el cambio en factores ambientales. Esto indicaría, por ejemplo, que el mismo grupo desnitrificante podría estar participando de la producción de N₂O en la BO y de su consumo en el NZMO, lo que explicaría que la composición genética de la comunidad desnitrificante tipo *nirS*, no cambie significativamente en relación con la distribución de N₂O observada en la columna de agua.

No obstante, el análisis filogenético de los genes *nirS*, mostró que similares parámetros químicos en la columna de agua subóxica del PSO y del mar de Arabia pueden haber generado el desarrollo de comunidades desnitrificantes hermanas a pesar de las grandes distancias geográficas. Sin embargo, el análisis filogenético también evidenció que así como en el PSO hay organismos con secuencias muy similares a la de organismos de otras áreas geográficas que sugieren su amplia distribución en el océano; también en esta área se encontraron nuevos organismos desnitrificantes, con secuencias *nirS* únicas, y que a su vez son característicos de una u otra estación costera. Estos resultados sugieren que deben existir factores ambientales adicionales a los estudiados, que están determinando la composición de las comunidades desnitrificantes tanto a lo largo de la ZMO chilena, como entre áreas subóxicas. Uno de ellos podría ser la disponibilidad de micronutrientes tales como el Cu y el Fe, esenciales para la actividad de cada una de las enzimas desnitrificantes (Zumft 1997). En este sentido al análisis filogenético refuerza esta idea, dado que la mayoría de las secuencias provenientes del NZMO y de la BO estuvieron estrechamente emparentadas con *Marinobacter sp.* y *Pseudomonas fluorescens*, organismos que producen marinobactinas (Martínez *et al.* 2000) y pioverdinas o seudobactinas (Cornelis & Matthijs 2002), reconocidos sideróforos envueltos en la toma de Fe por desnitrificadores. Dichos resultados aluden a la importancia potencial de los micronutrientes y en especial del Fe, en determinar la composición y actividad de comunidades desnitrificantes en la ZMO del PSO que se encuentra bajo una de las áreas de surgencia costera, considerada como un ambiente limitado por Fe (Dezileau *et al.* 2004, Hutchins *et al.* 2002).

4.5.- Consideraciones globales y perspectivas.

Los resultados de este estudio muestran que la tasa de reciclamiento de N_2O a través de la desnitrificación es mayor de lo que se había estimado previamente para el PSO, realzando la significancia del área para el presupuesto global del nitrógeno y del N_2O . Sin embargo, la fracción de N_2O que es reciclado por desnitrificación y que puede liberarse desde el océano a la atmósfera, está fuertemente relacionada con la variabilidad temporal y espacial de los factores ambientales que regulan dicho proceso, tal como el O_2 en primer lugar y el NO_3^- , NO_2^- y CO en segundo lugar. Es así como cambios antropogénicos que conduzcan a incrementos en el ingreso de nutrientes en aguas costeras desde la atmósfera, aguas subterráneas y escorrentía, pueden llevar al desarrollo de suboxia y anoxia en las áreas costeras acarreado significantes incrementos en la desnitrificación y en las emisiones de N_2O desde el océano. Adicionalmente, cambios en los niveles de O_2 en la ZMO producidos por diferentes procesos oceanográficos, ya sea estacionales, interanuales (ENSO), decadales o mileniales (glaciaciones) han podido afectar dicho reciclamiento, directamente a través de la desnitrificación o indirectamente a través de la nitrificación. En consecuencia, los cambios en O_2 y en el suministro de nutrientes, pueden y han podido alterar el flujo de N_2O desde el PSO a diferentes escalas espacio-temporales; afectando claramente la magnitud de las estimaciones del N_2O y/o N_2 perdido hacia la atmósfera desde esta área, con consecuencias para los modelos climáticos y para los presupuestos globales del nitrógeno.

De otra parte, el análisis genético evidenció que la desnitrificación en el océano es llevada a cabo por microorganismos que están mucho más diversificados de lo que previamente se creía y que las bacterias desnitrificantes marinas al parecer tienen un potencial de adaptación fisiológica a los cambios en las condiciones ambientales, que les permiten su activa participación en el reciclaje de nitrógeno en la columna de agua. No obstante, existen algunos grupos únicos en la ZMO del PSO que pueden desempeñar un papel específico dentro de las transformaciones del nitrógeno que aún desconocemos. De ahí que trabajos futuros deban enfocarse en el análisis particular de estas comunidades que permitan aislarlas, identificarlas y ahondar aún más en el estudio de su función y diversidad en el ambiente, de la cual hasta ahora conocemos sólo una pequeña fracción. En ese sentido se puede hacer uso de las herramientas moleculares desarrolladas para el estudio de las

proteínas (proteómica) y genes (genómica) de diversos microorganismos, tales como PCR cuantitativo, RT-PCR (que usa la transcriptasa reversa) y micro-arreglos entre muchos otros, que en la medida que sean mejoradas permitirán la detección, cuantificación y análisis de la actividad o expresión de cada uno de los genes involucrados en el ciclo del nitrógeno y específicamente en la desnitrificación y la producción de gases traza, como son los genes *nir* (NO_2^-), *nor* (NO) y *nos* (N_2O) en diferentes ambientes oceánicos. Asimismo, este estudio indica que la dinámica funcional entre los desnitrificadores y las demás comunidades microbianas responsables del reciclaje del nitrógeno en el PSO puede ser muy compleja. De ahí que se generen preguntas respecto de, cómo tales comunidades responden a las fluctuaciones temporales del ambiente químico, de la importancia de la disponibilidad de micronutrientes como el Fe y el Cu para la desnitrificación en las ZMO y de cómo la variación de los parámetros físico-químicos en las ZMO del océano inciden sobre la producción de NO , N_2O y N_2 a diferentes escalas espacio-temporales que permitan un mejor análisis de los balances globales de N_2O .

En conclusión, la ZMO Chilena posee una comunidad desnitrificante muy activa, a través de la cual el N_2O es reciclado a tasas mayores que las estimadas previamente para el PSO y para otras áreas con condiciones hipóxicas similares. Los resultados también indican que el reciclamiento del N_2O es influenciado principalmente por los niveles de O_2 y en menor grado por la disponibilidad de nutrientes, factores que pueden incidir directamente sobre las estimaciones globales del N_2O .

5.- REFERENCIAS

- Avaria S & P Muñoz 1987. Effects of the 1982-1983 El Niño on the marine phytoplankton off northern Chile. *Journal of Geophysical Research* 92:14369-14382
- Bange HW, S Rapsomanikis & MO Andreae 1996. Nitrous oxide in coastal waters. *Global Biogeochemical Cycles* 10:197-207
- Betlach MR & JM Tiedje 1981. Kinetic explanation for accumulation of nitrite, nitric oxide, and nitrous oxide during denitrification. *Applied and Environmental Microbiology* 42(6):1074-1084
- Blanco JL, AC Thomas, ME Carr & PT Strub 2001. Seasonal climatology of hydrographic conditions in the upwelling region off northern Chile. *Journal of Geophysical Research* 106(C6):11451-11467
- Bonin P & M Gilewicz 1991. A direct demonstration of corespiration of oxygen and nitrogen oxides by *Pseudomonas nautica*: some spectral and kinetic properties of the respiratory

- components. *FEMS Microbiology Letters* 80:183-8
- Bonin P, M Gilewicz & JC Bertrand 1989. Effects of oxygen on each step of denitrification on *Pseudomonas nautica*. *Canadian Journal of Microbiology* 35:1061-1064
- Bonin P, C Tamburini & V Michotey 2002. Determination of the bacterial processes which are sources of nitrous oxide production in marine samples. *Water Research* 36(3):722-732
- Braker G, A Fesefeldt & KP Witsel 1998. Development of PCR primer systems for amplification of nitrite reductase genes (*nirK* and *nirS*) to detect denitrifying bacteria in environmental samples. *Applied and Environmental Microbiology* 64:3769-3775
- Braker G, J Zhou, L Wu, AH Devol & JM Tiedje 2000. Nitrite reductase genes (*nirK* and *nirS*) as functional markers to investigate diversity of denitrifying bacteria in Pacific Northwest marine sediment communities. *Applied and Environmental Microbiology* 66:2096-2104
- Braker G, HL Ayala del Río, AH Devol, A Fesefeldt & JM Tiedje 2001. Community structure of Denitrifiers, Bacteria and Archaea along redox gradients in Pacific Northwest marine sediments by terminal restriction fragment length polymorphism analysis of amplified nitrite reductase (*nirS*) and 16S rRNA genes. *Applied and Environmental Microbiology* 67: 1893-1901
- Brandhorst W 1959. Nitrification and denitrification in the eastern tropical North Pacific. *Journal du Conseil International pour l'Exploration de la Mer* 25:3-20
- Brettar I & MG Höfle 1993. Nitrous oxide producing heterotrophic bacteria from the water column of the central Baltic: abundance and molecular identification. *Marine Ecology Progress Series* 94:253-265
- Brettar I, & G Rheinheimer 1992. Influence of carbon availability on denitrification in the central Baltic Sea. *Limnology and Oceanography* 37:1146-1163
- Butler JH, JW Elkins, CM Brunson, KB Egan, TM Thompson, TJ Conway & BD May 1987. Seasonal distributions and turnover of reduced trace gases and hydroxylamine in Yaquina Bay, Oregon. *Geochimica et Cosmochimica Acta* 51:697-706
- Capone DG 1991. Aspects of the marine nitrogen cycle with relevance to the dynamics of nitrous and nitric oxide. In: *Microbial Production and Consumption of Greenhouse Gases*. Rogers JE & WE Whitman (eds). American Society of Microbiology, Washington D.C, pp. 255-275
- Castro CG, FP Chavez & CA Collins 2001. Role of the California Undercurrent in the export of denitrified waters from the eastern tropical North Pacific. *Global Biogeochemical Cycles* 15(4):819-830
- Chester R 1996. Trace elements in the oceans. In: *Marine Geochemistry*. Chapman & Hall (eds). London, pp. 346-421
- Codispoti LA & JP Christensen 1985. Nitrification, denitrification and nitrous oxide cycling in the Eastern Tropical South Pacific Ocean. *Marine Chemistry* 16:277-300
- Codispoti LA, GE Friederich, TT Packard, HE Glover, PJ Kelly, RW Spinrad, RT Barber, JW Elkins, BB Ward, F Lipschultz & N Lostaunau 1986. High nitrite levels off northern Peru: A signal of instability in the marine denitrification rate. *Science* 233:1200-1202
- Codispoti LA, RT Barber & GE Friederich 1989. Do nitrogen transformations in the poleward undercurrent off Peru and Chile have a globally significant influence? In: *Coastal and Estuarine Studies. Poleward flows along eastern ocean boundaries*. Neshyba SJ et al. (eds). Springer-Verlag, Berlin, pp. 281-310
- Codispoti LA, JA Brandes, JP Christensen, AH Devol, SWA Naqvi, HW Paerl & T Yoshinari 2001. The oceanic fixed nitrogen and nitrous oxide budgets: moving targets as we enter the

anthropocene? *Science Marine* 65:85-105

- Cohen Y & LI Gordon 1978. Nitrous oxide in the oxygen minimum of the eastern tropical North Pacific: evidence for its consumption during denitrification and possible mechanisms for its production. *Deep-Sea Research* 25:509-524
- Cornelis P & S Matthijs 2002. Diversity of siderophore-mediated iron uptake systems in fluorescent pseudomonads: not only pyoverdines. *Environmental Microbiology* 4:787-801
- Crutzen PJ 1970. The influence of nitrogen oxides on the atmospheric ozone content. *Journal of Royal Meteorology Society* 96:320-325
- Daneri G, V Dellarossa, R Quiñones, B Jacob, P Montero & O Ulloa 2000. Primary production and community respiration in the Humboldt Current system off Chile and associated oceanic areas. *Marine Ecology Progress Series* 197:41-49
- Davies AG & CE Morales 1998. An appraisal of the stoichiometry of dissolved oxygen/nutrient inter-relationship in the upwelling system off northern Chile. *Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom* 78:697-706
- Delwiche T 1981. The nitrogen cycle and nitrous oxide. In: *Denitrification, Nitrification and atmospheric Nitrous Oxide*. Delwiche CC (ed), John Wiley, New York, pp 1-16
- Deuser WG, EH Ross & ZJ Mlodzinska 1978. Evidence for and rate of denitrification in the Arabian Sea. *Deep-Sea Research* 25:431-445
- Deutsch C, N Gruber, RM Key & JL Sarmiento 2001. Denitrification and N₂ fixation in the Pacific Ocean. *Global Biogeochemical Cycles* 15(2):483-506
- Devol AH 1978. Bacterial oxygen uptake kinetics as related to biological processes in oxygen deficient zones of the oceans. *Deep-Sea Research* 25:509-524
- Dezileau L, O Ullow, D Hebbeln, F Lamy, JL Reyss & M Fontugne 2004. Iron control of past productivity in the coastal upwelling system off the Atacama Desert, Chile. *Paleoceanography* 19(3), PA3012 10.1029/2004PA001006
- Dong LF, DB Nedwell, GJC Underwood, DCO Thornton & I Rusmana 2002. Nitrous oxide formation in the Colne Estuary, England: the central role of nitrite. *Applied and Environmental Microbiology* 68(3):1240-1249
- Eissler Y & RA Quiñones 1999. Microplanktonic respiration off northern Chile during El Niño 1997-1998. *Journal of Plankton Research* 21:2263-2283
- Elkins JW, SC Wofsy, MB McElroy, CE Kolb & WA Kaplan 1978. Aquatic sources and sinks for nitrous oxide. *Nature* 275:602-606
- Enfield D, MP Cornejo-Rodríguez, RL Smith & PA Newberger 1987. The equatorial source of propagating variability along the Perú coast during the 1982-1983 El Niño. *Journal of Geophysical Research* 92:14335-14346
- Escribano R, P Hidalgo & D Fernández 2002. Responses of zooplankton populations to the 1997/98 El Niño in the coastal upwelling zone off northern Chile: is El Niño that bad? *Investigaciones Marinas, Valparaíso* 30:109-111
- Falkowski PG 1997. Evolution of the nitrogen cycle and its influence on the biological sequestration of CO₂ in the ocean. *Nature* 387:272-275
- Farías L, A Paulmier, O Ulloa, D Ruiz Pino & M Gallegos. Strong N₂O production/consumption along oxygen minimum zone off northern Chile. *Deep Sea Research*. En revision.
- Fedele AJ 1993. Razón NO₃:PO₄ anómala, un trazador químico para la masa de agua ecuatorial subsuperficial (AESS). Tesis. Universidad Católica de Valparaíso. 134 pág.
- Firestone MK & JM Tiedje 1979. Temporal change in nitrous oxide and dinitrogen from denitrification following onset of anaerobiosis. *Applied and Environmental Microbiology* 38(4):673-679

- Fonseca TR & M Farías 1987. Estudio del proceso de surgencia en la costa chilena utilizando percepción remota. *Investigaciones Pesqueras* 34:33-46
- Friederich GE & LA Codispoti 1987. An analysis of continuous vertical nutrient profiles taken during a cold anomaly off Perú. *Deep-Sea Research* 34:1049-1065
- Ginestet P, JM Audic, V Urbain & JC Block 1998. Estimation of nitrifying bacterial activities by measuring oxygen uptake in the presence of the metabolic inhibitors allylthiourea and azide. *Applied and Environmental Microbiology* 64(6):2266-2268
- Goering JJ & RC Dugdale 1966. Denitrification rates in an island bay in the equatorial Pacific Ocean. *Science* 154:505-506
- González RR 2002. Actividad enzimática catabólica en las comunidades planctónicas y bentónicas asociadas a la zona de mínimo oxígeno en el sistema de la Corriente de Humboldt. Tesis de Doctorado Departamento de Oceanografía, Universidad de Concepción. 162 pág.
- González HE, G Daneri, D Figueroa, JL Iriarte, N Lefevre, G Pizarro, R Quiñonez, M Sobarzo & A Troncoso 1998. Primary production and its fate in the pelagic food web and deep sea and ocean-atmosphere CO₂ exchange in the northern Humbolt Current (23°S): Possible effects of the 1997-1998 El Niño in Chile. *Revista Chilena de Historia Natural* 71:429-458
- Goreau TJ, WA Kaplan, SC Wofsy, MB McElroy, FW Valois & SW Watson 1980. Production of NO₂⁻ and N₂O by nitrifying bacteria at reduced concentrations of oxygen. *Applied and Environmental Microbiology* 40:526-532
- Granger J & BB Ward 2004. Accumulation of nitrogen oxides in copper-limited cultures of denitrifying bacteria. *Limnology and Oceanography* 48(1):313-318
- Grüntzig V, SC Nold, J Zhou & JM Tiedje 2001. *Pseudomonas stutzeri* nitrite reductase gene abundance in environmental samples measured by real-time PCR. *Applied and Environmental Microbiology* 67(2):760-768
- Hattori A 1983. Denitrification and dissimilatory nitrate reduction. In: Nitrogen in the marine environment. Carpenter EJ & DG Capone (eds). Academic press, New York, pp.191-232
- Helder W & RTP DeVries 1983. Estuarine nitrite maxima and nitrifying bacteria. *Netherlands Journal of Sea Research* 17:1-18
- Hong H & DR Kester 1986. Redox state of iron in the offshore waters of Peru. *Limnology and Oceanography* 31(3):512-524
- Houghton JT, LG Meira Filho, J Bruce, H Lee, BA Callander, E Haites, N Harris & K Maskell 1995. Climate Change 1994, Radiative forcing of climate change and an evaluation of the IPCC IS92 Emission Scenarios, Cambridge University Press, New York, 200 pp.
- Hutchins DA, CE Hare, RS Weaver, Y Zhang, GF Firme, GR DiTullio, MB Alm, SF Riseman, JM Maucher, ME Geesey, CG Trick, GJ Smith, EL Rue, J Conn & KW Bruland 2002. Phytoplankton iron limitation in the Humboldt Current and Peru upwelling. *Limnology and Oceanography* 47:997-1011
- Hynes R & KR Knowles 1984. Production of N₂O by *Nitrosomonas europaea*: effects of acetylene, pH and oxygen. *Canadian Journal of Microbiology* 30:1397-404
- Iriarte JL & HE González 2004. Phytoplankton size structure during and after the 1997/98 El Niño in a coastal upwelling area of the northern Humbolt Current System. *Marine Ecology Progress Series* 269:83-90
- Jayakumar DA, CA Francis, SWA Naqvi & BB Ward 2004. Diversity of nitrite reductase genes (nirS) in the denitrifying water column of the coastal Arabian Sea. *Aquatic Microbial Ecology* 34:69-78.
- Kamykowski D & S Zentara 1990. Hypoxia in the world ocean as recorded in the historical data set. *Deep-Sea Research* 37:1861-1874

- Kester RA, W De Boer & HJ Laanbroek 1997. Production of NO and N₂O by pure cultures of nitrifying and denitrifying bacteria during changes in aeration. *Applied and Environmental Microbiology* 63:3872-3877
- Khalil MAK, RA Rasmussen & MJ Shearer 2002. Atmospheric nitrous oxide: patterns of global change during recent decades and centuries. *Chemosphere* 47:807-821
- Kim KR & H Craig 1990. Two-isotope characterization of N₂O in the Pacific Ocean and constraints on its origin in deep water. *Nature* 347:58-61
- Knowles R 1982. Denitrification. *Microbiological Reviews* 46:43-70
- Körner H & WG Zumft 1989. Expression of denitrification enzymes in response to the dissolved oxygen level and respiratory substrate in continuous culture of *Pseudomonas stutzeri*. *Applied and Environmental Microbiology* 55(7):1670-1676
- Krause B & KH Nealson 1997. Physiology and enzymology involved in denitrification by *Shewanella putrefaciens*. *Applied and Environmental Microbiology* 63:2613-2618
- Kuypers MMM, AO Sliemers, G Lavik, M Schmid, BB Jørgensen, JG Kuenen, JSS Damsté, M Strous & MSM Jetten 2003. Anaerobic ammonium oxidation by anammox bacteria in the Black Sea. *Nature* 422:608-611
- Law CS & NJP Owens 1990. Significant flux of atmospheric nitrous oxide from the northwest Indian Ocean. *Nature* 346:826-828
- Lewis BL & WM Landing 1991. The biogeochemistry of manganese and iron in the Black Sea. *Deep-Sea Research* 38:S773-S803
- Lipschultz F, SC Wofsy, BB Ward, LA Codispoti, G Friedrich & JW Elkins 1990. Bacterial transformations of inorganic nitrogen in the oxygen deficient waters of the eastern tropical south Pacific Ocean. *Deep-Sea Research* 37:1513-1541
- Liu KK & IR Kaplan 1982. Nitrous oxide in the sea off southern California. In: *The Environment of the Deep Sea*. Ernst WG & JG Marin (eds). Prentice Hall, New York, pp. 74-92.
- Liu X, SM Tiquia, G Holguín, L Wu, SC Nold, AH Devol, K Luo, AV Palumbo, JM Tiedje & J Zhou 2003. Molecular diversity of denitrifying genes in continental margin sediments within the oxygen-deficient zone off the Pacific coast of México. *Applied and Environmental Microbiology* 69:3549-3560
- Lloyd D, L Boddy & KJP Davies 1987. Persistence of bacterial denitrification under aerobic conditions: the rule rather than the exception. *FEMS Microbiology Ecology* 45:185-190
- Martínez JS, GP Zhang, PD Holt, HT Jung, CJ Carrano, MG Haygood & A Butler 2000. Self assembling amphiphilic siderophores from marine bacteria. *Science* 287:1245-47
- McElroy MB, JW Elkins, SC Wofsy & YL Yung 1976. Sources and sinks for atmospheric N₂O. *Reviews of Geophysics and Space Physics* 14(2):143-150
- Michotey V, V Méjean & P Bonin 2000. Comparison of methods for quantification of Cd₁-denitrifying bacteria in marine environmental samples. *Applied and Environmental Microbiology* 66:1564-1571
- Molina V, L Farías, Y Eissler, LA Cuevas, CE Morales & R Escibano. Ammonium recycling under the strong oxygen gradient associated with the oxygen minimum zone off northern Chile (23°S). *Marine Ecology Progress Series*. En prensa.
- Moore LR, AF Post, G Rocap & SW Chisholm 2002. Utilization of different nitrogen sources by the marine cyanobacteria *Prochlorococcus* and *Synechococcus*. *Limnology and Oceanography* 47(4):989-996
- Morales CE, M Braun, H Reyes, JL Blanco & AG Davies 1996. Anchovy larval distribution in the coastal zone off northern Chile: the effect of low dissolved oxygen concentrations and of a cold – warm sequence (1990-95). *Investigaciones Marinas (Chile)* 24:77-96

- Morales CE, SE Hormazábal & JL Blanco 1999. Interannual variability in the mesoscale distribution of the depth of the upper boundary of the oxygen minimum layer off northern Chile (18-24S): implications for the pelagic system and biogeochemical cycling. *Journal of Marine Research* 57:909-932
- Morales CE, JL Blanco, M Braun & N Silva 2001. Chlorophyll-a distribution and mesoscale physical processes in upwelling and adjacent oceanic zones off northern Chile (summer-autumn 1994). *Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom* 81:193-206
- Morrison JM, LA Codispoti, SL Smith, K Wishner, Ch Flagg, WD Gardner, S Gaurin, SWA Naqvi, V Manghnani, L Prosperie & JS Gundersen 1999. The oxygen minimum zone in the Arabian Sea during 1995. *Deep-Sea Research II* 46:1903-1931
- Muyzer G, EC de Waal & AG Uitterlinden 1993. Profiling of complex microbial populations by denaturing gradient gel electrophoresis analysis of polymerase chain reaction-amplified genes coding for 16S rRNA. *Applied and Environmental Microbiology* 59:695-700
- Muyzer G, S Hottenträger, A Teske & C Wawer 1996. Denaturing gradient gel electrophoresis of PCR-amplified 16S rDNA. A new molecular approach to analyse the genetic diversity of mixed microbial communities. *Molecular Microbiology and Ecology Manual* 3.4.4:1-23
- Najjar RG 1992. Marine biogeochemistry. In: *Climate System Modeling*. Trenberth KE (ed). Cambridge University Press, New York, pp. 241-280
- Naqvi SWA 1987. Some aspects of the oxygen deficient conditions and denitrification in the Arabian Sea. *Journal of Marine Research* 45:1049-1072
- Naqvi SWA 1991. N₂O production in the ocean. *Nature* 349:373-374
- Naqvi SWA & RJ Noronha 1991. Nitrous oxide in the Arabian Sea. *Deep-Sea Research Part A* 38:871-890
- Naqvi SWA, MD Kumar, PV Narvekar, SN De Sousa, MD George & C D'silva 1993. An intermediate layer associated with high microbial metabolic rates and denitrification in the northwestern Indian Ocean. *Journal of Geophysical Research* 98:469-479
- Naqvi SWA, T Yoshinari, DA Jayakumar, MA Altabet, PV Narvekar, AH Devol, JA Brandes & LA Codispoti 1998. Budgetary and biogeochemical implications of N₂O isotope signatures in the Arabian Sea. *Nature* 394:462-464
- Naqvi SWA, DA Jayakumar, PV Narvekar, H Naik, VVSS Sarma, W D'Souza, S Joseph & MD George 2000. Increased marine production of N₂O due to intensifying anoxia on the Indian continental shelf. *Nature* 408:346-349
- Nevison CD, JH Butler & JW Elkins 2003. Global distribution of N₂O and the N₂O-AOU yield in the subsurface ocean. *Global Biogeochemical Cycles* 17(4), 1119, doi:10.1029/2003GB002068
- Nevison CD, TJ Lueker, RF Weiss 2004. Quantifying the nitrous oxide source from coastal upwelling. *Global Biogeochemical Cycles* 18, GB1018, doi:10.1029/2003GB002110
- Nogales B, KN Timmis, DB Nedwell & AM Osborn 2002. Detection and diversity of expressed denitrification genes in estuarine sediments after reverse transcription-PCR amplification from mRNA. *Applied and Environmental Microbiology* 68:5017-5025
- Omnes P, G Slawyk, N García & P Bonin 1996. Evidence of denitrification and nitrate ammonification in the River Rhone plume (northwestern Mediterranean Sea). *Marine Ecology Progress Series* 141:275-281
- Otte S, NG Grobbsen, LA Robertson, MS Jetten & JG Kuenen 1996. Nitrous oxide production by *Alcaligenes faecalis* under transient and dynamic aerobic and anaerobic conditions. *Applied and Environmental Microbiology* 62(7):2421-2426

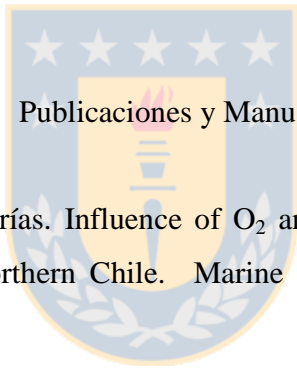
- Oudot C, C Andrie & Y Montel 1990. Nitrous oxide production in the tropical Atlantic Ocean. *Deep-Sea Research* 37:183-202
- Page MD & SJ Ferguson 1997. *Paracoccus denitrificans* CcmG is a periplasmic protein-disulphide oxidoreductase required for c- and aa 3-type cytochrome biogenesis; evidence for a reductase role in vivo. *Molecular Microbiology* 24:977-990
- Pantoja S, J Sepúlveda & HE González 2003. Decomposition of sinking proteinaceous material during fall in the oxygen minimum zone off northern Chile. *Deep-Sea Research Part I* 51:55-70
- Patra PK, Sh Lal, S Venkataramani, SN de Sousa, VVSS Sarma & S Sardesai 1999. Seasonal and spatial variability in N₂O distribution in the Arabian Sea. *Deep-Sea Research I* 46:529-543
- Payne WJ, PS Riley & JrCP Cox 1971. Separate nitrite, nitric oxide and nitrous oxide reducing fractions from *Pseudomonas perfectomarinus*. *Journal of Bacteriology* 106:356-361
- Pierotti D & RA Rasmussen 1980. Nitrous oxide measurements in the eastern tropical Pacific Ocean. *Tellus* 32:56-72
- Priemé A, G Braker & JM Tiedje 2002. Diversity of nitrite reductase (nirK and nirS) gene fragments in forested upland and wetland soils. *Applied and Environmental Microbiology* 68:1893-1900.
- Reid JL 1962. On circulation, phosphate-phosphorus content, and zooplankton volumes in the upper part of the Pacific Ocean. *Limnology and Oceanography* 7:237-306
- Rönner U & F Sörensson 1985. Denitrification rates in the low-oxygen waters of the Stratified Baltic Proper. *Applied and Environmental Microbiology* 50(4):801-806
- Rösch C, A Mergel & H Bothe 2002. Biodiversity of denitrifying and dinitrogen-fixing bacteria in an acid forest soil. *Applied and Environmental Microbiology* 68: 3818-3829.
- Samuelsson M-O & U Rönner 1982. Ammonium production by dissimilatory nitrate reducers isolated from Baltic sea water, as indicated by ¹⁵N study. *Applied and Environmental Microbiology* 44(5):1241-1243
- Scala DJ & LJ Kerkhof 1999. Diversity of nitrous oxide reductase (nosZ) genes in continental shelf sediments. *Applied and Environmental Microbiology* 65:1681-1687
- Shaffer G & U Rönner 1984 Denitrification in the Baltic proper deep water. *Deep-Sea Research* 31:197-220
- Shaffer G, O Pizarro, L Djurfeldt, S Salinas & J Rutlant 1997. Circulation and low-frequency variability near the Chilean coast: remotely forced fluctuations during the 1991-1992. El Niño. *Journal of Physical Oceanography* 27:217-235
- Silva N 1987. Contenido de sales nutrientes de las aguas de la región norte de Chile. *Ciencia y Tecnología del Mar Cona* 11:95-117
- Silva N & DH Konow 1975. Contribución al conocimiento de las masas de agua en el Pacífico sudoriental. Expedición Krill. Crucero 3-4 julio-agosto 1974. *Revista Comisión Permanente del Pacífico Sur* 3:63-75.
- Smith MS & K Zimmerman 1981. Nitrous oxide production by nondenitrifying soil nitrate reducers. *Soil Science Society of American Journal* 45:865-871
- Suntharalingam P, JL Sarmiento & JR Toggweiler 2000. Global significance of nitrous oxide production and transport from oceanic low-oxygen zones: A modeling study. *Global Biogeochemical Cycles* 14:1353-1370
- Takaya N, AB Catalan-Sakairi, Y Sakaguchi, I Kato, Z Zhou & H Shoun 2003. Aerobic denitrifying bacteria that produce low levels of nitrous oxide. *Applied and Environmental Microbiology* 69(6):3152-3157

- Taroncher-Oldenburg G, EM Griner, CA Francis & BB Ward 2003. Oligonucleotide microarray for the study of functional gene diversity in the nitrogen cycle in the environment. *Applied and Environmental Microbiology* 69:1159-1171
- Teske A, C Wawer, G Muyzer & NB Ramsing 1996. Distribution of sulfate-reducing bacteria in a stratified Fjord (Mariager Fjord, Denmark) as evaluated by most-probable number counts and denaturing gradient gel electrophoresis of PCR-amplified ribosomal DNA fragments. *Applied and Environmental Microbiology* 62:1405-1415
- Thauer R, KK Jungermann & K Decker 1977. Energy conservation in chemotrophic anaerobic bacteria. *Bacteriology Review* 41:100-180
- Tiedje JM 1988. Ecology of denitrification and dissimilatory nitrate reduction to ammonium. In: *Biology of Anaerobic Microorganisms*. Zehnder JB (ed.), Wiley-Liss, New York, pp 179-244
- Toumainen JM, S Hietanen, J Kuparinen, PJ Martikainen & K Servomaa 2003. Baltic Sea cyanobacterial bloom contains denitrification and nitrification genes, but has negligible denitrification activity. *FEMS Microbiology Ecology* 1528:1-14
- Troncoso VA, G Daneri, LA Cuevas, B Jacob & P Montero 2003. Bacterial carbon flow in the Humbolt Current System off Chile. *Marine Ecology Progress Series* 250:1-12
- Tsuchiya M 1975. Subsurface countercurrents in the eastern equatorial Pacific Ocean. *Journal of Marine Research* 33 (Suppl):145-175
- Ulloa O 2003. Photosynthesis in the oxygen minimum zone of the eastern South Pacific. In: *Abstracts of NATO advanced research workshop, past and present water column anoxia. Crimea, Ukrania*, p. 103
- Ulloa O, R Escribano, S Hormazábal, RA Quiñones, RR González & M Ramos 2001. Evolution and biological effects of the 1997-98 El Niño in the upwelling ecosystem off northern Chile. *Geophysical Research Letters* 28(8):1591-1594
- Van Mooy BAS, RG Keil & AH Devol 2002. Impact of suboxia on sinking particulate organic carbon: enhanced carbon flux and preferential degradation of amino acids via denitrification. *Geochimica and Cosmochimica Acta* 66(3):457-465
- Vollack K & WG Zumft 2001. Nitric oxide signaling and transcriptional control of denitrification genes in *Pseudomonas stutzeri*. *Journal of Bacteriology* 183:2516-2526
- Ward BB 2003. Significance of anaerobic ammonium oxidation in the ocean. *Trends in Microbiology* 11(9):408-410
- Wishner KF, CJ Ashjian, C Gelfman, MM Gowing, LA Levin, LS Mullineaux & J Saltzman 1995. Pelagic and benthic ecology of the lower interface of the eastern tropical Pacific oxygen minimum zone. *Deep-Sea Research* 42:93-115
- Wooster WS & M Gilmartin 1960. The Perú-Chile Undercurrent. *Journal of Marine Research* 19 (3):97-121
- Wooster WS, TJ Chow & I Barret 1965. Nitrite distribution in Peru current waters. *Journal of Marine Research* 23:211-221
- Wrage N, GL Velthof, ML Van Beusichem & O Oenema 2001. Role of nitrifier denitrification in the production of nitrous oxide. *Soil Biology and Biochemistry* 33:1723-1732
- Wrage N, GL Velthof, O Oenema & HJ Laanbroek 2004. Acetylene and oxygen as inhibitors of nitrous oxide production in *Nitrosomonas europaea* and *Nitrospira briensis*: a cautionary tale. *FEMS Microbiology Ecology* 47:13-18
- Wyrtki K 1963. The horizontal and vertical field of motion in the Peru current. *Bulletin of Scripps Institute of Oceanography* 8:313-346
- Yan T, MW Fields, L Wu, Y Zu, JM Tiedje & J Zhou 2003. Molecular diversity and

- characterization of nitrite reductase gene fragments (nirK and nirS) from nitrate and uranium contaminated groundwater. *Environmental Microbiology* 5:13-24
- Ye RW, BA Averill & JM Tiedje 1994. Denitrification: production and consumption of nitric oxide. *Applied and Environmental Microbiology* 60:1053-1058
- Yoshida N, H Morimoto, M Hirano, I Koike, S Matsuo, E Wada, T Saino & A Hattori 1989. Nitrification rates and ¹⁵N abundances of N₂O and NO₃⁻ in the western North Pacific. *Nature* 342:895-897
- Yoshinari T 1976. Nitrous oxide in the sea. *Marine Chemistry* 4:189-202
- Yoshinari T & I Koike 1994. The use of stable isotopes for the studies of gaseous nitrogen species in the marine environments. In: *Stable isotopes in ecology and environmental science*. Lawton JH & GE Likens (eds). Blackwell Scientific, London, pp. 114-137
- Yoshinari T, MA Altabet, SWA Naqvi, L Codispoti, A Jayakumar, M Kuhland & AH Devol 1997. Nitrogen and oxygen isotopic composition of N₂O from suboxic waters of the eastern tropical North Pacific and the Arabian Sea – measurement by continuous – flow isotope-ratio monitoring. *Marine Chemistry* 56:253-264
- Zumft WG 1997. Cell biology and molecular basis of denitrification. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 61:533-616



PARTE B



Publicaciones y Manuscritos

- 1.- Castro-González M & L Farías. Influence of O₂ and substrate on the N₂O cycling along the upper oxycline off northern Chile. Marine Ecology Progress Series (MS en revisión, Octubre de 2004).
- 2.- Castro-González M & L Farías 2004. N₂O cycling at the core of the oxygen minimum zone off northern Chile. Marine Ecology Progress Series 280:1-11.
- 3.- Castro-González M, G Braker, L Farías, O Ulloa. Communities of *nirS*- type denitrifiers in the water column of the oxygen minimum zone in the eastern South Pacific. Environmental Microbiology (MS en revisión, Octubre de 2004).



1.- Influence of O₂ and substrate on the N₂O cycling along the upper oxycline off northern Chile

Castro-González M & L Farías

Departamento de Oceanografía, Universidad de Concepción, Casilla 160-C,
Concepción, Chile

Manuscrito en revisión en Marine Ecology Progress Series, Octubre de 2004



2.- N₂O cycling at the core of the oxygen minimum zone off northern Chile.

Castro-González M & L Farías

Departamento de Oceanografía, Universidad de Concepción, Casilla 160-C,
Concepción, Chile

MS publicado en Octubre de 2004. Marine Ecology Progress Series 280:1-11



3.- Communities of *nirS*- type denitrifiers in the water column of the oxygen minimum zone in the eastern South Pacific

Castro-González M¹, G Braker², L Farías¹ & O Ulloa¹

¹Departamento de Oceanografía y Centro de Investigaciones Oceanográficas COPAS, Universidad de Concepción, Casilla 160-C, Concepción, Chile.

²Max Planck Institute for terrestrial Microbiology, Karl-von-Frisch-Strasse, D-35043

Marburg, Germany.

Manuscrito en revisión, *Environmental Microbiology* (Octubre de 2004).

