

T  
950

२१३३२



Casa abierta al tiempo

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA

DIVISIÓN DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y DE LA SALUD  
MAESTRIA EN CIENCIAS AGROPECUARIAS

CONTRIBUCIÓN DE LAS BACTERIAS FOTÓTROFAS  
ROJAS NO SULFUROSAS A LA PRODUCCIÓN  
PRIMARIA Y CARACTERIZACIÓN DE PIGMENTOS  
EN LA LAGUNA DE SONTECOMAPAN, VERACRUZ.

**T E S I S**

(IDÓNEA COMUNICACIÓN DE RESULTADOS)

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE:  
MAESTRA EN CIENCIAS AGROPECUARIAS

**P R E S E N T A :**

**BIOL. OLIVIA LAPARICIO OSORIO**

COMITÉ TUTORAL

DIRECTORA, DRA. MARIA JESÚS FERRARA GUERRERO

ASESORA, M. en C. MARÍA GUADALUPE FIGUEROA TORREZ

ASESOR DR. GILBERTO DÍAZ GONZÁLEZ

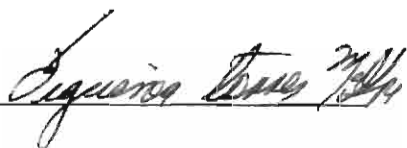
**MÉXICO, D.F. 24 MARZO 2009**

## SINODALES



M. en C. Javier Aldeco Ramirez

Presidente del jurado



M. en C. Maria Guadalupe Figueroa Torres

Secretaria



Dr. Gilberto Diaz Gonzalez

Vocal

## *DEDICATORIAS*

*DEDICADA MUY ESPECIALMENTE A MI PADRE "ISIDORO APARICIO ALVARADO" Y A MI MADRE "AURELIA OSORIO VÁZQUEZ" POR APOYARME EN TODO MOMENTO.*

*A MI QUERIDO SOBRINO "ANGEL GUILLERMO AGUILERA APARICIO" VALIÓ LA PENA EL TIEMPO INVERTIDO*

*A LA DRA. "SUSY" POR SER UNA GRAN PERSONA*

## AGRADECIMIENTO

A la **Dra. María Jesús Ferrara Guerrero**, por haberme brindado la oportunidad de seguir creciendo profesionalmente, por ser mi amiga y haberme enseñado que los sueños se alcanzan cuando uno no pierde la fe.

A la **M. en C. Guadalupe Figueroa Torres**, por todas sus enseñanzas enfocadas al crecimiento profesional y personal.

Al **M. en C. Javier Aldeco Ramírez** por toda su ayuda en el análisis estadístico para que este proyecto llegará a buenos términos, por su paciencia y enseñanzas MUCHAS GRACIAS,

Al **Dr. Luis Arturo García Hernández**, por toda su ayuda y apoyo para las salidas de muestreo y sus enseñanzas

Al **CONACYT** por la beca otorgada para llevar a cabo los estudios de Maestría en Ciencias Agropecuarias (No. de registro 198427), así como, al apoyo otorgado para la realización de los muestreos y análisis microbianos, mediante el financiamiento del proyecto 2002-39634-F/A-1, Titulado *"Influencia de la salinidad sobre la fijación no simbiótica del nitrógeno molecular y diversidad de la comunidad bacteriana microaerofílica en el complejo laguno-arrecifal de Sontecomapan, Veracruz"*. Responsable del proyecto: Dra. María Jesús Ferrara Guerrero.

Al **Dr. Gilberto Díaz González** por haber aceptado ser parte de este proyecto.

Al **Dr. Germán Mendoza Martínez** por sus consejos y enseñanzas durante el transcurso de mis estudios

Al **M. en C. A. J. Roberto Ángeles Vázquez** por su ayuda durante los muestreos y sus críticas para el mejoramiento de la tesis.

A la **M. en C. A. Vanesa Morán Villa** por su ayuda durante los muestreos realizados y por su paciencia.

A la **Dra. María Guadalupe Prado Flores** por brindarme su amistad, sus consejos y sus enseñanzas.

Al **M. en C. Alfonso Esquivel Herrera** por su ayuda y sus observaciones para el mejoramiento de la tesis.

A mis compañeros de laboratorios Gabriel, Santos de todos los Santos gracias por tus buenas críticas y por ser mi amigo, a Celene y Miguel por compartir buenos ratos, a Maria y a Erika Méndez "tu puedes".

No podía faltar la chica de JADE "**ADRIANA**" mil gracias por todo tu apoyo y ayuda y por haberte convertido en una de mis mejores amigas con la que puedo hablar de temas trascendentales.

Un agradecimiento muy especial a mis mejores amigas **MONI, GRIS, MARICRUZ, NADIA, MARIA LUISA, TETE, LAURA, AMALIA** y los que se sumaron en el desarrollo de la tesis, por su apoyo en los momentos difíciles y por que ser parte de mi tesoro.

A Lidia, a Marielena y Yolis del DEHA por toda su ayuda GRACIAS CHICAS.

## ÍNDICE

|                                                                                          |      |
|------------------------------------------------------------------------------------------|------|
| <b>RESUMEN</b>                                                                           | viii |
| <b>ABSTRACT</b>                                                                          | x    |
| <b>1. INTRODUCCIÓN</b>                                                                   | 12   |
| <b>2. MARCO TEÓRICO</b>                                                                  |      |
| 2.1. Bacterias fotótrofas rojas no sulfurosas                                            | 14   |
| 2.1.1 Metabolismo de las bacterias fotótrofas rojas no sulfurosas                        | 15   |
| 2.1.2 Importancia de las bacterias fotótrofas no sulfurosas en el ciclo del<br>nitrógeno | 18   |
| 2.1.3 Bacteriopigmentos                                                                  | 18   |
| 2.2 Biopelículas                                                                         |      |
| 2.2.1 Composición de las biopelículas bacterianas                                        | 24   |
| 2.2.2 Proceso de formación de la biopelícula                                             | 25   |
| 2.2.3 Composición de la matriz de exopolisacáridos                                       | 27   |
| 2.3 Producción primaria                                                                  | 28   |
| <b>3. JUSTIFICACIÓN</b>                                                                  | 32   |
| <b>4. HIPÓTESIS</b>                                                                      | 33   |
| <b>5. OBJETIVOS</b>                                                                      |      |
| 5.1 General                                                                              | 33   |
| 5.2 Particulares                                                                         | 33   |
| <b>6. ÁREA DE ESTUDIO</b>                                                                | 34   |
| <b>7. MATERIALES Y MÉTODOS</b>                                                           |      |
| 7.1 Análisis de parámetros físicos y químicos                                            | 36   |

|                                                                                                                                                      |    |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| 7.2 Colecta de agua intersticial para la determinación de nutrientes                                                                                 | 37 |
| 7.3 Colecta de muestras del primer centímetro de sedimento                                                                                           | 37 |
| 7.4 Trabajo de laboratorio                                                                                                                           | 38 |
| <b>8. RESULTADOS Y DISCUSIONES</b>                                                                                                                   |    |
| 8.1 Parámetros físicos y químicos                                                                                                                    | 47 |
| 8.2 Conteo del número total de células y volúmenes celulares medios y del topocobentos total (FPBT) y fotopicobacteriobentos total (FPBBT)           | 52 |
| 8.3 Biomasa total del FPBT y FPBBT                                                                                                                   | 54 |
| 8.4 Relación de la biomasa del FPBT y FPBBT y las variables físicas y químicas                                                                       | 57 |
| 8.5 Unidades formadoras de colonias de bacterias fotótrofas rojas no sulfurosas ( <i>Rhodospirillaceae</i> )                                         | 62 |
| 8.6 Aislamiento bacteriano de bacterias fotótrofas rojas no sulfurosas de la familia <i>Rhodospirillaceae</i> fijadoras de N <sub>2</sub>            | 63 |
| 8.7 Estrés al oxígeno                                                                                                                                | 64 |
| 8.8 Producción de bacteriopigmentos (bacterioclorofila <i>a</i> y carotenoides) de los aislados bacterianos fotótrofos rojos no sulfurosos obtenidos | 65 |
| <b>9. CONCLUSIONES</b>                                                                                                                               | 89 |
| <b>10. LITERATURA CITADA</b>                                                                                                                         | 91 |
| <b>11. ANEXOS</b>                                                                                                                                    | 99 |

## RESUMEN

Las bacterias fotótrofas rojas no sulfurosas son organismos procariontes unicelulares. Contienen pigmentos del tipo de la bacterioclorofila *a* y carotenoides de la serie de la espiriloxantina principalmente, por lo que los cultivos llegan a tener colores espectaculares en tonos que van del rojo, púrpura, rosa al marrón. La síntesis de los pigmentos puede ser inhibida por la presencia de altas concentraciones de oxígeno. Las bacterias fotótrofas rojas no sulfurosas aisladas en esta investigación tienen la potencialidad de fijar el nitrógeno molecular (diazótrofas) y pueden presentar un metabolismo microaerobio (bajos niveles de oxígeno).

Este grupo bacteriano junto con el fotopicobentos y fotopicobacteriobentos son potenciales productores primarios dentro de las redes tróficas bentónicas de las lagunas costeras.

El fotopicobentos, fotopicobacteriobentos y las bacterias rojas no sulfurosas se encuentran presentes dentro de los primeros milímetros de los sedimentos y forman parte de las biopelículas que se forman en la laguna de Sontecomapan, Veracruz. Esta laguna forma parte de las lagunas de ambientes tropicales bajo una moderada influencia antropogénica. Dentro de esta laguna somera existen aportes de diferentes ríos, y durante la temporada invernal es afectada por vientos fuertes a violentos del norte.

Con la finalidad de evaluar la contribución de estas comunidades autótrofas que forman parte del bacteriobentos a la producción primaria dentro del sistema, en esta investigación analizó la relación de la biomasa fotopicobacteriobentónica (FPBBT) y fotopicobentónica (FPBT) con los cambios estacionales de los factores físico y químicos y se analizaron espectrofotométricamente los bacteriopigmentos presentes en aislados bacterianos fotótrofos rojos no sulfurosos obtenidos del primer centímetro de la columna sedimentaria. En época de nortes del 2006 el valor promedio de la biomasa del FPBT fue de  $0.65 \pm 0.32 \mu\text{gCm}^{-2}$  y la del FPBBT fue  $1.1 \pm 0.77 \mu\text{gCm}^{-2}$ . En temporada de nortes en 2007 la biomasa promedio del FPBT fue de  $2.3 \pm 0.9 \mu\text{gCm}^{-2}$  y la del FPBBT de  $12 \pm 7 \mu\text{gCm}^{-2}$ . En las dos épocas de

nortes estudiadas se observó que los valores de biomasa del FPBBT fueron altos respecto a la biomasa del FPBT. En época de seca (2006) el valor promedio obtenido de biomasa del FPBT fue de  $1.9 \pm 1.6 \mu\text{gCm}^{-2}$  y la del FPBBT  $6.5 \pm 3 \mu\text{gCm}^{-2}$ . Las variables ambientales que afectaron la biomasa del FPBT y del FPBBT fue la materia orgánica ( $r=-0.51$  y  $r=-0.41$  respectivamente), el amonio ( $r=0.47$  para el FPBT y  $r=0.52$  para el FPBBT), el pH y el oxígeno solo afectaron a la biomasa del FPBBT ( $r=0.58$  y  $r=0.60$  respectivamente). La intensidad luminosa presentó una correlación de 0.51 con el FPBT.

Se obtuvieron 10 aislados bacterianos fotótrofos rojos no sulfurosos capaces de fijar el nitrógeno molecular ( $\text{N}_2$ ) bajo condiciones de microaerobiosis ( $85\text{N}_2/5\%\text{O}_2/10\%\text{CO}_2$ ). Se observó que los aislados CN23, PL17, LP21, CN21, FC23, FC22 y FC21 presentaron un crecimiento mayor cuando crecieron en condiciones de carencia de fuentes alternas de nitrógeno dentro del medio de cultivo. La síntesis de bacterioclorofila *a* y carotenoides de la serie de la espiriloxantina, licopeno,  $\beta$ -Caroteno fue mayor cuando en el medio existe una fuente alterna de nitrógeno en forma de amonio. Se observó que a concentraciones de oxígeno mayores a  $p\text{O}_2$  5% la producción de los bacteriopigmentos empieza a disminuir.

**Palabras clave.** bacterias rojas no sulfurosas, fotopicobacteriobentos, fotopicobentos, oxígeno disuelto, bacterioclorofila *a* y carotenoides.

## ABSTRACT

The phototrophic purple nonsulfur bacteria are prokaryotic unicellular organisms. Such bacteria contain pigments from the bacteriochlorophyll *a* and carotenoids from the series of spirilloxanthin mainly, reason why some cultures present amazing colours from red to purple, pink and brown. Pigments synthesis can be inhibited by the presence of high oxygen concentrations. The phototrophic purple nonsulfur bacteria isolated in this research own the ability to perform molecular (diazotrophic) nitrogen fixation and can present microaerobic metabolism (low oxygen levels).

This bacterial group, within the benthic-phototrophic and phototrophic-pico-benthic-bacteria are potential primary producers into the benthic chains from coastal lagoons.

The benthic-phototrophic, phototrophic-pico-benthic-bacteria and the phototrophic purple nonsulfur bacteria are in the first millimeters of the sediments which are part of the biofilms that are formed in Santecomapan, Veracruz lagoon. This lagoon is part of a group of tropical environmental lagoons which anthropogenic influence reminds moderate. There are different rivers waters contribute to this shallow lagoon water, along winter season it is being affected by strong to intense north winds.

In order to evaluate the contribution of this autotrophic communities which are part of the bacteriobenthos to primary production into the system, the present research analyzed the phototrophic-pico-benthic-bacteria (FPBBT) and benthic-phototrophic (FPBT) biomass relation with physical and chemical seasonal changes, the bacteriopigments present in phototrophic purple nonsulfur bacterial isolates obtained from the first centimeter from the sediment column were spectrophotometric analyzed. During north season, 2006 the range value of the FPBT biomass was  $0.65 \pm 0.32 \mu\text{gC m}^{-2}$  and the FPBBT was  $1.1 \pm 0.77 \mu\text{gC m}^{-2}$ . During the north season in 2007 the FPBT biomass range was  $2.3 \pm 0.9 \mu\text{gC m}^{-2}$  and for FPBBT was  $12 \pm 7 \mu\text{gC m}^{-2}$ . Both north seasons studied showed high biomass values for FPBBT respect to FPBT biomass. At dry season (2006) the FPBT

biomass range value obtained was  $1.9 \pm 1.6 \mu\text{gC} \cdot \text{m}^{-2}$  and for FPBBT is was  $6.5 \pm 3 \mu\text{gC} \cdot \text{m}^{-2}$ . Environmental variables affecting the FPBT biomass were organic matter ( $r = -0.51$  y  $r = -0.41$  respectively), ammonium ( $r = 0.47$  for FPBT and  $r = 0.52$  for FPBBT), FPBBT biomass was affected by pH and oxygen only ( $r = 0.58$  y  $0.60$  respectively). The luminous intensity showed a correlation of  $0.51$  with FPBT.

Ten phototrophic purple nonsulfur bacterial isolates were obtained, able to fixate molecular nitrogen ( $\text{N}_2$ ) under microaerobiosis conditions ( $85\text{N}_2/5\%\text{O}_2/10\%\text{CO}_2$ ). Isolates CN23, PL17, LP21, CN21, FC23, FC22 y FC21 that were observed, registered a mayor growth when growing in nitrogen alter sources lack conditions in culture media.

Bacteriochlorophyll *a* and carotenoides synthesis from spirilloxanthin series, licopeno,  $\beta$ -Carotene is higher when there is an alter source of nitrogen present in ammoniac form. It was observed that at oxygen concentrations higher than  $\text{pO}_2$  5% the bacteriopigmentosis it began to decrease.

**Keyword:** phototrophic purple nonsulfur bacteria, phototrophic-pico-benthic-bacteria, benthic-phototrophic, dissolver oxygen. Bacteriochlorophyll *a*, carotenoides

## 1. Introducción

Las bacterias fotótrofas rojas no sulfurosas, pertenecientes a la familia *Rhodospirillaceae* forman parte de las comunidades microbianas presentes en las biopelículas bacterianas que se forman sobre la superficie de los sedimentos lagunares costeros, son organismos procariontes capaces de crecer fotoautotróficamente, dando como resultado la producción de biomasa primaria. Son bacterias que no utilizan el azufre y no participan en el ciclo de este. Algunos géneros de bacterias fotótrofas pueden ser diazótrofes microaerobias, es decir, son organismos capaces de asimilar el nitrógeno atmosférico y de vivir con un mínimo de oxígeno. Especies como *Rhodobacter capsulatus* pueden crecer en estas condiciones presentando un crecimiento fotoautótrofo, fotoheterótrofo o quimioheterótrofo (Madigan, 1995; Imhoff, 1995). En cultivo, este grupo bacteriano presenta una gama de colores que van del violeta púrpura a morado, rojo y naranja-café, etc. Participan en el ciclo del nitrógeno, mediante la incorporación del  $N_2$  para la síntesis de compuestos orgánicos nitrogenados (Dawes, 1991) y forman parte del picobacteriobentos por lo que su talla varía entre 0.2 y 6  $\mu m$ .

Los pigmentos más frecuentes en estas bacterias son: bacterioclorofilas (*a* y *b*) y carotenoides de la serie de la espiriloxantina, la bacteriorubixantina, el  $\beta$ -caroteno, la zeaxantina, entre otros (Madigan *et al.*, 2004).

La contribución del fotopicobentos constituido por cianoprocariontes, proclorofitas y algunos eucariontes con talla de 0.2 a 2.0  $\mu m$  y del fotopicobacteriobentos constituido por bacterias autótrofas con talla de 0.2 a 2.0  $\mu m$ , en ecosistemas acuáticos puede ser evaluada a través de la estimación de su biomasa, definida como "la masa bacteriana viva disponible en un hábitat para los diferentes niveles tróficos", este parámetro es uno de los más importantes en la evaluación de la participación de estos grupos en la producción primaria bentónica en los ecosistemas costeros. Este parámetro es uno de los más importantes en la evaluación de la participación de estos grupos en la producción primaria béntica en los ecosistemas costeros (Bratbak, 1993).

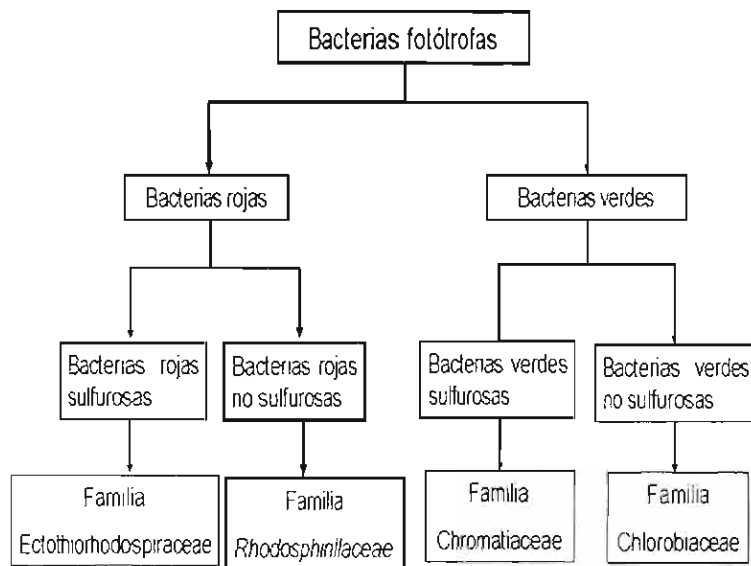
Por lo que el objetivo de esta investigación fue establecer la relación de la biomasa del fotopicobacteriobentos autótrofo total y del fotopicobentos total con respecto a factores físico y químicos e identificar los bacteriopigmentos presentes en aislados bacterianos fotótrofos rojos no sulfurosos, obtenidos del primer centímetro de la columna sedimentaria.

## 2. Marco de teórico

### 2.1 Bacterias fotótrofas rojas no sulfurosas

Las bacterias fotótrofas son organismos procariontes unicelulares divididos en dos grandes grupos en base a sus características morfológicas, fisiológica, bioquímicas y a sus pigmentos: las bacterias verdes y las bacterias rojas (figura 1), estas últimas se llaman rojas debido a que contienen pigmentos como bacterioclorofila a y diversos carotenoides que le dan a los medios de cultivos líquidos sus espectaculares colores, generalmente rojo, púrpura, rosa, marrón, etc. El grupo de bacterias rojas a su vez se divide en sulfurosas y no sulfurosa. Las bacterias rojas del azufre (familia *Ectothiorhodospiraceae*) utilizan el sulfuro de hidrógeno ( $H_2S$ ) como donador de electrones para la reducción fotosintética del  $CO_2$  y el sulfuro que es oxidado a azufre elemental ( $S^0$ ) es almacenado como gránulos de reserva dentro de las células con excepción de algunas bacterias sulfurosas que lo acumulan en el exterior de la célula, se encuentran habitualmente en zonas anóxicas de lagos bien iluminados y en hábitat acuáticos donde el  $H_2S$  se acumula. Mientras que las bacterias rojas no sulfurosas (familia *Rhodospirillaceae*) se denominan así porque inicialmente se pensaba que eran incapaces de usar sulfuros como donadores de electrones para la reducción de  $CO_2$  para la producción de biomasa primaria. Sin embargo, el sulfuro sí puede ser utilizado por la mayoría de las especies, aunque los niveles de este compuesto sean muy bajos comparados con las del azufre (Madigan, 1995; Madigan *et al.*, 2004). Además de llevar a cabo fotosíntesis anoxigénica bajo condiciones anóxicas

La familia Rhodospirillaceae está constituida por los géneros: *Rhodocyclus*, *Rhodomicrobium*, *Rhodopseudomonas*, *Rhodoferax*, *Rubrivivax*, *Rhodobacter*, *Rhodopila* y *Rhodospirillum* (Imhoff, 1995) La heterogeneidad morfológica de este grupo es muy amplia, las formas más representativas son bacilos (algunos con yemas), cocos, cocobacilos y pequeños espirilos, todas las bacterias pertenecen al grupo de las Proteobacterias alfa o beta (Pfennig y Trüper, 1981; Madigan, 1995)



**Figura 1.** Clasificación funcional de las bacterias fotótrofas (tomado de Madigan, 1995).

#### 2 1 1 Metabolismo de las bacterias fotótrofas rojas no sulfurosas

Madigan *et al.* (2004) establecieron dos grandes categorías de metabolismo energético en bacterias: a) aquel en que la fuente inicial de energía es la luz y b) aquel en que la fuente de energía es un compuesto químico. De acuerdo al primer inciso los microorganismos se pueden clasificar en: i) organismos que obtienen la energía de la luz y el carbono del dióxido de carbono (fotoautótrofo); ii) aquellos que obtiene la energía de la luz y de la oxidación de compuestos inorgánicos y el carbono del dióxido de carbono (fotoquimioautótrofo); iii) aquellos que obtienen la energía de la luz y el carbono de compuestos orgánicos (fotoheterótrofo) y por último iv) los que obtienen la energía de un compuesto químico que se oxida y el carbono de compuestos orgánicos (quimioheterótrofo), (figura 2) (Atlas y Bartha, 2000).

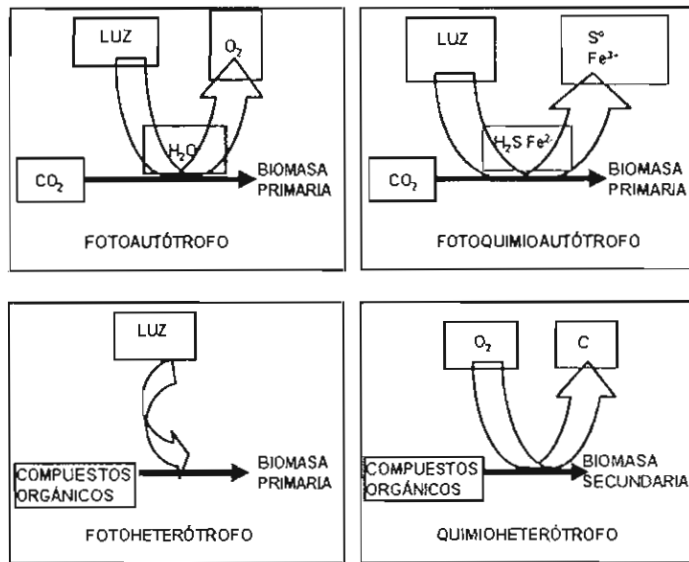


Figura 2 Tipos de metabolismos de las bacterias según su fuente de energía y de carbono (tomado de Morales, 2008)

El metabolismo fotosintético de las bacterias rojas no sulfurosas difiere del de las cianobacterias, algas y plantas verdes en que el agua no es el donador de electrones y no producen oxígeno. Las bacterias no sulfurosas foto-asimilan el dióxido de carbono a través del ciclo reductivo de las pentosas o del ciclo del ácido cítrico. La asimilación fotosintética del  $\text{CO}_2$  depende de la utilización de donadores de electrones externos, tales como compuestos reducidos de sulfuro, hidrógeno molecular o compuestos orgánicos. Una gran parte de las bacterias fotótrofas rojas no sulfurosas presentan un metabolismo fotoheterótrofo, el cual obtiene la energía de la luz y necesita compuestos orgánicos simples para su desarrollo, aunque algunas especies son capaces de desarrollarse fotoquimioautótrofamente utilizando el  $\text{H}_2$  como donador de electrones, dando como resultado la producción de biomasa primaria (Imhoff, 1995).

Algunas especies de bacterias rojas no sulfurosas son muy sensibles al oxígeno, el crecimiento de estos microorganismos es a menudo estudiado en condiciones aeróbicas, donde la disponibilidad de oxígeno molecular no es un factor limitante,

y en condiciones anaeróbicas, donde se excluye el O<sub>2</sub>. La disponibilidad de O<sub>2</sub>, por lo tanto, proporciona una señal primaria del medio para desarrollar cierto tipo de metabolismos, lo que permite al organismo utilizar C y N de fuentes diferentes (Grammel et al., 2003).

Así, especies como *Rhodobacter capsulatus* pueden presentar un metabolismo microaerobio otros son anaerobios fermentativos y/o anaerobios facultativos que pueden crecer en la oscuridad. Los organismos microaerobios utilizan el oxígeno como aceptor de hidrógeno en una vía respiratoria de producción de energía, y muestran un crecimiento óptimo a bajas concentraciones de oxígeno. La presión parcial de oxígeno necesaria para su crecimiento fluctúa entre 0.05 y 7%, debido a que dentro de su metabolismo no cuentan con la paquetería enzimática como la catalasa, la peroxidasa o superóxido dismutasa, que les ayuda a barrer los metabolitos tóxicos (Ferrara-Guerrero y Bianchi, 2000; Ferrara-Guerrero, 2002).

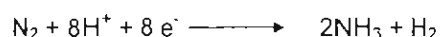
En general la mayoría de las especies son tolerantes al oxígeno y crecen bien bajo condiciones aerobias en la oscuridad, en estas condiciones la síntesis de pigmentos fotosintéticos es inhibida y los cultivos son ligeramente incoloros (Imhoff, 1995). Se ha reportado que en medios de cultivo líquido, teniendo un solo ácido orgánico como fuente de carbono y el amonio como fuente de nitrógeno hay un mayor crecimiento. Algunas especies requieren de factores de crecimiento como la biotina, tiamina, niacina, por lo que muchos compuestos orgánicos pueden ser utilizados fotosintéticamente como fuente de carbono y energía presentando un metabolismo respiratorio heterótrofo en la oscuridad (Madigan, 1993; Imhoff, 1995; Grammel et al., 2003). Los factores de crecimiento son sustancias que deben ser aportadas preformadas, ya que la bacteria que las requiere no las puede sintetizar a partir de los nutrientes más simples, por falta o ausencia de una vía metabólica.

Cuando crecen en condiciones óptimas fotoautótrofas, la gama del color de los cultivos va del violeta púrpura a morado, pasando por rojo, naranja-café, amarillo-café o verde. El diámetro de las células de los géneros varía de 0.3 a > 6 µm, son de formas bacilar, esférica, espiral, cocos, cocobacilos o vibroide, las células son

unicelulares o formas filamentosas multicelulares y su división celular es por fisión binaria (Pfennig y Tüper, 1981).

### 2.1.2. Importancia de las bacterias fotótrofas no sulfurosas en el ciclo del Nitrógeno

La disponibilidad de nitrógeno controla aspectos del funcionamiento local de los ecosistemas. A menudo el nitrógeno limita la tasa de producción primaria neta en los ecosistemas terrestres y acuáticos. La fijación biológica del  $N_2$  se define como el proceso de reducción del nitrógeno hasta amoníaco ( $NH_3$ ), el cual es transformado posteriormente a forma orgánica durante la biosíntesis celular, de acuerdo a la siguiente reacción (Brock y Madigan, 1993).



Las cianobacterias han sido consideradas por mucho tiempo, como las principales responsables de la fijación del nitrógeno, sin embargo, existen ya evidencias sobre la fijación de este por bacterias (Ferrara-Guerrero, 2002). Esta fijación directa del nitrógeno atmosférico la llevan a cabo ciertas bacterias rojas no sulfurosas a través de la incorporación de éste a compuestos orgánicos. Estudios realizados en bacterias rojas no sulfurosas han permitido conocer que especies como *Rhodobacter capsulatus*, son fijadoras de nitrógeno molecular (diazótrofas) y pueden presentar un crecimiento fotoautótrofo, fotoheterótrofo o quimioheterótrofo (Madigan, 1995; Imhoff, 1995).

### 2.1.3. Bacteriopigmentos

Entre los bacteriopigmentos presentes en las bacterias rojas no sulfurosas se encuentran diferentes bacterioclorofilas (*a* y *b*) y carotenoides de la serie de la espiriloxantina, característicos de este grupo bacteriano, y en menor proporción la astaxantina, el  $\beta$ -caroteno y la zeaxantina.

Los carotenoides se clasifican en dos grupos: los carotenos y las xantofilas, los carotenos solo contienen carbono e hidrógeno y producen una gama de coloración

del anaranjado a rojizos, mientras que las xantofilas contienen además de carbono e hidrógeno, oxígeno y producen color amarillo

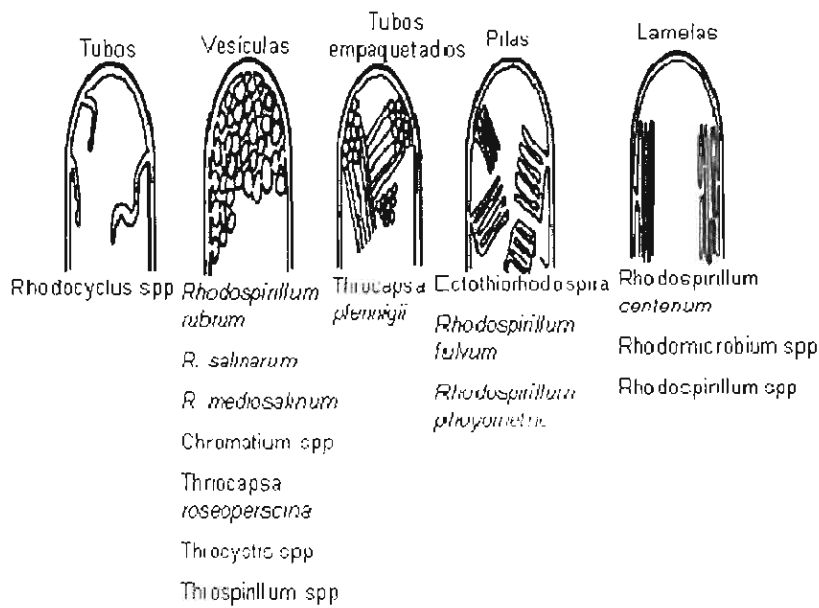
Madigan *et al.* (2004) reportaron que la presencia de los pigmentos fotosintéticos permite que diversos grupos bacterianos puedan utilizar longitudes de onda de luz diferentes, lo que les permite coexistir en un mismo hábitat; un ejemplo de ello son las bacterias verdes del azufre, las cuales pueden crecer a longitudes de onda de luz que cualquier otro fotótrofo conocido. Por otra parte, Brock y Madigan (1993) mencionan que algunos carotenoides son responsables de la pigmentación de las colonias bacterianas fotótrofas, algunos ejemplos de éstos son el  $\beta$ -caroteno y el licopeno los cuales les dan el color naranja, mientras que la espiriloxantina y el 3-4 hiroferoidenona les dan el color amarillo.

#### a) Bacterioclorofilas

Una de las principales diferencias entre las bacterias rojas y verdes consiste en la naturaleza del sistema de membranas fotosintéticas (tabla 1 y figura 3), las cuales son utilizadas para la clasificación taxonómica de estos grupos y para la identificación de determinados tipos de carotenoides. En las bacterias fotótrofas rojas los pigmentos fotosintéticos forman parte de un sistema elaborado de membranas internas, producido por la membrana plasmática con la que mantiene conexión. En algunos casos el sistema de membranas es una serie de láminas planas llamadas lamelas, mientras que en otros consiste en tubos de sección circular que se conocen como vesículas (Imhoff y Trüper, 1977).

**Tabla 1** Tipos de membranas fotosintéticas y presencia de bacterioclorofilas en diferentes grupos bacterianos fotótrofos (tomado de Madigan, 1995)

| Grupo bacteriano | Bacterioclorofila (Bcl)    | Sistema de membranas fotosintéticas                                    |
|------------------|----------------------------|------------------------------------------------------------------------|
| Bacterias rojas  | a, b                       | Lamelas, tubos o vesículas que se continúan con la membrana plasmática |
| Bacterias verdes | c, d, o e, más trazas de a | Clorosomas adheridos pero sin continuidad con la membrana plasmática   |
| Heliobacterias   | G                          | Sólo membrana plasmática                                               |



**Figura 3** Tipos de membranas intra-citoplasmáticas en diferentes géneros y especies bacterianas fotótrofas rojas en las que se han observado (tomado de Kondratieva *et al.*, 1992)

El contenido de las membranas fotosintéticas varía con el tipo de pigmento, que a su vez es afectado por la intensidad de luz y la presencia de  $O_2$ . Cuando las células crecen aeróbicamente se inhibe la síntesis de bacterioclorofilas (Bcl) y los organismos pueden estar prácticamente desprovistos de fotopigmentos, así como de los sistemas de membranas internas (Kondratieva *et al.*, 1992; Imhoff, 1995).

Se ha observado que cuando existe crecimiento fotoheterótrofo, en condiciones anaeróbicas es cuando se produce la mayor síntesis de bacterioclorofilas. Si la intensidad de luz es elevada se inhibe la síntesis del aparato fotosintético, mientras que si las células crecen a bajas intensidades de luz, su contenido de bacterioclorofila es alto y las membranas internas se empaquetan por medio de la membrana plasmática (este aumento del contenido de pigmento celular a bajas intensidades de luz permite al organismo utilizar mejor la luz disponible)

Normalmente la síntesis de carotenoides se regula principalmente en coordinación con el contenido de bacterioclorofila *a* (Kondratieva *et al.*, 1992; Madigan *et al.*, 2004).

La mayoría de los miembros de la familia *Rhodospirillaceae* contienen bacterioclorofila *a* como su pigmento principal, así como la presencia de diferentes carotenoides de la serie de la espiriloxantina, el  $\beta$  caroteno y la zeaxantina, entre otros. Pocas bacterias rojas carecen de bacterioclorofila *a* y en su lugar contienen bacterioclorofila *b*, la cual absorbe en el infrarrojo (apenas sobre 1000 nm) (Madigan, 1995). En la tabla 2 se enlistan las diferentes bacterioclorofilas que pueden estar presentes en las bacterias fotótrofas, así como sus absorbancias en vivo y cuando se utiliza metanol como solvente orgánico.

En estudios realizados por Le Bris *et al.*, 1998; López-Cortes, 1990,1998, 1999; en poblaciones fotosintéticas presentes en biopelículas bacterianas sedimentarias se han observado que la presencia de pigmentos (clorofilas, bacterioclorofilas y diferentes carotenoides) son indicadores de los grupos funcionales fotosintéticos (bacterias, cianobacterias, microalgas entre otras) que las conforman

Cuatro grupos bacterianos han sido identificados con base en sus pigmentos; a) bacterias rojas no sulfurosas (*Rhodospirillaceae*) que contiene Bcl *a* y carotenoides de la serie espiriloxantina principalmente; b) Las bacterias rojas sulfurosas (*Chromatiaceae*) que contienen Bcl *a* asociada con okenona o a la sene rodopinal, c) Las bacterias verdes sulfurosas (*Chlorobiaceae*) las cuales poseen varias bacterioclorofila (*c*, *d* o *e*) asociadas con el clorobacteno en el caso de la Bcl *c* y *d*, y la Bcl *c* al isorenieratano; d) las cianobacterias que contienen clorofila *a* asociada a la ficoeritrina y ficocianina, el pigmento rojo (ficoeritrina), presenta absorción máxima de luz a longitudes de onda próximas a 550 nm, mientras que el pigmento azul (ficocianina) presenta absorción máxima a 620 nm. Las microalgas contienen clorofila *a*, al igual que las cianobacterias y secundariamente, clorofila *b*, *c* o *d* y numerosos carotenos (Le Bris *et al.*, 1998; López-Cortes. 1990,1998, 1999; Demergasso *et al.*, 2003). En el grupo de las proclorofitas la divinil-clorofila *a* es el pigmento principal.

**Tabla 2.** Bacterioclorofilas y longitudes de onda de absorción *in vivo* y con metanol a las que se presentan en bacterias fotótrofas (tomado de Brock y Madigan, 1993)

| Pigmento                                                    | <i>In vivo</i> * | Extracto metanol* |
|-------------------------------------------------------------|------------------|-------------------|
| Bacterioclorofila <i>a</i> (bacterias rojas)                | 805, 830-890     | 771               |
| Bacterioclorofila <i>b</i> (bacterias rojas)                | 835-850          | 794               |
|                                                             | 1020-1040        |                   |
| Bacterioclorofila <i>c</i> (bacterias verdes del azufre)    | 745-755          | 660-669           |
| Bacterioclorofila <i>c</i> (bacterias verdes no del azufre) | 740              | 667               |
| Bacterioclorofila <i>d</i> (bacterias verdes del azufre)    | 705-740          | 654               |
| Bacterioclorofila <i>e</i> (bacterias verdes del azufre)    | 719-726          | 646               |
| Bacterioclorofila <i>g</i> (Heliobacterias)                 | 670-788          | 765               |

\*Absorción infrarroja máxima (nm)

#### b) Carotenoides

Los carotenoides son compuestos ubicuos en la naturaleza, indispensables para la vida debido principalmente, a las funciones que llevan a cabo en la fotosíntesis: captación de luz, fotoprotección, disipación de excesos de energía, desactivación de oxígeno singlete, etc. (Britton, 1995; Demmig-Adams *et al.*, 1996; Frank *et al.*, 1997).

Las interacciones de las bacterioclorofilas con los carotenoides son importantes desde el punto de vista biológico, debido a su participación en los procesos de fotosíntesis, además de que también sirven como fotoprotectores. Se han identificado cinco series de carotenoides en bacterias fotótrofas (tabla 3). Con frecuencia, la luz brillante resulta perjudicial para las células porque causa reacciones fotooxidativas que producen oxígeno singlete ( $O^1_2$ ) y pueden destruir el aparato fotosintético. Los carotenoides atenúan el efecto tóxico del oxígeno singlete y absorben buena parte de esta luz perjudicial. La función fotoprotectora de los carotenoides constituye una ventaja evidente, puesto que los organismos fotótrofos tienen que vivir en presencia de luz (Madigan *et al.*, 2004).

**Tabla 3.** Principales series de carotenoides presentes en bacterias fotótrofas anoxigénicas

| Grupo | Nombre                                    | Carotenoides que los Conforman                                               |
|-------|-------------------------------------------|------------------------------------------------------------------------------|
| 1     | Serie normal de la espiriloxantina        | Licopeno, Rodopina, Espiriloxantina                                          |
| 2     | Serie alternativa de la Espiriloxantina   | Licopeno, Licopenal, Cloroxantina, Esferoideno Esferoideno (Espiriloxantina) |
| 3     | Series de la Okenona                      | Okenona                                                                      |
| 4     | Series Rodopina (variaciones del grupo 1) | Licopeno, Licopenal, Licopenol, Rodopin, Rodopinal, Espiriloxantina          |
| 5     | Series de Clorobacteno                    | Clorobacteno, Isorenieratieno                                                |

Clasificación propuesta por Schmidt (1978) citado en Imhoff (1995)

Las funciones más importantes de estos pigmentos en bacterias fotótrofas es la de fotoprotección contra las radiaciones de la luz, la de proveer estabilización a las estructuras y de captura de energía en la región del espectro donde la absorción de la luz por tetrapirroles es mínima. La eficiencia de la transferencia de energía de los carotenoides a moléculas de bacterioclorofila varía de un 30% a casi 90%, dependiendo del número de dobles enlaces conjugados que contenga la molécula (Fiedor *et al.*, 2004).

Los carotenoides pueden ser compuestos lipídicos, algunos son insolubles en agua y solo se disuelven en solventes orgánicos: acetona, metanol, éter de petróleo, etanol. Se encuentran firmemente incluidos en la membrana. Tienen largas cadenas hidrocarbonadas con enlaces simples (C-C) y dobles (C=C) alternados en una disposición llamada sistema de dobles enlaces conjugados y absorben luz en la región azul del espectro (Madigan *et al.*, 2004). La asociación con proteínas permite a los carotenoides permanecer en una posición correcta con respecto a otras moléculas, un ejemplo de ello son los complejos pigmento-proteína que mantienen a carotenoides, bacterioclorofilas y clorofilas en posición adecuada para los procesos de transferencia de energía que tienen lugar durante la fotosíntesis (Imhoff, 1995)

Diferentes estudios se han realizado sobre carotenoides presentes en bacterias rojas (Rhodospirillaceae) y las longitudes de onda a las cuales se presenta un

determinado pigmento. En la tabla 4 se presenta una recopilación de las longitudes de onda de absorción de diferentes carotenoides.

**Tabla 4.** Longitudes de onda de absorción de diferentes carotenoides presentes en bacterias rojas

| Pigmento                                   | UV<br>Con acetona | Con metanol                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                             |
|--------------------------------------------|-------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Rodopina                                   | 474* (505)        |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                         |
| Espiriloxantina                            | 470* 496* 530*    | 315 <sup>1</sup> 385 <sup>1</sup> 464 <sup>1</sup> 492 <sup>1</sup> 524 <sup>1</sup> 492 <sup>4</sup> -<br>493 <sup>4</sup> 526 <sup>4</sup> -527 <sup>4</sup>                                                                                                                                                                                                                                          |
| Equinenona                                 | 462*              |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                         |
| Anhidrovibrina                             | 460* 482* 518*    | 304 <sup>1</sup> 373 <sup>1</sup> 454 <sup>1</sup> 481 513 <sup>1</sup>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                 |
| Lycopene                                   | 448* 474* 506*    | 293 <sup>1</sup> 360 <sup>1</sup> 442 <sup>1</sup> 468 <sup>1</sup> 499 <sup>1</sup>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                    |
| β-caroteno                                 | 428* 456* 482*    |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                         |
| Zeaxantina                                 | 424* 454* 480*    | 273 <sup>1</sup> 448 <sup>1</sup> 473 <sup>1</sup>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                      |
| Equinenona                                 | 462*              | 298 <sup>1</sup> 462 <sup>1</sup>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                       |
| Bacterioclorofila a con<br>geranilgeraniol | 360* 580* 770*    |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                         |
| β-caroteno (autentico)                     |                   | 275 <sup>1</sup> 448 <sup>1</sup> 476 <sup>1</sup>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                      |
| β-caroteno                                 |                   | 275 <sup>1</sup> 449 <sup>1</sup> 475 <sup>1</sup>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                      |
| β-criptoxantina                            |                   | 272 <sup>1</sup> 447 <sup>1</sup> 473 <sup>1</sup>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                      |
| Caloxantina                                |                   | 273 <sup>1</sup> 448 <sup>1</sup> 474 <sup>1</sup>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                      |
| Nostoxantina                               |                   | 275 <sup>1</sup> 447 <sup>1</sup> 473 <sup>1</sup>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                      |
| 13-Cis-zeaxantina                          |                   | 276 <sup>1</sup> 336 <sup>1</sup> 442 <sup>1</sup> 478 <sup>1</sup>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                     |
| Rubixantina                                |                   | 282 <sup>1</sup> 346 <sup>1</sup> 458 <sup>1</sup> 487 <sup>1</sup>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                     |
| Bacteriorubixantina                        |                   | 293 <sup>1</sup> 361 <sup>1</sup> 510 <sup>1</sup>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                      |
| Fitoeno                                    |                   | 275 <sup>1</sup> 285 <sup>1</sup> 295 <sup>1</sup>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                      |
| Bacterioclorofila a                        |                   | 770 <sup>3</sup> 366 <sup>5</sup> 608 <sup>5</sup> 771 <sup>5</sup> 365 <sup>6</sup> 608 <sup>6</sup><br>772 <sup>6</sup> 364 <sup>7</sup> 606 <sup>7</sup> 770 <sup>7</sup> 366 <sup>8</sup> 608 <sup>8</sup><br>771 <sup>8</sup> -772 <sup>8</sup> 365 <sup>9</sup> 368 <sup>9</sup> 608 <sup>9</sup> 770 <sup>9</sup><br>353 <sup>10</sup> 769 <sup>10</sup><br>771 <sup>2</sup><br>794 <sup>2</sup> |
| Bacterioclorofila a                        |                   |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                         |
| Bacterioclorofila b                        |                   |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                         |

\*Steinman *et al.* 1998, <sup>4</sup>Smith *et al.* 1980b; <sup>1</sup>Takaichi *et al.* 1990; <sup>2</sup>Brock y Madigan 1993, <sup>3</sup>Shiba 1991, <sup>4,5,6,7,8,9,10</sup> Le Bris *et al.* 1998

## 2.2 Biopelículas

### 2.2.1 Composición de las biopelículas bacterianas

Las biopelículas bacterianas pueden estar formadas por una única especie bacteriana autótrofa, heterótrofa, sulfato-reductoras a metanogénicas o por una

diversidad de especies bacterianas (Davey y O'Toole, 2000). Las células bacterianas se encuentran adheridas al sedimento y unidas entre si, por una matriz de exopolisacáridos (López-Cortes, 1999; Avendaño-Herrera *et al.*, 2002; Kierek-Pearson y Karatan, 2005). En la naturaleza constituyen un modo de crecimiento que les confiere protección contra las perturbaciones exteriores del ambiente (Wimpenny *et al.*, 2000), además de ser altamente funcionales las biopelículas juegan un papel importante en los flujos de energía y en los ciclos biogeoquímicos de los nutrientes de los ecosistemas donde se encuentran (Szewzyk *et al.*, 2000; Långmark *et al.*, 2005). Otra característica de las biopelículas es su resistencia a hospederos y agentes antimicrobianos debido a que forman una capa impermeable en donde los microorganismos más superficiales son los únicos afectados, mientras que los microorganismos que se encuentran aislados son más susceptibles a estos factores de control.

#### 2.2.2 Proceso de formación de la biopelícula

Numerosos estudios experimentales han sugerido que el proceso de colonización inicial de la bacteria con el sustrato, depende de variables físicas y químicas como: penetración de la luz, velocidad de corriente, pH, oxígeno, disponibilidad de nutrientes, y de variables biológicas como son la depredación y competencia y de factores genéticos como es el caso de la producción de exopolisacáridos (EPS) (Rice *et al.*, 2003; Kierek-Pearson y Karatan, 2005; O'Toole *et al.*, 2000). En los últimos años se ha reportado que los microorganismos presentes en la biopelícula responden a estas variables ambientales con distintos modelos de crecimiento, lo que puede determinar el desarrollo gradual de la biopelícula, su estructura interna y sus actividades metabólicas. (Atlas y Bartha 2000; Danese *et al.*, 2000; Rice *et al.*, 2003; Kierek-Pearson y Karatan, 2005).

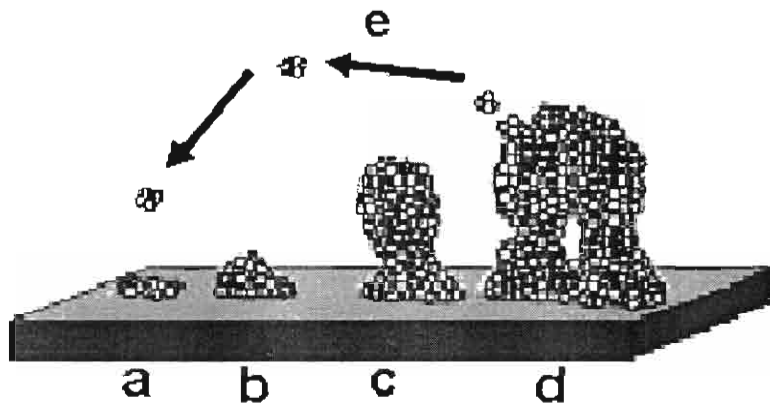


Figura 4 Procesos de formación de la biopelícula bacteriana. a) adherencia de la bacteria al sustrato, b) primera producción de exopolisacáridos; c) maduración celular y división celular d) segunda producción de exopolisacáridos y desarrollo final de la biopelícula y e) desprendimiento celular para colonizar nuevos sustratos (tomado de Lasa *et al.*, 2005)

El proceso de formación consta de 5 fases (figura 4), las cuales son:

- a) Adherencia de la bacteria a la superficie del sustrato. Esta puede ser activa (por medio de flagelos o cilios) o pasiva (por gravedad, difusión y dinámica de fluidos). Durante este proceso las células microbianas alteran sus fenotipos en respuesta a la proximidad de la superficie (Costerton, 1995); en bacterias Gram negativas como *Pseudomonas aeruginosa*, *Vibrio cholerae*, *Escherichia coli*, *Salmonella enterica* se ha observado que los flagelos y los cilios son importantes para la etapa de adherencia. En este proceso las células bacterianas pueden eliminarse fácilmente (O'Toole *et al.*, 2000).
- b) Unión bacteriana irreversible con la superficie del sustrato que es la adhesión de la biopelícula debida a la producción de una primera matriz de exopolímeros, junto con la aparición de estructuras similares a setas, entre las cuales se observa la presencia de canales (figura 4), así como, un aumento en la concentración de nutrientes. En esta fase la biopelícula difícilmente es eliminada (Kierck-Pearson y Karatan, 2005).

c) Durante la división celular y el desarrollo de las comunidades bacterianas empieza la producción de una matriz de polímeros polianiónicos, limosos y pegajosos que excretan al exterior, lo que permite mantener unidas las células entre ellas con la superficie del sustrato, al mismo tiempo que otros microorganismos de los ambientes circundantes son atrapados dentro de la biopelícula.

d) Los microorganismos presentes en la biopelícula sintetizan gran cantidad de diversos exopolisacáridos creando una compleja matriz, lo que permite la retención de los nutrimentos, además, de protegerla contra diversos biocidas.

e) En la última fase de una biopelícula se observa el desprendimiento o liberación de células bacterianas, así como la colonización de nuevas superficies (Kierek-Pearson y Karatan, 2005).

Al proceso de liberación de células individuales o en pequeños grupos se le conoce como erosión, mientras que a la rápida separación de porciones grandes de biopelícula se le denomina desprendimiento (Stoodley *et al.*, 2001).

En una biopelícula madura, del 75 al 95% del volumen está ocupado por una matriz laxamente organizada alrededor de unas pocas células bacterianas (5 al 25%), lo que proporciona una cubierta gelatinosa y deslizante a la superficie colonizada (Geesey, 2001).

### 2.2.3 Composición de la matriz de exopolisacáridos

La composición de la matriz de exopolisacáridos es poco conocida y varía de acuerdo a las especies bacterianas, pero consta esencialmente de polisacáridos o glicoproteínas como la glucosa, fructosa, manosa, N-acetilglucosamina, ADN y agua (Zhang *et al.*, 1998). También puede contener proteínas libres, fosfolípidos y ácido teicoico que son polímeros de ribosa o glicerol modificados químicamente y unidos por grupos fosfato. El ácido teicoico se sintetiza a partir de subunidades de manera semejante al peptidoglicano. Algunos polisacáridos tienen grupos hidrofóbicos tales como el metilo o acetilo, los cuales contribuyen a que la superficie celular sea más hidrofóbica (Neu *et al.*, 1992). Muchos EPS poseen estructura firmes que contienen secuencias de 1,3 ó 1,4- $\beta$  hexosa que permiten

que la estructura de la matriz no se deforme y en algunos casos sea insoluble. Otros polisacáridos son relativamente más solubles y pueden formar frágiles geles que se pueden ser fácilmente disueltos (Sutherland, 2001).

El glicocáliz está compuesto de polímeros de azúcar material se excreta desde la pared celular bacteriana, su estructura se forma a partir de grupos de polisacáridos neutros o portadores de cargas eléctricas, que confiere a la adherencia la capacidad de actuar como un sistema de intercambio iónico para atrapar y concentrar los nutrimentos que encuentre (Geesey, 2001). Se ha observado que en presencia de iones los EPS incrementan su viscosidad, así como la síntesis de EPS depende de la disponibilidad de nutrimentos tales como: carbono, nitrógeno, potasio y fosfatos, entre otros (Sutherland, 2001).

### 2.3 Producción primaria

Con frecuencia los cambios físicos y químicos en los sedimentos influyen en un cambio en la distribución y abundancia de las comunidades microbianas (Danovaro *et al.*, 2001). Algunos de los factores que pueden influenciar estos cambios son el tamaño de las partículas de sedimento, las perturbaciones físicas, la disponibilidad de sustratos orgánicos, de aceptores de electrones como el oxígeno ( $O_2$ ), los nitratos ( $NO_3^-$ ), los sulfatos ( $SO_4^{2-}$ ), y los carbonatos ( $HCO_3^-$ ), entre otros (Dauwe *et al.*, 1998).

La producción primaria de los microorganismos autótrofos presentes en los sedimentos superficiales puede medirse a través de la contribución directa de su biomasa, la cual, es la cantidad de materia viva existente en un momento dado por unidad de superficie o volumen, mediante la relación existente entre los biovolúmenes celulares (cocos y bacilos) y la abundancia expresada en No. de células  $cm^{-2}$ . Ésta se puede expresar en peso húmedo, peso seco, peso seco sin cenizas o en carbono (p.ej.  $mgm^{-3}$  o  $\mu gCm^{-2}$ ). Otra forma de evaluar la producción primaria es de forma indirectamente, a través, de las concentraciones de pigmentos (clorofilas, bacterioclorofilas y carotenoides) (Barreiro y Signoret, 1999). Se ha observado que existe una relación directa entre la concentración de clorofila *a*, bacterioclorofila *a* y la producción primaria (Barlow *et al.*, 1990).

*a) Importancia de los pigmentos en la producción primaria*

Dos grupos importantes como el fotopicobentos total (FPBT) y fotopicobacteriobentos total (FPBBT) son responsables de una fracción significativa del total de producción primaria en muchos ambientes bentónicos, son importantes conductores de carbono, nutrimentos, y energía en el ciclo de las redes alimenticias microbianas. El fotopicobacteriobentos total (FPBBT) está constituido por bacterias autotófras y el fotopicobentos total (FPBT) formado por cianoprocariotas, proclorofitas y algunos eucariontes. Los microorganismos del FPBT tienen tallas muy pequeñas y su morfología es parecida entre sí, lo que hace difícil su diferenciación al observarlas por microscopía de luz, ya que se perciben como pequeñas esferas que se distinguen a lo mucho, por el color autofluorescente de sus pigmentos (verde, rojo, rojo-naranja, o marrón) (tabla 5). La talla de ambos grupos va entre 0.2 y 2.0  $\mu\text{m}$  (Macissac y Stockner, 1993).

Los microorganismos del FPBT puede ser observado en microscopía de epifluorescencia mediante la autofluorescencia natural de sus clorofilas (clorofila *a*, divinil-clorofila *a*) y de las ficobilinas (ficoeritrinas y ficocianinas), las cuales se excitan a longitudes de onda diferentes y emiten su autofluorescencia a otra longitud de onda (tabla 6) (Macisaac y Stockner, 1993) El FPBBT puede también ser observado mediante microscopía de epifluorescencia por tñido de pigmentos secundarios.

**Tabla 5.** Microorganismos que forman parte del fotopicobentos total

| Grupos microbianos | Forma celular                              | Tallas (diámetro en $\mu\text{m}$ ) | $\lambda$ de excitación (nm)                          |
|--------------------|--------------------------------------------|-------------------------------------|-------------------------------------------------------|
| Cianobacterias     | Cocoides unicelulares, bacilos             | <i>Synechococcus</i> sp (0.5 a 1.5) | violeta azul (420 a 440) o verde-amarillo (550 a 580) |
| Proclorofitas      | Procariontes unicelulares de forma cocoide | 0.3 a 1.0                           | violeta-azul (420 a 440)                              |
| Eucariontes        | Unicelulares cocoides o células flagelada  | microalgas < 2.0                    | Violeta-azul (420 a 440)                              |

**Tabla 6.** Longitudes de onda de excitación y de fluorescencia de pigmentos presentes en el FPBT

| Pigmento                                                                             | Longitud de onda de excitación* (nm)  | Longitud de onda de fluorescencia* (nm) |
|--------------------------------------------------------------------------------------|---------------------------------------|-----------------------------------------|
| Clorofila a y divinil clorofila a                                                    | Violeta-azul (420 a 440)              | rojo profundo (670 a 690)               |
| Feofitina                                                                            | (400 a 430)                           |                                         |
| Ficocianina, aloficocianina                                                          | Naranja-rojo (620 a 650)              | rojo intenso (640 a 660)                |
| Ficoeritrina tipo II con los cromóforos ficourobilina (PUB) y ficoeritrobilina (PEB) | 490 a 500 y<br>540 a 560              |                                         |
| Ficoeritrina tipo II con el cromóforo o ficoeritrobilina (PEB)                       | 540 a 565                             |                                         |
| Ambos tipos de ficoeritrinas                                                         | verde y amarillo-naranja<br>550 a 580 |                                         |

Li *et al.* (1992) y Campbell *et al.* (1994) han encontrado que cianobacterias de los géneros *Synechococcus* y *Prochlorococcus* son las más abundantes en zonas oligotróficas, donde la producción primaria está sustentada principalmente por fitoplancton pequeño de tallas menores a 0.2  $\mu\text{m}$ . En estos ambientes *Synechococcus* tiene un tamaño aproximado de 0.5 a 1  $\mu\text{m}$  y una abundancia de entre  $10^3$  y  $10^4$  células por mL, mientras que las proclorofitas que miden alrededor de 0.6  $\mu\text{m}$  y su abundancia va de entre  $10^5$  a  $10^6$  células por mL.

En matas algales microbianas formadas principalmente por comunidades de algas, cianobacterias y bacterias fotótrofas, el perfil de profundidad de los pigmentos fotosintéticos es indicativo de la distribución vertical de los organismos fotótrofos (Demergasso *et al.*, 2003). Visscher y Van Gemerden (1991) en su estudio de matas microbianas encontraron que los picos máximos de clorofila a ( $0.825 \text{ mg.cm}^{-3}$ ) se presentaron entre los 2.5 y 5 mm de profundidad en el sedimento y la bacterioclorofila a ( $0.445 \text{ mg.cm}^{-3}$ ) en los sedimento justo por debajo de la capa de clorofilas a. La presencia de estos pigmentos junto con los carotenoides está relacionada con la producción primaria de los sistemas (Barlow *et al.*, 1990, Bratbak, 1993).

#### *b) Importancia de la biomasa en la producción primaria*

La medición de la biomasa del FPBT y FPBBT se emplea para determinar la producción de una población y la transferencia de energía entre los diferentes niveles tróficos del ecosistema. La biomasa béntica se puede evaluar a través de la técnica de conteo directo por microscopía de epifluorescencia, utilizando la relación carbón/biovolumen (Norland, 1993).

Cole *et al.* (1988) ha reportado que la producción de biomasa bacteriana heterótrofa equivalía a 20 ó 30 % de carbono celular aportado en sistemas oligotróficos y eutróficos. Una alta eficiencia de producción de biomasa por parte de los microorganismos fotoautótrofos, suele estar relacionada con el buen estado del ambiente, en condiciones óptimas esta eficiencia puede alcanzar un 50%. Azam *et al.* (1983) y Bratbak (1993) estimaron que los microorganismos heterótrofos utilizan hasta un 50% del carbono fijado en la fotosíntesis y que la acción depredadora de pequeños flagelados y microzooplancton mantiene el "aza microbiana" a través de la cual fluye una parte importante de la producción primaria.

Estos grupos de microorganismos han sido reportados en sistemas estratificados (biopelículas bacterianas, tapetes microbianos y matas algales) dentro de gradientes verticales de luz y componentes químicos, principalmente sulfuro y oxígeno (Pringault *et al.*, 1999).

En lo que se refiere a la abundancia de las bacterias fotótrofas rojas no sulfurosas en sedimentos biopelículas a la producción primaria, pocos estudios se han hecho en México.

### 3. Justificación

Como se dijo anteriormente, en México se han realizado pocos estudio acerca de la ecología, fisiología de las bacterias fotótrofas rojas no sulfurosas en sedimentos, estos han sido realizados sobre todo por López-Cortes (1990,1998 y 1999) en tapetes microbianos, por lo que se conoce poco sobre su ecología y su posible potencial biotecnológico y ecológico. La mayor parte de los estudios realizados sobre este grupo bacteriano provienen de países europeos y de Los Estados Unidos y su importancia ecológica reside en que este grupo bacteriano participa en los procesos sintróficos que se llevan a cabo en las biopelículas de los sedimentos para el reciclamiento de los compuestos inorgánicos nitrogenados. Su importancia biotecnológica ha sido enfocada sobre todo en la obtención de pigmentos naturales para la industria alimenticia.

De manera colateral se aislarán bacterias fotótrofas no sulfurosas provenientes de sedimentos costeros para incluirse en el cepario, y que puedan ser utilizadas con fines biotecnológicos, ya sea en recuperación de suelos salinos contaminados y/o en la industria agropecuaria. Igualmente, es importante conocer su participación en la producción de biomasa primaria de los cuerpos de agua costeros.

De ahí que se hayan planteado las siguientes preguntas a resolver durante esta investigación:

- ¿Qué influencia tienen los parámetros ambientales sobre la distribución de esta población al interior de la laguna?
- ¿Qué tipo de pigmentos presentan las bacterias rojas no sulfurosas diazótrofas aisladas de la zona de estudio?
- ¿Cómo contribuye este grupo bacteriano a la producción primaria neta en la zona de estudio?

#### 4. Hipótesis

- Las bacterias fotótrofas rojas no sulfurosas contribuyen a la producción primaria béntica de una laguna costera tropical.
- La producción primaria bacteriana béntica varía con el tipo de sedimento y con los diferentes estaciones climáticas del año.

#### 5. Objetivos

##### 5.1 Objetivo general

Establecer la relación de la biomasa del fotopicobacteriobentos autótrofo total y del fotopicobentos total con respecto a factores físico y químicos e identificar los bacteriopigmentos presentes en aislados bacterianos fotótrofos rojos no sulfurosos, obtenidos del primer centímetro de la columna sedimentaria

##### 5.2 Objetivos particulares

1. Determinar la distribución horizontal de la abundancia y biomasa microbiana autótrofa bentónica total con respecto a las variables físicas y químicas.
2. Aislar y purificar las bacterias fotótrofas rojas no sulfurosas (Rhodospirillaceae) fijadoras del nitrógeno atmosférico ( $N_2$ ) presentes en el primer centímetro de los sedimentos.
3. Identificar los bacteriopigmentos presentes en los aislados bacterianos fotótrofos obtenidos

## 6. Área de estudio

La laguna de Sontecomapan (Figura 5) se sitúa dentro de la Reserva de Biosfera de Los Tuxtla, en la región de la cuenca que forman el volcán de San Martín Tuxtla y la Sierra de Santa Martha, en el estado de Veracruz, México. Sus coordenadas geográficas son 18° 30' y 18° 34' N y 95° 54' y 95° 02' W (Contreras, 1985).

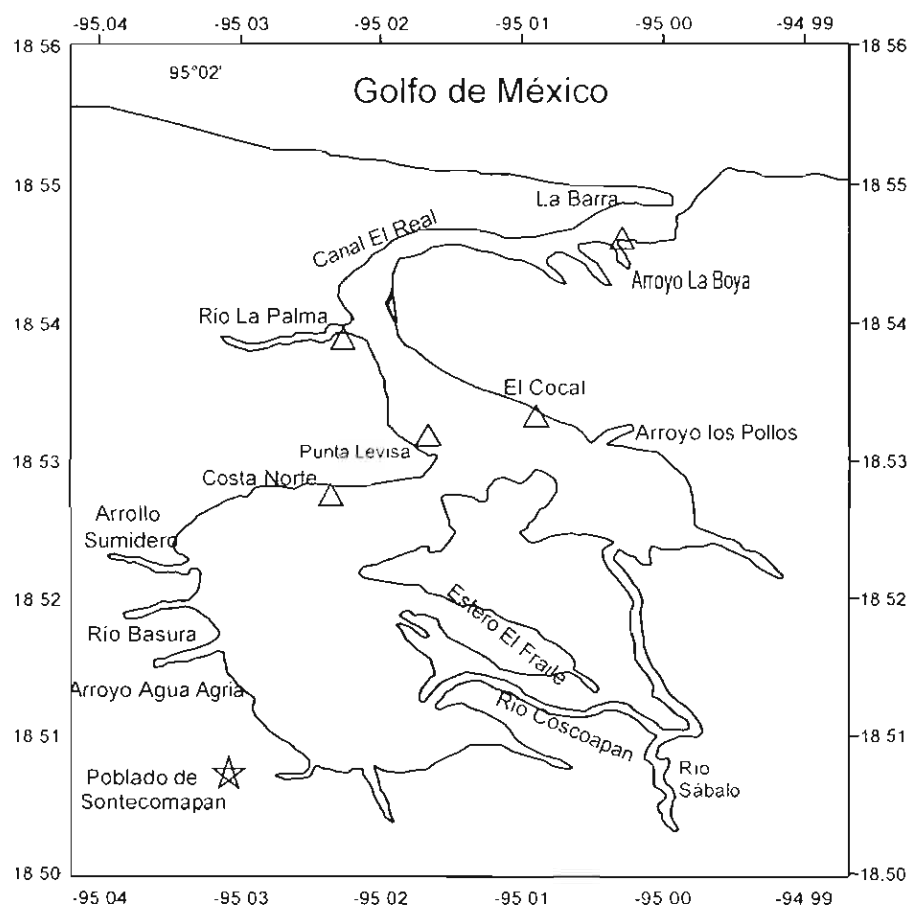
Es una laguna de forma irregular, tiene una extensión aproximada de 12 km largo, incluyendo las ensenadas, por 1.5 km de ancho (Reséndez, 1982). Su única conexión con el mar es permanente. Los sedimentos se caracterizan por ser en su mayoría areno-limosos (Morán-Villa, 2007).

Moran-Villa (2007) ha reportado que la laguna de Sontecomapan presenta fuertes fluctuaciones de salinidad y de oxígeno disuelto a lo largo del ciclo anual. La salinidad promedio registrada en la columna es de  $\approx 23.7 \pm 10.8$  ‰, y las concentraciones promedio de oxígeno varió entre  $5.13 \pm 2.3$  y  $6.9 \pm 1.73$  mg L<sup>-1</sup>. La laguna se caracteriza por su origen tectónico, tiene un substrato sedimentario conformado principalmente por cenizas volcánicas, ríos como la Palma y el Sábalo, y arroyos como la Boya, el Fraile y de la Basura de la zona sur y sureste, que aportan una cantidad considerable de agua dulce al sistema durante los periodos de lluvias y "nortes", convirtiéndolo prácticamente en un lago, pero con un aporte continuo de agua marina debido a las mareas (Calva *et al.*, 2005).

La laguna de Sontecomapan se encuentra rodeada por una franja de manglares del género *Rhizophora mangle* (mangle rojo), *Avicennia germinans* (mangle negro) y *Laguncularia racemosa* (mangle blanco) (López-Portillo y Ecurra, 2002). La deforestación del manglar y de otros ecosistemas adyacentes a la laguna de Sontecomapan ha permitido mayores áreas para la agricultura y la ganadería extensiva, esta última avanza cada vez más hacia el interior del manglar. Así mismo, las prácticas agrícolas que se realizan en la zona están sustituyendo a los manchones de selva, lo que ha ocasionado graves problemas ambientales como son el azolve de los ríos y de la laguna por arrastre eólico y fluvial (Carmona-Díaz *et al.*, 2004). La falta de un plan de manejo adecuado propicia la pérdida continua

de recursos naturales. Entre las especies pesqueras de interés comercial se encuentra el camarón blanco, ostión, langostino, mojarra, robalo, lisa y pargo, entre otros.

Por todo lo anterior este ecosistema costero es considerado de gran importancia económica y biológica. Desde febrero del 2004 los manglares y humedales de la laguna de Sontecomapan están incluidos en la Reserva de la Biosfera de los Tuxtlas (Calva *et al.*, 2005).



**Figura 5.** Ubicación de las estaciones de muestreo (Δ) en la Laguna de Sontecomapan, estado de Veracruz

## 7. Materiales y Métodos

Se realizaron tres muestreos en dos diferentes épocas del año: dos en épocas de nortes (4 al 8 de enero del 2006 y 20 al 25 de febrero del 2007) y uno en épocas de secas (30 de mayo al 3 de junio del 2006). Las estaciones de muestreo se ubicaron en la desembocadura de los ríos La Boya (cerca de la boca de la laguna), y La Palma (que desemboca sobre el canal de navegación), las estaciones Punta Levisa y El Cocal se localizan sobre el canal de navegación y la estación Costa Norte al noroeste de la laguna (figura 5).

La red de estaciones de muestreo dentro de la laguna, se determinaron según las características de intercambios de agua de diferente salinidad provenientes de la línea de costa y de los ríos que desembocan en la laguna.

### 7.1 *Análisis de parámetros físicos y químicos*

- i) Para las mediciones del pH y del potencial de oxido-reducción (Eh) de los sedimentos superficiales: se tomó un nucleador por cada punto de muestreo. En el se realizaron las mediciones de pH con un minielectrodo de penetración en forma de aguja marca ORION de 2 mm de diámetro, y las del potencial de oxido reducción (Eh) con un minielectrodo marca SENTEK de 3 mm. Para evitar perturbar la capa superficial del sedimento y la penetración del agua entre los intersticios del mismo durante las lecturas, las mediciones se hicieron de manera escalonada cada 5 mm de profundidad.
- ii) La medición de la intensidad de luz en en la interfase agua-sedimento se midió con un luxómetro marca Li\_cor modelo Li\_250.
- iii) La transparencia y la profundidad se midieron con un disco de Secchi
- iv) La temperatura se registró con ayuda de un termómetro de mercurio para suelos y sedimentos.
- v) La concentración de oxígeno disuelto en agua de fondo se obtuvo mediante la técnica de Winkler (Aminot y Chaussepied, 1983).
- vi) La salinidad se midió con un refractómetro de campo marca ATAGO S MILL-E (precisión  $\pm 1\%$ ) y con un salinometro de campo marca YSI modelo 85

### 7.2 *Colecta de agua intersticial para la determinación de nutrientes*

El agua intersticial para la determinación de nutrimentos se obtuvo de un nucleador de policarbonato de 10 cm de largos por 5 mm de d.e., con una serie de oficios de 1 mm a lo largo de los 2 últimos centímetros del tubo, el agua intersticial fue succionada con una manguera unida a una jeringa de 50 cm<sup>3</sup>. El agua obtenida fue filtrada a través de un swinex con membrana Whatman GF/F de 25 mm de diámetro (Moran-Villa, 2007), y conservada en frascos de penicilina con capacidad de 50 ml en congelación. La medida de la concentración de los iones nitrogenados y fosfatados inorgánicos ( $\text{N-NO}_3^-$ ,  $\text{N-NO}_2^-$ ,  $\text{N-NH}_4^+$  y  $\text{HPO}_4^{2-}$ ) se realizó por métodos químicos colorimétricos, mediante el método de Bendschneider y Robinson (1952) modificados por Aminot y Chaussepied (1983) para aguas marinas.

### 7.3 *Colecta de muestras del primer centímetro de sedimento*

En cada estación de muestreo se colectaron cuatro muestras del primer centímetro de sedimento para la determinación de materia orgánica, la realización de conteo celular directo del fotopicobentos total y fotopicobacteriobentos total y para la obtención de aislados bacterianos fotótrofos rojos no sulfurosos. Se utilizaron nucleadores manuales de plexiglás (de 15 cm de largo por 5 cm de diámetro interior) por buceo libre evitando perturbar la interfase agua-sedimento.

Para la determinación del porcentaje de materia orgánica (MO) en sedimentos, de un nucleador se hizo un corte del primer centímetro de sedimento con ayuda de un émbolo y una espátula, la submuestra de sedimento se colocó en una bolsa de plástico, la cual se conservó en refrigeración ( $\sim 4^\circ\text{C}$ ) hasta su procesamiento en el laboratorio

Para el conteo directo celular y cálculo de la biomasa del FPBT y FPBBT, se colectó una submuestra de sedimento de 1 ml utilizando una jeringa estéril de 5 cm<sup>3</sup> sin punta. La muestra de sedimento se preservó en un frasco ámbar estéril conteniendo 9 ml de formaldehído al 2%, y se refrigeró inmediatamente a  $\sim 4^\circ\text{C}$ , hasta su análisis en el laboratorio.

Para el conteo de bacterias fotótrofas viables se utilizó la técnica de Unidades Formadoras de Colonias (UFC). Se colectaron 5 cm<sup>3</sup> de sedimento superficial de un nucleador con ayuda de una jeringa estéril de 10 cm<sup>3</sup> sin punta. La submuestra se colocó en botellas de vidrio estériles conteniendo 45 ml de gliceraldehído al 20%, preservándolas inmediatamente en congelación (-20°C) hasta su procesamiento en el laboratorio.

#### 7.4 Trabajo de laboratorio.

El trabajo de laboratorio consistió en el procesamiento de las muestras para: a) sedimento para la textura y contenido de materia orgánica (%MO); b) conteo directo del fotopicobentos total (FPBT) constituido por cianobacterias, proclorofitas, eucariontes, y del fotopicobacteriobentos total (FPBBT) solo bacterias autótrofas para la determinación de biomasa primaria, mediante la relación conteo/volumen celular; c) cuantificación por el método de unidades formadoras de colonias (UFC) y d) aislado de bacterias rojas no sulfurosas y purificación de los aislados.

##### *a) Contenido de materia orgánica (%MO) y textura del primer centímetro de sedimento*

La determinación del porcentaje de materia orgánica (MO) se obtuvo mediante el método de titulación del exceso de dicromato de potasio usado en la oxidación de la materia orgánica, con una solución de 0.5N de sulfato ferroso (Gaudette *et al.*, 1974).

El análisis de la textura del sedimento se realizó por el método hidrométrico recomendado por Bouyoucos (1963) el cual se refiere a la proporción relativa de arena, limo y arcilla en el sedimento; específicamente la clasificación de texturas se basa únicamente en la cantidad de partículas menores a 2 mm de diámetro.

b) *Conteo directo total y cálculo de la biomasa del fotopicobentos (FPBT), constituido por cianobacterias, eucariontes y proclorofitas y del fotopicobacteriobentos total (FPBBT) (bacterias autótrofas) presentes en el primer centímetro del sedimento.*

- i) El conteo de las células del FPBT se realizó mediante la técnica de autofluorescencia de pigmentos primarios (clorofila *a*, divinil clorofila *a*, ficocianina y ficoeritrina) de acuerdo a Macisaac y Stockner (1993), utilizando un microscopio de epifluorescencia (Olympus BIMAX60 100x) y un filtro UV de longitud de onda de excitación de 406 a 435 nm. El desarrollo del método se muestra ver en la figura 6.
- ii) El conteo de las células del FPBBT (bacterias autótrofas) se hizo por la técnica de microscopía de epifluorescencia, de acuerdo con Ferrara Guerrero (1993) (Figura 6), utilizando como flurocromo el FICT (Isotiocinato de fluorosceína) a una concentración de 0.02mg/ml, el cual tiñe pigmentos secundario (carotenoides) y se excita con la luz azul a una longitud de onda de 490 nm y emite a 514 nm (Reimers y Smith, 1986).
- iii) Las membranas utilizadas se tiñeron con Negro de Sudan (ver anexos) y la torrecilla de filtración fue esterilizada cada vez que se utilizó.
- iv) Todo el proceso se lleva a cabo en oscuridad.
- v) Para ambas técnicas se tomaron de cada filtro al menos tres fotomicrografías (película Fujichorome 400 ASA) y se seleccionaron al azar 20 campos para el conteo de células con fluorescencia azul y 20 campos para células por autofluorescencia de pigmentos, en un microscopio de epifluorescencia Olympus (BIMAX60 100x) unido a un sistema de fotomicrografía HP5 Olympus

Conteo celular del fotopicobentos total por autofluorescencia de clorofila *a*, divinyl clorofila *a*, ficocianina y ficoeritrina, y del fotopicobacteriobentos total por el t  ido de pigmentos secundarios

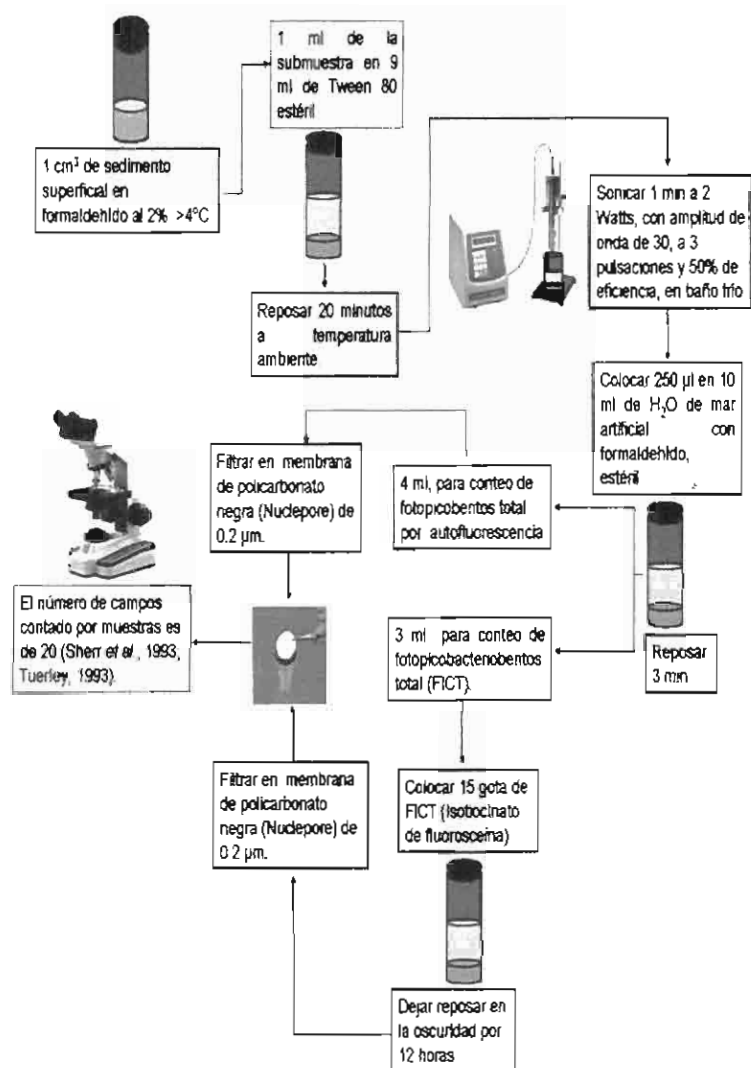


Figura 6. Protocolo seguido para el conteo celular total del fotopicobentos y fotopicobacteriobentos presentes en el primer centímetro del sedimento

#### iv) Cálculo de biomasa

Para el cálculo de biomasa del FPBT y FPBBT se utilizó la siguiente fórmula:

**Biomasa ( $\mu\text{gCm}^{-2}$ )** = No. total de cél. x vol. cel. medio x factor de conversión  
volumen:carbono celular/factor de agrandamiento

El conteo celular total se realizó utilizando la siguiente formula:

$$N = n \times d \times \text{superficie del campo del microscopio} \times \frac{1}{v} \times \frac{10}{9}$$

donde:

$N$  = número total de bacterias

$n$  = media del número de bacterias por campo contado

$d$  = dilución de la muestra dentro de la torrecilla de filtración

$v$  = volumen filtrado de la muestra

$10_9$  = corrección debida al formaldehído utilizado en los ml filtrados en la torrecilla

El valor de la superficie del campo del microscopio a 100x se calculó sacando el diámetro de la luz de la base de la torrecilla y se multiplica por el diámetro del campo de observación

**Volumen celular medio ( $\mu\text{m}^3/\text{célula}$ )**= volumen promedio de todas las células medidas

**Factor de conversión ( $\text{gC}\mu\text{m}^{-3}$ )** se calculó de acuerdo a los valores reportados por diferentes autores para bacterias acuáticas y graficadas por Torreton (1992) relacionando volumen celular vs la concentración de carbono celular.

En esta investigación este factor de conversión varió en las diferentes épocas de año.

Los resultados de biomasa fueron reportados en  $\mu\text{gC}$  bacteriano por  $\text{m}^2$  utilizando un factor de conversión para pasar de número de bacterias por mL a número de bacterias por  $\text{m}^2$ . Éste se obtuvo calculando la superficie del círculo del cilindro del

nucleador multiplicado por la profundidad de sedimento utilizado para el análisis y dividido por 10000

**Biovolumen:** Se calculó a partir de la proyección sobre pantalla de las fotomicrografías tomadas de tres campos seleccionados al azar por muestra. Se midió el ancho (W) y largo (L) de los bastones y el diámetro de los cocos (Van Wambeke, 1988), con base en una escala de referencia.

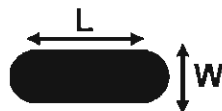
i) El volumen de los cocos se calculó en base al volumen de una esfera, por su similitud con ésta:



Volumen de la esfera =  $\pi \times (W^3/6)$

Volumen de los cocos =  $(\pi \times (W^3/6) / \text{factor de agrandamiento sobre la pantalla})$ .

ii) Para calcular el volumen de los bacilos y filamentos, se tomaron en cuenta dos figuras geométricas la esfera y el cilindro, de tal forma que:



Volumen de la esfera =  $\pi \times (W^3/6)$

Volumen del cilindro =  $(L-W) \times ((\pi W^2)/4)$

Volumen de los bacilos o filamentos =  $(\pi \times ((L W^2)/4 - (W^3)/12)) / \text{factor de agrandamiento}$

**Factor de agrandamiento:** este factor es obtenido al proyectar una microfotografía de la reglilla micrométrica (100µm) a 100x y proyectada a una determinada distancia de una pantalla, lo cual permite tener una correspondencia entre micrones y milímetros.

**Biovolumen medio** ( $\mu\text{m}^3/\text{célula}$ ) =  $\Sigma$  de los volúmenes celulares de cocos y bacilos / número de células medidas (Serna-Martínez, 2007).

*c) Conteo de bacterias fotótrofas rojas no sulfurosas viables*

Para la obtención de UFC se utilizó la técnica de serie de diluciones decimales en tubos de prueba conteniendo agar al 3% bacteriológico propuesta por Van Niel (1971) y modificada por Pfennig y Trüper (1981). El medio de cultivo utilizado fue específico para este grupo de bacterias (ver anexo). El procedimiento seguido fue el siguiente:

- i) Las muestras se descongelaron a temperatura ambiente y una alícuota de un mL fue sembrada en tubos de prueba conteniendo 3 mL de agar bacteriológico al 3% y 6 mL de medio específico para bacterias fotótrofas rojas no sulfurosas (Biebl y Pfennig 1981, ver anexo), previamente fundido en baño María.
- ii) La muestra fue homogenizada con ayuda de un vortex, y a partir de ésta se hicieron una serie de diluciones decimales ( $10^{-1}$  hasta  $10^{-5}$  donde ya no ocurrió ningún crecimiento). Los cultivos fueron realizados por triplicado.
- iii) Una vez que el medio solidificó en baño helado, se le agregaron 3 mL de una mezcla de parafina con aceite de parafina (proporción 1:1), para obtener las condiciones anaeróbica requeridas. Finalmente, los tubos fueron incubados a temperatura ambiente y luz incandescente roja (244 watts), con fotoperiodos de 16 horas luz y 8 horas de oscuridad, debido a que las células en vivo muestran absorbancia en el límite cercano a la luz roja (entre 800 y 860 nm) y pocas bacterias rojas no presentan bacterioclorofila *a* y en su lugar contienen bacterioclorofila *b*, la cual absorbe en el infrarrojo (escasamente sobre 1,000 nm) (Madigan et al., 2004).
- iv) La incubación fue hecha durante 3 meses, tiempo en que aparecieron las primeras colonias rojas. Posteriormente se contaron las UFC  $\text{mL}^{-1}$ .

#### *d) Aislamiento bacteriano*

Para la obtención de los aislados bacterianos fotótrofos rojos no sulfurosos se siguió el procedimiento descrito a continuación:

- i) Se quitó el tapón de parafina de los tubos
- ii) Las colonias bacterianas se extrajeron con pipeta Pasteur estéril
- iii) Se colocaron en tubos de ensaye conteniendo medio de cultivo líquido para bacterias rojas no sulfurosas
- iv) Los tubos inoculados se incubaron a temperatura ambiente en fotoperiodo descrito anteriormente, durante 60 días
- v) Posteriormente se transfirió una alícuota de 1 mL a tubos de Hungate previamente gasificados, con una atmósfera microaerobia (5% O<sub>2</sub>/85% N<sub>2</sub>/10% CO<sub>2</sub>)
- vi) Los tubos inoculados se incubaron a temperatura ambiente en fotoperiodo descrito anteriormente, durante 60 días

Para la obtención de aislados bacterianos puros se utilizó la técnica de tubo rodado, la cual, consiste en colocar 2 mL de agar en un tubo de Hungate + 1 mL de medio de cultivo específico para bacterias rojas no sulfurosas, tapar y gasificar con una mezcla de 5% O<sub>2</sub>/85% N<sub>2</sub>/10% CO<sub>2</sub> y esterilizar. Posteriormente colocar los tubos en baño maría para disolver el medio de cultivo y agregar una mezcla de vitaminas y oligoelementos (ver anexos) e inocular con 0.5 mL de cultivo bacteriano, colocar el tubo en el rotor pasando hielo sobre el tubo de prueba para una pronta solidificación del agar. Los tubos inoculados se incubaron en condiciones de fotoperiodo (ya descrito anteriormente) Una vez que se observó crecimiento de colonias bacterianas, éstas se extrajeron con una pipeta Pasteur estéril con punta doblada a 45° y flujo de N<sub>2</sub>. Las colonias así obtenidas se colocaron en medio de cultivo líquido gasificado. Se hicieron, resiembras consecutivas hasta la obtención de cultivos uní específicos.

Para la caracterización de los aislados puros obtenidos se les realizó una serie de pruebas morfológicas y fisiológicas: tipo celular, talla celular, respuesta a la

tensión de Gram, movilidad, producción de polihidroxiбутирато (PHB) (lípidos) y producción de esporas.

*e) Capacidad de fijar el nitrógeno atmosférico (N<sub>2</sub>)*

Con la finalidad de conocer la potencialidad de los aislados a fijar el N<sub>2</sub>, se crecieron en medios de cultivo líquido con y sin nitrógeno combinado bajo condiciones de baja oxigenación

- i) Diez mL de un cultivo bacteriano crecido en condiciones microaerobias (pO<sub>2</sub> 5%O<sub>2</sub>/85%N<sub>2</sub>/10%CO<sub>2</sub>) se sembraron en 90 mL de medio específico para bacterias rojas no sulfurosas, sin fuentes alternas de nitrógeno (ver anexos), en frascos tipo penicilina de 120 mL de capacidad y se mantuvieron bajo condiciones de fotoperíodo (ya descrito anteriormente).
- ii) Otros diez mL de cultivo bacteriano del mismo medio pero con sus fuentes alternas de nitrógeno y bajo las mismas condiciones de cultivo fueron utilizados como testigo.
- iii) El tiempo de incubación fue de aproximadamente dos meses.

El crecimiento bacteriano se midió por espectrofotometría a una longitud de onda de 650 nm utilizando un espectrofotómetro Shimadzu UV a doble haz, utilizando como blanco el medio de cultivo específico sin inocular.

*f) Estrés al oxígeno*

Con la finalidad de conocer la tolerancia al oxígeno de los aislados bacterianos obtenidos y delimitar si presentan un metabolismo microaerobio o anaerobio estricto, una alícuota de 4 mL (tomada del crecimiento en los tubos Hungate incubados a pO<sub>2</sub> de 5%) fue introducida en frascos tipo penicilina (capacidad 60 mL) conteniendo 46 mL del medio de cultivo líquido con fuente alterna de nitrógeno, los cuales fueron gasificados a diferentes pO<sub>2</sub>, (5, 4 y 0) e incubados bajo el régimen de fotoperíodo, como se indicó anteriormente.

Debido a que la mezcla de gas de 4%O<sub>2</sub>/96%N<sub>2</sub> + CO<sub>2</sub>, incorporado a 10% de la fase gaseosa del frasco

*g) Análisis de los bacteriopigmentos (bacterioclorofila a y carotenoides) presentes en los cultivos de los aislados bacterianos fotótrofos rojos no sulfurosos*

Para el análisis cualitativo de los bacteriopigmentos se utilizó la técnica de López-Cortes (1990) modificada en esta investigación como se muestra a continuación:

- De los cultivos bacterianos crecidos en todas las condiciones de  $pO_2$  antes mencionadas, se obtuvieron alícuotas de 10 mL.
- La cuales se colocaron en tubos de centrifuga cónicos de 15 ml y fueron centrifugadas a 5000 rpm por 15 min
- El sobrenadante se eliminó, evitando perder el botón celular
- El botón celular fue resuspendido en 3 mL de metanol puro
- Se volvió a centrifugar a las mismas revoluciones e inmediatamente se hizo la lectura espectrofotométrica por medio de un barrido de 250 a 1000 nm en un espectrofotómetro Shimadzu de doble haz UV-Visible, utilizando como blanco metanol puro

*XI- Análisis estadístico*

Para conocer la relación existente entre la biomasa del FPBT y FPBBT con las variables físicas y químicas se realizó un análisis de matriz de correlaciones utilizando el software el programa Microsoft Excell 2003.

El número de variables consideradas fueron 15 ( $n=15$ ), las correlaciones más significativas presentaron valores de  $r>0.47$  con un nivel de significancia de 0.10 ( $\alpha=0.10$ ).

Con la finalidad de conocer la influencia de las variables ambientales sobre la abundancia de la biomasa del FPBT y del FPBBT, se realizó un dendrograma con los datos obtenidos de los cálculos de biomasa y las variables físicas y químicas utilizando el software Statística versión '99, y el método de Ward para la agrupación de las variables y la distancia Euclidiana para la unión de los grupos. La línea de corte que definió los grupos del dendrograma se realizó de acuerdo a Bianchi (1971).

## 8. RESULTADOS Y DISCUSIONES

### 8.1 Parámetros físicos y químicos

Durante los muestreos que se llevaron a cabo en la laguna de Sontecomapan, estado de Veracruz, en las dos épocas del año (nortes 2006-2007 y secas 2006) se observaron grandes fluctuaciones en los valores de los parámetros físicos y químicos. En la época de nortes la salinidad promedio registrada no varió considerablemente ( $15.9 \pm 9.6\text{‰}$  y  $16.0 \pm 11.1\text{‰}$ , respectivamente), la estación ubicada en la desembocadura del río La Palma fue la que presentó las mayores fluctuaciones en salinidad la cual varió de 4 a 0 2 ‰ en ambas épocas de nortes y hasta 32 ‰ en época de secas. Para la época de secas del 2006, la salinidad fue cercana a la de las aguas marinas entrantes (tabla 7).

En la época de norte 2006 el pH mostró un valor promedio de  $5.8 \pm 1.3$ , con excepción de la estación La Boya que presentó consistentemente un pH de 7.3. Sin embargo, en la época de norte 2007 y en la época de seca 2006 el pH en todas las estaciones se mantuvo ligeramente básico (tabla 7)

La concentración promedio de oxígeno en el agua de fondo no presentó variaciones significativas en las dos épocas de norte, el valor promedio de norte 2006 fue  $6.2 \pm 1.4 \text{ mg L}^{-1}$  y la de norte 2007 fue  $7.9 \pm 0.5 \text{ mg.L}^{-1}$ , los valores más altos se obtuvieron en las estaciones que se ubican sobre el canal de navegación en época de norte 2007, sin embargo en 2006 las concentraciones de oxígeno estuvieron por debajo de los valores de saturación. En secas de 2006 el valor promedio de oxígeno fue ligeramente más bajo que época de norte de 2006 ( $6.04 \pm 0.5 \text{ mg.L}^{-1}$ ) (tabla 7).

En la época de nortes 2007 en casi todas estaciones se obtuvieron temperaturas altas. En época de seca 2006 el valor promedio de la temperatura fue de  $30.2 \pm 1.3$  °C, (tabla 7).

**Tabla 7.** Variación de los parámetros físicos y químicos en el primer centímetro de sedimentos y del O<sub>2</sub> en agua de fondo, en época de nortes 2006-2007 y secas 2006, en la laguna de Sontecomapan (Veracruz).

| Est    | Salinidad<br>(‰) |     |     | pH   |      |      | O <sub>2</sub> disuelto<br>(mg L <sup>-1</sup> ) |       |      | Temperatura<br>(°C) |     |      |
|--------|------------------|-----|-----|------|------|------|--------------------------------------------------|-------|------|---------------------|-----|------|
|        | N06              | N07 | S06 | N06  | N07  | S06  | N06                                              | N07   | S06  | N06                 | N07 | S06  |
| Costa  | 15.7             | 20  | 30  | 5.9  | 7.7  | 7.3  | 6.67                                             | 5.69  | 5.72 | 24.3                | 31  | 26.5 |
| Norte  |                  |     |     |      |      |      |                                                  |       |      |                     |     |      |
| Punta  | 11.4             | 19  | 32  | 4.6  | 7.3  | 6.5  | 8.15                                             | 10.36 | 6.02 | 21.7                | 32  | 25.8 |
| Levisa |                  |     |     |      |      |      |                                                  |       |      |                     |     |      |
| El     | 18.3             | 11  | 33  | 4.5  | 8.1  | 7    | 6.3                                              | 9.35  | 6.72 | 21.2                | 29  | 18   |
| Cocal  |                  |     |     |      |      |      |                                                  |       |      |                     |     |      |
| La     | 4                | 0.2 | 32  | 6.78 | 8.48 | 7.44 | 5.56                                             | 6.40  | 6.22 | 21                  | 29  | 24.1 |
| Palma  |                  |     |     |      |      |      |                                                  |       |      |                     |     |      |
| La     | 30               | 30  | 32  | 7.3  | 8.0  | 7.7  | 4.26                                             | 7.72  | 5.52 | 26                  | 30  | 24.5 |
| Boya   |                  |     |     |      |      |      |                                                  |       |      |                     |     |      |

Est=estaciones de muestreo. N06=época de norte 2006, N07=época de norte 2007, S06=época de seca 2006.

El valor promedio del potencial de oxido reducción (Eh) en los sedimentos en época de norte 2006 fue de  $-47.7 \pm 133$  mV, la mayoría de los sedimentos en esta época registraron un Eh electronegativos con excepción de la estación El Cocal en la cual se obtuvo un valor de Eh positivo (151.1 mV). Por el contrario, en la época de norte 2007 el sedimento de todas las estaciones presentó valores de Eh positivo lo cual de acuerdo a Brune et al. (2000), refleja procesos de oxidación de la materia orgánica. Los valores de Eh variaron de -10.8 a -240.9 mV en la época de secas, con excepción de la estación La Palma que tuvo un Eh positivo (32.8) (tabla 8).

El promedio del porcentaje de carbono orgánico en los sedimentos durante los dos muestreos realizados en época de norte, fue muy variable. En 2006 los sedimentos presentaron una mayor acumulación de MO ( $2.3 \pm 0.6\%$ ) debido al aporte de los ríos y posiblemente a la presencia de raíces de la vegetación circundante, lo que generó un alto volumen de materia orgánica depositada en los sedimento (Ziervogel et al., 2007), mientras que en nortes 2007 ( $0.94 \pm 0.3\%$ ) se

observó una disminución en la concentración de la materia orgánica en todas las estaciones debido a las fuertes corrientes que acarrearón los sedimentos. En época de seca de 2006 los valores más altos de materia orgánica se presentaron en las estaciones Costa Norte ubicada al noroeste de la laguna y La Boya ubicada en la entrada de la boca de la laguna (tabla 8)

**Tabla 8.** Variación de los parámetros físicos y químicos registrados en el primer centímetro de sedimentos, y valores de profundidad y transparencia en época de nortes y secas, en la laguna de Sontecomapan (Veracruz).

| Est          | Eh<br>(mV) |      |        | C orgánico<br>(%) |     |     | Profundidad<br>(cm) |     |     | Transparencia<br>(cm) |     |     |
|--------------|------------|------|--------|-------------------|-----|-----|---------------------|-----|-----|-----------------------|-----|-----|
|              | N06        | N07  | S06    | N06               | N07 | S06 | N06                 | N07 | S06 | N06                   | N07 | S06 |
| Costa Norte  | -66.5      | 25.3 | -95    | 2.8               | 0.5 | 2.1 | 40                  | 130 | 110 | 25.4                  | 75  | 80  |
| Punta Levisa | -215.5     | 30.4 | -87.5  | 1.4               | 0.9 | 0.6 | 70                  | 110 | 135 | 17.8                  | 84  | 80  |
| El Cocal     | 151        | 28.3 | -10.8  | 1.8               | 1.2 | 1.2 | 200                 | 170 | 180 | 17.8                  | 84  | 120 |
| La Palma     | -16.6      | 8.7  | 32.8   | 2.6               | 0.9 | 1.4 | 50                  | 75  | 100 | 26.7                  | 75  | 90  |
| La Boya      | -91.3      | 14.2 | -240.9 | 2.9               | 1.1 | 3   | 40                  | 58  | 58  | 46.3                  | 58  | 58  |

Est=estaciones N06=época de norte 2006, N07=época de norte 2007, S06=época de seca 2006

La profundidad varió de 80 ± 68 cm en nortes 2006 hasta de 108.6 ± 44.5 cm en norte 2007. En seca 2006 la profundidad promedio fue de 84.2 ± 46.3 cm, y la estación La Boya presentó la menor profundidad con 58 cm (tabla 8).

Los mayores valores de transparencia se obtuvieron en época de Nortes 2007 y secas 2006, y los menores fueron observados nortes 2006 (26.8 ± 11.7 cm) (Tabla 8).

Los sedimentos fueron principalmente de tipo areno-limoso en época de norte del 2006 y secas 2006, y areno-arcilloso-limoso en norte de 2007, la variación de las arenas en 2006 con respecto a la del 2007 fue de 79.2 ± 13.8 % y 72.8±29.7 %

respectivamente, sin embargo, el porcentaje de arcillas fue mayor en 2007 que en 2006 ( $5.6 \pm 3 \%$  y  $11.8 \pm 11 \%$ ) (tabla 9)

**Tabla 9.** Variaciones en la textura de los sedimentos y en la intensidad luminosa en el agua de fondo en las diferentes épocas de muestreo.

| Est          | Arenas (%) |     |      | Arcillas (%) |     |     | Limo (%) |     |      | Intensidad luminosa ( $w/m^2$ ) |      |      |
|--------------|------------|-----|------|--------------|-----|-----|----------|-----|------|---------------------------------|------|------|
|              | N06        | N07 | S06  | N06          | N07 | S06 | N06      | N07 | S06  | N06                             | N07  | S06  |
| Costa Norte  | 94         | 20  | 80.5 | 4            | 31  | 5.1 | 2        | 49  | 14.4 | 24.6                            | 48.4 | 51.7 |
| Punta Levisa | 72         | 88  | 96.3 | 6            | 10  | 2.1 | 22       | 2   | 1.4  | 25                              | 23.5 | 43.5 |
| El Cocal     | 60         | 84  | 87.5 | 10           | 6   | 2.5 | 30       | 10  | 10   | 0.17                            | 16.7 | 56.8 |
| La Palma     | 90         | 90  | 94.2 | 2            | 4   | 1.4 | 8        | 6   | 4.4  | 25.3                            | 36.5 | 65   |
| La Boya      | 80         | 92  | 90.6 | 6            | 8   | 2.7 | 14       | 10  | 6.7  | 5.4                             | 40.5 | 56.2 |

Est.=estaciones, N06=época de norte 2006 N07=época de norte 2007. S06=época de seca 2006

La intensidad luminosa estuvo por arriba de  $43.5 w/m^2$  en seca 2006 y en norte 2006 ésta fue menor a la registrada en norte de 2007 (tabla 9).

Los valores promedios de los nutrimentos inorgánicos estudiados ( $N-NO_3^-$ ,  $N-NO_2^-$ ,  $N-NH_4^+$ ,  $HPO_4^{2-}$  y fósforo total) reflejaron cambio estacionales durante el periodo de norte 2006 a norte de 2007 y seca 2006. Los nitratos, el amonio, los ortofosfatos y el fósforo total fueron mayores en época de norte 2007 que en norte 2006 siendo el fósforo total y los nitritos los que presentaron los promedios más altos. En época de seca del 2006 con excepción de los nitritos, se presentaron los valores más altos de estos nutrimentos (figura 8).

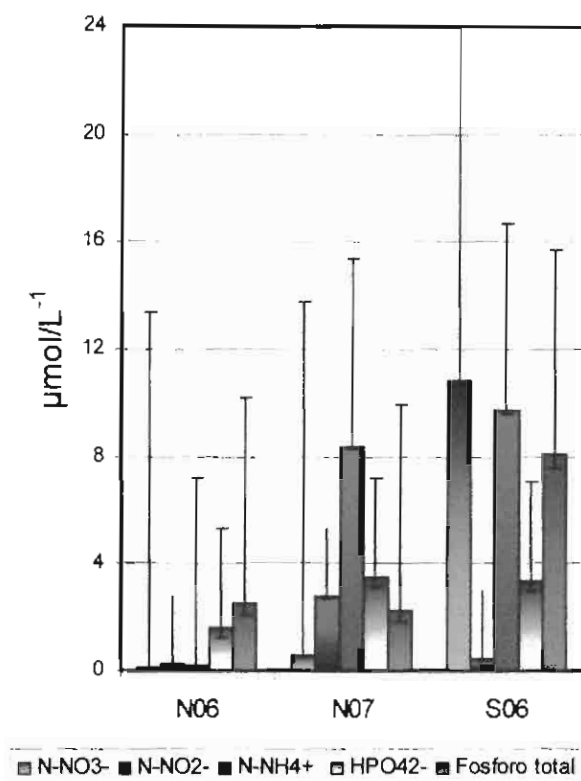
La primera época de norte (2006) se caracterizó en general, por las bajas concentraciones de nutrimentos en todas las estaciones. Los valores de nitratos ( $N-NO_3^-$ ) fueron de  $0.02$  a  $0.26 \mu mol.L^{-1}$ , los de nitritos ( $N-NO_2^-$ ) de  $1.14$  a  $2.15 \mu mol.L^{-1}$  y los de amonio ( $N-NH_4^+$ ) de  $0.02$  a  $0.92 \mu mol.L^{-1}$ . Las concentraciones de ortofosfatos fueron de  $0.09$  a  $0.28$  y las de fósforo total de  $1.14$  a  $3.26 \mu mol.L^{-1}$ . En

época de norte 2007 las concentraciones de los nutrimentos se incrementaron al igual que época de secas 2006, los valores más altos de los iones de amonio fueron de 10.88 y 16.45  $\mu\text{mol.L}^{-1}$ . La estación ubicada Frente al Cocal presentó el valor más bajo de este nutrimento (0.246  $\mu\text{mol.L}^{-1}$ ), las concentraciones más altas de los iones de nitratos se registraron en la estación Costa Norte y La Boya (0.9  $\mu\text{mol.L}^{-1}$ ) y las de nitritos las estaciones Costa Norte con 5.45  $\mu\text{mol.L}^{-1}$  y La Palma con 5.48  $\mu\text{mol.L}^{-1}$ . Las concentraciones de los ortofosfatos y del fósforo total, en general fueron altas. En la época de seca 2006 las concentraciones de los nitratos y el amonio fueron las más altas en casi todas las estaciones. Las concentraciones más altas de nitratos fueron de 21.43  $\mu\text{mol.L}^{-1}$  (estación Frente Cocal) y 28.57  $\mu\text{mol.L}^{-1}$  (La Boya), mientras que las del amonio fueron de 12.14 a 14.29  $\mu\text{mol.L}^{-1}$ . En esta época de año el fósforo total presentó concentraciones más altas que en las 2 épocas de norte (tabla 10).

**Tabla 10.** Variación en las concentraciones de nitratos nitritos, amonio, ortofosfatos y fosforo total en laguna de Sontecomapan en las diferentes épocas de muestreo

| Est          | N-NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> $\mu\text{mol.L}^{-1}$ |     |       | N-NO <sub>2</sub> <sup>-</sup> $\mu\text{mol.L}^{-1}$ |      |      | N-NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> $\mu\text{mol.L}^{-1}$ |       |       | PO <sub>4</sub> <sup>3-</sup> $\mu\text{mol.L}^{-1}$ |      |      | Fósforo total $\mu\text{mol.L}^{-1}$ |      |      |
|--------------|-------------------------------------------------------|-----|-------|-------------------------------------------------------|------|------|-------------------------------------------------------|-------|-------|------------------------------------------------------|------|------|--------------------------------------|------|------|
|              | N6                                                    | N7  | S6    | N6                                                    | N7   | S6   | N6                                                    | N7    | S6    | N6                                                   | N7   | S6   | N6                                   | N7   | S6   |
| Costa Norte  | 0.14                                                  | 0.9 | 1.7   | 1.87                                                  | 5.45 | 0.64 | 0.16                                                  | 10.88 | 6.43  | 0.28                                                 | 5.05 | 1.9  | 2.88                                 | 2.51 | 7.1  |
| Punta Levisa | 0.02                                                  | 0.3 | 1.8   | 1.67                                                  | 1.38 | 0.5  | 0.19                                                  | 16.45 | 2.86  | 0.14                                                 | 1.95 | 1.9  | 3.26                                 | 2.63 | 7.1  |
| Frente Cocal | 0.26                                                  | 0.5 | 21.43 | 1.42                                                  | 0.17 | 0.43 | 0.02                                                  | 0.24  | 14.29 | 0.09                                                 | 5.26 | 1.42 | 1.9                                  | 2.69 | 0.9  |
| La Palma     | 0.17                                                  | 0.2 | 0.6   | 2.15                                                  | 5.48 | 0.14 | 0.12                                                  | 14.5  | 12.86 | 0.22                                                 | 3.74 | 1.0  | 2.79                                 | 1.38 | 4.5  |
| La Boya      | 0.14                                                  | 0.9 | 28.57 | 1.14                                                  | 1.46 | 0.57 | 0.92                                                  | 2.07  | 12.14 | 0.17                                                 | 1.47 | 1.8  | 1.14                                 | 2.45 | 20.8 |

Est=estaciones. N6=época de norte 2006, N7=época de norte 2007, S6=época de seca 2006



**Figura 7.** Valor medio de las variaciones promedio y desviación estándar de los nutrientes durante la época de norte (N06), norte 2007 (N07), y seca 2006 (S06) en la laguna de Sontecomapan.

## 8.2. Conteo del número total de células y volúmenes celulares medios y del topicobentos total (FPBT) y fotopicobacteriobentos total (FPBBT).

En la tabla 11 se presentan los valores de los volúmenes medios de bacilos y cocos y del número total de células del FPBT y del FPBBT, los cuales mostraron variaciones en las distintas épocas de muestro. Se observó que en época de norte del 2006 la estación Punta Levisa los volúmenes celulares del FPBT fueron más altos ( $0.85 \mu\text{m}^3$ ) que en el resto de las estaciones. En época de norte del 2007 en las estaciones la Palma y la Boya se registraron los volúmenes medios de cocos y

bacilos más altos (4 y 1  $\mu\text{m}^3$ , respectivamente). En estas mismas estaciones los volúmenes celulares del FPBBT fueron también los más altos (0.62 y 0.58  $\text{cm}^3$  respectivamente). En época de seca del 2006 la estación La Boya registró valores bajos de volúmenes de FPBT (0.31  $\mu\text{m}^3$ ), es importante señalar que en este muestreo se obtuvieron volúmenes altos de FPBBT en casi todas las estaciones (tabla 11).

**Tabla 11.** Volumen celular (cocos y bacilos) y número total de células del fotopico bentos (FPBT) y del fotopicobacterio bentos (FPBBT) presentes en el primer centímetro de sedimento en las diferentes épocas de muestreo

| Est          | Volumen medio de bacilos y cocos del FPBT ( $\mu\text{m}^3$ ) |      |      | No de células $\text{cm}^{-2}$ FPBT |       |       | Volumen medio de bacilos y cocos del FPBBT ( $\mu\text{m}^3$ ) |      |      | No de células $\text{cm}^{-2}$ FPBBT |        |        |
|--------------|---------------------------------------------------------------|------|------|-------------------------------------|-------|-------|----------------------------------------------------------------|------|------|--------------------------------------|--------|--------|
|              | N06                                                           | N07  | S06  | N06                                 | N07   | S06   | N06                                                            | N07  | S06  | N06                                  | N07    | S06    |
| Costa Norte  | 0.55                                                          | 0.4  | 0.57 | 6204                                | 32828 | 26736 | 0.22                                                           | 0.6  | 0.43 | 37115                                | 166511 | 55729  |
| Punta Levisa | 0.82                                                          | 0.4  | 1.1  | 11055                               | 41853 | 9025  | 0.63                                                           | 0.3  | 0.56 | 5546                                 | 422069 | 37556  |
| El Cocal     | 0.48                                                          | 0.42 | 0.51 | 13311                               | 25044 | 24931 | 0.53                                                           | 0.34 | 0.57 | 4738                                 | 441021 | 162450 |
| La Palma     | 0.40                                                          | 4    | 1.7  | 6994                                | 34059 | 4738  | 0.6                                                            | 0.62 | 0.66 | 32490                                | 106344 | 88294  |
| La Boya      | 0.38                                                          | 1    | 0.31 | 7896                                | 38469 | 26398 | 0.23                                                           | 0.58 | 0.5  | 32490                                | 58512  | 150567 |

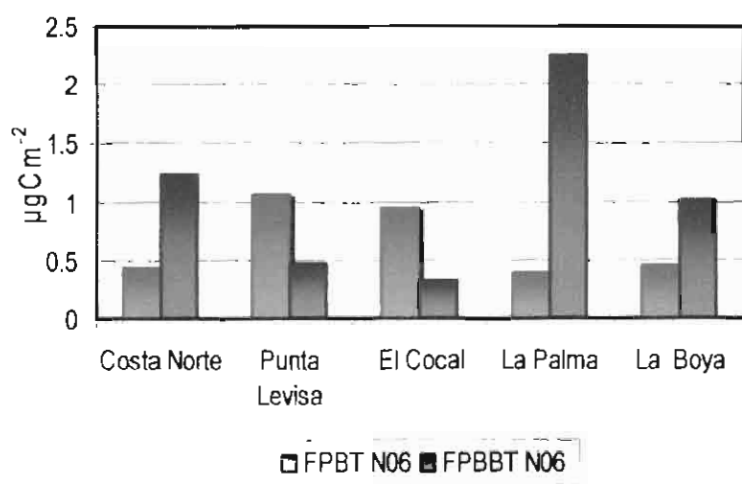
Est= estaciones, N06= época de nortes 2006, N07= época de nortes 2007, S06 época de secas 2006

De manera general se observó que la abundancia del FPBT y del FPBBT durante las tres épocas de muestreo fue mayor de un grupo a otro en las diferentes estaciones. La abundancia del FPBBT en época de nortes 2006 fue mayor que la del FPBT en casi todas las estaciones, con excepción de Punta Levisa y El Cocal donde se registraron abundancias altas del FPBT (11055 y 13311 No. de células  $\text{cm}^{-2}$  respectivamente). Para la época de norte 2007 la abundancia del FPBBT fue mayor que la del FPBT en todas las estaciones, sin embargo, las abundancias del FPBT no son despreciables. En época de secas 2006 se observó el mismo comportamiento que en época de norte 2007 (tabla 11).

### 8.3 Biomasa total del FPBT y FPBBT

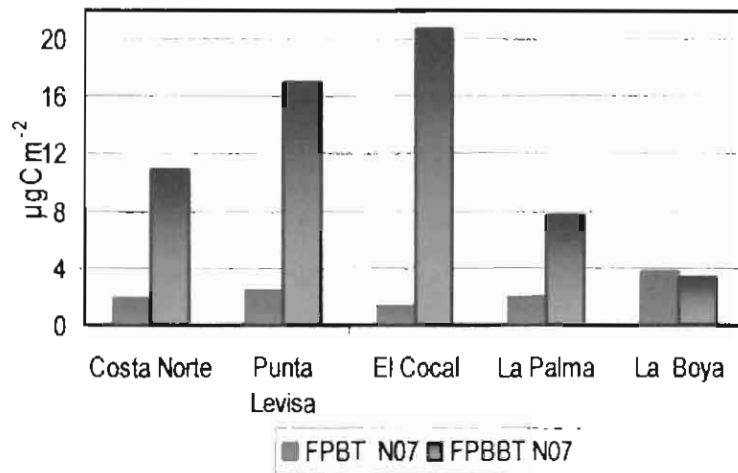
La estimación de la biomasa total del FPBT y del FPBBT en las tres épocas de muestreo varió en todas las estaciones. En la época de norte 2006 se registró el menor aporte de contenido de carbono por ambos grupos, y la mayor contribución de biomasa total del FPBT y FPBBT se presentó en norte del 2007 en todas las estaciones. En época de seca 2006, aun cuando hay un mayor aporte del FPBBT, la estación La Palma registró los más altos valores de biomasa del FPBT durante los tres muestreos.

En época de nortes del 2006 el valor promedio de la biomasa del FPBT fue de  $0.65 \pm 0.32 \mu\text{gCm}^{-2}$  y la del FPBBT fue  $1.1 \pm 0.77 \mu\text{gCm}^{-2}$ . La estación Punta Levisa presentó un aporte mayor de biomasa del FPBT ( $1.06 \mu\text{gCm}^{-2}$ ), seguida de la estación El Cocal ( $0.94 \mu\text{gCm}^{-2}$ ); en estas estaciones se observó que la contribución del FPBBT fue menor. Los aportes mayores de biomasa del FPBBT se registraron en las estaciones La Palma, Costa Norte y La Boya ( $2.25$ ,  $1.24$  y  $1.01 \mu\text{gCm}^{-2}$ , respectivamente) (figura 8), en estas estaciones los conteos celulares del FPBBT fueron los más altos (tabla 11).



**Figura 8.** Variación de la biomasa del fotopicobacteriobentos total (FPBT) y del picobacteriobentos total (FPBBT) en época de nortes del 2006 (N06).

En temporada de nortes en 2007 la biomasa promedio del FPBT fue de  $2.3 \pm 9 \mu\text{gCm}^{-2}$  y la del FPBBT de  $12 \pm 7 \mu\text{gCm}^{-2}$ . La mayor contribución en carbono del FPBT se presentó en las estaciones La Boya y Punta Levisa (3.73 y  $2.32 \mu\text{gCm}^{-2}$  respectivamente), la estación El Cocal presentó la mayor biomasa del FPBBT ( $20.72 \mu\text{gCm}^{-2}$ ). En esta época de muestreo se observó un comportamiento inverso en la producción de biomasa, así en las estaciones en las que se observó menor biomasa de FPBT la biomasa de FPBBT fue las más alta (figura 9).

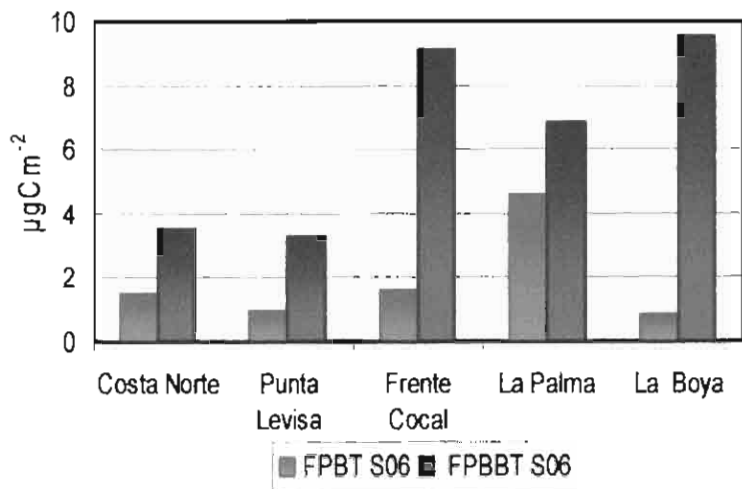


**Figura 9.** Variación de la biomasa del fotopicobacteriobentos total (FPBT) y del picobacteriobentos total (FPBBT) en época de nortes del 2007.

En las dos épocas de nortes estudiadas se observó que las estaciones de muestreo que presentaron valores altos de biomasa del FPBT en 2006, en 2007 presentaron una disminución y un incremento en la biomasa del FPBBT, el cual fue mayor en 2007 (figuras 8 y 9).

En época de seca (2006) el valor promedio obtenido de biomasa del FPBT fue de  $1.9 \pm 1.6 \mu\text{gCm}^{-2}$  y la del FPBBT  $6.5 \pm 3 \mu\text{gCm}^{-2}$ . En todas las estaciones la contribución del FPBBT fue mayor: en la estación La Palma con influencia de agua dulce, se registró la mayor biomasa del FPBT ( $4.6 \mu\text{gCm}^{-2}$ ), mientras que en la

estación La Boya con influencia de agua marina la menor contribución en carbono fue la del FPBT ( $0.81 \mu\text{gCm}^{-2}$ ) (figura 10)



**Figura 10.** Variación de la biomasa del fotopicobacteriobentos total (FPBT) y del picobacteriobentos total (FPBBT) en época de seca del 2006 (S06).

La relación entre la biomasa del FPBT y FPBBT con el volumen celular  $\mu\text{m}^3$  y el número de células  $\text{cm}^{-2}$ , se analizó mediante una matriz de coeficiente de correlación con 15 variables biológicas. El número de variables consideradas fue de 15 ( $n=15$ ), se consideraron significativos los valores de  $r>0.47$  con un nivel de significancia de 0.10 ( $\alpha=0.10$ ).

En este análisis estadístico se observó que la biomasa del FPBT se vio influenciada con una significancia de  $r=0.68$  por los volúmenes medios de bacilos y cocos, mientras que la biomasa del FPBBT presentó una alta correlación de  $r=0.97$  con el número de células  $\text{cm}^{-2}$ .

Los resultados obtenidos indican una variación en tiempo y espacio en el tamaño de las comunidades del FPBT y FPBBT en cada una de las épocas muestreadas, lo que se refleja en el establecimiento de dos procesos de contribución de carbono al sistema. La mayor contribución en carbono microbiano se debe al FPBBT, sin embargo la contribución del FPBT es importante ya que los volúmenes celulares

en algunas estaciones fueron mayores que el FPBBT, lo que se confirma con el coeficiente de correlación. Los conteos del FPBT en casi todas las estaciones fueron menores que los del FPBBT. Lee y Fuhrman (1987) con base a los resultados que se obtuvieron de las relaciones entre volúmenes celulares, conteo directo y biomasa, sugieren que células pequeñas tienden a tener más carbono y nitrógeno por volumen que células grandes. En cuanto a los volúmenes menores del FPBBT, Bratbak (1985) y Gajú *et al.* (1989) refieren que los volúmenes celulares de bacterias fotoautótrofas tienden a cambiar en respuesta a las variables como la velocidad de crecimiento, la temperatura y a las interferencias que causa la presencia de vesículas de gas al interior de las células, inclusiones intracelulares y formación de agregados. Estos pueden ser factores de error a la hora de cálculo de biomasa

La abundancia del FPBT y el FPBBT se ve afectada por la depredación, la sucesión de microorganismos, los procesos de heterotrofia, y en un momento dado por los cambios en la estructura de las comunidades microbianas (Danovaro *et al.*, 2001; Haglund *et al.*, 2002). Lo que puede explicar que en un momento dado los conteos celulares hayan sido bajos.

#### *8.4 Relación de la biomasa del FPBT y FPBBT y las variables físicas y químicas*

La relación entre la biomasa del FPBT y FPBBT y las variables físicas y químicas se analizó mediante una matriz de coeficiente de correlación con 15 variables ambientales y biológicas (entre los que se encuentran la biomasa del FPBT y del FPBBT). El número de variables consideradas es de 15 ( $n=15$ ), se consideraron correlaciones significativas con valores de  $r>0.47$  con un nivel de significancia de 0.10 ( $\alpha=0.10$ ) (tabla 12).

Se hace notorio que los coeficientes de correlación mostraron que la biomasa del FPBT y del FPBBT estuvieron influenciadas por la materia orgánica de manera inversa ( $r=-0.51$  y  $r=-0.41$  respectivamente). Esto probablemente se explica porque al ser microorganismos autótrofos la abundancia de ambas es inhibida por procesos de heterotrofia. Otra variable relacionada con la abundancia de ambas

biomasas fue con el amonio, con  $r=0.47$  para el FPBT y  $r=0.52$  para el FPBBT, coincidiendo probablemente con la producción de amonio por el bentos o debido a la entrada de éste vía alóctona, haciéndolo disponible para los procesos de biosíntesis de estos grupos microbianos (Stal, 2003). El pH también se relacionó con la abundancia de la biomasa del FPBBT con  $r=0.58$ , lo que puede indicar un balance en los procesos de mineralización de la materia orgánica en el momento del muestreo, principalmente en N07 y S06 lo que favoreció la abundancia de estos microorganismos que crecen mejor a valores de pH de entre 4 y 8.5 (Imhoff, 2006) (durante los muestreos los valores de pH no fueron mayores al rango señalado) Otra relación con la abundancia del FPBBT fue la del oxígeno con una correlación de  $r=0.60$ . Actualmente se sabe que muchas de ellas son bacterias microaerobias capaces de crecer bien en condiciones de estrés en oxígeno sin que se vea afectada la síntesis de pigmentos ni la destrucción de la célula (Imhoff, 2006). La intensidad luminosa presentó una correlación de 0.51 con el FPBT.

Los coeficientes de correlaciones más altos en la matriz con respecto a las variables ambientales, se presentaron entre las arenas, el limo y las arcillas con una correlación de  $r=-0.98$  para arena limo y  $r=-0.94$  arena arcilla, lo que señala dos ambientes diferentes en cuanto a la composición del tamaño de grano, debido a la hidrodinámica del sistema

Otra correlación importante es entre la salinidad y la temperatura con  $r=0.76$ , en todos los muestreos la temperatura del agua marina fue mayor a la de los aportes de agua dulce.

El amonio con la temperatura presentó una correlación de  $r=0.52$ . Si se atribuye la presencia de este a un ambiente oxido-reductor, se pudiera establecer que la temperatura favorece la presencia de compuestos orgánicos en la interfase agua-sedimento, probablemente como producto de exudados de cianobacterias y bacterias autótrofas o como producto de proceso de mineralización de la materia (Álvarez, 2005) Otras variables que presentaron correlación con el amonio son la intensidad luminosa y la transparencia con  $r=0.64$  y  $r=0.71$ , respectivamente.

**Tabla 12.** Matriz de correlación entre el fotopicobentos total (FPBT), el fotopicobacteriobentos total (FPBBT) y las variables ambientales

|                               | FPBT  | FPBBT | Sal   | pH    | Eh    | NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> | NO <sub>2</sub> <sup>-</sup> | NH <sub>4</sub> | Aren  | °C    |
|-------------------------------|-------|-------|-------|-------|-------|------------------------------|------------------------------|-----------------|-------|-------|
| pH                            | 0.41  | 0.58  | 0.09  | 1     | 0.43  | 0                            | 0                            | 0               | 0     | 0     |
| PO <sub>4</sub> <sup>3-</sup> | 0.64  | 0.37  | -0.02 | 0.35  | 0.31  | -0.20                        | 0.18                         | 0               | 0     | 0     |
| NH <sub>4</sub>               | 0.47  | 0.52  | 0.23  | 0.48  | 0.07  | 0.45                         | 0.42                         | 1               | 0     | 0     |
| mg/L O <sub>2</sub>           | 0.28  | 0.60  | 0.27  | 0.01  | 0.21  | -0.18                        | -0.10                        | 0.13            | 0     | 0     |
| NO <sub>2</sub> <sup>-</sup>  | 0.19  | 0.23  | -0.31 | 0.48  | 0.20  | -0.15                        | 1                            | 0               | 0     | 0     |
| MO                            | -0.51 | -0.41 | 0.07  | -0.20 | -0.42 | 0.27                         | -0.48                        | -0.34           | 0     | 0     |
| Fosf total                    | -0.15 | 0.06  | 0.41  | 0.14  | -0.65 | 0.67                         | -0.18                        | 0               | 0     | 0     |
| °C                            | 0.19  | -0.11 | 0.76  | 0.22  | -0.34 | 0.43                         | 0.04                         | 0.52            | 0.17  | 1     |
| Arena                         | -0.02 | -0.03 | 0.08  | 0.13  | -0.25 | 0.18                         | -0.51                        | 0.01            | 1     | 0     |
| %Arcilla                      | 0.09  | 0.22  | -0.08 | 0.06  | 0.30  | -0.22                        | 0.62                         | 0.13            | -0.94 | 0     |
| %Limo                         | -0.08 | -0.08 | -0.08 | -0.23 | 0.21  | -0.14                        | -0.42                        | -0.10           | -0.98 | 0     |
| Prof                          | 0.07  | 0.29  | -0.11 | -0.17 | 0.50  | -0.37                        | 0.03                         | -0.13           | -0.38 | -0.22 |
| Intensida                     | 0.51  | 0.15  | 0.48  | 0.44  | -0.25 | 0.49                         | 0.13                         | 0.64            | 0.11  | 0.72  |
| Luminosa                      |       |       |       |       |       |                              |                              |                 |       |       |
| Trans                         | 0.47  | 0.63  | 0.41  | 0.65  | 0.17  | 0.32                         | 0.23                         | 0.71            | 0.13  | 0.52  |

La correlación entre nitratos y fósforo total fue de  $r=0.67$ , probablemente se debe a la presencia de actividades heterótrofas en la interfase agua-sedimento, si se considera que el fósforo total incluye materia orgánica en un ambiente donde los procesos de mineralización de la materia orgánica se están llevando a cabo, asociado a la correlación de este nutrimento con la intensidad luminosa ( $r=0.49$ ).

Los nitritos tuvieron una correlación negativa con la materia orgánica y con las arenas de  $r=-0.48$  y  $r=-0.51$  respectivamente, y una correlación de  $r=0.62$  con las arcillas.

Otra correlación fue la del fósforo total con el potencial de oxido reducción (Eh) de ( $r=-0.65$ ) y con la profundidad ( $r=0.50$ ). Lo que indica que la presencia del fósforo

total es mayor en un ambiente oxidante, y en aquellos donde existe una mayor descarga de éste vía alóctona, principalmente en época de nortes.

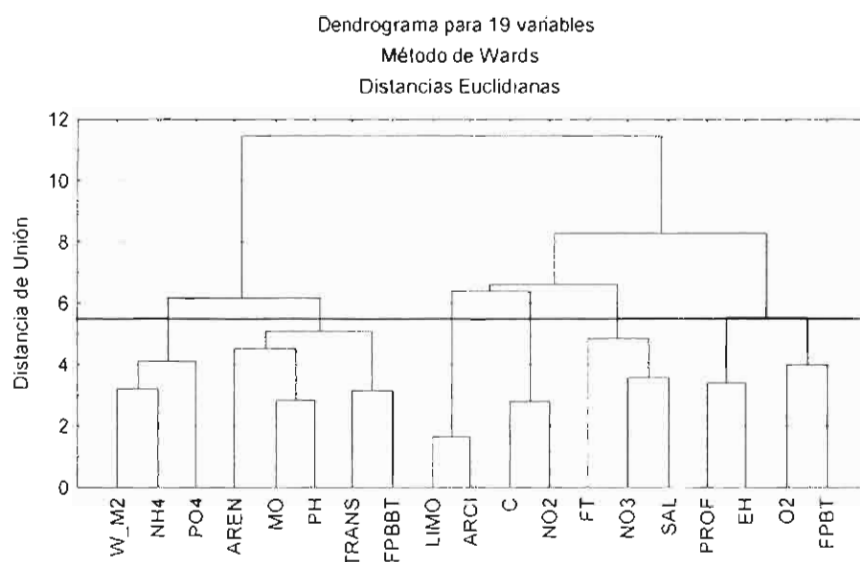
Por otro lado, se pudo observar que el  $\text{NH}_4^+$  y  $\text{NO}_2^-$  tienen una correlación directa con el pH ( $r=0.48$ ) y con la profundidad ( $r=0.65$ ). Estos nutrimentos son incorporados por procesos de mineralización de la materia a los sedimentos superficiales.

Igualmente, con la finalidad de conocer la influencia de las variables ambientales sobre la abundancia de la biomasa del FPBT y del FPBBT, se realizó un dendrograma general con los resultados de los cálculos de biomasa y las variables físicas y químicas, utilizando el programa Statistica, método de Ward para la agrupación de las variables y la distancia Euclidiana para la unión de los grupos. La línea de corte que definió los grupos del dendrograma se realizó de acuerdo a Bianchi (1971) (figura 12 anexos)

En el dendrograma las variables se agruparon en dos ambientes (figura13): uno a la izquierda y otro a la derecha, separados por una distancia Euclidiana de 12. El ambiente de la izquierda representa un ambiente de más energía por estar las arenas (AREN), en él quedó agrupada la biomasa del FPBBT; mientras que en el ambiente de la derecha se encuentra los limos (LIMO) y las arcillas (ARCI) característicos de ambientes de baja energía y las biomasas del FPBT.

El ambiente de la izquierda se dividió en dos grupos, el grupo 1 formado por las intensidad luminosa ( $W_{M2}$ ), el amonio ( $\text{NH}_4^+$ ) y los ortofosfatos ( $\text{PO}_4^{3-}$ ), y el grupo 2 por el FPBBT, la transparencia (TRANS), el pH, la materia orgánica (MO) y las arenas (AREN).

El ambiente de la derecha está formado por dos grupos, en él quedaron agrupadas la mayor parte de las variables ambientales, el grupo 1 quedó formado por los limos (LIMO), las arcillas (ARCI), la temperatura (C), los nitritos ( $\text{NO}_2^-$ ), el fósforo total (FT), los nitratos ( $\text{NO}_3^-$ ) y la salinidad (SAL), el grupo 2 formado por la biomasa del FPBT, el  $\text{O}_2$  el Eh y la profundidad (PROF).



**Figura 12** Dendrograma de las variables ambientales y biológicas, de toda las épocas de muestreo (nortes 2006, nortes 2007 y secas 2006).

En los siguientes párrafos se discute la connotación de las variables, intra y extra grupales, con la abundancia de la biomasa del FPBBT y FPBT. En el dendrograma la abundancia de la biomasa del FPBBT estuvo más directamente influenciada por la transparencia, el pH, la MO y por la arenas y en menor escala por el grupo formado por la cantidad de energía incidente (medida en  $Wm^{-2}$ ); en este mismo grupo se encuentran el amonio y los ortofosfatos, que se tienen como materia prima y producto, respectivamente de las actividades microbianas, el amonio es utilizado como fuente de nitrógeno para la acumulación de biomasa. En este ambiente las arenas son un mejor sustrato para la presencia del FPBBT, ya que permiten una mejor difusión del  $O_2$  y la penetración de la luz roja e infrarroja (Demergasso et al., 2003). Los microorganismos fotótrofos utilizan la luz como fuente de energía para la producción de biomasa (Madigan et al., 2004).

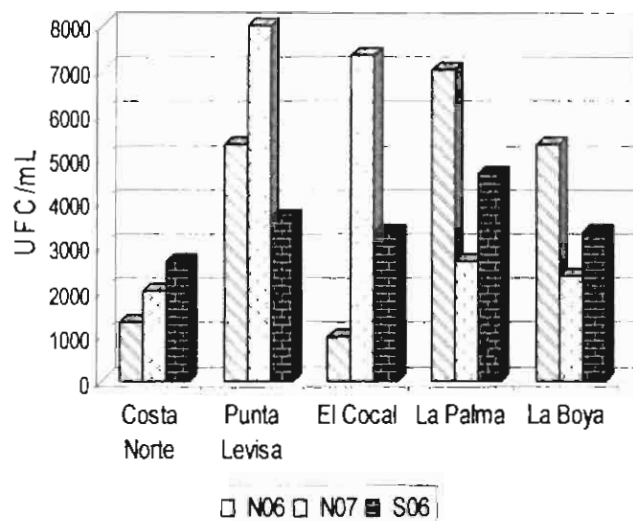
Por otro lado la abundancia del FPBT tuvo una mayor relación con el  $O_2$ , el EH y la PROF, y una menor relación con la SAL, los  $NO_3^-$ , el FT, los  $NO_2^-$ , la C, las ARCI y los LIMO. Es importante resaltar que la salinidad marca un ambiente

propicio para la actividad de este grupo, ya que las poblaciones del FPBT soportan fluctuaciones de salinidad, y las fracciones pequeñas como las arcillas son un mejor sustrato para este grupo, y dependiendo del contenido orgánico presente en los sedimentos, la abundancia puede verse afectada (Watermann *et al.*, 1999; Stal, 2003). También de esta figura cabe resaltar que la temperatura tuvo poca relación con FPBT. La presencia del FPBT ha sido reportada en arcillas-limosa (Watermann *et al.*, 1999).

#### 8.5 Unidades formadoras de colonias de bacterias fotótrofas rojas no sulfurosas (*Rhodospirillaceae*)

De las tres épocas de muestreo se observó que en época de nortes 2007 hubo una abundancia mayor a  $2.7 \times 10^3$  UFC mL<sup>-1</sup> de bacterianas fotótrofas rojas no sulfurosas, en casi todas las estaciones de muestreo. En norte del 2006 solo en la estación La Palma y La Boya se registraron abundancias de  $7 \times 10^3$  y  $5.3 \times 10^3$  UFC mL<sup>-1</sup>, respectivamente. En época de seca la abundancia de las colonias bacteriana fue  $> 2.7 \times 10^4$  UFC mL<sup>-1</sup>. Los valores promedios de las abundancias de las colonias bacterianas rojas no sulfurosas en época de nortes del 2006 y 2007 fueron de  $4 \times 10^3 \pm 2.7 \times 10^3$  UFC mL<sup>-1</sup> y  $4.5 \times 10^3 \pm 2.9 \times 10^3$  mL<sup>-1</sup> respectivamente. En época de seca 2006 la abundancia promedio fue de  $3.5 \times 10^3 \pm 7.3 \times 10^2$  UFC mL<sup>-1</sup>. En época de norte 2006 la estación El Cocal y Costa Norte presentaron las menores abundancias ( $1 \times 10^3$  y  $1.3 \times 10^3$  UFC mL<sup>-1</sup> respectivamente). Para la época de norte del 2007 las estaciones Punta Levisa y El Cocal presentaron una mayor abundancia de UFC. En época de seca del 2006 la estación La Palma presentó las abundancias más altas ( $4.7 \times 10^3$  UFC mL<sup>-1</sup>) (figura 13).

Con el fin de conocer la influencia de las variables ambientales sobre la abundancia de la población bacteriana fotótrofa roja no sulfurosa se realizó una matriz de correlación entre las UFC y las variables físicas y químicas.



**Figura 13.** Unidades Formadoras de Colonias (UFC) de bacterias fotótrofas rojas no sulfurosas presentes en el primer centímetro de sedimento, de las diferentes estaciones de muestreo, en época de norte del 2006 (N06), en época de norte del 2007 (N07) y en época de seca del 2006 (S06).

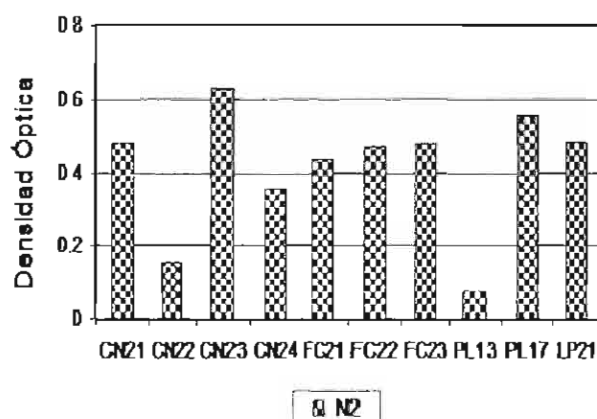
De entre todas las variables sólo el oxígeno presentó una correlación significativa con la abundancia de bacterianas fotótrofas rojas no sulfurosas con una  $r=0.47$ .

#### 8.6 Aislamiento bacteriano de bacterias fotótrofas rojas no sulfurosas de la familia *Rhodospirillaceae* fijadoras de $N_2$

Se obtuvieron un total de 10 aislados bacterianos fotótrofos rojos no sulfurosos fijadoras de nitrógeno molecular ( $N_2$ ) bajo condiciones de microaerobiosis ( $85N_2/5\%O_2/10\%CO_2$ ). De los resultados obtenidos se observó que los aislados CN23, PL17, LP21, CN21, FC23, FC22 y FC21 presentaron un crecimiento mayor utilizando el  $N_2$ , mientras que los aislados bacterianos CN22 y PL13 fueron los que tuvieron un bajo crecimiento; (figura14). Cabe resaltar que el 100% de los aislados crecieron bien en medio con amonio como fuente de nitrógeno en el medio de cultivo.

En cuanto a las pruebas morfológicas realizadas, el 100% de los aislados bacterianos fueron Gram negativos (característico de este grupo bacteriano). El 80% fueron bacilos, 10% espirilos y 10% cocos. El 30% presentó pleomorfismo, el 100% fueron no presentaron esporas y el 60% tuvo movilidad.

El 20% de los aislados bacterianos produjo gránulos de reserva intracelulares (PHB). EL 70% cuenta con cuerpos de reserva (lipidos) al interior de la célula.



**Figura 14.** Capacidad de crecimiento de los aislados bacterianos fotótrofos rojos no sulfurosos fijando  $N_2$ .

### 8.7 Estrés en oxígeno

En cuanto a la capacidad de los aislados bacterianos de crecer bajo diferentes concentraciones de oxígeno ( $5\%O_2/85\%N_2/10\%CO_2$ ,  $4\%O_2/96\%N_2/10\%CO_2$  y  $0\%O_2/10\%CO_2/90\%N_2$ ), el 60% de los aislados fueron capaces de crecer mejor a una concentración de 5% de oxígeno, la respuesta para crecer a 4 y 0% de oxígeno no varió mucho, como se observa en la figura 15. Estos aislados (CN22, CN23, CN24, FC22, PL17 y PL21) presentaron un metabolismo facultativo microaerobio ya que pueden crecer tanto en condiciones de baja oxigenación y de anaerobiosis. El 30% tuvo un metabolismo anaerobio estricto. Mientras que un solo aislado (FC23) creció a 5 y 4% de oxígeno

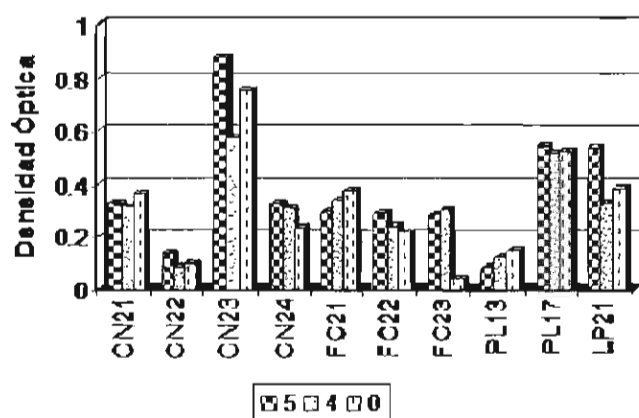


Figura 15. Respuesta de los aislados bacterianos fotótrofos rojos no sulfurosos a diferentes concentraciones de oxígeno.

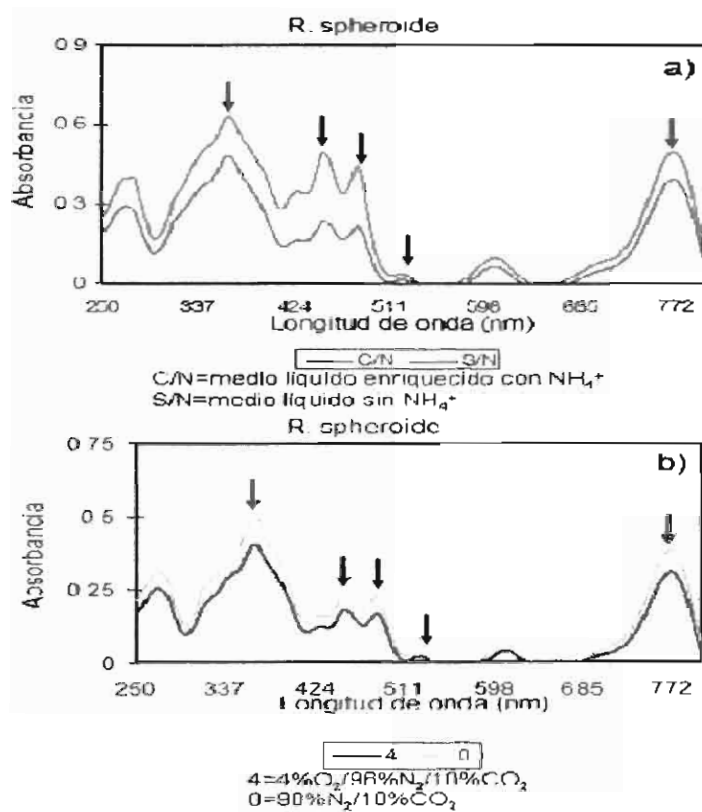
#### 8.8 Producción de bacteriopigmentos (bacterioclorofila a y carotenoides) de los aislados bacterianos fotótrofos rojos no sulfurosos obtenidos.

A cada uno de los 10 aislado bacteriano fotótrofo rojo no sulfuroso aislados durante esta investigación, así como a la cepa de referencia *Rhodobacter spheroides*, se les realizó un análisis de producción de bacteriopigmentos en medio enriquecido con amonio y sin ninguna fuente de nitrógeno en el medio de cultivo e incubados bajo atmosfera de 5, 4 y 0 % de oxígeno balance N<sub>2</sub>.

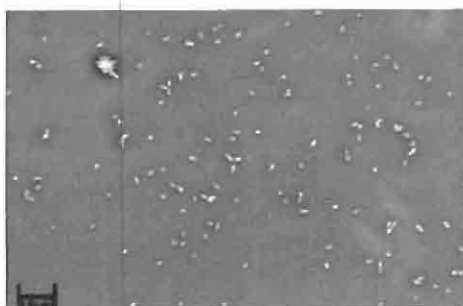
##### Cepa *Rhodobacter spheroides*

*R. spheroides* utilizada como cepa de referencia, tiene la capacidad de fijar N<sub>2</sub>, sin embargo, su mejor crecimiento y producción de bacterioclorofila a y carotenoides como el anhidrovibrina y derivados de la serie espinloxantina fueron mayores cuando el medio de cultivo fue enriquecido con amonio (figura 16a) y en condiciones de 0 y 4% de O<sub>2</sub>. Concentraciones de O<sub>2</sub> mayores de 5% inhiben el crecimiento y la producción de bacterioclorofila a y carotenoides (figura 16b)

La coloración producida en los medios de cultivos varió de acuerdo a la adición o no de amonio. Las dimensiones celulares fueron de 1.5 a 4.2  $\mu\text{m}$  de largo x 0.7 a 1.6  $\mu\text{m}$  de diámetro y presenta vacuolas en su interior (figura 17).



**Figura 16.** Características espectrales de la bacterioclorofila *a* y de los diferentes tipos de carotenoides a distintas concentraciones de oxígeno y fuente alterna de nitrógeno de *R. spheroides*. Las flechas rojas indican los picos de la bacterioclorofila *a* y las flechas negras los picos de carotenoides.



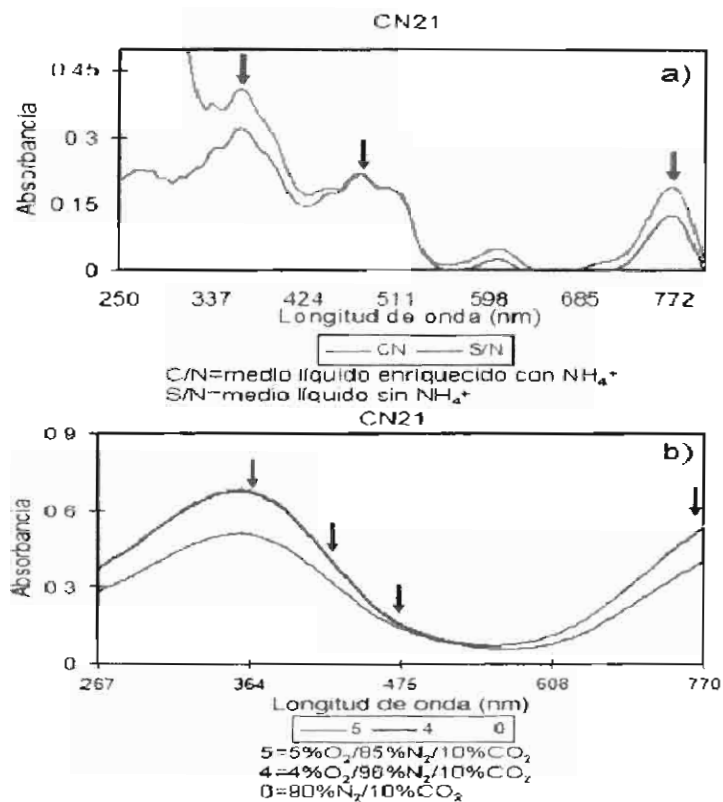
**Figura 17.** Morfología celular de la cepa de referencia *R. spheroides* en microscopia de contraste de fase y objetivo 100x.

El aislado CN21 presentó capacidad de fijar  $N_2$ . La producción de bacterioclorofila a aparentemente fue la misma en ambas condiciones de crecimiento (con o sin amonio añadido al medio de cultivo). En cuanto a la producción de carotenoides, estos variaron de acuerdo a la fuente de nitrógeno utilizado en el medio. En condiciones de fijación  $N_2$ , se observó la aparición de dos picos que son similares a los reportados para el carotenoide fitoeno (a longitudes de onda de 292 y 279 nm), a la bacteriorubixantina (363 y 306 nm) y al 13-Cis-zeaxantina (477 nm). El carotenoide licopeno con un pico a 445 nm sólo se presentó en medio de cultivo enriquecido con amonio y posiblemente el  $\beta$ -Caroteno (a 475 nm) (tabla 4 y figura 18a).

En todas las concentraciones de oxígeno utilizadas para el crecimiento de este aislado, se observó presencia de la bacterioclorofila a que tuvo su máxima absorbancia a 770 nm. La mayor concentración de este pigmento se observó en condiciones anóxicas y a 4%  $O_2$ . El pico del carotenoide 475 nm, producido en todas las concentraciones de  $O_2$ , es el reportado para el  $\beta$ -caroteno (tabla 4 y figura 18b).

El crecimiento de este aislado bacteriano se vio favorecido en condiciones anóxicas y disminuye ligeramente con el aumento en la concentración de  $O_2$ .

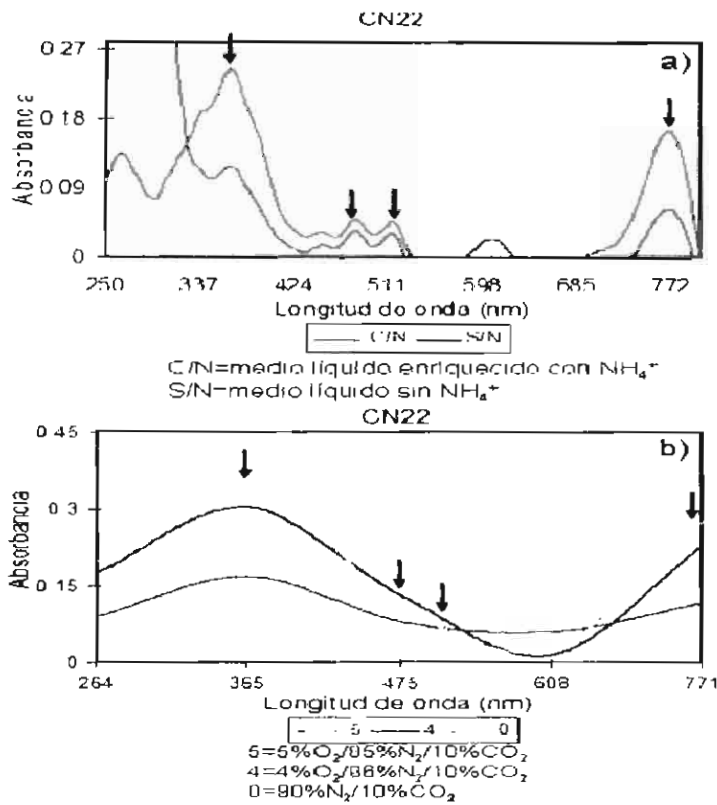
Las células del aislado bacteriano CN21 son de forma bacilar y su talla varía de 1 a 4  $\mu m$  de largo y de 0.8 a 1.4  $\mu m$  de ancho, presentan vacuolas al interior de la célula y cuerpos refringentes al exterior de ésta, presenta movilidad.



**Figura 18.** Características espectrales de la bacterioclorofila *a* y de los diferentes tipos de carotenoides a distintas concentraciones de oxígeno y con fuente alterna de nitrógeno del aislado bacteriano fotótrofo CN21. Las flechas rojas indican los picos de la bacterioclorofila *a* y las flechas negras los picos de carotenoides.

El aislado bacteriano CN22 fija  $N_2$ , produce muy pocos pigmentos y éstos se sintetizan mejor en medio de cultivo enriquecido con  $NH_4^+$ . La producción de bacterioclorofila *a* es levemente mayor cuando se encuentran fijando  $N_2$ . Se observó mayor producción de picos de carotenoides en medio carente de nitrógeno que cuando éste se encuentra presente en el medio de cultivo. Los picos correspondientes al carotenoide bacteriorubixantina y fitoeno solo se presentaron cuando fijan  $N_2$  y el caroteno licopeno en medio amonificado (figura 19a).

Este aislado es un anaerobio aerotolerante y presenta su mejor crecimiento y su mayor producción de pigmentos a 5%  $O_2$ . La producción de pigmentos no se vio favorecida en anoxia. Las absorbancias de la bacterioclorofila *a* fueron pequeñas en todas las concentraciones de oxígeno utilizadas. El carotenoide licopeno se produjo solo en 5% y en anoxia; en 4% de  $O_2$  se observó un pico pequeño de  $\beta$ -caroteno (475 nm) (figura 19b). La talla de los bacilos fue de 2.1 a 3.9  $\mu m$  de largo y de 1 a 1.8  $\mu m$  de ancho (figura 20). Las células presentan vacuolas y tienen movilidad. La coloración de los medios de cultivos a 5, 4 y 0 %  $O_2$  fue ligeramente rosa, mientras que el medio enriquecido con  $NH_4^+$  fue rojo intenso.



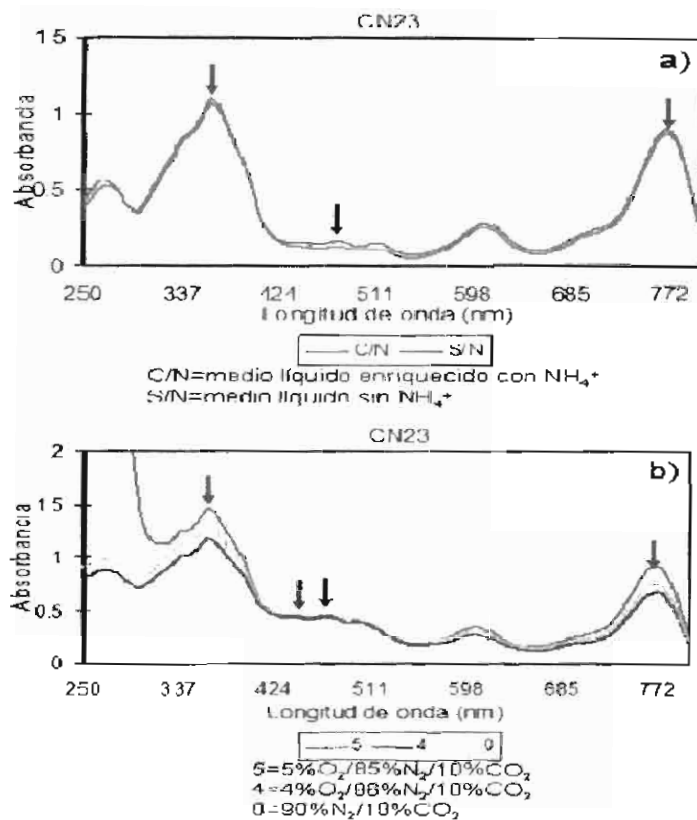
**Figura 19.** Características espectrales de la bacterioclorofila a y de los diferentes tipos de carotenoides a distintas concentraciones de oxígeno y fuente alterna de nitrógeno del aislado bacteriano fotótrofo CN22. Las flechas rojas indican los picos de la bacterioclorofila a y las flechas negras los picos de carotenoides.



**Figura 20.** Morfología celular del aislado CN22 en microscopia de contraste de fase y objetivo 100x.

El aislado bacteriano CN23 presentó capacidad de fijar  $N_2$ . La producción de pigmentos fue la misma en medio conteniendo amonio como fuente de nitrógeno y con nitrógeno adicionado. Se observó que la síntesis de bacterioclorofila *a* fue ligeramente mayor cuando creció en medio de cultivo con de nitrógeno atmosférico. La presencia del carotenoide 13-Cis-zeaxantina fue observado cuando el aislado creció en medio de cultivo sin nitrógeno adicionado y el  $\beta$ -caroteno en medios de cultivo adicionado con amonio (figura 21a y tabla 4). Este aislado es un microaerobio ya que su mayor crecimiento se obtuvo cuando fue incubado a una  $pO_2$  de 5%. La máxima absorbencia de bacterioclorofila *a* se obtuvo a 5%  $O_2$  al igual que el pico correspondiente al carotenoide licopeno (figura 21b).

Las células de este aislado son bacilos no móviles pleomórficos que forman cuerpos cocoides y presentan pigmento de color rojo intenso en todas las condiciones de oxigenación y de necesidades de nitrógeno en los que fueron incubados

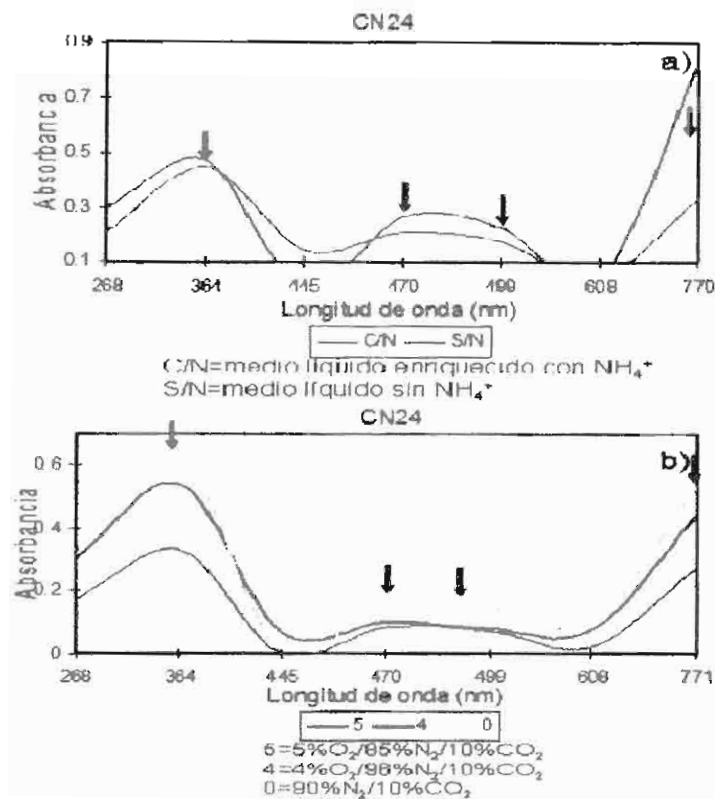


**Figura 21.** Características espectrales de la bacterioclorofila *a* y de los diferentes tipos de carotenoides a distintas concentraciones de oxígeno y fuente alterna de nitrógeno en el aislado bacteriano fotótrofo CN23. Las flechas rojas indican los picos de la bacterioclorofila *a* y las flechas negras los picos de carotenoides.

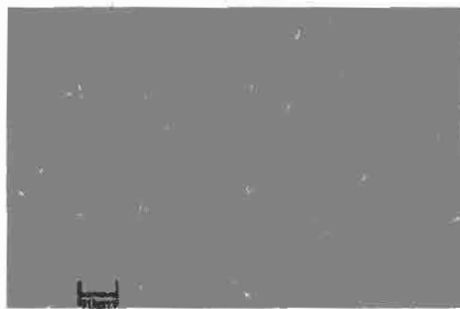
El aislado bacteriano CN24 presentó capacidad de fijar  $N_2$ . La síntesis de bacterioclorofila *a* (770 nm) y del carotenoide licopeno son mayores cuando se encuentra en condición de fijar el  $N_2$  (figura 22a).

Además de que este aislado presentó un mayor crecimiento en condiciones microaerobias (5 y 4%  $O_2$ ), la síntesis de bacterioclorofila *a* se vio favorecida en condiciones de anoxia y se vió disminuida a 5% $O_2$ . Los picos registrados parecen pertenecer al carotenoide licopeno (tabla 4 y figura 22b).

Las células son bacilos pleomórficos, de talla entre 2.2 a 4  $\mu m$  de largo y de 1.6 a 1.2  $\mu m$  de ancho. Las células contienen vacuolas al interior y son móviles (figura 23).



**Figura 22.** Características espectrales de la bacterioclorofila a y de los diferentes tipos de carotenoides a distintas concentraciones de oxígeno y fuente alterna de nitrógeno en el aislado bacteriano fotótrofo CN24. Las flechas rojas indican los picos de la bacterioclorofila a y las flechas negras los picos de carotenoides.

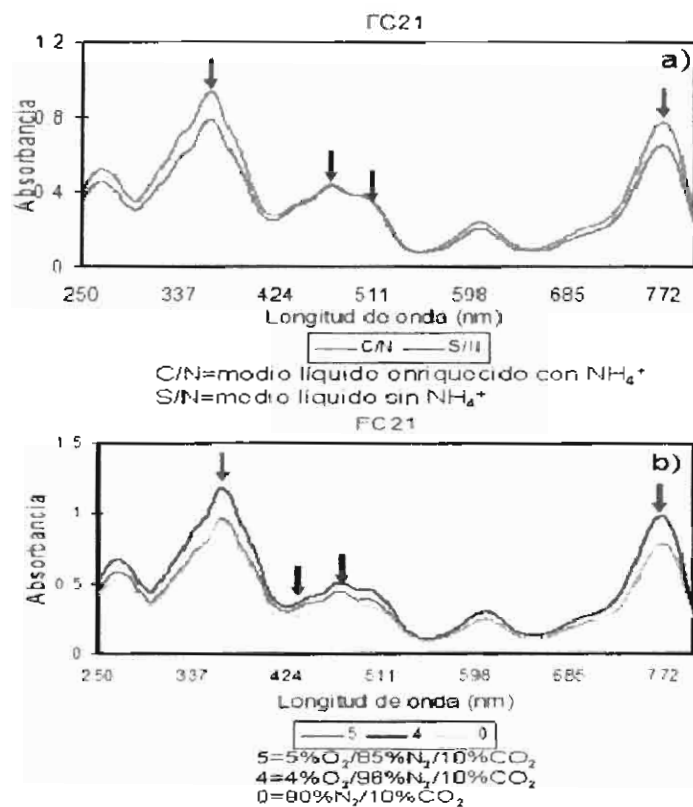


**Figura 23.** Morfología celular del aislado CN24 en microscopia de contraste de fase y objetivo 100x.

El aislado bacteriano FC21 al igual que los anteriores, tiene la capacidad de fijar  $N_2$ . La síntesis de bacterioclorofila *a* (770 nm) y del carotenoide licopeno (474 nm) se ve favorecida ligeramente cuando el medio de cultivo es enriquecido con  $NH_4^+$ . (figura 24a).

El mayor crecimiento de FC21 fue en anoxia (0%  $O_2$ ), sin embargo, la mayor síntesis de bacterioclorofila *a* y de los carotenoides licopeno y posiblemente zeaxantina, se observó a 4 y 5% de  $O_2$  (figura 24b)

Las células de este aislado son pleomórficas, se agregan en forma de roseta con vacuolas al interior de las células y forman cuerpos cocoides. Son bacilos curvos que va de 2.7 a 4  $\mu m$  de largo por 0.8 a 1.4  $\mu m$  de ancho, móviles (figura 25), y en cultivo presentan coloración roja.



**Figura 24.** Características espectrales de la bacterioclorigila a y de los diferentes tipos de carotenoides a distintas concentraciones de oxígeno y fuente alterna de nitrógeno en el aislado bacteriano fotótrofo FC21. Las flechas rojas indican los picos de la bacterioclorigila a y las flechas negras los picos de carotenoides.

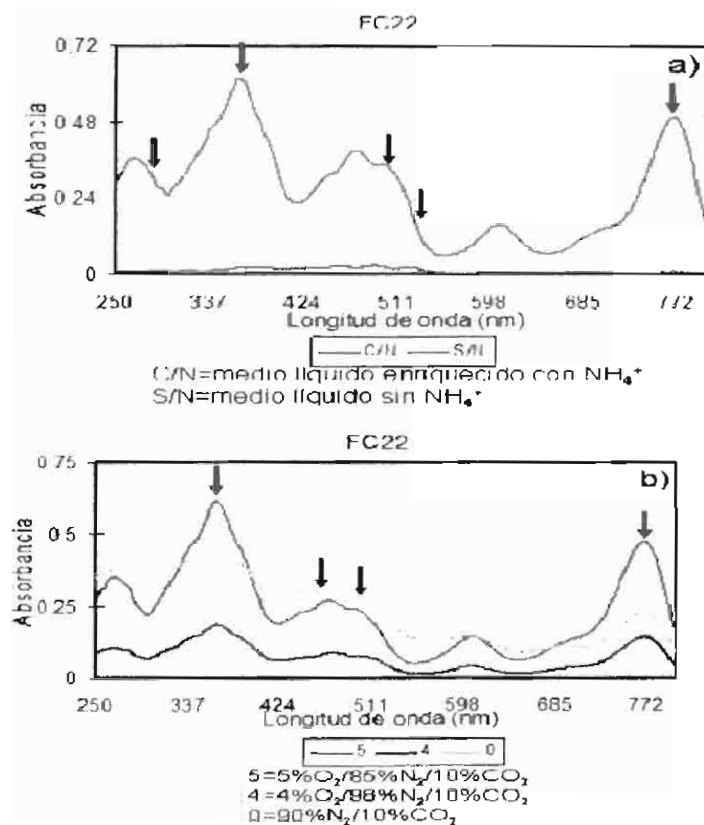


**Figura 25.** Morfología celular del aislado FC21 en microscopia de contraste de fase y objetivo 100x.

Además de que el aislado FC22 puede fijar  $N_2$ , en esta condición la producción de bacterioclorofila *a* y carotenoides de la serie de la espiriloxantina fue inhibida en su totalidad, mientras que en medio líquido enriquecido con  $NH_4^+$  la síntesis de bacterioclorofila *a* y el carotenoide licopeno fueron altas (figura 26a).

El aislado bacteriano FC22 presenta un metabolismo microaerobio ya que su mayor crecimiento y producción de pigmentos fotosintéticos se obtuvo en condiciones de baja oxigenación ( $pO_2$  5 y 4%), aunque también presentó la capacidad de crecer en condiciones de anoxia (0%  $O_2$ ). La mayor producción de bacterioclorofila *a* y de licopeno fue a 4%  $O_2$  (figura 26b).

Son bacilos móviles, con producción de pigmentos de color rojo intenso en todas las condiciones de cultivo probadas.

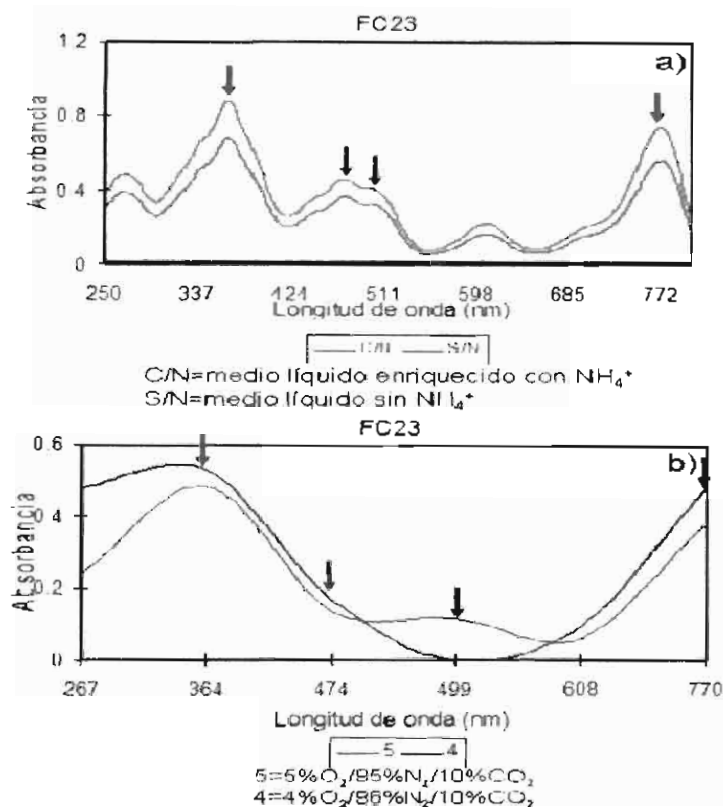


**Figura 26.** Características espectrales de la bacteriocladorofila a y de los diferentes tipos de carotenoides a distintas concentraciones de oxígeno y fuente alterna de nitrógeno en el aislado bacteriano fotótrofo FC22. Las flechas rojas indican los picos de la bacteriocladorofila a y las flechas negras los picos de carotenoides.

### *Aislado bacteriano FC23*

El aislado FC23 puede fijar  $N_2$ . La producción de bacterioclorofila *a* y de los carotenoides es ligeramente mayor cuando el medio de cultivo es enriquecido con una fuente de nitrógeno inorgánico ( $NH_4^+$ ) que cuando carece de él (figura 27a). Presenta un metabolismo microaerobio incapaz de crecer en anoxia. La síntesis de bacterioclorofila *a* es ligeramente mayor en 4%  $O_2$ , sin embargo cuando son incubados a 5% de  $O_2$  se registraron dos picos de carotenoides (474 y 499 nm) (figura 27b)

Son bacilos grandes, el diámetro de los bastones es de 3.2 a 4.8  $\mu m$  de largo y de 1.2 a 1.3  $\mu m$  de ancho, forman cuerpos cocoides presentan gránulos de reserva al interior de la célula. No forma esporas (figura 28).



**Figura 27.** Características espectrales de la bacterioclorofila a y de los diferentes tipos de carotenoides a distintas concentraciones de oxígeno y fuente alterna de nitrógeno en el aislado bacteriano fotótrofo FC23. Las flechas rojas indican los picos de la bacterioclorofila a y las flechas negras los picos de carotenoides.



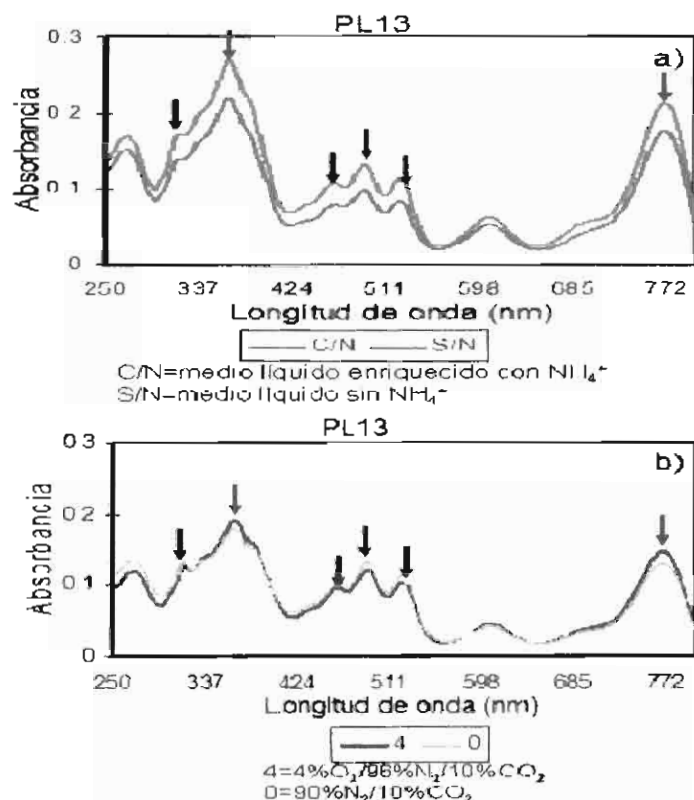
**Figura 28.** Morfología celular del aislado FC23 en microscopia de contraste de fase y objetivo 100x.

### *Aislado bacteriano PL13*

El aislado PL13 es capaz de fijar el  $N_2$ . La síntesis de bacterioclorofila a y de los carotenoides de la serie de la espiriloxantina se ven ligeramente favorecida cuando el medio es enriquecido con  $NH_4^+$  (figura 29a)

Este aislado presenta principalmente un metabolismo anaerobio aerotolerante, a 5%  $O_2$  el crecimiento es inhibido en su totalidad. La presencia de bacterioclorofila a y de los carotenoides de la serie de la espiriloxantina es la misma a 4 y 0% de  $O_2$  (Figura 29b).

Son bacilos grandes que pueden medir de 2.3 a 3.7  $\mu m$  de largo y de 1.1 a 2.3  $\mu m$  de ancho (figura 30). No presenta movilidad.



**Figura 29.** Características espectrales de la bacterioclorofila a y de los diferentes tipos de carotenoides a distintas concentraciones de oxígeno y fuente alterna de nitrógeno en el aislado bacteriano fotótrofo PL13. Las flechas rojas indican los picos de la bacterioclorofila a y las flechas negras los picos de carotenoides.

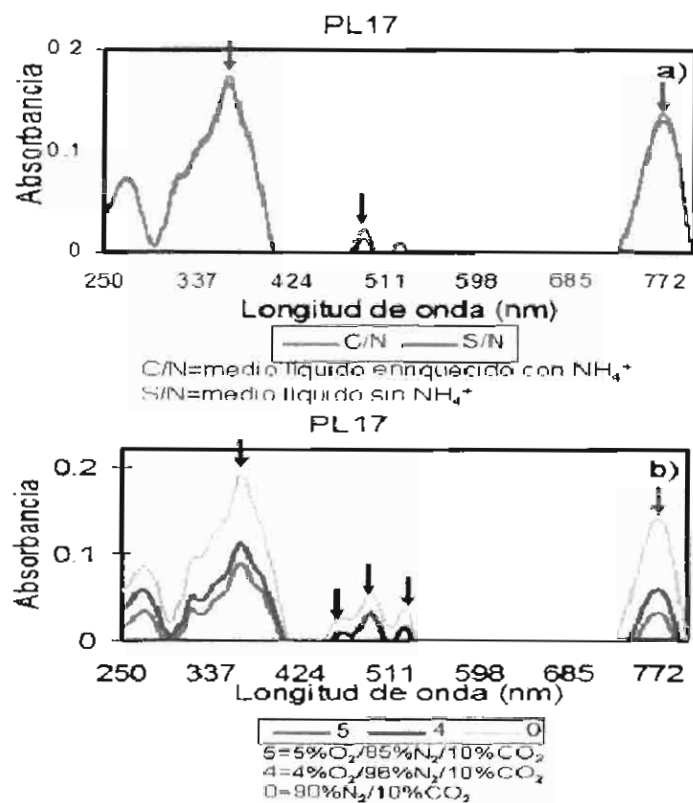


**Figura 30.** Morfología celular del aislado LP13 en microscopia de contraste de fase y objetivo 100x.

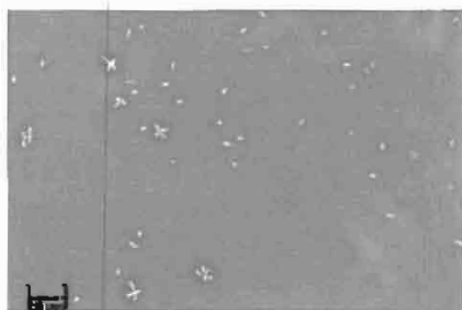
El aislado bacteriano PL17 presentó una baja capacidad de fijar el  $N_2$ . Sin embargo la producción de bacterioclorofila a y de carotenoides de la serie de la espiriloxantina fue la misma cuando creció en medio con y sin nitrógeno disponible en el medio de cultivo (figura 31a).

Este es un aislado con metabolismo anaerobio facultativo, capaz de crecer en todas las concentraciones de oxígeno probadas (de 0 a 5% de  $O_2$ ). Sin embargo la producción de pigmentos se vio favorecida en la condición anóxica. A más altas concentraciones de oxígeno la producción de carotenoides disminuye apreciablemente (figura 31b). Los carotenoides de la serie de la espiriloxantina fueron producidos en todos los bioensayos

Son bacilos de talla entre 2.4 a 2.3  $\mu m$  de largo y de 0.8 a 1.2  $\mu m$  de ancho. Presenta movilidad y posee vacuolas al interior de la célula (figura 32).



**Figura 31.** Características espectrales de la bacterioclorigila *a* y de los diferentes tipos de carotenoides a distintas concentraciones de oxígeno y fuente alterna de nitrógeno en el aislado bacteriano fotótrofo PL17. Las flechas rojas indican los picos de la bacterioclorigila *a* y las flechas negras los picos de carotenoides.



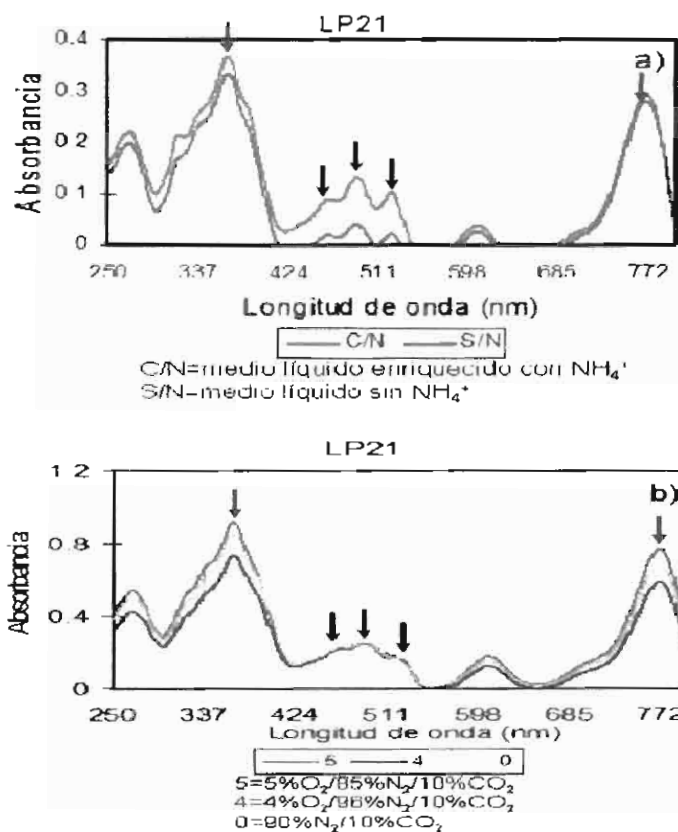
**Figura 32.** Morfología celular del aislado LP17 en microscopia de contraste de fase y objetivo 100x.

#### Aislado bacteriano PL21

El aislado bacteriano PL21 presenta una buena capacidad para fijar  $N_2$  y la síntesis de bacterioclorofila a no tiene diferencias significativas entre la realizada en medio enriquecido con amonio o no. Sin embargo, la producción de carotenoides de la serie de la espiriloxantina (característico de bacterias rojas) se vio favorecida cuando en el medio de cultivo hubo amonio suficiente (figura 33a).

Es un microaerobio capaz de crecer en anoxia. La producción de bacterioclorofila a y de los carotenoides de la serie espiriloxantina se ve ligeramente favorecida a 5% de  $O_2$ . En esta misma condición de incubación se registraron picos correspondientes a carotenoides de la serie de la espeiriloxantina (520, 490 y 467 nm) (figura 33b).

Son bacilos de tallas que van de 2.8 a 6  $\mu m$  de largo y de 1.4 a 2.2  $\mu m$  de ancho. No tienen esporas, ni movilidad (figura 34).



**Figura 33.** Características espectrales de la bacterioclorofila *a* y de los diferentes tipos de carotenoides a distintas concentraciones oxígeno y con fuente alterna de nitrógeno en el aislado bacteriano fotótrofo. Las flechas rojas indican los picos de la bacterioclorofila *a* y las flechas negras los picos de carotenoides.



**Figura 34.** Morfología celular del aislado LP21 en microscopia de contraste de fase con objetivo 100x.

Al parecer todos los aislados bacterianos obtenidos pertenecen a la familia Rhodospirillaceae, con producción de bacterioclorofila a (770-772 y 363-365 nm) y al parecer la mayoría de los carotenoides sintetizados pertenecen a la serie de la esperiloxantina característica de este grupo.

Los resultados obtenidos del bioensayo de tolerancia al oxígeno, nos permiten pensar que los aislados CN22, CN23, CN24, FC22, FC23, PL17 y PL21 son fotótrofos microaerobios, coincidiendo con los resultados obtenidos por Grammel *et al.* (2003) en donde la cepa bacteriana fotótrofa *Rhodospirillum rubrum* presentó un metabolismo microaerobio a 5% de O<sub>2</sub>. Imhoff (2006) menciona que algunos géneros como *Rhodobacter capsulatus* presentan metabolismo microaerobio.

Los resultados obtenidos sobre los probables pigmentos fotosintéticos producidos en las diferentes condiciones de oxigenación, mostraron que en muchos casos, la producción de bacterioclorofila a fue mayor en condiciones subóxicas (pO<sub>2</sub> 4 y 5%), cómo había sido ya reportado por Arnheim y Oelze (1983), quienes estudiaron la producción de este pigmento en cepas bacterianas de *Rhodopseudomonas sphaeroides*, *Rhodopseudomonas capsulatus* y *Rhodospirillum rubrum* en concentraciones de 1, 3 y 5% de oxígeno. Por otro lado, los carotenoides sintetizados bajo distintas concentraciones de oxígeno (5, 4 y 0 %), así como, en medio sin fuente de nitrógeno, pueden ser utilizados como indicadores alternos de la presencia de las poblaciones fotótrofas en habitats naturales (Šestanović *et al.*, 2009) presentes en los sedimentos

## 9. Conclusiones

- La contribución de las bacterias rojas a la producción primaria bentónica de la laguna de Sontecomapan fue mayor en épocas de nortes que en época de secas.
- La contribución a la producción primaria béntica en la laguna de Sontecomapan, sur de Veracruz, varió durante las épocas de nortes (2006 y 2007, respectivamente) y de seca (2006). La biomasa del fotopicobentos fue favorecida principalmente, por el sedimento areno-arcilloso en todos los muestreos, mientras que la biomasa del fotopicobacteriobentos por las arenas.
- En cuanto a la contribución de carbono por ambos grupos microbianos, se observó que el mayor aporte de biomasa fue dado por el fotopicobacteriobentos en época de norte del 2007 y en época de secas del 2006. En época de norte del 2006 sólo en las estaciones con influencia de agua marina se observó un incremento en la biomasa del fotopicobentos.
- La biomasa del fotopicobentos se vio favorecida por los ortofosfatos, el amonio, la intensidad luminosa, y la transparencia y presentó una relación inversa con la concentración de materia orgánica. La biomasa del fotopicobacteriobentos estuvo influenciada por el oxígeno, el amonio, pH y por la transparencia.
- Aún cuando la mayor biomasa fue dada por el fotopicobacteriobentos durante las tres épocas muestreo (norte 2006 y 2007 y secas 2006), en casi todas las estaciones de muestreo, la contribución del fotopicobentos no es nada despreciable, ya que éstos son los primeros en responder a cambios de entrada de energía luminosa al sistema.

- En general los 10 aislados bacterianos fotótrofos rojos mostraron ser diazótrofos (tener capacidad de fijar nitrógeno atmosférico),
- Sólo los aislados CN23, FC21, FC22, FC23, y PL21 presentaron un metabolismo microaerobio (mejor crecimiento a 5%O<sub>2</sub>), los demás presentaron un metabolismo respiratorio anaerobio aerotolerante.
- La síntesis de bacterioclorofila *a* es mayor cuando en el medio existe una fuente de alterna de nitrógeno inorgánica (NH<sub>4</sub>)
- Los principales carotenoides sintetizados por los aislados pertenecen a la serie de la espiriloxantina, y con menor frecuencia el licopeno. El β-Caroteno.

## 10. Literatura citada

- Álvarez S (2005) La descomposición de la materia orgánica en humedales. Ecosistemas. 2005/2 (URL: <http://revistaecosistemas.net/articulo.asp?Id=122&tipo=portada>)
- Aminot A, Chaussepied M (1983) Manuel des analyses chimiques en milieu marin. CNEXO (ed). Brest 395 pp
- Arnheim K; Oelze J (1983) Differences in the control of bacteriochlorophyll formation by light and oxygen. Archives of Microbiology 135. 299-304
- Atlas MR, Bartha R (2000) Ecología microbiana y microbiología ambiental. 4ª edición. Addison Wesley. España. 677 pp
- Avendaño-Herrera RE, Riquelme CE, Silva F (2002) Utilización de biopelículas bacterianas en el asentamiento de larvas de *Argopecten purpuratus* (Lamarck 1819) en un hatchery comercial. Revista de Biología Marina y Oceanografía 37: 35-41
- Azam F, Fenchel T, Field JG, Gray JS, Meyer-Reil LA, Thingstad F (1983) The ecological role of water-column microbes in the sea. Marine Ecology Progress Series 10: 257-263
- Barlow RG, Collos Y, Maestrini SY, Roy S (1990) Microphytobenthic pigments in a salt marsh pond determined by HPLC and spectrophotometry. Marine Microbial Food Webs 4: 117-128
- Barreiro MTG y Signoret MP (1999) Productividad primaria en sistemas acuáticos costeros. Métodos de evaluación. Libros de texto. Universidad Autónoma Metropolitana. Unidad Xochimilco. México 77 pp
- Bianchi A (1971) Ecologie et taxonomie des bactéries hétérotrophes aérobies des sédiments marins. Leur participation à la dégradation des matières organiques. Thèse de Doctorat d'Etat. Université d'Aix-Marseille II. 220 pp.
- Biebl H, Pfennig H (1981) Isolation of members of the family Rhodospirillaceae. p. 267-273. In: Starr MP, Stolp H, Truper HG, Balows A, Schlegel HG (Eds.) *The Prokaryotes*. Springer-Verlag, New York

- Bouyoucos GJ (1963) Methods. Directions for making mechanical analysis of soil by hydrometer. *Soil Science* 42: 25-30
- Bratbak G (1985) Bacterial biovolumen and biomass estimations *Applied and Environmental Microbiology* 49:1488-1493
- Bratbak G (1993) Microscope methods for measuring bacterial biovolumen: epifluorescence microscopy, scanning electron microscopy, and transmission electron microscopy p 309-318 *In* Kemp FP, Sherr FB, Sherr BE y Cole JJ (eds). *Hand Book of methods in aquatic microbial ecology*. Lewis Pub. London
- Britton G (1995) Structure and properties of carotenoids in relation to function. *The FASEB Journal* 9: 1551-1558
- Brock DT, Madigan MT (1993) *Microbiología*. 6a edición. Prentice Hall México 956 p
- Brune A, Frenzel P, Cypionke Heribert (2000) Life at the oxic-anoxic interface. microbial activities and adaptations *FEMS Microbiology Reviews* 24: 691-710
- Calva BJG, Botello AV, Ponce VG (2005) Composición de hidrocarburos alifáticos en sedimentos de la laguna de Sontecomapan, Ver , México. *Hidrobiológica* 15: 97-108
- Carmona-Díaz G, Morales-Mávil JE, Rodríguez-Luna E (2004) Plan de manejo para el manglar de Sontecomapan, Catemaco, Veracruz México. una estrategia para la conservación de sus recursos naturales *Maderas y Bosques Número Especial 2*: 5-23
- Campbell L, Nolla HA, Vaulot D (1994) The importance of *Prochlorococcus* to community structure in the central North Pacific Ocean. *Limnology Oceanography* 39: 954-961
- Cole JJ, Findlay S, Pace ML (1988) Bacterial production in fresh and salt water ecosystems: a cross-system overview. *Marine Ecology Progress Series* 43:1-10
- Contreras F (1985) *Lagunas Costeras Mexicanas*. Centro de codesarrollo. Secretaria de Pesca, Distrito Federal, México 253 pp

- Costerton JW (1995) Overview of microbial biofilms. *Journal Industrial Microbiology* 15: 137-140
- Danese PN, Pratt LA, Kolter R (2000) Exopolysaccharide production is required for development of *Escherichia coli* K-12 biofilm architecture. *Journal of Bacteriology* 182: 3593-3596
- Danovaro R, Armeni M, Dell'Anno A, Fabiano M, Manini E, Marrale D, Pusceddu A, Vanucci S (2001) Small-scale distribution of bacteria enzymatic activities, and organic matter in coastal sediments. *Microbial Ecology* 42: 177-185
- Dauwe BP, Herman MJ, Heip CHR (1998) Community structure and bioperturbation potential of macrofauna at four North Sea stations with contrasting food supply *Marine Ecology Progress Series* 173: 67-83
- Davey ME, O'Toole GA (2000) Microbial biofilms: from ecology to molecular genetics. *Microbiology Molecular Biology* 64: 847-867
- Dawes JC (1991) *Botánica Marina*. Limusa. New York 673 P
- Demergasso C, Chong G, Galleguillos P, Escudero L, Martínez-Alonso M, Esteve I (2003) Tapetes microbianos del Salar de Llamará, norte de Chile *Revista Chilena de Historia Natural* 76: 485-499
- Demming-Adams B, Gilmore AM, Adams III WW (1996) In vivo functions of carotenoids in higher plants *The FASEB Journal* 10: 403-412
- Ferrara-Guerrero M (1993) Distribution des bactéries microaérophiles dans les sédiments de lagunes côtières Méditerranéennes. Comparaison avec la distribution des bactéries aérobies et anaérobies. Étude des potentialités métaboliques. These Doctorat. Université de Aix-Provenza, Francia. 218 pp
- Ferrara-Guerrero MJ y Bianchi A (2000) Bacterial microaerophilic biomass measurements based on Adenosine Triphosphate and direct counting techniques in a semi-solid agar column. *Ciencias Marinas* 26: 335-336
- Ferrara-Guerrero MJ (2002) Bacterias microaerofilicas marinas: importancia ecológica y probables aplicaciones biotecnológicas. p. 77-90. En Monroy O (ed) *Apuntes del Curso Internacional de Microbiología*. Universidad Autónoma Metropolitana Unidad Iztapalapa, México, D.F

- Fiedor L, Akahane J, Koyama Y (2004) Carotenoid-induced cooperative formation of bacterial photosynthetic LH1 complex. *Biochemistry* 43: 16487-16496
- Frank HA, Chynwat V, Desamero RZB, Farhoosh R, Erickson J, Bautista J (1997) On the photophysics and photochemical properties of carotenoids and their role as light-harvesting pigments in photosynthesis. *Pure Applied of Chemistry* 69: 2177-2124
- Gajú N, Guerrero R, Pedrós-Alió C (1989) Measurement of cell volume of phototrophic bacteria in pure cultures and natural samples. phase contrast, epifluorescence and particle sizing. *FEMS Microbiology Ecology* 62: 295-302
- Gaudette HE, Flight WR, Turner L, Folger DW (1974) An inexpensive titration method for the determination organic carbon recent sediments *Journal Sediment Petrology* 44: 249-253
- Geesey GG (2001) Bacterial behavior at surfaces. *Current Opinion in Microbiology* 4: 296-300
- Grammel H, Gilles E-D, Ghosh R (2003) Microaerophilic cooperation of reductive and oxidative pathways allows maximal photosynthetic membrane biosynthesis in *Rhodospirillum rubrum* *Applied and Environmental Microbiology* 69: 6577-6586
- Haglund AL, Törnblom E, Boström B, Tranvik L (2002) Large differences in the fraction of active bacteria in plankton, sediments, and biofilm. *Microbial Ecology* 43: 232-241
- Imhoff JF (2006) The phototrophic alpha-proteobacteria. p 41-64. *In* Dworkin M, Falkow S, Rosenberg E, Schleifer K-H, Stackebrandt E (eds) *The Prokaryotes*. Springer-Verlag New York
- Imhoff JF (1995) Taxonomy and physiology of phototrophic purple bacteria and green sulfur bacteria. p 1-15. *In* Blankenship RE, Madigan MT y Bauer CE (eds) *Anoxygenic photosynthetic bacteria*. Kluwer Academia Pub. Netherlands

- Imhoff JF, Trüper HG (1977) *Ectothiorhodospira halochloris* sp. nov., a new extremely halophilic phototrophic bacterium containing bacteriochlorophyll *b*. Archives of Microbiology 114: 115–121
- Kierek-Pearson K, Karatan E (2005) Biofilm development in bacteria. Advances in Applied Microbiology 57: 79-104
- Kondratieva EN, Pfennig N, Trüper HG (1992) The phototrophic prokaryotes. p 312-330. In Balows A, Trüper HG, Dworkin M, Harder W, Schleifer K-H (eds). *The prokaryotes*. Springer-Verlag, New York
- Långmark J, Storey MV, Ashbolt NJ, Stenström TA (2005) Accumulation and fate of microorganism and microspheres in biofilms formed in a pilot-scale water distribution system. Applied and Environmental Microbiology 71: 706-712
- Lasa I, del Pozo JL, Penades JR, Leiva J (2005) Biofilms bacterianos e infección. Anales del Sistema Sanitario de Navarra 28: 163-176
- Le Bris S, Plante-Cuny M-R, Vacelet E (1998) Characterisation of bacterial and algal pigments and breakdown products by HPLC in mixed fresh-water planktonic populations. Archives Hydrobiology 143: 409-434
- Lee S, Fuhrman JA (1987) Relationships between biovolume and biomass of naturally derived marine bacterioplankton. Applied and Environmental Microbiology 53: 1298-1303
- Li WKW, Dickie PM, Irwin BD, Wood AM (1992) Biomass of bacteria, cyanobacteria, prochlorophytes and photosynthetic eukaryotes in the Sargasso Sea. Deep-Sea Res. 39:501-519
- López-Cortés A (1990) Microbial mats in tidal channels at San Carlos, Baja California Sur, México. Geomicrobiology Journal 8: 69-85
- López-Cortés A (1998) Ecología y biotecnología de las comunidades microbianas. Ciencia y Desarrollo 24: 11-17
- López-Cortés A (1999) Paleobiological significance of hydrophobicity and adhesion of phototrophic bacteria from microbial mats. Precambrian Research 96: 25-39

- López-Portillo J, Ezcurra E (2002) Los manglares de México: una revisión. *Maderas y Bosques* Número Especial 1: 5-25
- Macissac EA, Stockner JG (1993) Enumeration of phototrophic picoplankton by autofluorescence microscopy. p 187-197. *In: Kemp, PF, Sherr BF, Sherr EB y Cole JJ (eds). Handbook of methods in aquatic microbial ecology.* Lewis Pub. London
- Madigan MT (1995) Microbiology of nitrogen fixation by anoxygenic photosynthetic bacteria. p 915-925. *In: Blankenship RE, Madigan MT y Bauer CE (eds). Anoxygenic photosynthetic bacteria.* Kluwer Academia Pub. Netherlands
- Madigan MT, Martinko JM, Parke J (2004) Brock. Biología de los microorganismos. Prentice Hall Madrid 987 p
- Morales CS (2008) Metabolismo bacteriano en: <http://www.unmsm.edu.pe/veterinaria/Aula%20Virtual/Microbiologia/metabolismo%20bacteriano%202008.pdf>
- Morán-Villa VL (2007) Influencia de los parámetros físicos y químicos sobre las tasa de fijación del nitrógeno atmosférico y de desnitrificación en la laguna de Sontecomapan Veracruz. Tesis de Maestría en Ciencias Agropecuarias. Universidad Autónoma Metropolitana, Unidad Xochimilco, México, D.F. 164 p
- Neu TR, Dengler T, Jann B, Poralla K (1992) Structural studies of an emulsion stabilizing exopolysaccharide produced by an adhesive, hydrophobic *Rhodococcus* strain. *Journal General Microbiology* 138: 2531–2537
- Norland S (1993) The relationship between biomass and volume of bacteria p 187-197. *In: Kemp, PF, Sherr BF, Sherr EB y Cole JJ (eds). Handbook of methods in aquatic microbial ecology.* Lewis Pub. London
- O'Toole G, Kaplan HB, Kolter R (2000) Biofilm formation as microbial development. *Annual Review of Microbiology* 54. 49-79
- Pfennig H, Trüper HG (1981) Isolation of members of the family Chlorobiaceae. p 267– 273 *In: Starr MP, Stolp H, Trüper HG, Balows A, Schlegel HG (eds). The prokaryotes* Springer-Verlag, New York

- Pringault O, de Wit R, Kühl M (1999) A microsensor study of the interaction between purple sulfur and green sulfur bacteria in experimental gradients. *Microbial Ecology* 37: 173-184
- Reséndez, M (1982) Hidrobiología e ictiofauna de la laguna de Sontecomapan Veracruz, México. *Anales del Instituto de Ciencias del Mar y Limnología, UNAM, México* 53: 385-417
- Rice AR, Hamilton MA, Camper AK (2003) Movement, replication, and emigration rates of individual bacteria in a biofilm. *Microbial Ecology* 45: 163-172
- Serna-Martínez A (2007) Estudio de la comunidad bacteriana con actividad nitrificante, desnitrificante, amonificante y fijadora de nitrógeno en la columna de agua del Cañón de Campeche y en la zona costera del sureste del Golfo de México. Reporte de Servicio Social. Universidad Autónoma Metropolitana Xochimilco, México. 67 pp
- Šestanović S, Šolić M, Krstulović Nada (2009) The influence of organic matter and phytoplankton pigments on the distribution of bacteria in sediments of Kaštela Bay (Adriatic Sea). *Scientia Marina* 73: 83-94
- Shiba T (1991). *Roseobacter litoralis* gen. nov., sp. nov. and *Roseobacter denitrificans* sp. nov., aerobic pink-pigmented bacteria which contain Bacteriochlorophyll *a*. *Systematic Applied Microbiology* 14: 140-145
- Smith KM, Goff DA, Fajer J, Barkigia KM (1980) Structures of the bacteriochlorophyll-*c* homologues: a solution to a long-standing problem *Journal American Chemistry Society* 102:7149-7159
- Stal JL (2003) Microphytobenthos, their extracellular polymeric substances, and the morphogenesis of intertidal sediments. *Geomicrobiology Journal* 20:463–478
- Steinman AD, Havens KE, Louda JW, Winfree NM, Baker EW (1998) Characterization of the photoautotrophic algal and bacterial communities in a large, shallow, subtropical lake using HPLC-PDA based pigment analysis. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences* 55. 206-219S

- Stoodley P, Jacobsen A, Dunsmore BC, Purevdorj B, Wilson S, Lappin-Scott HM, Costerton JW (2001) The influence of fluid shear and AICI<sub>3</sub> on the material properties of *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 and *Desulfovibrio* sp. EX265 biofilms. *Water Science Technology* 43: 113–120
- Szewzyk U, Szewzyk R, Manz W, Schleifer K-H (2000) Microbiological safety of drinking water. *Annual Reviews Microbiology* 54: 81-127
- Takaichi, S, Shimada K, Ishitsu J (1990). Carotenoids from the aerobic photosynthetic bacterium, *Erythrobacter longus*:  $\beta$ -carotene and its hydroxyl derivatives. *Archives of Microbiology* 15: 118-122
- Torretón, JP (1992) Importance des bactéries hétérotrophes aérobies dans une lagune eutrophique tropicale (Lagune Ebrié, Côte d'Ivoire). Biomasse, production, exportations. Tesis Doctorado de L'Université D'Aix-Marseille II Francia. 246 pp
- Van Wambeke F (1988) Numération et taille des bactéries planctoniques au moyen de l'analyse d'images couplée à l'épifluorescence *Annales l'Institute Pasteur/Microbiologie* 139: 261-272
- Visscher PT, Van Gemerden H (1991) Production and consumption of Dimethylsulfoniopropionate in marine microbial mats *Applied and Environmental Microbiology* 57: 3237-3242
- Watermann F, Hillebrand H, Gerdes G, Krumbein WE, Sommer U (1999) Competition between benthic cyanobacteria and diatoms as influenced by different grain sizes and temperatures. *Marine Ecology Progress Series* 187: 77-87
- Wimpenny J, Manz W, Szewzyk U (2000) Heterogeneity in biofilms. *FEMS Microbiology Reviews* 24: 661-667
- Zhang XQ, Bishop PL, Kupferle MJ (1998). Measurement of polysaccharides and proteins in biofilm extracellular polymers. *Water Science Technology* 37: 345–348
- Ziervogel K, Karlsson E, Arnosti C (2007) Surface associations of enzymes and of organic matter: consequences for hydrolytic activity and organic matter remineralization in marine systems. *Marine Chemistry* 104: 241-252

## 11. ANEXOS

Preparación de reactivos para la tinción con el fluorocromo FICT (Isotiocinato de fluoresceína)

Buffer de fosfatos 0.01 M a pH 7      a)  $\text{KH}_2\text{PO}_4$   
b)  $\text{K}_2\text{HPO}_4$

a)  $\text{KHPO}_4$

PM 136.09

0.01mol = 0.136g

aforados en 100 mL de  $\text{H}_2\text{O}$  desionizada

b)  $\text{K}_2\text{HPO}_4$

PM 228.23

0.01mol=0.228g

aforados en 100 mL de  $\text{H}_2\text{O}$  desionizada

Buffer de carbonato 0.5 M a pH 9.5      a)  $\text{Na}_2\text{CO}_3$   
b)  $\text{Na}_2\text{HCO}_3$

a)  $\text{Na}_2\text{CO}_3$

PM 105.99

0.01 mol= 5.3 g

aforados en 100 mL de  $\text{H}_2\text{O}$  desionizada

b)  $\text{Na}_2\text{CO}_3$

PM 84

0.01mol=4.28

aforados en 100 mL de  $\text{H}_2\text{O}$  desionizada

Mezclar 60.63 mL de la solución a en 100 mL de la solución b

Solución salina:  $\text{Na}_2\text{Cl}$  0.85%

0.85 g de  $\text{Na}_2\text{Cl}$  100 mL de agua destilada estéril

Solución FICT

0.5 mL de buffer carbonatos

2.2 mL de buffer de fosfatos

2.2 mL de  $\text{Na}_2\text{Cl}$  a 0.85%

0.2 mg de isotiocinato de fluoresceína

Agua de mar artificial con formaldehído

20 mL de agua de mar artificial

80 mL de agua destilada

0.69 mL de formaldehído

Agua de mar artificial

|                                 | g/L     |
|---------------------------------|---------|
| NaF                             | 0.0015  |
| SrCl <sub>2</sub>               | 0.012   |
| H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>  | 0.013   |
| KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> | 0.045   |
| KBr                             | 0.048   |
| NH <sub>4</sub> Cl              | 0.096   |
| KCl                             | 0.36    |
| NH <sub>4</sub> Cl              | 0.36    |
| CaCl <sub>2</sub>               | 0.55    |
| MgCl <sub>2</sub>               | 2.48    |
| NaCl                            | 11.75   |
| Na <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> | 1.95    |
| H <sub>2</sub> O                | 1000 mL |

Tween 80 (1/100)

Se coloca 0.1 mL de tween 80 en 100 mL de agua destilada estéril

Medio para bacterias púrpuras fotótrofas rojas no sulfurosas (familia

*Rhodospirillaceae*)

(Biebl y Pfennig 1981, modificada esta investigación).

|                                         | g/L  |
|-----------------------------------------|------|
| CH <sub>3</sub> COONa.3H <sub>2</sub> O | 1.00 |
| CH <sub>3</sub> COONH <sub>4</sub>      | 0.50 |
| Fe(III) citrato solución                |      |

|                                                                                                                                    |         |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|---------|
| (0.1% en 10 ml de H <sub>2</sub> O destilada)                                                                                      | 5.00 ml |
| KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>                                                                                                    | 0.50 g  |
| NH <sub>4</sub> Cl                                                                                                                 | 0.40 g  |
| MgCl <sub>2</sub> ·7H <sub>2</sub> O                                                                                               | 0.20 g  |
| NaCl                                                                                                                               | 20.00 g |
| CaCl <sub>2</sub> ·2H <sub>2</sub> O                                                                                               | 0.05 g  |
| Agua destilada                                                                                                                     | 1000ml  |
| Ajustar el pH a 6.8 con una solución 2M de H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> o con una solución 2M de Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> |         |
| Esterilizar en la autoclave a 120°C                                                                                                |         |

#### Solución de elementos traza SLA

(Imhoff y Truper, 1977)

|                                                     |       |
|-----------------------------------------------------|-------|
|                                                     | mg/L  |
| FeCl <sub>3</sub> ·4H <sub>2</sub> O                | 1800  |
| CoCl <sub>2</sub> ·6H <sub>2</sub> O                | 250   |
| NiCl <sub>2</sub> ·6H <sub>2</sub> O                | 10    |
| CuCl <sub>2</sub>                                   | 10    |
| MnCl <sub>2</sub> ·4H <sub>2</sub> O                | 70    |
| ZnCl <sub>2</sub>                                   | 100   |
| H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>                      | 50    |
| Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> ·2H <sub>2</sub> O | 30 mg |

El pH se ajusta con HCl 1N para obtener un pH de 2-3

Esterilizar por filtración sobre membrana Millipore de 0.2 µm diámetro de poro, en frascos de penicilina gasificados con N<sub>2</sub>, guardar en refrigeración y agregar de dos a tres gotas a cada tubo en el momento de realizar las siembras.

#### Solución de vitaminas (VA) Modificada de Imhoff y Trüpper (1977)

|                   |           |
|-------------------|-----------|
|                   | mg/100 ml |
| Biotina           | 10        |
| Niacina           | 35        |
| Tiamina dicloruro | 30        |

|                          |    |
|--------------------------|----|
| Ácido p-aminobenzoico    | 20 |
| Pyridoxolium hidrodoruro | 10 |
| Pantotenoico-Ca          | 10 |
| Vitamina B <sub>12</sub> | 5  |

Disolver en 100 ml de H<sub>2</sub>O destilada

Esterilizar por filtración sobre membrana Millipore de 0.2 µm de diámetro de poro, en frascos de penicilina gasificados con N<sub>2</sub>, guardar en refrigeración y agregar de dos a tres gotas a cada tubo en el momento de sembrarlos.

Medio para bacterias púrpuras fotótrofas rojas no sulfurosas de la familia

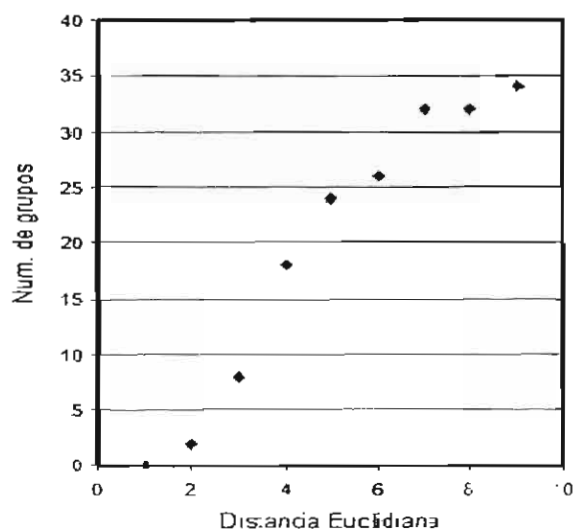
Rhodospirillaceae, sin fuente de nitrógeno

(Biebl y Pfennig 1981, modificada en esta investigación)

|                                               |      |
|-----------------------------------------------|------|
|                                               | g/L  |
| CH <sub>3</sub> COONa 3H <sub>2</sub> O       | 1.00 |
| Fe(III) citrato solución                      |      |
| (0.1% en 10 ml de H <sub>2</sub> O destilada) | 5.00 |
| KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>               | 0.50 |
| MgCl <sub>2</sub> 7H <sub>2</sub> O           | 0.20 |
| NaCl                                          | 20.0 |
| CaCl <sub>2</sub> 2H <sub>2</sub> O           | 0.05 |
| Agua destilada                                | 1000 |

Ajustar el pH a 6.8 con una solución 2M de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> o con una solución 2M de Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>

Esterilizar en la autoclave a 120°C durante 30 min



**Figura 11.** Línea de corte para la definición de los grupos ambientales del dendrograma de la figura 14.