



**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA  
UNIDAD XOCHIMILCO**

**DIVISIÓN DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y DE LA SALUD  
MAESTRÍA EN CIENCIAS AGROPECUARIAS**

**TASAS DE FIJACIÓN DE NITRÓGENO ATMOSFÉRICO  
Y CARACTERIZACIÓN QUÍMICA Y MOLECULAR DE  
BACTERIAS DIAZOTROFAS MICROAEROFÍlicas  
PROCEDENTES DE SEDIMENTOS.**

**T E S I S   D E   M A E S T R Í A  
(IDÓNEA COMUNICACIÓN DE RESULTADOS)**

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:  
MAESTRO EN CIENCIAS AGROPECUARIAS**

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

**B i o l . J O S É R O B E R T O A N G E L  
V Á Z Q U E Z**

**COMITÉ TUTORAL**

**DIRECTOR  
DRA. MARÍA JESÚS  
FERRARA GUERRERO**

**ASESORES  
DR. FACUNDO RIVERA BECERRA  
DR. GILBERTO DÍAZ GONZÁLEZ**

**MÉXICO, D.F. DICIEMBRE**

**Hoja de firmas.**

---

**Dr. Néstor Octavio Pérez Ramírez**  
**Presidente del jurado**

---

**Dr. Facundo Rivera Becerril**  
**Secretario**

---

**Dr. Gilberto Díaz González**  
**Vocal**

## Resumen

La fijación biológica del nitrógeno molecular es un proceso imprescindible para el buen funcionamiento de los ecosistemas, específicamente para la producción nueva y regenerada. Desde el punto de vista agrícola, las bacterias diazotrofas tienen un uso potencial como biofertilizantes nitrogenados. Los fijadores de nitrógeno de vida libre han sido poco estudiados, particularmente los bentónicos con metabolismo microaerobio. La finalidad de la presente investigación fue caracterizar químicamente once cepas diazotrofas quimioorganótrofas microaerófilas de vida libre aisladas de tres ecosistemas acuáticos (canales de la zona chinampera de Xochimilco, laguna de Sontecomapan, Veracruz y sureste del Golfo de México), considerando su morfología, fisiología, perfiles de ácidos grasos, reducción de acetileno, así como la presencia del gen *nifH* y la secuenciación del segmento 16S rDNA. Se identificaron los metabolismos microaerobio estricto y microaerobio facultativo en la colección de aislados; la salinidad mostró ser un factor determinante en la diversidad de la comunidad bacteriana. El análisis de ácidos grasos, con base en los estándares FAME y BAME, permitió determinar los perfiles para los aislados de procedencia dulceacuícola y marina, además de identificar ciertos ácidos grasos característicos de ambientes específicos, los que podrían ser utilizados como biomarcadores del bacteriobentos diazotrofo microaerófilo. La colección de aislados presentó una elevada actividad heterotrófica al ser capaces de utilizar una alta diversidad de fuentes de carbono (aminoácidos, azúcares, ácidos orgánicos, ácidos grasos, alcoholes), además de sintetizar diferentes exoenzimas (ADNasas, proteasas, fosfatasas, esculinasas, lecitinasas, tvenasas, amilasas, celulasas), responsables de la hidrólisis de compuestos orgánicos simples y de cadena larga. Se obtuvieron valores significativos de actividad de la nitrogenasa ( $0.059$  y  $0.069 \text{ N}_2 \text{ L}^{-1} \text{ h}^{-1}$ ) en siete aislados capaces de reducir el acetileno. Empero, en ninguno de ellos fue amplificado el fragmento correspondiente al gen *nifH*, por lo que la fijación de nitrógeno puede estar atribuida a nitrogenasas alternativas. Según la secuencia del segmento 16S rDNA, la colección de aislados se encuentra conformada por siete especies bacterianas (*Caulobacter* sp, *Ochrobacterium anthropi*, *Sphingobium* sp, *Sphingobium amiense*, *Bacillus firmus*, *Bacillus* sp y *Pseudomonas stutzeri*), y probablemente por una especie nueva procedente de los sedimentos de la laguna de Sontecomapan.

## Contenido

Agradecimientos .....	1
Capitulo I. Antecedentes .....	4
1 Introducción .....	4
1.1 Marco teórico .....	6
1.2 Clasificación de las bacterias con base en su tolerancia al oxígeno.....	6
1.3 Fijación biológica de nitrógeno molecular .....	8
1.4 Características de las bacterias diazotrofas .....	9
1.5 Factores que afectan la fijación del nitrógeno atmosférico .....	10
1.6 Regulaciones y mecanismos para proteger el complejo Nitrogenasa .....	11
1.7 Importancia ecológica de la fijación y reciclamiento de nitrógeno en los ecosistemas acuáticos .....	12
1.8 Importancia de la fijación biológica del N <sub>2</sub> en la agricultura .....	12
1.9 Fijación simbiótica del nitrógeno .....	13
1.1.0 Importancia biotecnológica de las bacterias diazotrofas microaerofílicas .....	14
1.1.2 Justificación .....	15
1.1.3 Objetivos .....	16
Literatura citada .....	17
Capitulo II. Los ácidos grasos como herramienta taxonómica .....	20

2 Introducción .....	20
2.1 Materiales y métodos .....	23
2.2 Procedencia de los aislados bacterianos .....	21
2.3 Toma de muestras .....	21
2.4 Purificación de los aislados bacterianos	
diazotrofos .....	21
2.5 Tolerancia a la presencia de oxígeno. ....	22
2.6 Pruebas morfológicas y fisiológicas .....	22
2.7 Determinación de ésteres metílicos .....	23
2.8 Análisis estadístico .....	24
2.9 Resultados .....	25
2.1.0 Discusión .....	31
Literatura citada .....	36
Capítulo III. Tasas de fijación de nitrógeno, actividad heterotrófica y caracterización molecular .....	40
3 Introducción .....	40
3.1 Materiales y métodos .....	42
3.2 Tolerancia a diferentes concentraciones de salinidad .....	42
3.3 Utilización de fuentes de carbono .....	42
3.4 Producción de exoenzimas .....	43
3.5 Prueba de actividad de la nitrogenasa <i>in vitro</i> .....	43
3.6 Obtención de biomasa bacteriana para el análisis molecular del segmento 16S rDNA .....	45
3.7 Extracción y purificación de DNA genómico .....	45
3.8 Cuantificación de DNA genómico .....	46

3.9 Amplificación del segmento 16S rDNA por PCR .....	47
3.1.0 Amplificación del gen <i>nifH</i> . .....	48
3.2.0 Secuenciación del segmento 16S rDNA .....	50
3.3.0 Resultados .....	51
3.4.0 Discusión .....	64
Literatura citada .....	68
Capítulo IV. Conclusiones generales .....	73

## ***Agradecimientos***

A mi **Madre**, con todo el amor, respeto, admiración y gratitud. Gracias por apoyarme siempre en todos los sentidos y de manera incondicional.

A mi **Padre**, donde quiera que est

A **Ramón**, por el inmenso apoyo que siempre me demostraste, por bondad, lealtad, humildad y por la guía que siempre has sido.

Quiero agradecer ampliamente a **Ana** y **Felipe** toda su disposición para apoyarme en todos mis proyectos, por la enorme confianza y por demostrar que uno nunca está solo.

**Elia** y **Raúl**, gracias por estar siempre en mis momentos más especiales y por apoyarme en todo.

Con todo mi amor y cariño, **Viridian**

A la **Dra. María Jesús Ferrara Guerrero**, por dirigir la presente investigación, por el entusiasmo, el apoyo incondicional, por la formación profesional y por la enorme confianza. Con toda mi gratitud y admiración.

Al Dr. **Facundo Rivera Becerril**, por estar siempre comprometido con el desarrollo de este proyecto, por su asesoría y por demostrar una amplia responsabilidad durante su ejecución, característica de un excelente docente.

Quiero agradecer al Dr. **Gilberto Díaz González** el haber aceptado ser asesor de esta investigación y por proporcionar toda la infraestructura para la determinación de ácidos grasos y tasas de fijación de nitrógeno en el Laboratorio de Análisis Instrumental.



Un reconocimiento al Dr. **Néstor Octavio Pérez**, por la oportunidad de adiestramiento en la caracterización molecular de los aislados bacterianos, la parte esencial del presente proyecto y por las gestiones para la realización de la estancia en PROBIOMED S.A. de C.V., en donde se adquirieron los conocimientos y habilidades.

Quiero agradecer ampliamente a la M. en C. **Lidia Irene Leal Guadarrama** (PROBIOMED S.A. de C.V.), por todo su conocimiento compartido para llevar a cabo la caracterización molecular de los aislados bacterianos.

Al M. en C. **Alfonso Esquivel Herrera**, por su incondicional ayuda en los análisis estadísticos y por mostrar siempre una actitud de apoyo y cooperación.

A la Biól. **Vanesa Lisbeth Morán Villa**, por su ayuda en la evaluación de las tasas de fijación de nitrógeno, y a la Biól. **Olivia Aparicio Osorio** por su asesoría en los índices de producción exoenzimática.

Quiero agradecer el financiamiento otorgado por el **CONACYT** a través del proyecto Influencia de la salinidad sobre la fijación no simbiótica de nitrógeno molecular y diversidad de la comunidad bacteriana microaerofílica en el complejo laguno-arrecifal de Sontecomapan Veracruz (39634-F/A-1) y por la beca de estudios de maestría otorgada a J. Angeles Vázquez (198431).

Con infinita gratitud a los doctores, **Guadalupe Prado, Salvado Vega, Germán Mendoza, Rey Gutiérrez, Fernando de León y Héctor Castillo** profesores de la maestría, los cuales en algún momento fungieron como revisores de los diferentes proyectos y trabajos de investigación. Gracias por sus valiosas observaciones y comentarios.

Al Coordinador de la Maestría en Ciencias Agropecuarias, Dr. **Luis Arturo García**, por los apoyos otorgados para los congresos y estancias realizadas y por la buena guía sobre el desarrollo del presente proyecto.

## Capítulo I. ANTECEDENTES

### I . Introducción

La distribución vertical del oxígeno en los sistemas acuáticos es determinada por las condiciones físicas y químicas prevalecientes. El oxígeno es el agente químico más importante que controla el potencial de óxido-reducción en el agua y en los sedimentos superficiales, al igual que el principal aceptor terminal de electrones para los microorganismos aerobios, tanto heterótrofos como quimiolitótrofos, en las reacciones de producción de energía. Por tanto, el oxígeno es una de las principales variables ambientales que afectan fuertemente la distribución de los microorganismos (Atlas, 1984; Fridovich, 1974; Hansen *et al.*, 1980).

La distribución, la estructura y la función de las comunidades bacterianas en los ecosistemas acuáticos están ligadas estrechamente a la disponibilidad de aceptores terminales de electrones y producción biológica, riqueza de partículas orgánicas, concentración de iones inorgánicos, y a los gases disueltos tanto en la columna de agua como en el agua intersticial de los sedimentos (Caumette, 1988; Reimers, 1989).

Las bacterias diazotrofas juegan un papel fundamental en el reciclamiento de nitrógeno y en la producción regenerada, ya que liberan compuestos nitrogenados, principalmente  $\text{NO}_2$ ,  $\text{NO}_3^-$  y  $\text{NH}_4^+$  que son aprovechados principalmente por los productores primarios (Reimers, 1989).

Por ello, conocer las características funcionales y los procesos biológicos y biotecnológicos en los que este grupo bacteriano se encuentra involucrado es de gran importancia; en México existen muy pocos trabajos científicos relacionados con este tema, y particularmente en lo que se refiere a los diazotrofos microaerofílicos bentónicos. En la actualidad, la mayor parte de las investigaciones se centran en géneros de importancia agronómica como son *Rhizobium* y *Azotobacter* o de relevancia médica como en el caso de *Campylobacter*, pero poco se sabe sobre las potencialidades metabólicas de las bacterias diazotrofas de vida libre con metabolismo respiratorio microaerofílico.

Por lo anterior, con la presente investigación se pretendió contribuir al conocimiento de la potencialidad fijadora de nitrógeno atmosférico ( $\text{N}_2$ ) de la diversidad taxonómica de una colección de once cepas diazotrofas microaerobias de vida libre, aisladas de sedimentos de tres ecosistemas

acuáticos ecológicamente diferentes, a través de la caracterización morfológica, química, molecular (secuenciación del segmento 16S rDNA), amplificación del gen *nifH*, características lipídicas de las membranas celulares (perfiles de ácidos grasos) y determinación de las tasas de fijación del nitrógeno por la técnica de reducción del acetileno molecular.

## 1.1 Marco teórico

### 1.2 Clasificación de las bacterias con base en su tolerancia al oxígeno

En función de su tolerancia al oxígeno, las bacterias se clasifican en cuatro grupos:

a) Bacterias aeróbicas estrictas: Para su metabolismo respiratorio requieren únicamente oxígeno como aceptor terminal de electrones y son incapaces de utilizar aceptores alternativos de electrones (nitratos, sulfatos y carbonatos).

b) Bacterias anaeróbicas facultativas: Emplean el oxígeno molecular si se encuentra disponible, pero en su ausencia utilizan otras alternativas como la respiración de nitratos o la fermentación. Estos microorganismos responden a la presencia gracias a la síntesis de ciertas enzimas como la superóxido dismutasa (por ejemplo la catalasa y la superóxido dismutasa).

c) Bacterias anaeróbicas estrictas: En general son inhibidas por las concentraciones extracelulares de oxígeno. Se dividen en dos grupos de acuerdo con su sensibilidad al oxígeno:

- i. Anaerobias estrictas: Son oxilábiles y el oxígeno es un inhibidor de su crecimiento.
- ii. Anaerobias aerotolerantes: Son capaces de crecer a muy bajas concentraciones de oxígeno gracias a la producción de la enzima superóxido dismutasa.

d) Bacterias microaerófilas: Los criterios para definir este grupo metabólico son aun insatisfactorios; algunos autores las definen como bacterias aerobias o anaerobias facultativas debido a que pueden metabolizar con o sin oxígeno. La concentración máxima de oxígeno que las bacterias microaerófilas pueden tolerar no está bien establecida (Atlas, 1984; Morris, 1984).

Las consideradas como anaerobias facultativas utilizan el nitrato como aceptor de hidrógeno, en tanto que las anaerobias estrictas se desarrollan en concentraciones menores a 3% de oxígeno y utilizan de manera eficiente sustratos de carbono que dan las condiciones de anaerobiosis estricta (Ferrara-Guerrero, 1993).

Las bacterias microaerófilas estrictas son del tipo de *Campylobacter*

crecen en condiciones de microaerobiosis en presencia de nitrato fumarato; utilizan el oxígeno como aceptor de hidrógeno dentro de su cadena respiratoria y producción de energía. La presión parcial de oxígeno necesaria para este grupo metabólico fluctúa entre 0.05 y 7% (Bazylinski y Blakemore, 1983; Day y Döbereiner, 1976; Ferrara-Guerrero y Bianchi, 2000; Holland *et al.*, 1987; Reddy y Lodha, 1986).

En general, la distribución de las bacterias microaerófilas en los ecosistemas acuáticos (marinos y dulceacuícolas) no ha sido muy estudiada; las técnicas de cultivo utilizadas actualmente no permiten precisar la importancia relativa de esta comunidad bacteriana con respecto a los otros grupos fisiológicos. De acuerdo con el Manual de Bergey (1994), los géneros reportados como microaerófilos estrictos se muestran en el cuadro 1, así como las características fisiológicas de cada uno de ellos.

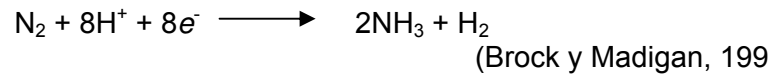
**Cuadro 1.** Géneros de bacterias microaerófilas reportadas así como sus características morfológicas y fisiológicas (Tomado de Bergey, 1994).

<b>Características</b>	<b><i>Campylobacter</i></b>	<b><i>Helycobacter</i></b>	<b><i>Spirillum</i></b>	<b><i>Wolinella</i></b>
<b>Forma celular</b>	Vibrioide	Vibrioide	Helicoidal	Vibrioid
<b>Diámetro celular (µm)</b>	0.2 a 0.9	0.5 a 1.0	1.4 a 1.7	0.5 a 1.0
<b>Tinción Gram</b>	-	-	-	-
<b>Patogenia</b>	D	+	-	-
<b>Origen marino</b>	-	-	-	-
<b>Origen de agua dulce</b>	+	-	+	-
<b>Origen bentónico</b>	-	-	-	-
<b>Patógeno de animales o humanos</b>	+	+	-	+
<b>Asociación con raíces</b>	+	-	-	-
<b>Crecimiento en presencia de sales</b>	+	-	-	-
<b>Utilización de glucosa</b>	-	-	-	-

D: Diferentes reacciones para cada especie

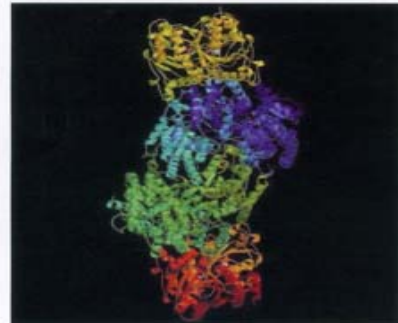
### 1.3 Fijación biológica de nitrógeno molecular

La fijación biológica del nitrógeno se define como el proceso de reducción del nitrógeno atmosférico hasta amoníaco, el cual es transformado posteriormente a forma orgánica durante la biosíntesis celular, de acuerdo con la siguiente reacción:

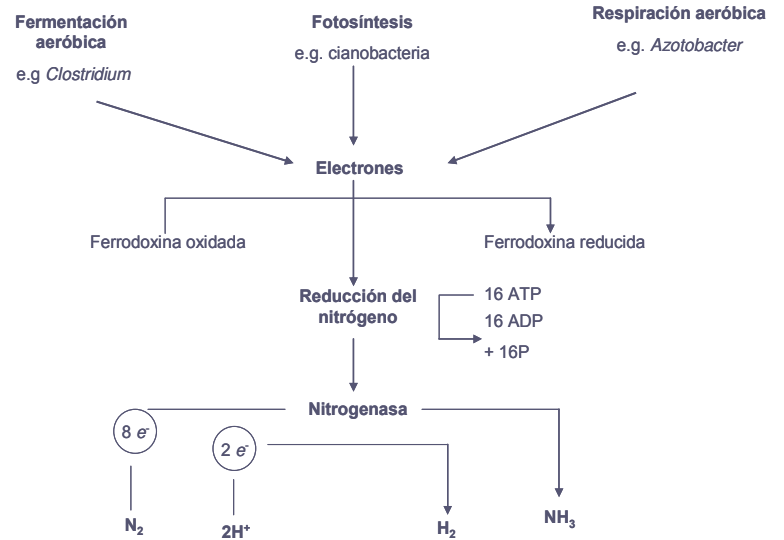


Esta incorporación directa del nitrógeno atmosférico en los materiales intracelulares la llevan a cabo ciertas especies de bacterias incluyendo organismos fotolitótrofos, quimiolitótrofos y quimioorganótrofos. La reacción de fijación de nitrógeno es catalizada por la enzima nitrogenasa, un complejo molibdeno-enzima existente en algunos procariontes filogenéticamente diferentes (eubacterias y arqueobacterias), con una fisiología que va desde heterótrofos aerobios, fotótrofos aerobios, hasta anaerobios facultativos, hasta anaerobios estrictos (Atlas y Bartha, 2002).

La nitrogenasa está constituida por dos subunidades: la dinitrogenasa (contiene hierro) y la reductasa de la dinitrogenasa (contiene hierro y molibdeno) (Figura 1). La dinitrogenasa es muy sensible al oxígeno, por lo que el proceso de fijación de  $\text{N}_2$  presenta una mayor eficiencia en condiciones anaerobias. En aerobiosis la célula emplea estrategias especiales para proteger la enzima de los radicales tóxicos del oxígeno (Broughton, 1981). La reducción de nitrógeno hasta amoníaco demanda una gran cantidad de energía por parte de las células, como se observa en la figura 2.



**Figura 1.** Estructura tridimensional obtenida por rayos X del complejo enzimático de la nitrogenasa de *Azotobacter vinelandii*. Los componentes de hierro y molibdeno (reductasa de la dinitrogenasa) se muestran en azul y verde; el subconjunto de la dinitrogenasa se aprecia en amarillo, rojo y naranja (tomado de Baldini *et al.* 1997).



**Figura 2.** Reacciones que se llevan a cabo durante la fijación de nitrógeno (Brody y Madigan. 1993).

#### 1.4 Características de las bacterias diazotrofas

Las bacterias diazotrofas son aquellas capaces de fijar el N<sub>2</sub> e incorporarlo en su biomasa durante el anabolismo; este grupo de bacterias pueden metabolizar bajo diferentes gradientes de oxígeno y considerarse como aerobias facultativas o anaerobias facultativas; actualmente se incluye dentro del grupo de los microaerobios estrictos.

Los diazotrofos presentan alternativas respiratorias según la concentración de oxígeno y los compuestos nitrogenados existentes en el ambiente, obtienen su energía a partir de distintas fuentes de carbono. Con base en el suministro de energía pueden ser quimioorganótrofos (utilizan la materia orgánica), fotótrofos (emplean luz) y quimiolitótrofos (utilizan compuestos químicos inorgánicos) (Vargas y Novelo, 2003). Los géneros diazotrofos y sus diferentes fuentes de energía se muestran en el cuadro 2.

**Cuadro 2.** Algunos organismos diazotrofos y su fuente de carbono y energía.

<b>Aerobios facultativos</b>		
<b>Quimiorganótrofos</b>	<b>Fotótrofos</b>	<b>Quimiolitótrofos</b>
<b>Bacteria</b> <i>Azotobacter</i> ssp, <i>Kleb</i> , <i>Bacillus polymuxasiella</i> , <i>Mycobacterium flavum</i> , <i>Azospirillum lipoferum</i> , <i>Citrobacter nemundii</i> , <i>Azotobacter diazotrophicus</i> , <i>Methylomonas</i> , <i>Methylococcus</i>	<b>Cianobacterias</b> (varias pero no todas)	<i>Alcaligenes</i> , <i>Thiobacillus</i> (algunas especies)
<b>Anaerobios facultativos</b>		
<b>Quimiorganótrofos</b>	<b>Fotótrofos</b>	<b>Quimiolitótrofos</b>
<b>Bacteria</b> <i>Clostridium</i> sp, <i>Desulfovibrio</i> , <i>Desulfotomaculum</i>	<b>Bacteria</b> <i>Chlorobium</i> , <i>Chromatium hiocapsa</i> , <i>Rhodospirillum</i> , <i>Rhodophila</i> , <i>Rhodopseudomonas</i> , <i>Rhodobacter</i> y <i>Heliobacterium</i> .	<i>Alcaligenes</i> , <i>Thiobacillus</i> (algunas especies)
<b>Simbióticos</b>		
<b>Con plantas leguminosas</b>		<b>Con plantas no leguminosas</b>
<b>Bacteria</b> <i>Rhizobium</i> , <i>Bradyrhizobium</i> o <i>Azorhizobium</i>		<b>Bacteria</b> <i>Frankia</i>

### 1.5 Factores que afectan la fijación del nitrógeno atmosférico

Según Pérez y Torralba (1997), existe una serie de factores que afectan la cantidad de nitrógeno fijado tanto por los microorganismos libres como por aquellos que viven en simbiosis. Estos factores incluyen el número de microorganismos fijadores, la luz, la temperatura, la concentración de oxígeno, así como los compuestos de nitrógeno presentes y otros nutrientes minerales, estos factores se describen a continuación,

- i. Número de microorganismos: A mayor cantidad de microorganismos fijadores de nitrógeno presentes en el medio habrá niveles más elevados de fijación. La distribución de las bacterias diazotrofas en los distintos hábitats es muy variable. Así, *Azotobacter* es muy abundante en el delta del Nilo y prácticamente inexistente en suelos de las islas Británicas (alrededor de una bacteria por gramo de suelo).
- ii. Intensidad luminosa: Este es un factor aplicable a microorganismos fotosintéticos fijadores de nitrógeno. La fijación requiere del poder reductor generado en la fotosíntesis, aunque la reacción de



nitrogenasa *per se* es independiente de la luz. Muchas cianobacterias pueden crecer y fijar nitrógeno en completa oscuridad si disponen de suficientes sustratos orgánicos. Las cianobacterias expuestas a la luz, pueden también fijar nitrógeno en la oscuridad durante un cierto periodo de tiempo aprovechando para ello los sustratos producidos en la fase luminosa, el ATP y el poder reductor generado.

- iii. Temperatura: Los microorganismos fotosintetizadores son comunes en las zonas templadas, abundantes en los trópicos y llegan a estar presentes en ambientes extremos (polos y zonas calientes). La actividad de la nitrogenasa aumenta con la temperatura, aunque al llegar a un máximo (normalmente entre 25 y 30°C) comienza a decrecer, a pesar de que en zonas cálidas la población microbiana siga aumentando.
- iv. Concentración de oxígeno: Cuando aumenta la concentración de oxígeno se observa una disminución en las tasas de fijación de nitrógeno. Esto se debe a que el proceso de fijación exige condiciones reductoras. Ante la presencia de oxígeno (misma que será obligada en los microorganismos aerobios), se produce un gasto considerable de poder reductor para proteger a la nitrogenasa del oxígeno.
- v. Los compuestos nitrogenados: La síntesis de la nitrogenasa es inhibida por las altas concentraciones de compuestos nitrogenados en el medio, tales como amonio o nitratos. Además, éstos también interfieren en los procesos de competencia entre microorganismos fijadores de nitrógeno y los no fijadores.

## **1.6 Regulación y mecanismos de protección del complejo Nitrogenasa**

El ADP (adenosín difosfato) es un potente inhibidor de la nitrogenasa. Cuando la relación ATP/ADP es igual o inferior, la nitrogenasa queda totalmente inhibida. Los inhibidores competitivos que esta enzima presenta son el acetileno y el CO<sub>2</sub>.

Existen dos mecanismos de protección que utiliza la enzima nitrogenasa para enfrentarse a las condiciones adversas del medio:

- 1) Protección respiratoria: El microorganismo intensifica la respiración cuando hay demasiado oxígeno, lo que requiere de un gasto elevado de compuestos carbonados (esto no es válido en poblaciones con limitación de carbono).

2) Protección conformacional: Paso de la forma activa de la enzima (que es sensible al oxígeno) a la forma inactiva (que no lo es) para no fijar nitrógeno molecular (Lundgren, 2001; Stephan *et al.*, 1991).

### **1.7 Importancia ecológica de la fijación y reciclamiento del nitrógeno en los ecosistemas acuáticos**

El nitrógeno en los ecosistemas acuáticos se encuentra distribuido en forma sólida, disuelta, gaseosa y/o en formas nitrogenadas fosfatadas principalmente como  $\text{NH}_4^+$ ,  $\text{NO}_3^-$ ,  $\text{NO}_2^-$ ,  $\text{HPO}_4^{2-}$  y urea (Caumette, 1988; Reimers, 1989). La distribución, la estructura y la función de las comunidades microbianas en los ecosistemas acuáticos están ligadas estrechamente a la riqueza de partículas nitrogenadas orgánicas e inorgánicas, que junto con el  $\text{CO}_2$ , sustentan la producción primaria del ecosistema y por ende, son parte fundamental de las redes tróficas acuáticas (Contreras *et al.*, 1997).

La fijación del nitrógeno molecular es un proceso imprescindible para el buen funcionamiento del ecosistema, pero a pesar de ello existe muy poca información sobre la participación del bacterioplancton y el bacteriobentos quimiorganótrofo y su aporte de nitrógeno asimilable en los ecosistemas acuáticos.

En general, los microorganismos responsables del reciclamiento de los compuestos nitrogenados juegan un papel fundamental en la producción nueva y regenerada en los ecosistemas acuáticos, ya que contribuyen con el aporte a la columna de agua de iones nitrogenados inorgánicos que son utilizados por los productores primarios durante sus procesos fotosintéticos. Ello ocasiona muchas veces, la aparición de afloramientos que sustentan a los consumidores.

### **1.8 Importancia de la fijación biológica del $\text{N}_2$ en la agricultura**

Dentro de los microorganismos diazotrofos se encuentran los denominados fijadores de vida libre, quienes llevan a cabo este proceso sin la cooperación de otras formas vivas. La familia Azotobacteriaceae agrupa los géneros más importantes en la producción agrícola sustentable, debido a su uso como biofertilizantes nitrogenados (Baldini *et al.*, 1997).

Miembros del género *Azotobacter* son de los más utilizados como biofertilizantes y por lo tanto, uno de los más estudiados. Sus propiedades benéficas se han puesto de manifiesto en una gran variedad de hortalizas.

granos y viandas. Estos organismos son capaces de fijar de 20 a 30 kg de  $N_2$   $ha^{-1}$   $año^{-1}$ , sin embargo, su efecto positivo así como el de los representantes del género *Azospirillum* no se debe solamente a la cantidad de  $N_2$  fijado, sino también a la capacidad de sintetizar en determinadas condiciones, vitaminas y sustancias estimuladoras del crecimiento (ácido indolacético, ácido giberélico, citoquininas) que influyen directamente en el desarrollo vegetal (Reis *et al.*, 2000).

Las principales formas de suministro de nitrógeno en el suelo son la aplicación de fertilizantes nitrogenados y la fijación biológica de  $N_2$ . Sin embargo, el alto costo de la investigación para la producción de fertilizantes nitrogenados, la gran cantidad de energía requerida para su producción y las capacidades subóptimas para su transportación, limitan su uso en países en vías de desarrollo, especialmente en comunidades agrícolas pequeñas (Bell *et al.*, 2005; Ueda *et al.*, 1995).

### **1.9 Fijación simbiótica del nitrógeno**

Existen asociaciones simbióticas entre bacterias fijadoras de nitrógeno y algunas plantas leguminosas (principalmente), en las cuales el diazotrofo se aloja en los nódulos de las raíces. En esta interacción existe un beneficio mutuo ya que ambos simbiosntes intercambian diferentes compuestos (Reis *et al.*, 2000).

El inicio de la relación simbiótica depende de la estructura espacial de las bacterias fijadoras de nitrógeno en el suelo. Las bacterias por medio de las raíces excretan compuestos en la rizosfera que promueven el desarrollo y crecimiento vegetal, en lo cual radica el beneficio y éxito de la nodulación (Zengler, 1995).

El nitrógeno regularmente es liberado en forma de nitratos y amoníaco, indispensables para el metabolismo de la planta asociada. Por su parte, las bacterias son beneficiadas por el  $CO_2$  liberado como producto de los metabolismos del vegetal asociado. Como ejemplos de asociaciones simbióticas se encuentran *Rhizobium*-leguminosas, *Bradyrhizobium*-leguminosas y *Frankia*-plantas actinorrízicas (Zehr *et al.*, 1995; Zengler, 1995).

### **1.1.0 Importancia biotecnológica de las bacterias diazotrofas microaerófilas**

La biotecnología es la disciplina que se refiere al uso de microorganismos vivos o de sus productos en procesos a gran escala. La microbiología industrial originalmente se inició con la fermentación alcohólica, como la fabricación de cerveza y vino, y actualmente existen otros procesos industriales mediados por microorganismos como son la producción de antibióticos, aditivos alimentarios y sustancias químicas como el butanol y el ácido cítrico (Steppe y Paerl, 2002).

El campo de la biotecnología ha tenido recientemente un incremento en su producción gracias a la ingeniería genética, donde las bacterias diazotrofas son uno de los grupos más utilizados. Por ejemplo, especies del género *Clostridium* que es anaerobio facultativo, se utilizan en el proceso de fermentación alcohólica, sobre todo en la producción de cerveza (Atlas y Bartha, 2002).

### 1.1.2 Justificación

Todo lo anteriormente expuesto, permite resaltar la relevancia del estudio de las bacterias diazotrofas; sin embargo, poco se conoce sobre el papel que juegan las bacterias microaerófilas diazotrofas de vida libre en el ciclo del nitrógeno dentro de los ecosistemas acuáticos. Los estudios que se han realizado en México están basados en unos cuantos géneros de gran importancia económica, entre los que se encuentran los géneros *Rhizobium* y *Azotobacter*.

De igual manera, la información sobre los ésteres metílicos de los lípidos que conforman las membranas celulares de este grupo bacteriano es escasa. Asimismo, poco se conoce sobre sus características bioquímicas moleculares del mismo, debido a las dificultades técnicas para aislamiento y purificación de estos organismos.

Por ello, la finalidad de la presente investigación fue contribuir al conocimiento del potencial fijador de nitrógeno atmosférico y conocer la diversidad taxonómica y fisiológica de una colección de once cepas diazotrofas microaerófilas de vida libre, procedentes de los sedimentos de tres ecosistemas acuáticos ecológicamente diferentes (canales de zona chinampera del lago de Xochimilco, laguna de Sontecomapa, Veracruz y sureste del Golfo de México).

### 1.1.3 Objetivos

#### Objetivo general

Caracterizar química y molecularmente once cepas diazotrofas quimiorganótrofas microaerófilas de vida libre aisladas de tres diferentes ecosistemas acuáticos.

#### Objetivos particulares

1. Caracterizar morfológica, fisiológica y bioquímicamente las cepas bacterianas aisladas.
2. Determinar la variabilidad y concentración porcentual de los ésteres metílicos de los ácidos grasos presentes en las membranas celulares.
3. Estimar la potencialidad de fijar nitrógeno molecular *in vitro*.
4. Corroborar el carácter diazotrofo de los aislados a través de la implicación del gen *nifH*.
5. Identificar los aislados con base en la secuencia del segmento 16S rDNA.

## Literatura citada

- Atlas, R.M. 1984. Microbiology. Fundamentals and applications. Mc Millan Pub. Co. Nueva York, Londres. 879 p.
- Atlas, R.M. y Bartha, R. 2002. Microbial Ecology. Fundamentals and applications. The Bergaing Cumminge Pul.Co, Madrid. 563 pp.
- Baldini, J. I., Caruso, L., Baldani, V.L.D., Goi, S. R., y Döbereiner, J. 1997. Recent advances in BNF with non-legumes plants. *Soil Biol. Biochem.* 29:911-922.
- Bazylinski, D.A. y Blakemore, R.P. 1983. Denitrification and assimilatory nitrate reduction in *Aquaspirillum magnetotacticum*. *Appl. Environ. Microbiol.* 46: 1118-1124.
- Bell, T. J, Newman, A., Bernard, W., Sarha, L y Andrew, K. 2005. The contribution of species richness and composition to bacterial services. *Nature.* 436: 1157-1160.
- Bergey, 1994. Manual of determinative bacteriology. Volume 1. Ed. Springer Verlag, Michigan .1157-198p.
- Brock, J. y Madigan, D. 1993. Microbiología. Prentice Hall Hispanoamericana. México, D.F. 487 p.
- Broughton, W. J. 1981. Nitrogen fixation. Volume 1. Ecology. Ed. Oxford Univesity Press. New York. 174 p.
- Caumette, P. 1988. Les lagunes et les marais maritimes. *En* Bianchi, M. I. Marty, J.C. Bertrand, P. Caumette y M. Gauthier (eds) *Microorganismes dans les écosystemes océaniques*. Masson, Paris. 149-282 pp.
- Contreras E., F., O. Castañeda L. y. Torres R. A.1997. Hidrología, nutrientes y productividad primaria en las lagunas costeras del estado de Oaxaca, México. *Hidrobiológica* 7: 9-17.
- Day, J.M. y Döbereiner, J. 1976. Physiological aspects of N<sub>2</sub>-fixation by *Spirillum* from *Digitaria* roots. *Soil. Biol. Biochem.*8: 45-50.

- Ferrara-Guerrero, M.J. 1993. Distribution des bactéries microaérophiles dans les sédiments de lagunes côtières Méditerranéenne. Comparaison avec la distribution des bactéries aérobies anaérobies. Étude des potentialités métaboliques. Tesis Doctoral. Université de Aix-en-Provence, 218 p.
- Ferrara-Guerrero, M.J. y A. Bianchi. 2000. Bacterial microaerophilic biomass measurements based on Adenosine Triphosphate and direct counting techniques in a semi-solid agar column. *Revista de Ciencias Marinas*. 26(2):335-36.
- Fridovich, I. 1974. The biology of oxygen radicals. *Science* 201: 875-880.
- Holland, K.T., Knapp, J.S y Shoesmith, G. 1987. Anaerobic bacteria. Elsevier, Blackie, Glasgow, London. 206 p.
- Hansen, H.P., Grasshoff, K y Petersen J. 1980. *In-situ* registration of oxygen utilization at sediment water interfaces. *Marine Chemistry* 10:47-54.
- Lundgren, P. 2001. Katagnymene: Characterization of a novel marine diazotrophe. *J. of Phycol.* 37: 1052-1062.
- Morris, J.G.1984. Changes in oxygen tension and microbial metabolism of organic carbon. En Codd, G.A (ed). *Aspects of microbial metabolism and ecology*. Society for General Microbiology Academic Press. Londres, Nueva York. p 59-96.
- Pérez, S. y Torralba, A. 1997. La fijación del nitrógeno por los seres vivos. Seminario Fisiología Vegetal, 21.01. Facultad Biología Oviedo, España. 21 p. Pérez, S. y Torralba, A, 1997.197. Microaerophily. *Antoine van Leuwenhoek*. 45: 5-12.
- Reddy, A.T y Lodha, M. L. 1986. Nitrate-ammonification in groundnut *Rhizobium* strain 6050 grown microaerobically. *Biochem. Physiol. Pflanzen*. 44: 149-158.
- Reimers, C.E. 1989. Control of benthic fluxes by particulate supply. En Berger, W.H., V. S. Smetacek y G. Wefer (eds). *Productivity of the ocean: present and past*. Life Science Research. John Wiley and Sons. Chichester, Nueva York. p 217-233.



- Reis, V.M., Baldani, J.I., Baldani V.L y Doberiner, J. 2000. Biological dinitrogen fixation in Gramineae and palm trees. *Crit. Rev. Plant Sci.* 19: 227-247.
- Stephan, P.M., Oliveira, S. R. K., Martinez-Drets, G and Dobereiner, 1991. FEMS Microbiology Letters. 77: 67-72.
- Steppe, F. P y Paerl, W. H. 2002. Potential of N<sub>2</sub> fixation by sulfate-reducing bacteria in a marine intertidal microbial mat. *Aquatic Microbial Ecology.* 28:1-12.
- Ueda, T., Suga, Y., Yahiro, N y Matsuguchi, 1995. Remarkable N<sub>2</sub>-fixing bacterial diversity detected in rice roots by molecular evolutionary analysis of *nifH* gene sequences. *Appl. Environ. Microbiol.* 64: 1171-1197.
- Vargas, R y Novelo, E. 2003. Fijación de nitrógeno por cyanoprocarotas en la Reserva Ecológica del Edén, Q.R., México. *Estudios Mexicanos.* 19:2 285-289.
- Zehr, P.J., Mellon, M., Litaker, W., Steppe, T y Paerl, H. 1995. Diversity of heterotrophic nitrogen fixation genes in a marine Cyanobacterial mat. *Applied and Environmental Microbiology.* 61:7 2527-2532.
- Zengler, K. 1995. Cultivating the uncultured. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 92: 15681-15686.

## Capítulo II. LOS ÁCIDOS GRASOS COMO HERRAMIENTA TAXONÓMICA

### 2 Introducción

Los análisis lipídicos se constituyen como una alternativa metodológica para cuantificar y estudiar la estructura de las comunidades bacterianas tanto cultivables como no cultivables. Particularmente, la composición de los ácidos grasos presentes en las membranas celulares de las comunidades bacterianas son una herramienta para identificar grupos de géneros, además ayudan a determinar microorganismos específicos de ciertos ambientes (Fred y Findlay, 1993).

Thompson *et al.* (1993), se basaron en la composición de los ésteres metílicos de los ácidos grasos presentes en las membranas celulares como herramienta para determinar subgrupos de poblaciones bacterianas del género *Klebsiella*. De igual manera, existen una serie de investigaciones realizadas sobre la caracterización de las comunidades microbianas en sedimentos, utilizando el análisis de los fosfolípidos y ácidos grasos (Narasimmalu *et al.*, 1994).

Por otra parte, Sheridan *et al.* (1994) estudiaron la precisión con la que se interpreta el uso de los ésteres metílicos como modelos para el análisis de las comunidades bacterianas y describieron el cambio de éstos a partir de ciertas condiciones ambientales.

Poco se conoce acerca de los perfiles de ésteres metílicos de los lípidos de las membranas celulares en bacterias diazotrofas microaerófilas. En esta forma, no existen estudios comparativos para identificar la variabilidad en aislados procedentes de ecosistemas diferentes. Por lo tanto, este estudio tiene como finalidad identificar ácidos grasos que pudieran servir como biomarcadores para la diferenciación taxonómica de este grupo bacteriano, así como para detectar la presencia de aquellos difícilmente cultivables, en diferentes ecosistemas acuáticos. Para ello, se tomaron como referencia dos estándares de identificación, el Fattid Acid Metyl Ester (FAME) y Bacter Acid Metyl Ester (BAME).

Los resultados derivados de la utilización del estándar FAME como referencia para la identificación de los ésteres metílicos de las membranas celulares de los aislados bacterianos, se han incluido un manuscrito que será sometido a la revista Canadian Journal of Microbiology.

## 2.1 Materiales y métodos

**2.2 Procedencia de los aislados bacterianos.** Se delimitaron tres regiones de muestreo:

a) Lago de Xochimilco, ubicado en el sureste de la Ciudad de México entre los 99°9'41" y 99°2' W y los 19°17'35" N, a una altura de 2 500 msnm (Jiménez *et al.*, 1995); está constituido por canales alimentados por aguas de reuso de la ciudad y sus lodos tienen utilización agrícola en las áreas intercanales conocidas como "chinampas" (Juárez *et al.*, 2003).

b) La Laguna de Sontecomapan, situada en el Estado de Veracruz, entre los 10°30' y 18°34' N y 95°00' y 95°00' 04' W; tiene forma irregular y está conectada con el mar de manera permanente; tiene aproximadamente 8 km de ancho, con una profundidad promedio de 2 m (Reséndez, 1982).

c) Golfo de México, la zona en estudio está situada entre los 20°12' y 21°46' N y los 92°24' y 93°24' W (Salas de León *et al.*, 2004), con una salinidad superficial que varía de 34 a 36 ‰ durante el verano; las salinidades de 34 ‰ se encuentran en las desembocaduras de los ríos San Pedro y Grijalva (SW del Golfo de México) (Turcott, 1994). Las concentraciones de oxígeno disuelto varían de 3.5 mg l<sup>-1</sup> en el agua de fondo durante el verano, hasta 6 mg l<sup>-1</sup> en la zona occidental durante el invierno (Bessonov *et al.*, 1971).

**2.3 Toma de muestras.** Los sedimentos superficiales (0-1 mm de profundidad) de la Laguna de Sontecomapan (Estado de Veracruz) y de los canales de la zona chinampera del lago de Xochimilco, se obtuvieron con un nucleador manual de acrílico (5 cm d.e y 26 cm de largo). Del nucleador se tomaron, con una jeringa estéril sin punta, 2 cm<sup>3</sup> de sedimento, fueron depositados en un frasco estéril conteniendo 18 ml de gliceraldehído al 20% y se conservaron a -20°C hasta su procesamiento en laboratorio.

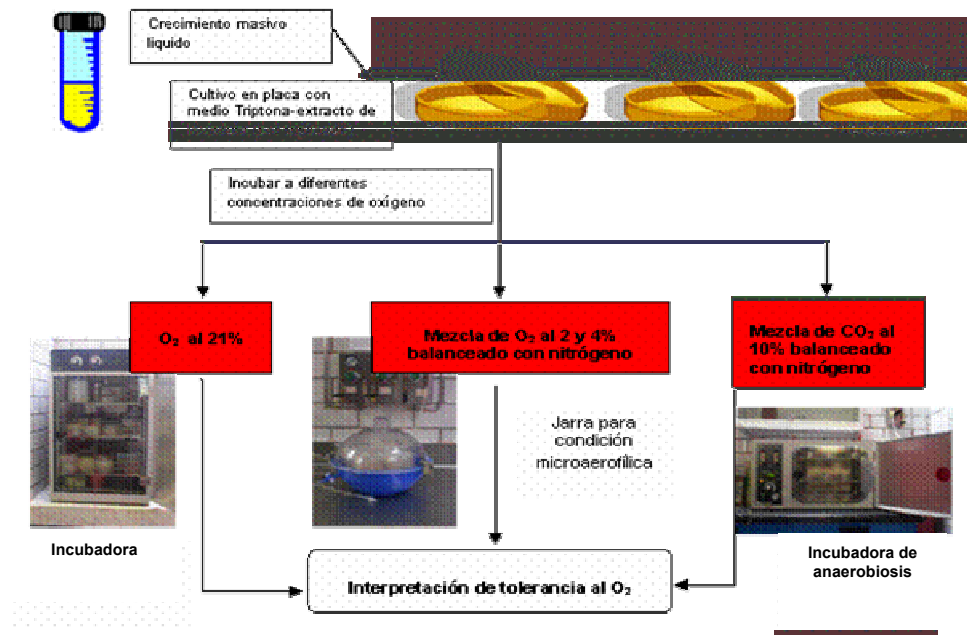
Las muestras de sedimentos costeros y oceánicos se tomaron con un draga de caja tipo Van Been a bordo del Buque Oceanográfico Justo Sierra (UNAM). Se tomó una submuestra de 2 cm<sup>3</sup> de la misma manera descrita anteriormente, evitando perturbar la zona de interfase agua-sedimento (Romero y Negrete, 2000).

**2.4 Purificación de los aislados bacterianos diazotrofos.** Las poblaciones bacterianas microaerófilas diazotrofas, fueron evidenciadas en un medio mineral semi sólido (2 g de agar l<sup>-1</sup>) sin fuentes de nitrógeno

En el caso de los aislados de origen marino la fuente de nitrógeno incluyó únicamente formas químicas presentes en el agua de mar artificial utilizada para la preparación del medio de cultivo (Ferrara-Guerrero *et al.*, 1993). Los anillos de crecimiento microaerófilico fueron aislados y resembrados de manera sucesiva en medio mineral líquido enriquecido con  $0.1 \text{ ml l}^{-1}$  de una mezcla de vitaminas de Balch (Balch *et al.*, 1979) y gasificado con una mezcla de 4%  $\text{O}_2$  y 96% de  $\text{N}_2$  (v/v), hasta su purificación.

Las cepas bacterianas utilizadas como referencia fueron *Azospirillum lipoferum* (DSM23391) y *Magnetospirillum magnetotacticum* (DSM23865).

**2.5 Pruebas de tolerancia a la presencia de oxígeno.** Para determinar la tolerancia de los aislados microbianos a la presencia de oxígeno, se incubaron los cultivos puros a diferentes presiones parciales saturación de oxígeno, 4%  $\text{O}_2/96\%$   $\text{N}_2$  (v:v) y anoxia (90%  $\text{CO}_2/10\%$   $\text{N}_2$ ) (v:v). Los detalles del proceso se muestran en la figura 3.



**Figura 3.** Proceso de tolerancia a la presencia de oxígeno molecular.

**2.6 Pruebas morfológicas y fisiológicas:** La caracterización de los aislados bacterianos microaerófilicos con potencialidad diazotrofo, fue

llevada a cabo considerando tres pruebas morfológicas (forma celular, movilidad, presencia de cuerpos cocoides) y ocho fisiológicas (respuesta a la tinción de Gram, formación de cápsulas, actividad catalasa y oxidasa, respiración de  $\text{NO}_3^-$  y sulfatos, oxidación y fermentación de glucosa) (Meynell y Meynell, 1979; Stanier *et al.*, 1996; Merck, 2000). Todas las pruebas se realizaron bajo atmósfera de baja oxigenación ( $\text{pO}_2$  4%  $\text{O}_2$ ), utilizando jarras para cultivos anaeróbicos (Bioxon), con manómetro incorporado.

**2.7 Determinación de ésteres metílicos de los ácidos grasos de las membranas celulares:** El tipo y concentración porcentual de los ésteres metílicos de los ácidos grasos presentes en las membranas celulares de los aislados bacterianos, fueron determinados con base en el método de cromatografía en fase gaseosa (Badings y Joung 1983; Fiindlay y Bobb 1993).

Para obtener un perfil más amplio de ácidos grasos se utilizaron dos estándares de referencia, el FAME (Fattid Acid Methyl Ester) de 31 componentes de ésteres metílicos de ácidos grasos SUPELCO y el BAM (Bacter Acid Methyl Ester) de 26 componentes (Pérez *et al.*, 1997; Díaz González *et al.*, 2002).

Para la extracción de los ácidos grasos, se realizaron cultivos masivos de cada uno de los aislados puros, por quintuplicado, en medio de cultivo triptona-extracto de levadura (Dunfield *et al.*, 1999), incubados en jarras de anaerobiosis en condiciones de baja oxigenación ( $\text{pO}_2$  4%).

Posteriormente, la biomasa bacteriana fue recuperada por lavado con 3 ml de una solución de formaldehído al 5% y centrifugada a 700 *g* durante 15 min a 4°C. El botón celular fue lavado dos veces con una solución de suero fisiológico (0.85% de NaCl). La biomasa obtenida fue liofilizada 3 h a un vacío de 7 kPa; antes de la liofilización la muestra se congeló durante 24 h a -70 °C.

Veinte ng de peso seco bacteriano fueron metilados con 0.1 ml de yoduro de metóxido de sodio 0.5 N y 0.9 ml de éter de petróleo nanogrado. Una alícuota de 1  $\mu\text{l}$  fue inyectada en un cromatógrafo de gases (Perkin Elmer Modelo Autosistem 9000) con detector de ionización de flama y una columna capilar de 100 m de longitud en sílica fundida con base de siloxano y carbonato de alta resistencia térmica (SEG HTS), con recubrimiento de aluminio y utilizando helio (4.6 flujo) como gas acarreador. Este mismo procedimiento fue utilizado para la identificación de ácidos grasos con los dos estándares (FAME y BAME).

**2.8 Análisis estadístico.** Los resultados obtenidos fueron analizados con el método multivariado de Cluster con base en la distancia euclidiana como algoritmo para la formación de grupos el método de varianza mínima de Ward (Pielou, 1984), con el programa Statistica® (Statsoft, 1999).

Para determinar la contribución de la varianza de los ácidos grasos (AG) en cada uno de los aislados con respecto al total de los mismos, se realizó un análisis de componentes principales basado en la diversidad de ésteres metílicos.

Una mayor precisión en la identificación de ácidos grasos característicos e identificación de las asociaciones de estos en cada una de las zonas de estudio, se realizó con base en el análisis de Olmstead Tukey (Sokal y Rohlf, 1995).

## 2.9 Resultados

**Pruebas de tolerancia a la presencia de oxígeno.** En los once aislados se identificaron dos metabolismos respiratorios; dos de ellos presentaron un metabolismo microaerobio estricto (S63 y GF73), en tanto que el resto de la colección exhibió un metabolismo respiratorio microaerofílico facultativo. La respuesta de tolerancia a diferentes  $pO_2$  se muestra en (tabla 1).

**Tabla 1.** Resultados de las pruebas de tolerancia al oxígeno realizado en aislados bacterianos provenientes de los tres ecosistemas estudiados.

Procedencia	Clave	21% O <sub>2</sub>	4%O/96%N <sub>2</sub>	10%N <sub>2</sub> /90% CO <sub>2</sub>
Lago de Xochimilco	X1	+	+	-
Lago de Xochimilco	X11	+	+	-
Lago de Xochimilco	X35	+	+	-
Laguna de Sontecomapan	S46	+	+	-
Laguna de Sontecomapan	S55	+	+	-
Laguna de Sontecomapan	S56	+	+	-
Laguna de Sontecomapan	S63	-	+	-
Golfo de México	GF67	+	+	-
Golfo de México	GF70	+	+	-
Golfo de México	GF73	-	+	-
Golfo de México	GF75	+	+	-

**Pruebas morfológicas.** El 100% de los aislados presentaron movilidad mediada por flagelos; el 45.4% exhibieron cápsula y el 34.4% cuerpos cocoides (Tabla 2).

**Respuestas fisiológicas.** El 72.7% de los aislados fueron Gram negativos. En ninguno de ellos se evidenció la presencia de citocromo oxidasa y por el contrario, el 100% presentaron actividad catalasa. Todos los aislados de origen marino, así como dos procedentes del Lago de Xochimilco presentaron la capacidad de respirar el nitrato, pero ninguno de ellos presentó la facultad de utilizar el sulfato como aceptor terminal de electrones (Tabla 2).

Finalmente, cuatro aislados presentaron la facultad de oxidar la glucosa, sólo uno fue incapaz de fermentarla,

**Tabla 2.** Características fisiológicas de los once aislados bacterianos estudiados

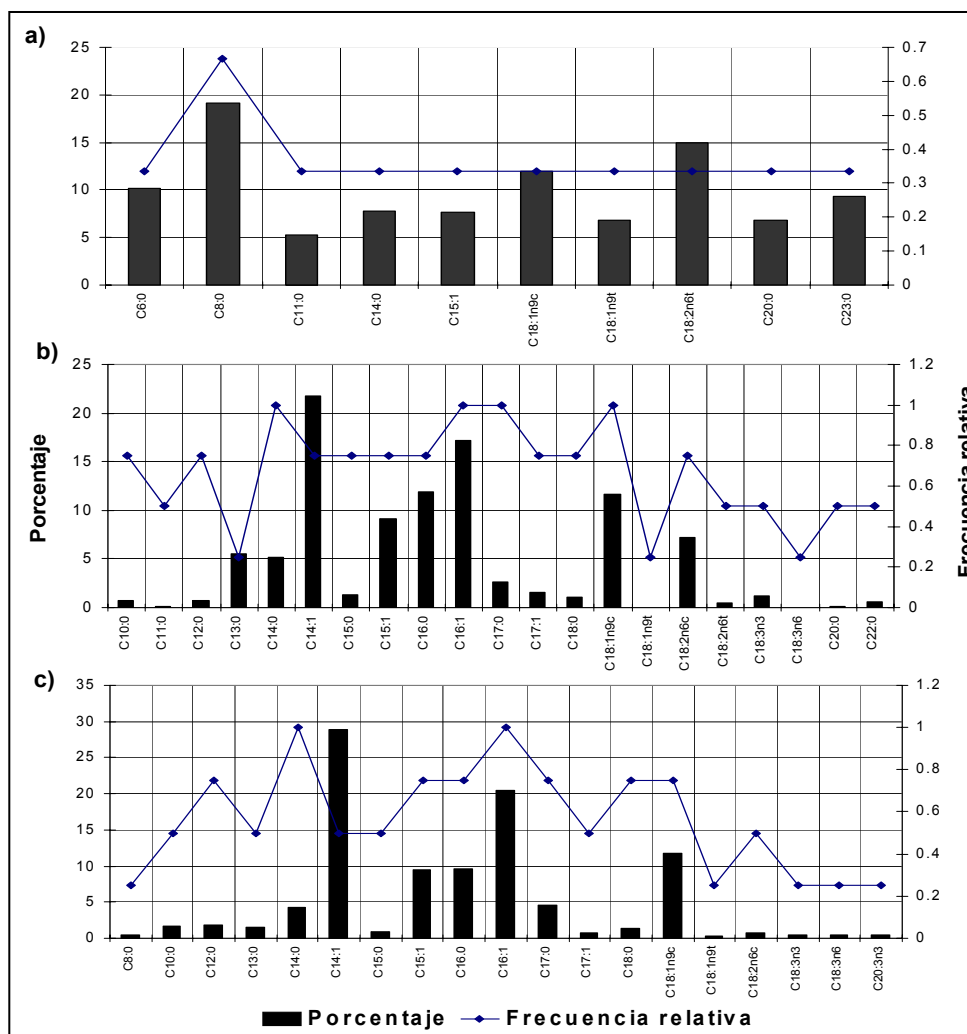
Pruebas fisiológicas	X1	X 11	X 35	S 46	S 55	S 56	S 63	GF 67	GF 70	GF 73	GF 75	Porcentaje
<b>Movilidad</b>	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	100
<b>Formación de cápsulas</b>	+	-	+	+	-	-	+	-	-	-	+	45.4
<b>Presencia de cuerpos cocoides</b>	-	-	-	+	-	+	+	-	-	+	-	36.4
<b>Gram -</b>	-	+	-	-	-	-	-	-	+	+	-	72.7
<b>Citocromo oxidasa</b>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0
<b>Catalasa</b>	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	100
<b>Respiración de nitratos</b>	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	90.9
<b>Respiración de sulfatos</b>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0
<b>Fermentación de glucosa</b>	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	90.9
<b>Oxidación de glucosa</b>	+	-	+	-	+	-	-	-	-	+	-	36.4

**Identificación de ácidos grasos FAME.** El análisis de ésteres metílicos de los ácidos grasos tomando como referencia el estándar FAME, puso de manifiesto la existencia de 25 tipos diferentes de AG en las membranas de las poblaciones bacterianas, procedentes de las tres áreas de estudio. La mayor variabilidad se observó en los aislados provenientes de la laguna de Sontecomapan (21), seguida por los procedentes del Golfo de México (11) y en último término los del lago de Xochimilco (Tabla 3).





Los porcentajes de concentración más bajos de ciertos tipos de AG se presentaron en aislados procedentes del Golfo de México; sólo el A C14:1 mostró una elevada concentración (superior al 25%), a diferencia del resto del conjunto que presentaron porcentajes inferiores al 4% (Figura 4). La diversidad de ésteres metílicos de los AG, así como su concentración porcentual en las tres zonas en estudio se muestran en la tabla 3.



**Figura 4.** Frecuencia relativa y concentración (% p/p) de los diferentes tipos de ésteres metílicos identificados en las comunidades bacterianas aisladas de sedimentos superficiales de: a) lago de Xochimilco, b) laguna de Sontecomapan y c) Golfo de México.

**Identificación de ácidos grasos BAME:** El análisis de ésteres metílicos en las membranas celulares tomando como referencia el estándar BAME puso de manifiesto la existencia de 15 tipos diferentes de AG en los aislados bacterianos procedentes de las tres regiones estudiadas. La mayor variabilidad se observó en los aislados provenientes de la laguna de Sontecomapan, Veracruz (12 tipos diferentes), los aislados de los sedimentos del lago de Xochimilco y la laguna de Sontecomapan presentaron solo nueve tipos (Tabla 4).

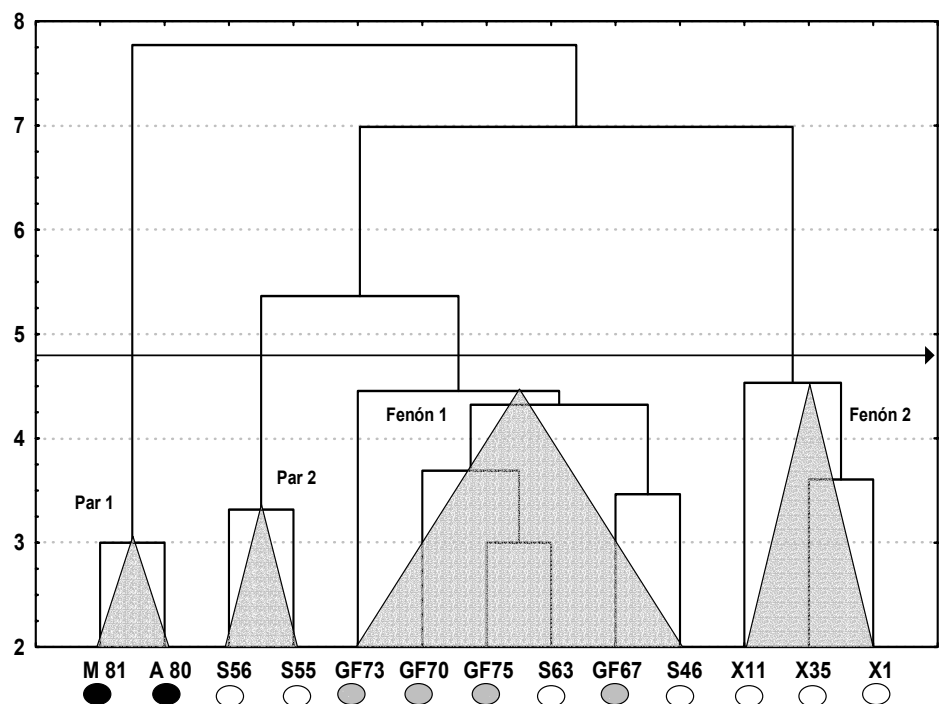
**Tabla 4.** Perfil de ácidos grasos obtenido por el análisis BAME y concentración porcentual en cada uno de los aislados bacterianos procedentes de las tres regiones en estudio y cepas de referencia.

	Tipo de ácido graso	X1	X11	X35	S46	S55	S56	S63	GF67	GF70	GF73	GF75	A	M
1	2-OH 10:0	-	-	-	-	-	0.17	-	-	-	-	-	0.07	0.07
2	3-OH 12:0	-	-	-	-	5.72	1.01	0.57	-	-	-	0.77	0.40	0.40
3	14:0	-	-	-	-	1.7	-	0.37	3.55	-	4.32	-	39.59	39.59
4	i-15:0	-	-	0.26	-	89.88	3.45	-	-	-	-	21.71	51.80	24.10
5	a-15:0	10.3	-	1.06	2.93	-	-	11.47	-	-	69.27	41.8	-	72.10
6	15:0	-	-	-	-	-	-	-	53.37	100	-	-	-	-
7	2-OH 14:0	60.7	100	0.20	97.07	-	81.32	3.4	-	-	-	-	5	5
8	3-OH 14:0	-	-	11.33	-	-	-	8	43.08	-	19.72	1.37	-	2.10
9	i-16:0	-	-	-	-	-	0.78	-	-	-	-	-	-	-
10	16:1 <sup>9</sup>	20.7	-	-	-	2.7	-	0.44	-	-	6.69	17.35	2.73	2.73
11	16:0	-	-	6.2	-	-	13.27	0.80	-	-	-	15.45	3.40	3.40
12	i-17:0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1.55	-	0.15
13	i-17:0 <sup>A</sup>	8.3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
14	17:0	-	-	6.22	-	-	-	12.32	-	-	-	-	-	-
15	18:2 <sup>9,12</sup>	-	-	74.73	-	-	-	62.63	-	-	-	-	-	-

**Análisis estadístico.** El análisis multivariado de Cluster comprendió los resultados de las variables morfológicas, fisiológicas y tipos AG /FAME) de los once aislados bacterianos, incluyendo las dos cepas de referencia (*M. lipoferum* y *M. magnetotacticum*). A una distancia euclidiana de 4.8, se identificaron dos fenones (y dos). El par 2 y fenón 1 agruparon a los aislados procedentes de la laguna de Sontecomapan en la cual (salinidad: 5 - 18 ‰) y del Golfo de México (salinidad: fluctúa 34-36 ‰) (Bessonov *et al.*, 1971).

Por el contrario, el fenón 2 estuvo constituido por aislados bacterianos provenientes de los sedimentos del lago de Xochimilco, que es un

ecosistema dulceacuícola. El par 1, quedó conformado por las cepas de referencia (*A. lipoferum* y *M. magnetotacticum*).

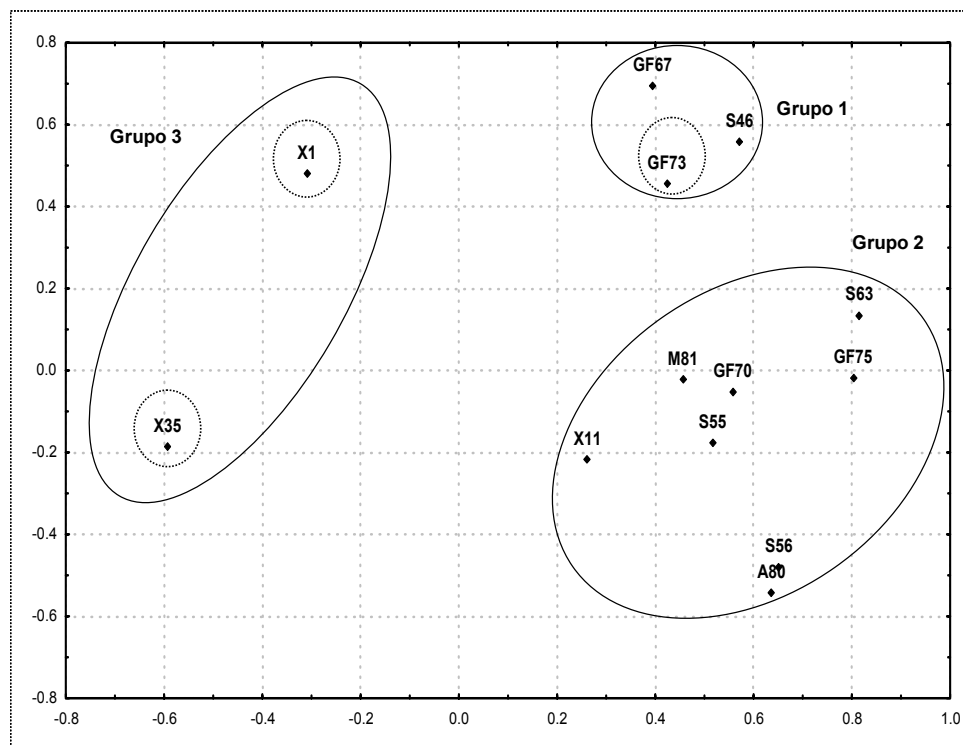


**Figura 5.** Dendrograma elaborado a partir de las diferentes pruebas morfológicas, fisiológicas y AG aplicadas a los 11 aislados bacterianos procedentes de las tres regiones de estudio. (X) Lago de Xochimilco, (S) laguna de Sontecomapan, (GF) Golfo de México, (M y A) cepas de referencia.

El análisis de componentes principales realizado con base en la diversidad de AG FAME arrojó tres grupos, determinados a partir de los AG característicos (presentes en aislados exclusivos de cierto ambiente) y por la diversidad de cada uno de ellos. Una mayor diversidad de AG se encontró en los aislados reunidos en el grupo 2, mismo que incluyó ocho de ellos (Figura 6). Los AG más representativos de este grupo fueron C12:0, C16:1 y C17:0 principalmente.

Por el contrario, los aislados bacterianos con menor diversidad de AG FAME y de origen dulceacuícola, se reunieron en el grupo 3 con solamente 10 tipos. Sin embargo, en estos dos aislados se encontraron presentes los dos AG considerados como característicos (C6:0, C23:0) ya que fueron exclusivos de las membranas bacterianas de agua dulce. Por otro lado,

grupo 1 presentó un perfil de AG semejante al del grupo 2, con particularidad de que el primero se alejó del resto debido a que presentó tipo C20:5n3, considerado como característico.



**Figura 6.** Diagrama de componentes principales basado en la diversidad de los ácidos grasos (FAME) presentes en las membranas celulares de los 11 aislados. Se pueden observar tres agrupaciones, los aislados bacterianos con perfiles característicos se señalan dentro de un círculo punteado.

## 2.1.0 Discusión

De acuerdo con las pruebas de tolerancia al oxígeno, la mayor parte de los miembros de la colección presentaron un metabolismo respiratorio aerobio o microaerofílico, debido a que se observó un desarrollo en un intervalo de concentración de oxígeno comprendido entre 21 y 4%, y aunque utilizan nitrato como aceptor terminal de electrones, no presentaron crecimiento en condiciones estrictas de anoxia.

De los 11 aislados, dos mostraron metabolismo respiratorio microaerofílico estricto (S63 y GF73) al crecer solamente en condiciones de baja oxigenación ( $pO_2$  4%); presentaron una citocromo oxidasa pero no catalasa, lo que las pone en desventaja ante los metabolitos tóxicos del  $O_2$  producidos durante la respiración aerobia estricta (Ferrara-Guerrero y Bianchi, 2000). Ambos aislados provienen de ecosistemas marinos y quedaron incluidos en el fenón 1 dentro del dendograma realizado.

Los resultados del análisis Cluster sugieren que la salinidad puede ser un factor determinante en la diversidad de la comunidad bacteriana microaerofílica con potencialidad de fijar el  $N_2$ , debido a que la mayoría de los aislados se agruparon de acuerdo con las diferentes regiones estudiadas (dulceacuícolas y marinas). Solamente el aislado S63 de los sedimentos lagunares, parecen tener un carácter ubicuo.

A pesar de que el par 1 (*A. lipoferum* y *M. magnetotacticum*) y 2 (S56 y S55) se ubicaron casi a la misma distancia euclidiana de 3.5 por presentar características fisiológicas y morfológicas semejantes, se agruparon de manera independiente debido a las diferencias en los perfiles de los ácidos grasos ésteres metílicos de los AG de sus membranas celulares; el par 2 presentó 28 tipos de AG y las cepas de referencia solamente 19. Los más representativos del par 1 son el C12:0, C14:0, C14:1 y C15; a las cepas de referencia les corresponde el C12:0, C18:0 y C18:1n9c.

Igualmente se observó que existen AG que se presentaron únicamente en las membranas de los aislados bacterianos de alguna de las regiones estudiadas; como es el caso de los AG C6:0 y C23:0 fueron exclusivos de los aislados bacterianos procedentes del Lago de Xochimilco (X1 y X35) mientras que el AG C20:5n3, originario del Golfo de México y sólo se mostró en el aislado GF73. En los aislados bacterianos procedentes de los sedimentos de la Laguna de Sontecomapan no se identificaron AG característicos ya que en su mayoría, presentaron perfiles semejantes.

En los aislados bacterianos de sedimentos de la laguna de Sontecomapan no se identificaron AG característicos; su mayoría el perfil fue semejante del Golfo de México.

De acuerdo con lo anterior y como lo proponen Fred y Findlay (1993) estos AG pueden servir como biomarcadores para identificar géneros bacterianos característicos de ambientes marinos y dulceacuícolas. Este tipo de análisis ha sido ampliamente utilizado para contribuir igualmente con la clasificación taxonómica y la filogenia bacteriana, y como lo reportan Piotrowska y Mroziak (2005), proveen una poderosa herramienta discriminatoria para estudios de la variación estructural de comunidades bacterianas en ecosistemas sedimentarios.

Esta misma herramienta fue utilizada por Zhadanov *et al.* (2006), quienes describieron marcadas diferencias en los AG de las cepas de *Pseudomonas aurantiaca*, teniendo como perfil los tipos C16:0, C16:1 y C18:1. En la presente investigación se identificaron los dos primeros en los aislados de origen marino (laguna de Sontecomapan y Golfo de México), mismos que fueron mayoritarios.

Los resultados reportados aquí, también coinciden con los obtenidos por Frolova *et al.* (2005), Jaisong *et al.* (2006) y con los de Gordon *et al.* (2006) quienes reportaron los AG C13:1, C14:0, C15:0, C15:1, C16:0, C16:1 y C17:0 como característicos de microorganismos de sedimentos marinos y de protobacterias. Los AG C15:0 y C15:1 fueron reportados por Gordon *et al.*, 2006 como biomarcadores del género *Desulfococcus* provenientes de sedimentos marinos. Estos mismos ácidos orgánicos fueron identificados solamente en aislados de origen salobre y marino pero no en los provenientes del lago de Xochimilco.

Como se aprecia en el análisis de componentes principales, la formación de grupos estuvo determinada por la variedad de AG, lo que confirma que éstos pueden diferenciar marcadamente un conjunto de aislados, como en el caso de los aislados X1 y X35 pertenecientes al grupo 3, el cual contiene dos AG característicos (C6:0 y C23:0); esto puede ser la causa de que estos aislados se encuentren más alejados del origen y por lo tanto mayor es la diferencia con el resto de los aislados.

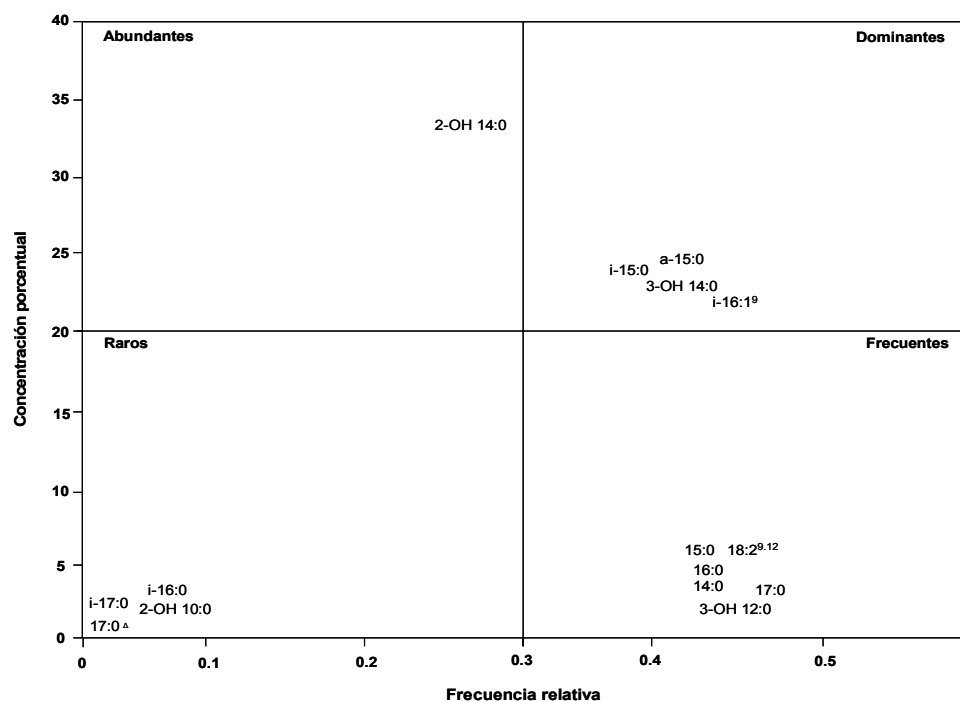
Por otra parte, las cepas utilizadas como referencia (*A. lipoferum* y *A. magnetotacticum*) se encontraron reunidas en el grupo 2 junto con el aislado X11, que comparten los AG C20:0, C18:1n9t y C15:1, por lo que es posible que este aislado procedente de Xochimilco sea semejante en la composición química de sus membranas celulares a las cepas utilizadas

de referencia, aunque sus características morfológicas y fisiológicas presenten diferencias.

Los perfiles de AG identificados con el estándar BAME mostraron también perfiles que caracterizan a los aislados, principalmente de aquellos provenientes del Golfo de México; tal es el caso de los 2-OH 10:0, 3-OH 12:0, 14:0 y 15:0. Dichos AG no se presentaron en los aislados de origen dulceacuícola y salobre por lo que pueden ser indicadores de la presencia de diazotrofos microaerofílicos marinos.

Un análisis de Tukey permitió identificar a los tipos *i*-16:0, *i*17:0, *i*17:0<sup>Δ</sup> y 2-OH 10:0 como AG (BAME) raros (Figura 7); ello debido a que estos tipos solo fueron detectados en alguno de los aislados y no en el resto del conjunto (Tabla 4), es decir, presentaron baja frecuencia en la colección.

La clasificación arrojada por el análisis de Tukey se muestra en la Tabla 4. Sólo se identificó un AG abundante (2-OH 14:0), esto como consecuencia de que se presenta en la mayoría de los aislados.



**Figura 7.** Diagrama del análisis de Tukey el cual muestra la clasificación de AG (BAME) a partir de su frecuencia relativa y concentración porcentual.



**Tabla 5.** Clasificación de los AG BAME y aislados bacterianos en los que fueron identificados como constituyentes de sus membranas celulares.

AG abundantes	Clave del aislado que lo presenta	AG dominantes	Clave del aislado que lo presenta	AG frecuentes	Clave del aislado que lo presenta	AG raros	Clave del aislado que lo presenta
2-OH 14:0	X1, X11, X35, S46, S56, S63	a-15:0	X1, X35, S46, S63, GF73, GF75	14:0	S55, S63, GF67, GF73	i-16:0	S56
		i-15:0	X35, S55, S56, GF75	15:0	GF67, GF70	2-OH 10:0	S56
		3-OH 14:0	X35, S63, GF67, GF73, GF75	16:0	X35, S56, S63, GF75	i-17:0	GF75
		16:1 <sup>9</sup>	X1, S55, S63, GF73, GF75	3-OH 12:0	S55, S56, S63, GF75	i-17:0 <sup>A</sup>	X1
				18:2 <sup>9,12</sup>	X35, S63		
				17:0	X35, S63		

En general y de acuerdo con los resultados arrojados con los análisis de los AG FAME y BAME de las membranas celulares bacterianas, los aislados marinos presentaron ésteres metílicos diferentes a los de origen dulceacuícola; el perfil de ácidos grasos FAME de los aislados de origen marino estuvo caracterizado por los C10:0, C12:0, C13:0, C14:1, C15:0, C16:0, C:16:1, C17:0, C17:1, C18:0, C18:3n3, C18:2n6c, C18:3n, C20:5n3; en tanto, en los aislados de origen dulceacuícola solamente se identificaron el C6:0 y C23:0. El perfil de AG BAME particular de los aislados marinos estuvo constituido por los tipos OH 10:0, 3-OH 12:0, 14:0 y 15:

Se puede concluir que el análisis de los perfiles de ésteres metílicos de los AG de las membranas celulares, es una buena herramienta para identificar las comunidades bacterianas presentes en diferentes ecosistemas acuáticos, tanto de agua dulce como marina, así como para identificar taxonómicamente, géneros y especies bacterianas *in vitro*.

## Literatura citada

- Badings, T.F y Joung, C. 1983. Glass capillary gas chromatography of fatty acid methyl esters. A study of condition for the quantitative analysis of short and long-chain fatty acid in lipid. *Journal Chromatography* 279:493-506.
- Balch, W., Foy, G.E., Magrum, L.J. y Wolfe B.S. 1979. Metanogen reevaluation of a unique biological group. *Microbiological* 43: 260-293.
- Bessonov, N., Elizaron, A y González O. 1971. Resultados de las investigaciones y Cubano-Soviéticas en el Banco de Campeche. Coloquio sobre Investigaciones y Recursos del Mar Caribe y Regiones Adyacentes. UNESCO-FAO, París. pp 53-60.
- Díaz- González, G. Gutiérrez, R. Pérez, N. Vega y León, S. Gonzáles, M. Prado, G. Urbán, G. Ramírez, A y Pinto M. 2002. Detección de adulteraciones en la grasa de leche pasteurizada mexicana. *Revista de Salud Animal* 24: 54-59.
- Dunfield, K.E., Xavier, L.J.C y Germida, J.J. 1999. Identification of *Rhizobium leguminosarum* and *Rhizobium* sp. (Cicer) strains using a custom Fatty Acid Methyl Ester (FAME) profile library. *J. Appl. Microbiol* 86: 78-86
- Ferrara Guerrero M.J., Marty D.G y Bianchi A. 1993. Isolation and enumeration of anaerobic and microaerophilic bacteria in aquatic habitats. p. 9-19. En Kemp P.F, B.F. Sherr, E.B. Sherr y J.J. Cole (eds). *Handbook of Methods in Aquatic Microbial Ecology*. Elsevier, Lewis Publishers, Miami.
- Ferrara-Guerrero, M.J. y A, Bianchi. 2000. Bacterial microaerophilic biomass measurements based on Adenosine Triphosphate and direct counting techniques in a semi-solid agar column. *Revista de Ciencias Marinas* 26(2):335-36.
- Fred, C.D. y Findlay, R.H. 1993. Analysis of microbial lipids to determine biomass and detect the response of sedimentary microorganisms to disturbance. *Lewis Publisher*, Nueva York. 347 pp.
- Frolova, G. M., Pavel, K.K., Shparteeva, A.A., Nedashkovskaya O.

- Gorshkova, N.M., Ivanova, Gorshkova & Mikhailov, V.V. 2005. Lipid composition of novel *Shewanella* species isolated from Fe-rich Eastern Seas. *Microbiology* 41: 6 664-669.
- Findlay H.R y Bobbs C.F. 1993. Analysis of microbial lipids to determine biomass and detect the response of sedimentary microorganism to disturbance. p. 347-357. *En* Kemp P.F, Sherr B.F, Sherr E.B y Cloern J.J (eds.) *Handbook of Methods in Aquatic Microbial Ecology*. Lewis Publishers, Miami.
- Gordon W., Lynsey C., Watt J.R., Jhon C.F., Richard P.E., Jhon R.P. y Andrew J.W. 2006. A comparison of stable isotope probing of DNA and an aphispholipid fatty acids to study prokaryotic functional diversity in sulfate-reducing marine sediment enrichment slurries. *Enviromental Microbiology* 8:9 1575-1589.
- Jaison F., Arankawa S., Chicaiki, K & Stefan S. 2006. Microbial diversity in cold-seep sediments in Sagami Bay, Japan, as determined by 16S rRNA gene and lipid analyses. *FEMS Microbiology Letters* 57: 423-441.
- Jiménez, I. Ortiz, R. Arco, R & Cabrera, E. 1995. Evaluación química preliminar en los suelos chinamperos de Xochimilco y su posible repercusión en la contaminación de las hortalizas de la zona. Delegación Xochimilco. Segundo Seminario Internacional de Investigaciones de Xochimilco, México, D.F.
- Juárez, F. Silva, S y Cifuentes, G. 2003. Microbiological indicator of water quality in the Xochimilco canals, México City. *Salud Pública de México* 45: 389-395.
- Merck. 2000. *Microbiology manual*. 4a. ed. Frankfurt am Main. 189 p.
- Meynell, G.G y Meynell, E. 1979. Theory and practice in experimental bacteriology. 2a. ed. Cambridge University Press, Londres. 347 pp.
- Narasimmalu, R., Osamu, M., Yoshicuni, U y Usio, S. 1999. Characterization of microbial community structure in the surface sediment of Osaka Bay, Japan, by phospholipids fatty acid analysis. *Appl. Environm. Microbio* 60: (1) 248-257.
- Pérez, F., Díaz, G., Prado, F., Gutiérrez, T., González, L y Acacia, R. 1999. *Manual de técnicas de análisis por cromatografía de gas -líquida para la determinación de ácidos grasos, triglicéridos y esterole*

Laboratorio de Lácteos, Departamento de Producción Agrícola Animal, Universidad Autónoma Metropolitana-Xochimilco, México D. F. pp 65.

Piotrowska, Z.S y Mrozik, A. 2005. Signature lipid biomarker (SLB) Analysis in determining changes in community structure of soil microorganisms. *Pub. J. Enviro. Studies* 12: 669-675.

Pielou, E.C. 1984. *The interpretation of ecological data*. Wiley-Interscience, Nueva York, 254 pp.

Piotrowska, Z.S y Mrozik A, 2005, Signature lipid biomarker (SLB) Analysis in determining changes in community structure of soil microorganisms. *Publicher Journal Enviroment Studies*, 12: 669-675.

Reséndez, M. 1982. Hidrobiología e ictiofauna de la Laguna de Sontecomapan Veracruz, México. *An. Inst. Biol. UNAM*, México 53:385-417.

Romero, J.J y Negrete R. 2000. Muestreo microbiológico. p. 189-200. *En: Granados Barba, V. Solis-Weiss y R. Bernal-Ramírez (eds) Métodos de muestreo en la investigación oceanográfica*. Posgrado en Ciencias del Mar y Limnología, UNAM, México, D.F

Salas de León, D. Montreal-Gómez, A. Signoret, M y Aldeco J. 2000. Anticyclonic-cyclonic eddies and their impact on near-surface chlorophyll stocks and oxygen supersaturation over the Campeche Canyon, Gulf of Mexico. *J. Geophysical Res.* 109: C05012-C05029.

Sheridan, K.H, Helen, G., David, A.O., Larry, J.F y Michael, J.K, 1999. Accuracy, reproducibility, and interpretation of fatty acid methyl ester profiles of model bacterial communities. *Applied Environmental Microbiolog* 60: 2483-2493.

Sokal, R.R. y Rohlf, F.J. 1995. *Biometry*. W. F. Freeman. New York. 887 pp.

Stanier, R.Y., Palleroni, N.J y Doudoroff, M. 1996. The aerobic pseudomonads, a taxonomy study. *J. Gen. Microbiol.* 43:159-271.

Statsoft, 1999. *Statistica for Windows 99*. Tulsa.

- Thompson, I.P., Mark, J.B., Richard, J.E y Kevin, J.P. 1993. Subgrouping of bacterial populations by cellular fatty acid composition. *Scientific Data Direct* 102: 75-84
- Turcott, V. 1994. Caracterización de la zona de estudio. p. 5-15. *Estudio de la Productividad planctónica en aguas del Golfo de México y Mar Caribe Noroccidental*. 1º Informe Conacyt (julio-agosto 1994). México.
- Zhadanov R.I., Shmyrina A.S., Zarubina T.V., Graus A y Lorenz W. 2000. Fatty acid profiles of DNA-Buoyed a whole cell lipids *Pseudomonas aurantiaca* drastically differ. *Doklady Biochemistry and Biophysics* 410: (4) 548-552.

## Capítulo III. TASAS DE FIJACIÓN DE NITRÓGENO, ACTIVIDAD HETEROTRÓFA Y CARACTERIZACIÓN MOLECULAR.

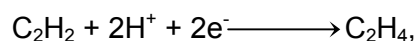
### 3. Introducción

La productividad en los sistemas acuáticos está controlada por los ciclos biogeoquímicos, los cuales delimitan el intercambio de compuestos incluyendo las rutas de intercambio de dióxido de carbono, entre los sistemas acuáticos y la atmósfera. La fijación de carbono es limitada por la disponibilidad de nutrientes incluyendo el nitrógeno, fósforo y hierro; en el agua el nitrógeno se encuentra presente en elevadas concentraciones en forma gaseosa y sólo puede ser utilizado por algunos microorganismos con capacidad biológica de fijarlo y reducirlo hasta amoníaco (Zehr, *et al.* 1999). Es reconocido que el proceso de la fijación de nitrógeno molecular es realizada por microorganismos diazotrofos (Lipschultz y Owens, 1996).

En los sistemas acuáticos, el potencial biológico de la fijación de nitrógeno ayuda a satisfacer la demanda de compuestos nitrogenados que son elementos imprescindibles para el metabolismo de los productores primarios y secundarios

En el suelo, el ciclo del nitrógeno, así como la asimilación, dependen de factores como son el tipo de suelo, de plantas, de la cantidad y calidad de materia orgánica y presencia de compuestos orgánicos e inorgánicos asimilables (Raynaud *et al.*, 2006); por ello, es importante considerar el estudio de la capacidad que tienen los microorganismos para degradar compuestos orgánicos e inorgánicos, lo que proporcionaría un diagnóstico previo sobre la actividad biológica presente en el medio.

La nitrogenasa es una enzima que se presenta en los microorganismos fijadores de nitrógeno; ésta cataliza biológicamente la reducción del N<sub>2</sub> hasta amoníaco, está conformada por dos proteínas conservadas: hierro (codificada por el gen *nifH*) y el hierro-molibdeno (codificada por los genes *nifD* y *nifK*) (Young, 1992). Una de las formas indirectas de evaluar la fijación biológica de nitrógeno es a través del ensayo de la reducción de acetileno a etileno (ARA), ilustrado en la siguiente reacción:



La cual es semejante a la reacción de la fijación biológica de nitrógeno, por lo que se infiere que la cantidad de acetileno reducido es proporcional al nitrógeno fijado (Capone, 1993).

El estudio e identificación de organismos diazotrofos puede llevarse a cabo por medio de estrategias moleculares, el gen 16S rDNA es la macromolécula más ampliamente utilizada en estudios de filogenia y taxonomía bacteriana, pues refleja la distancia evolutiva entre los microorganismos, así como sus relaciones filogenéticas, lo que crea un marco apropiado para su clasificación e identificación (Neefs, *et al.*, 1990). A este respecto estudiaron la diversidad microbiana existente en los microorganismos procedentes de océanos mediante secuenciación del gen 16S rDNA, identificando grupos genotípicamente diferentes. Por último, Wolfgang *et al.* (2005) realizaron comparaciones genómicas de bacterias diazotrofas empleando subunidades del 16S rDNA.

Otras investigaciones moleculares de organismos diazotrofos están basadas en los perfiles de restricción y secuenciación del gen 16S, este método resulta altamente eficiente para estudios de diversidad genética entre microorganismos (Church *et al.*, 2005).

El gen *nifH* es un segmento del regulón *nif* que sólo se presenta en los microorganismos fijadores de nitrógeno; además es una región conservada que presenta elevada divergencia con otras regiones, por lo que ha sido utilizado para determinar si un microorganismo es diazotrofo o no; también se ha utilizado para monitorear la presencia de organismos diazotrofos en cultivos puros (Marin *et al.*, 2003).

Existen diferentes estudios acerca de la fijación de nitrógeno mediada por microorganismos, sin embargo, en el caso específico de diazotrofos microaerobios bentónicos la información es muy limitada, particularmente en lo que se refiere a la comparación del potencial fijador de nitrógeno. En este capítulo abordaremos el análisis fisiológico, bioquímico, la capacidad de fijar el N<sub>2</sub>, así como la secuenciación del segmento 16rDNA y amplificación del gen *nifH* de los aislados procedentes de tres ecosistemas con características físicas y químicas diferentes (Golfo de México, laguna de Sontecomapan, Veracruz y lago de Xochimilco).

### 3.1 Materiales y métodos

**3.2 Tolerancia a diferentes concentraciones de salinidad.** Los aislados bacterianos fueron cultivados por triplicado en viales de 5 ml conteniendo 4 ml de medio líquido SA 500 a concentraciones de 0, 20, 40 y 60 ppm de NaCl; los cuales fueron incubados durante 8 días en jarras herméticas (Bioxon) en condiciones microaerobias (4% O<sub>2</sub>/96% N<sub>2</sub>) (Ferrara-Guerrero y Bianchi, 1993). El crecimiento bacteriano fue determinado a una densidad óptica de 560 nm en un espectrofotómetro Shimadzu UV-1601.

**3.3 Utilización de fuentes de carbono.** La evidencia de utilización de diferentes sustratos orgánicos como única fuente de carbono y energía se realizó de acuerdo con lo recomendado por Stainer *et al.* (1976). Los aislados se hicieron crecer en frascos tipo penicilina de 60 ml conteniendo medio de cultivo SA 500 y gasificado con una mezcla de gases de 4% O<sub>2</sub> balanceado con N<sub>2</sub>. Las diferentes fuentes de carbono (Tabla 6) se agregaron al medio de cultivo a razón de 1 g l<sup>-1</sup> ó 2 g l<sup>-1</sup> en el caso de los azúcares. Posteriormente, se incubaron a temperatura ambiente con agitación de 190 rpm. El crecimiento celular fue cuantificado por espectrofotometría a una densidad óptica de 650 nm.

**Tabla 6.** Familias químicas utilizadas como única fuente de carbono y energía durante las pruebas bioquímicas realizadas a los 11 aislados bacterianos microaerobios.

Aminoácidos	Azúcares	Ácidos orgánicos	Ácidos grasos	Alcoholes
Glicina	Arabinosa	Malonato	Acetato	Manitol
Serina	Ribosa	Succinato	Propionato	Sorbitol
Glutamato	Glucosa	Furamato	Capronato	Glicerol
Prolina	Sacarosa	Adipato		
Triptofano	Almidón	Lactato		
Arginina	Gluconato	Glicolato		
Ornitina	Glucosamina	Citrato		
Alanina				
Aspartato				
Metionina				
Bezoato				

Se determinó el índice medio de utilización de compuestos orgánicos (IMI) el cual indica la proporción de cepas que participan en el metabolismo de los sustratos (Ferrara-Guerrero, 2003) utilizando la siguiente fórmula:



$$IMU = \frac{\sum P}{N}$$

En donde: P= porcentaje de utilización de cada uno de los sustratos.

N= número total de sustratos probados de cada familia química

**3.4 Producción de exoenzimas.** Para conocer la capacidad heterotrófica de cada una de las cepas, se probó su potencialidad para producir och exoenzimas que les permitan hidrolizar sustratos orgánicos de alto peso molecular. Las pruebas fueron realizadas en medios de cultivo selectivos en placa (Lányi, 1987). Las exoenzimas estudiadas se enlistan en la continuación:

- ADNasas
- Proteasas
- Fosfatasas
- Esculinasas
- Lecitinasas
- Twenasas
- Amilasas
- Celuasas

Los cultivos se realizaron por triplicado y fueron incubados a 30°C a una atmósfera de 4% O<sub>2</sub> balanceado con N<sub>2</sub> durante siete días.

La respuesta a los diferentes sustratos fue determinada mediante el índice medio de expresión exoenzimática (IME), el cual corresponde a la distribución de frecuencias de expresión y potencialidad enzimática para un sustrato (Ferrara-Guerreo, 2003). Con la aplicación de la siguiente fórmula:

$$IME = \frac{\sum RP}{Ne}$$

En donde: RP= frecuencia de respuestas positivas de la producción de exoenzimas por prueba.

Ne= número de exoenzimas probadas.

### 3.5 Prueba de actividad de la nitrogenasa *in vitro*

La actividad de la nitrogenasa fue evaluada a través del método de reducción del acetileno (ARA) (Capone, 1993), en viales tipo penicilina de 4

60 ml conteniendo 20 ml de medio de cultivo SA500 líquido, en los que se agregó un inóculo de 2 ml del cultivo bacteriano en fase de crecimiento exponencial ( $\approx 10^7$  cel ml<sup>-1</sup>). Posteriormente se retiró el 10% del volumen del espacio gaseoso con una jeringa estéril gasificada con N<sub>2</sub> y se inyectó el mismo volumen de acetileno para obtener 10 kPa.

Los cultivos fueron incubados a temperatura ambiente durante 36 h y con agitación a 190 rpm. Cada 12 h se tomó una muestra de 10 ml de la fase gaseosa, que fue almacenada en un tubo vacutainer sin conservadores.

El etileno (C<sub>2</sub>H<sub>4</sub>) fue analizado por cromatografía de gases para calcular los nM producidos (h ml<sup>-1</sup>) (Capone, 1993), con un cromatógrafo Shimadzu GC-8A con detector de ionización de flama acoplado a un integrador Spectraphysic SP4290, con las siguientes características:

T °C inyector/detector	150°C
T °C columna	50°C
Presión gas portador	1.2 kg cm <sup>-2</sup>
Columna Porapak	N 80/100 int 1/8"55

Los cálculos de producción de etileno se hicieron con base en la siguiente fórmula:

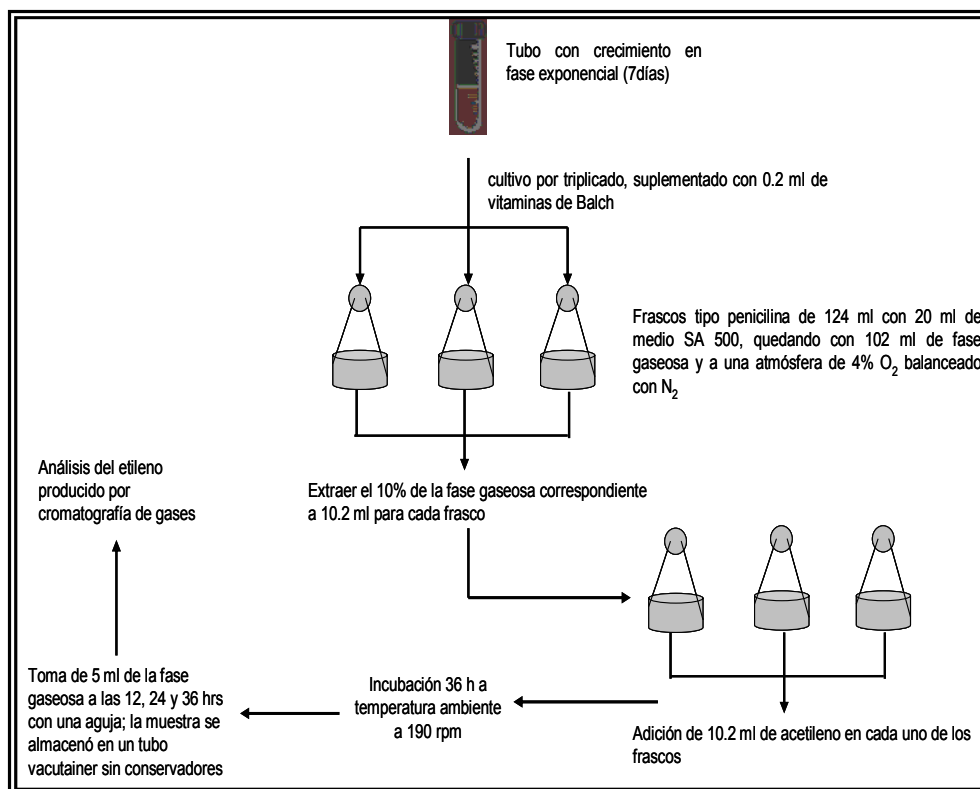
$$M = \frac{P(EP)}{Vem} Vm \times t \times PS$$

Donde:

- M= Valor integrado correspondiente al pico de etileno de la muestra.
- P= Valor integrado correspondiente al pico patrón de etileno.
- EP= Concentración de etileno del patrón inyectado.
- Vem= Volumen del vial utilizado (40 ml).
- Vm= Volumen de la muestra inyectada en el cromatógrafo (0.5 ml).
- t= el tiempo de incubación expresado en horas (0.5 h).
- P.S.= Valor del peso seco en miligramos, de los 10 ml de muestra.

El proceso del bioensayo se ilustra en la siguiente figura.

**Figura 8.** Diagrama de flujo para determinar la actividad de la nitrogenasa *in vitro*



**3.6 Obtención de biomasa bacteriana para el análisis molecular del segmento 16S rDNA.** Se tomó una alícuota de 0.3 ml a partir de un cultivo líquido en fase exponencial de crecimiento, la cual fue inoculada en medio SA 500 sólido (Ferrara-Guerrero 1990), y enriquecido con 10 ml de vitaminas de Balch 10 veces concentrado (Balch, 1979), por quintuplicado. Los cultivos fueron incubados en jarras herméticas (OXOID) en condiciones microaerobias (4% O<sub>2</sub> balanceado con N<sub>2</sub>) durante siete días a 30°C. Posteriormente, las cajas fueron lavadas con agua deionizada estéril y filtrada a través de una membrana de celulosa con un poro de 0.2 µm; suspensión resultante fue centrifugada en tubos estériles de 50 ml a 450 rpm durante 15 min y a una temperatura de 4°C.

**3.7 Extracción y purificación de DNA genómico.** La extracción de DNA genómico se realizó de acuerdo a lo establecido por el Short Protocol (1999); el proceso de la extracción se describe a continuación:

#### Reactivos:

- Amortiguador TE.
- Dodecil sulfato de sodio al 10% p/v.
- Proteinasa K 20 mg ml<sup>-1</sup>.
- NaCl. 5 M
- Fenol/cloroformo/alcohol isoamílico (25:24:1).
- Isopropanol.
- Etanol al 70%.

#### Procedimiento:

1. Lavado de las cajas con crecimiento bacteriano y centrifugación en tubos de 50 ml a 4500 rpm durante 5 min a 4°C.
2. eliminación del sobrenadante y transferencia de la biomasa precipitada en un tubo de 1.5 ml.
3. Adición de 350 µl de amortiguador TE.
4. Adición al mismo tubo de 30 µl de SDS al 10% y 20 µl de proteinasa k 3mg/ml.
5. Agitación en vórtex.
6. Incubación 1 h a 37°C.
7. Adición al vial de un volumen 1:1 de fenol/cloroformo/alcohol isoamílico.
8. Mezclado y centrifugación a 5000 rpm durante 5 min a 4°C.
9. Transferencia del sobrenadante a un vial limpio (evitar remover la interfase).
10. Adición de 300 µl de fenol/cloroformo/alcohol isoamílico y agitar en el vórtex.
11. Centrifugación a 16000 rpm durante 7 min a 4°C
12. Separación de la fase superior acuosa y depósito de la muestra en un vial limpio.
13. Adición de 2 vol de etanol absoluto y 0.5 vol de acetato de amonio 7.5 M y mezclar con la mano.
14. Centrifugación a 13000 rpm durante 5 min a 4°C y agregar 1 ml de etanol al 70%
15. Centrifugación a 13000 rpm durante 5 min a 4°C
16. Eliminación del sobrenadante y secado del botón a 37°C.
17. Resuspensión en 100 µl de amortiguador TE.

**3.8 Cuantificación de DNA genómico.** El DNA purificado fue cuantificado por espectrofotometría a una longitud de onda de 260 y 280 nm, en donde el valor de la relación A<sub>260</sub>/A<sub>280</sub> es alrededor de 1.8, la cuantificación se realizó a partir de la siguiente fórmula:

$$\text{DNA} = \frac{A_{260}(160)(50)}{1000}$$

Donde: A260= Absorbancia registrada a 260 nm.

160= Factor de dilución.

50= Equivalencia de absorbancia a una unidad de DNA.

1000= Valor para dar  $\mu\text{l}^{-1}$

**3.9 Amplificación del segmento 16S rDNA por PCR.** La amplificación del gen ribosomal 16S rDNA por PCR se realizó de acuerdo a lo establecido por Laguerre *et al.* (1994), utilizando los iniciadores rD1 y fD1, cuya secuencia se muestra a continuación:

Iniciador	Secuencia	Número del iniciador en Invitrogen	Concentración final
rD1	(5'-3'): AAGGAGGTGATCCAGCC	59270075	10 PM $\mu\text{l}^{-1}$
fD1	(5'-3'): AGAGTTTGATCCTGGCTCAG	59270109	10 PM $\mu\text{l}^{-1}$

Para una reacción de 100  $\mu\text{l}$  de amplificación por PCR se utilizaron los siguientes reactivos.

- **DNA** ..... 50  $\mu\text{g}$
- **Iniciador rD1** ..... 0.1  $\mu\text{M}$
- **Iniciador fD1** ..... 0.1  $\mu\text{M}$
- **Amortiguador** 10 X
- **dNTPs** ..... 20  $\mu\text{M}$
- **MgCl:** ..... 1.5 mM
- **Taq pol** ..... 2.5 U

Las condiciones de amplificación del segmento 16S se muestran en la siguiente tabla.

**Tabla 7.** Condiciones de amplificación del segmento 16S de los 11 aislados bacterianos microaerobios bentónicos estudiados.

	Temperatura (°C)	Tiempo (min)	Ciclos
<b>Desnaturalización inicial</b>	95	5	1
<b>Desnaturalización</b>	94	1	35
<b>Alineación</b>	55	1	35
<b>Extensión</b>	72	2	35
<b>Extensión final</b>	72	3	1

Los productos de la PCR (1500 pb) fueron visualizados en geles de agarosa al 1.2% y teñidos con 11  $\mu\text{l}$  de solución de bromuro de etidio ( $1 \mu\text{g} \mu\text{l}^{-1}$ ), tomando como referencia el marcador GeneRuler DNA ladder con 10,000 pb (Fermentas). Las imágenes fueron registradas en un fotodocumentador BIORAD Gel Doc XR.

**3.1.0 Amplificación del gen *nifH*.** Para esto se emplearon dos estrategias de amplificación del gen *nifH* basándose en lo establecido por Valdés *et al.* (2005). En el primer paso se amplificó un segmento de 1.2 kb el cual comprende el fragmento completo del gen *nifH* y la región de espacio intergenético en el extremo 5' del gen *nifD*. Para la amplificación de este segmento se utilizaron los iniciadores IGK y NDR-1 cuya secuencia se muestra a continuación:

Iniciador	Secuencia	Número de iniciador Invitrogen	Concentración final
<b>IGK</b>	(5'-3'): TAC GGY AARGCB GGY ATC GG	59270110	10 PM $\mu\text{l}^{-1}$
<b>NDR-1</b>	(5'-3'): TTG GAG CCG GCR TAN GCR	59270111	10 PM $\mu\text{l}^{-1}$

La reacción de amplificación por PCR (50  $\mu\text{l}$ ) se realizó utilizando los siguientes reactivos.

- **DNA** ..... 50 ng
- **Mg<sup>2+</sup>** ..... 1.5 mM
- **dNTPs** ..... 200 μM
- **Iniciador IGK** ..... 0.1 μM
- **Iniciador NDR-1**..... 0.1 μM
- **Taq pol** ..... 2.5 U

Para la amplificación del segmento *nifD-nifH* se utilizó un termociclador Perkin Elmer Gene Amp PCR System 2400; las condiciones de amplificación para 50 μl reacción se muestran en la tabla 8.

**Tabla 8.** Condiciones de amplificación del segmento *nifH-NifD*.

	Temperatura °C	Tiempo	Ciclos
<b>Desnaturalización inicial</b>	95	5 min	1
<b>Desnaturalización</b>	94	1 min	35
<b>Alineación</b>	45	30 s	35
<b>Extensión</b>	72	40 s	35
<b>Extensión final</b>	72	7 min	1

En la segunda PCR se amplificó el espacio interno *nifH*, con los iniciadores PoIF y PoIR esperando tener fragmentos con un peso de 360 pb; la secuencia de los oligonucleótidos se muestra en la continuación.

Nombre del iniciador	Secuencia	Número del iniciador Invitrogen	Concentración final
<b>PoIF</b>	(5'-3'): TGC GAY CCS ARR GCB GGY ATC GG	59270133	10 PM μl <sup>-1</sup>
<b>PoIR</b>	(5'-3'): ATS GCC ATC ATY TCR CCG GA	59270109	10 PM μl <sup>-1</sup>

La reacción de PCR se llevó a cabo en un volumen de 25 μl, con los siguientes componentes:

- **DNA** ..... 50 ng
- **Mg<sup>2+</sup>** ..... 50 mM
- **dNTPs** ..... 200 μM
- **Iniciador PoIF** ..... 0.1 μM
- **Iniciador PoIR** ..... 0.1 μM
- **Taq pol** ..... 2.5 U

Las condiciones de amplificación se muestran en la siguiente tabla.

**Tabla 9.** Condiciones de amplificación del gen *nifH*.

	Temperatura °C	Tiempo (min)	Ciclos
<b>Desnaturalización inicial</b>	95	5	1
<b>Desnaturalización</b>	94	1	35
<b>Alineación</b>	56	1	35
<b>Extensión</b>	72	2	35
<b>Extensión final</b>	72	7	1

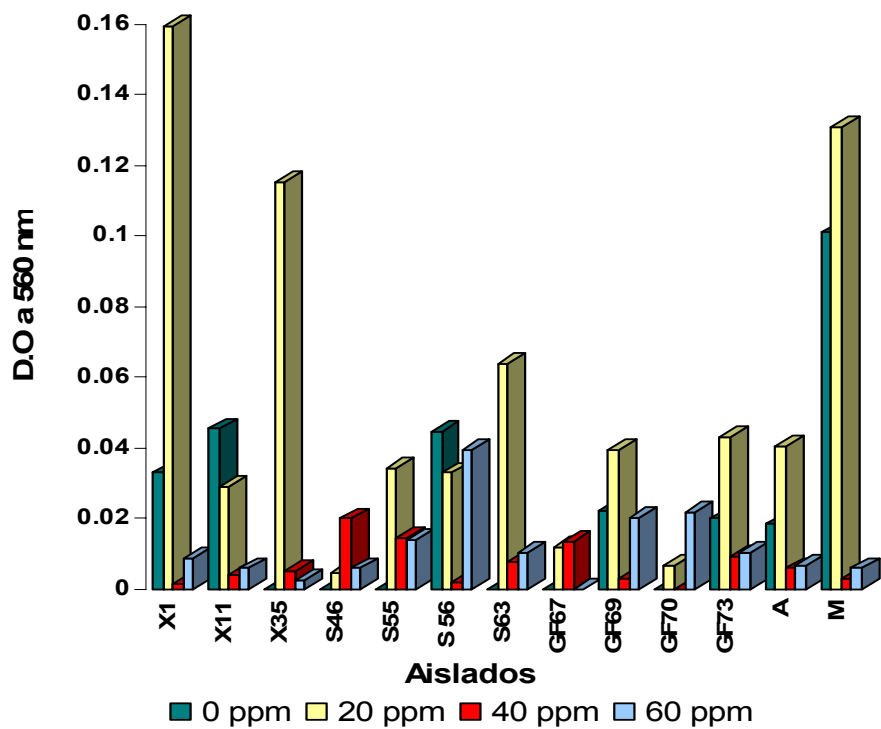
Los amplicones fueron visualizados en geles de agarosa al 1.2% (peso/volumen) y teñidos con una solución de bromuro de etidio (1 μg μl<sup>-1</sup>) tomando como referencia el marcador GeneRuler DNA con 50 pb (fermentas). Las imágenes fueron registradas en un fotodocumentador.

**3.2.0 Secuenciación del segmento 16S rDNA.** El segmento 16S rDNA se secuenció en el Instituto de Biotecnología, UNAM (campus Cuernavaca), para realizarla, fueron purificados 50 μl de productos PCR con el paquete QIAquick (Quiagen). Los productos PCR fueron cuantificados por densidad óptica a 650 nm. Un volumen de 16 μl conteniendo 150 ng de producto purificado más 2 μl de iniciador (5 pM μl<sup>-1</sup>) fue secuenciado de manera automatizada a partir del nucleótido 5' desde el extremo 3' del oligonucleótido y hasta 500 bases en promedio. Este mismo volumen purificado se consideró para el iniciador fD1 y rD1 respectivamente. Los resultados de la secuenciación se analizaron en el programa DNA Star versión 4.0.



### 3.3.0 Resultados

**Respuesta a diferentes concentraciones de salinidad.** La mayoría de los aislados bacterianos mostraron un mejor crecimiento a concentraciones de 20 ppm, con valores de DO entre 0.03 y 0.159 (Figura 9); el crecimiento bacteriano se desarrolló de manera óptima a concentraciones de 0 ppm con valores de DO entre 0.022 y 0.045 (Tabla 10). A concentraciones de 40 y 60 ppm, únicamente dos aislados bacterianos se vieron favorecidos en su crecimiento, uno proveniente de la laguna de Sontecomapan (S46) y otro de Golfo de México (GF 67), el aislado GF70 solo presentó crecimiento a 60 ppm (Tabla 10). Las cepas de referencia *A. lipoferum* y *Magnetotacticum* mostraron en óptimo desarrollo entre 0 y 20 ppm.

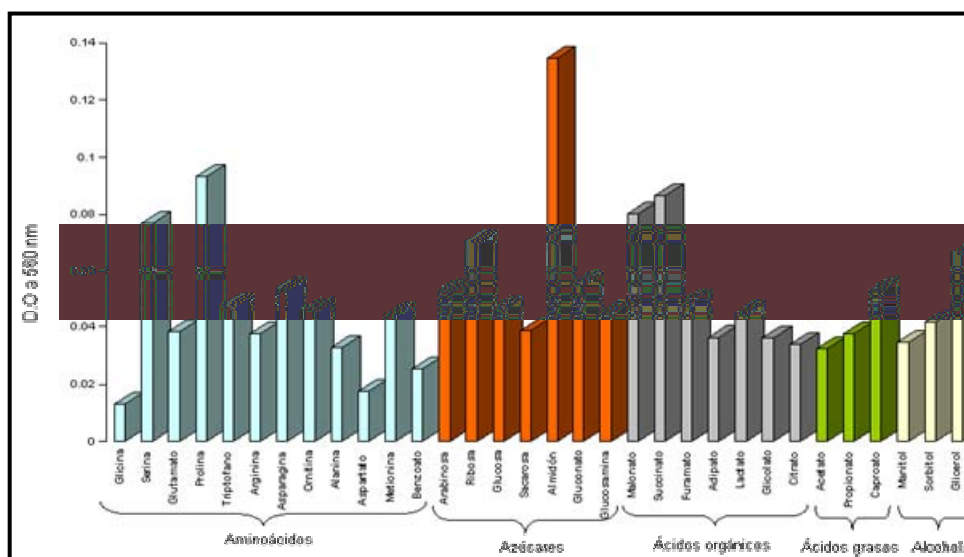


**Figura 9.** Respuesta de los aislados bacterianos a las diferentes concentraciones de salinidad probadas.

**Tabla 10.** Promedio de los valores de densidad óptica para el crecimiento de cada aislado, incluyendo las cepas de colección, en respuesta a diferentes concentraciones de NaCl.

	X1	X11	X35	S46	S55	S 56	S63	GF67	GF69	GF70	GF73	A
0 ppm	0.03	0.05	0.00	0.00	0.00	0.04	0.00	0.00	0.02	0.00	0.02	0.02
20 ppm	0.16	0.03	0.12	0.00	0.03	0.03	0.06	0.01	0.04	0.01	0.04	0.04
40 ppm	0.00	0.00	0.01	0.02	0.01	0.00	0.01	0.01	0.00	0.00	0.01	0.01
60 ppm	0.01	0.01	0.00	0.01	0.01	0.04	0.01	0.00	0.02	0.02	0.01	0.01

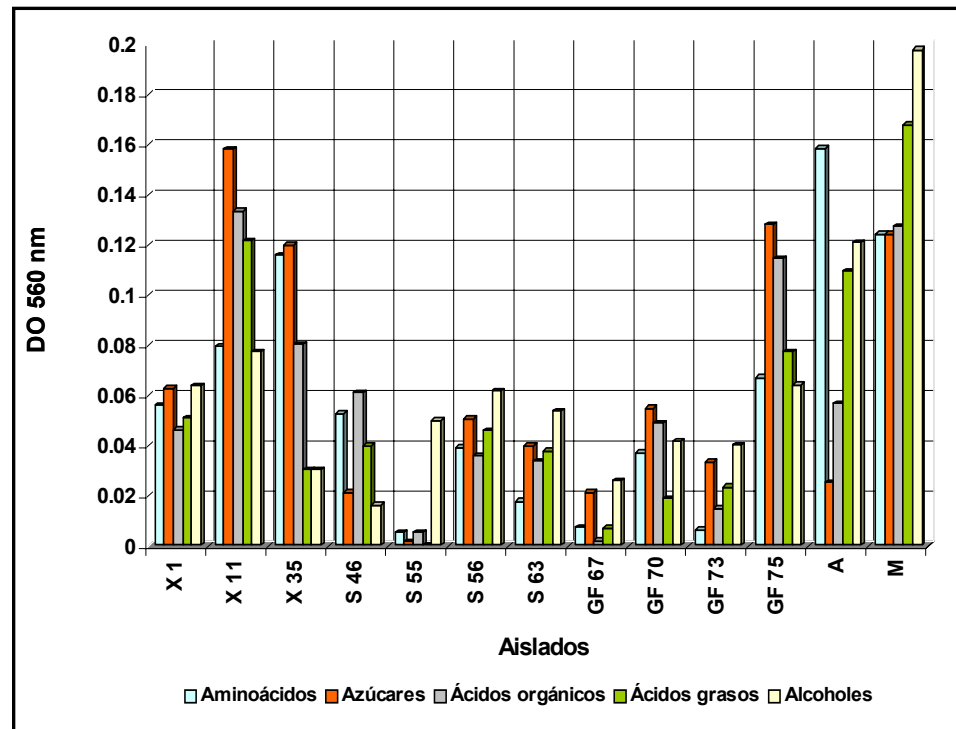
**Utilización de fuentes de carbono.** Se observó una elevada utilización de las diferentes familias químicas probadas (IMU=100%), sin embargo no todos permitieron un óptimo crecimiento para los aislados probados. Como se puede apreciar en la figura 10 los sustratos más utilizados como única fuente de carbono y energía, correspondieron a los azúcares y aminoácidos. Los aminoácidos menos utilizados fueron la prolina y serina; la ribosa y el almidón los azúcares que permitieron un mejor crecimiento de los aislados bacterianos (Figura 10). En menor proporción pero de manera importante los ácidos orgánicos manifestaron una fuente significativa de carbono, principalmente el malonato y succinato. Por el contrario los sustratos menos utilizados correspondieron a los ácidos grasos y los alcoholes (Figura 10).



**Figura 10.** Familias químicas probadas y la respuesta de crecimiento (D O a 580 nm) de los 11 aislados bacterianos microaerófilicos.

Si observamos la utilización de los sustratos en cada uno de los aislados de los diferentes ambientes, se puede apreciar que los procedentes del lago de Xochimilco presentaron un buen crecimiento con la mayor parte de los sustratos orgánicos probados, en condiciones microaerobias (Figura 11). Por otro lado, los aislados de origen marino presentaron la capacidad de utilizar todos los sustratos probados, pero su crecimiento fue muy débil en condiciones de baja oxigenación. Los aislados S55 y GF67 fueron los que menos utilizaron las fuentes de carbono probadas en condiciones de baja oxigenación. (Tabla 11).

Como se observa en la figura 11 las dos cepas de referencia mostraron una elevada utilización de todas las fuentes de carbono en condiciones microaerofílicas, siendo *Azospirillum magnetotacticum* la cepa con mayor capacidad utilizar los ácidos grasos y los alcoholes (Tabla 11).



**Figura 11.** Capacidad de crecimiento de los 11 aislados bacterianos microaerofílicos y las dos cepas de colección, en condiciones de baja oxigenación y utilizando diferentes familias químicas como única fuente de carbono y energía.

**Tabla 11.** Promedio de los valores de DO (560 nm) de los 11 aislados bacterianos y las 2 cepas de colección utilizadas como referencia, cuando crecieron en condiciones de baja oxigenación y utilizando diferentes familias químicas como única fuente de carbono y energía.

Aislados	Aminoácidos	Azúcares	Ácidos orgánicos	Ácidos grasos	Alcoholes
X1	0.056	0.062	0.046	0.050	0.063
X11	0.079	0.158	0.133	0.122	0.077
X35	0.116	0.120	0.080	0.030	0.030
S46	0.052	0.021	0.060	0.04	0.016
S55	0.004	0.001	0.005	0	0.05
S56	0.039	0.050	0.036	0.046	0.061
S63	0.017	0.04	0.033	0.037	0.053
GF67	0.007	0.021	0.001	0.006	0.026
GF70	0.037	0.054	0.048	0.018	0.041
GF73	0.006	0.033	0.014	0.023	0.040
GF75	0.067	0.128	0.114	0.077	0.064
A	0.158	0.025	0.056	0.109	0.121
M	0.124	0.124	0.127	0.168	0.198

**Producción exoenzimática.** Se obtuvieron elevados índices medios de producción exoenzimática lo que indica que estos aislados presentan una fuerte capacidad heterotrófica, siendo los aislados originarios del Golfo de México el que presentó el valor del IME más alto (86%), en los de la laguna de Sontecomapan fue de 83.3% y el valor más bajo se observó en los procedentes del lago de Xochimilco (72.9%).

Los aislados provenientes del Golfo de México que presentaron una mayor actividad exoenzimática, de entre ellos los aislados GF67, GF70 y GF73 produjeron la mayoría de las exoenzimas buscadas, y en el caso de los procedentes de la laguna de Sontecomapan fueron el S55 y el S63.

Los aislados originarios del lago de Xochimilco fueron los que presentaron menor actividad exoenzimática, principalmente el aislado X11, ya que presentó un IME de solo 55.6% (Tabla 12). Sin embargo se puede apreciar que, en general, los once aislados tuvieron una elevada actividad exoenzimática con un valor del IME de entre 77.8 y 88.9%.

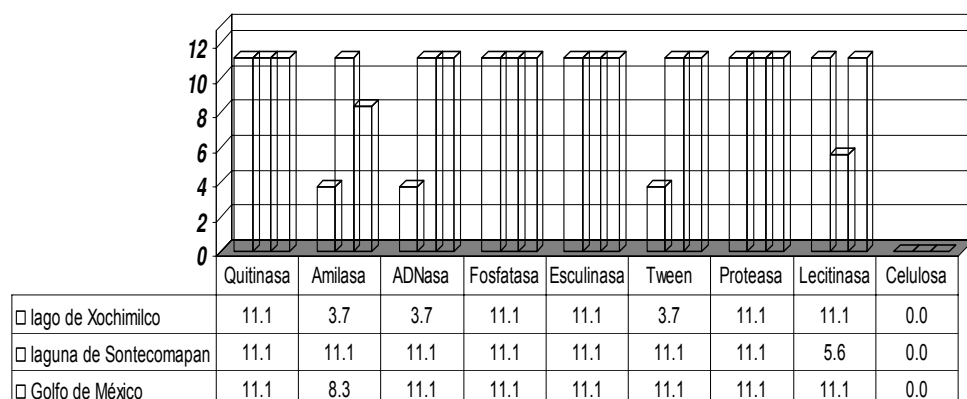
La capacidad de hidrolizar la celulosa fue la única actividad que no se presentó en el conjunto de aislados; las cepas de colección mostraron una baja actividad exoenzimática, *M. magnetotacticum* presentó un valor de IME de 55.6% y *A. lipoferum* no evidenció la producción de ninguna exoenzima.

**Tabla 12** Valores del índice medio de producción de exoenzimas (IME), de cada uno de los 11 aislados microaerobios y las 2 cepas de colección utilizadas como referencia.

	X 1	X 11	X 35	S 46	S 55	S 56	S 63	GF 67	GF 70	GF 73	GF 75	A	M
Quitinasa	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	-	-
Amilasa	1	-	-	1	1	1	1	1	1	-	1	-	-
ADNasa	1	-	-	1	1	1	1	1	1	1	1	-	-
Fosfatasa	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	-	-
Esculinasa	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	-	-
Celulasa	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Tweenasa	-	-	1	1	1	1	1	1	1	1	1	-	-
Proteasa	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	-	-
Lecitinasa	1	1	1	-	1	-	1	1	1	1	1	-	-
<b>Total</b>	<b>7</b>	<b>5</b>	<b>6</b>	<b>7</b>	<b>8</b>	<b>7</b>	<b>8</b>	<b>8</b>	<b>8</b>	<b>7</b>	<b>8</b>	<b>-</b>	<b>5</b>
<b>Porcentaje (IME)</b>	<b>77.8</b>	<b>55.6</b>	<b>66.7</b>	<b>77.8</b>	<b>88.9</b>	<b>77.8</b>	<b>88.9</b>	<b>88.9</b>	<b>88.9</b>	<b>77.8</b>	<b>88.9</b>	<b>0.0</b>	<b>55.6</b>

De acuerdo al potencial exoenzimático que permite a los aislados heterótrofos hidrolizar compuestos de alto peso molecular en condiciones microaerobias, se pudo observar que los aislados procedentes del Golfo de México y de la laguna de Sontecomapan, mostraron una elevada capacidad para hidrolizar la quitina, el ADN, la esculina y las proteínas, además de proveer al ambiente de ortofosfatos (producción de fosfatasa) (Figura 12). La producción de lecitinasa mostró un IME muy bajo (5.6%). Ningún aislado mostró la capacidad de hidrolizar ácidos grasos de alto peso molecular (no producción de tweenasa).

**Figura 12.** Respuesta a los diferentes sustratos a través del índice medio de expresión exoenzimática (IME).



**Actividad de la nitrogenasa por el método de reducción de  $C_2H_2$ .** La capacidad de reducir el  $C_2H_2$  no se evidenció en los 11 aislados, ya que solamente los X35, S46, GF67, GF73 y GF75 fueron capaces de producir  $C_2H_4$ .

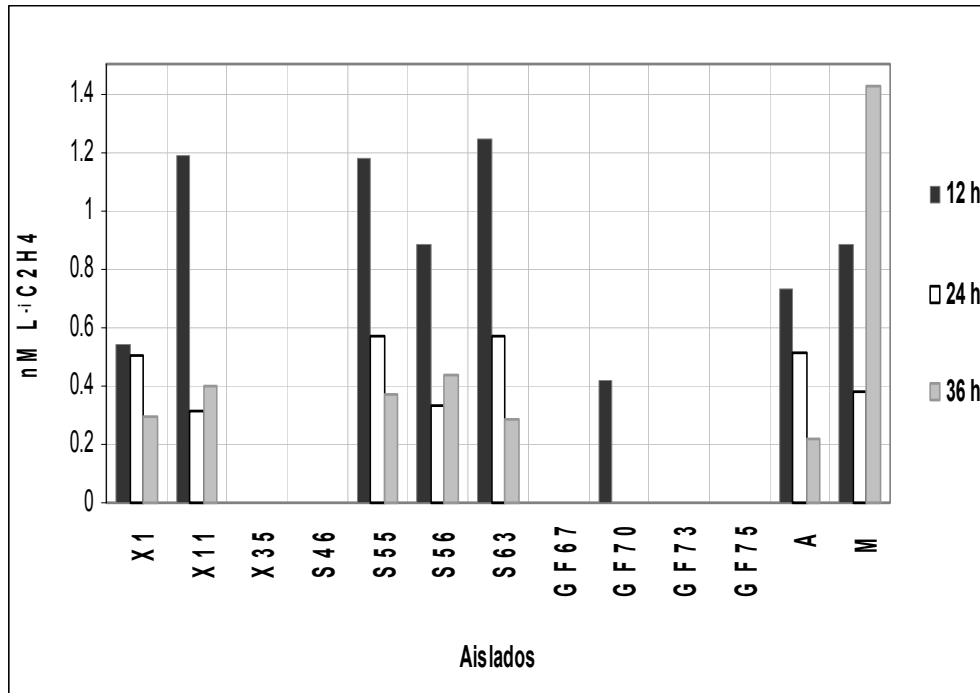
En general, se observó que en los aislados donde se evidenció esta actividad, la formación de  $C_2H_4$  aumentó con el tiempo de incubación (Figura 13). Así, a las 12 h de incubación se detectó la mayor producción de  $C_2H_4$ . Los aislados X11, S55, S56 y S63 fueron los que presentaron una mayor capacidad de reducir el  $C_2H_2$  con valores superiores al  $0.6 \text{ nmol L}^{-1} \text{ h}^{-1}$  (Tabla 13); entre ellos, solamente los aislados X11 y S56 mostraron un ligero incremento en la producción de  $C_2H_4$  a las 36h de incubación. En cuanto a los aislados provenientes del Golfo de México, solo el GF73 presentó un valor  $0.42 \text{ nM L}^{-1} \text{ h}^{-1}$  de  $C_2H_4$  producido a las 12 h, y después de este tiempo no se detectó un aumento en la producción de etileno.

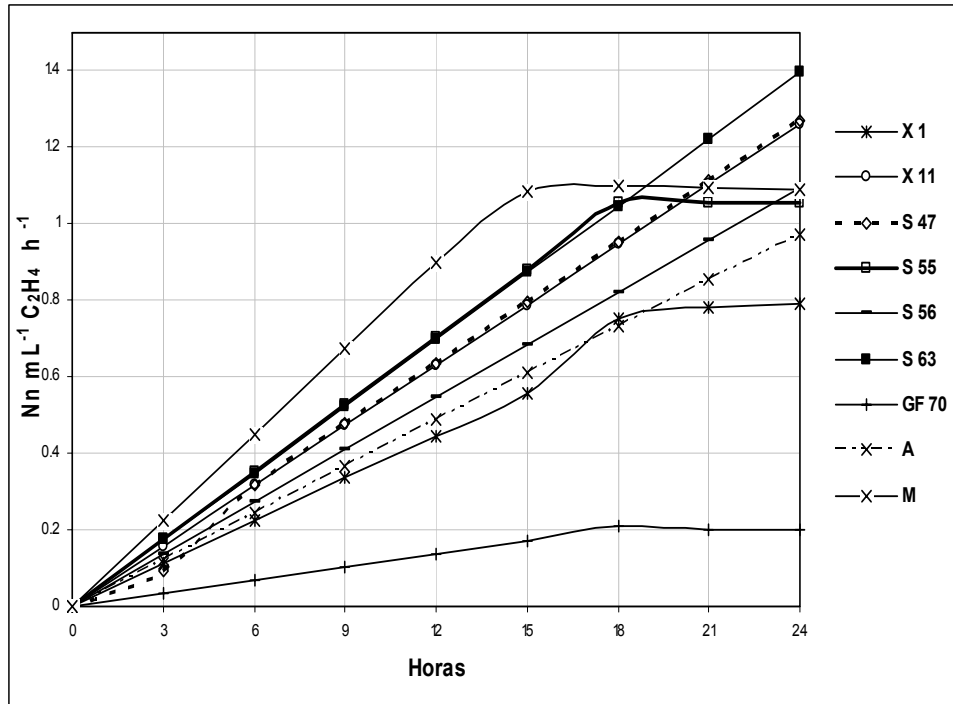
En cuanto a las cepas de colección, se pudo observar que ambas mostraron la capacidad de reducir el  $C_2H_2$ , de manera significativa, siendo *M. magnetotacticum* la cepa que presentó una mayor actividad de nitrogenasa ( $1.43 \text{ } \mu\text{M L}^{-1} \text{ h}^{-1}$ )

De los cálculos de la cinética de producción de  $C_2H_4$  por hora, se observó que en general, entre 18 y 21 h de incubación se alcanza el máximo pico de producción, siendo el aislado S63 el que presentó el máximo valor registrado ( $0.065 \text{ nM L}^{-1} \text{ h}^{-1}$ ) con excepción de los aislados S55, S56 y X11.

que presentaron un ligero aumento después de 21 h; comportamiento similar al observado en la cepa de referencia *A. lipoferum* (Figura 14). El único aislado proveniente del Golfo de México (GF70) presentó una muy baja actividad de la nitrogenasa ( $0.012 \text{ nM L}^{-1}\text{h}^{-1}$ ) en contraste a cepa de la colección *M. magnetotacticum* que presentó los valores de reducción de  $\text{C}_2\text{H}_2$  más elevados ( $0.069 \text{ nM L}^{-1} \text{ h}^{-1}$ ), figura 13. Los valores en las tasas de en la reducción de  $\text{C}_2\text{H}_2$  se muestran en la tabla 14.

**Figura 13.** Producción de  $\text{C}_2\text{H}_4$  durante los diferentes periodos de incubación en condiciones de baja oxigenación ( $\text{pO}_2$  4%), como resultado de la reducción de  $\text{C}_2\text{H}_2$ .





**Figura 14.** Cinética de producción de  $C_2H_4$  por hora de cada uno de los aislados que presentaron actividad de la nitrogenasa (ARA).

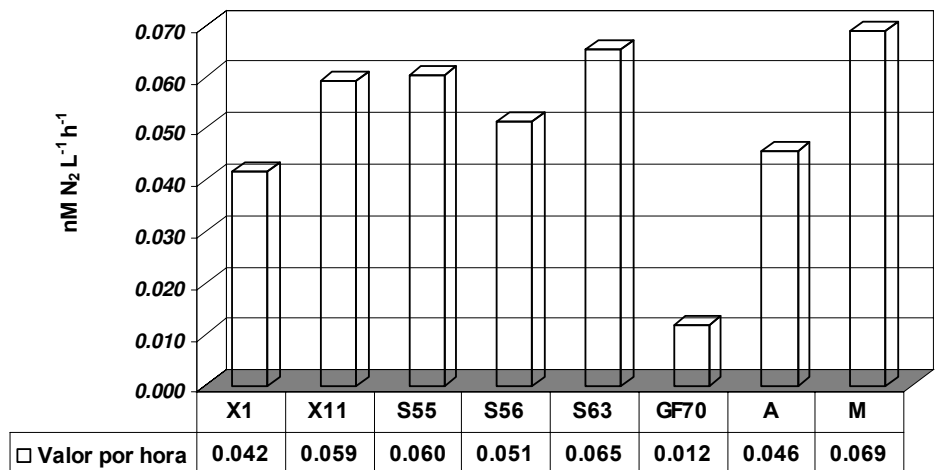
**Tabla 14.** Valores en la producción de  $C_2H_4$  ( $nM L^{-1}$ ) en un periodo de 24 h.

	0 h	3 h	6 h	9 h	12 h	15 h	18 h	21 h	24 h
<b>X1</b>	0	0.11	0.22	0.34	0.45	0.56	0.75	0.78	0.79
<b>X11</b>	0	0.16	0.32	0.47	0.63	0.79	0.95	1.10	1.26
<b>S55</b>	0	0.18	0.35	0.53	0.70	0.88	1.05	1.05	1.06
<b>S56</b>	0	0.14	0.27	0.41	0.55	0.68	0.82	0.96	1.10
<b>S63</b>	0	0.17	0.35	0.52	0.70	0.87	1.05	1.22	1.40
<b>GF70</b>	0	0.03	0.07	0.10	0.14	0.17	0.21	0.20	0.20
<b>A</b>	0	0.12	0.24	0.37	0.49	0.61	0.73	0.85	0.97
<b>M</b>	0	0.22	0.45	0.67	0.90	1.09	1.10	1.09	1.09

**Estimación de  $N_2$  fijado.** Para determinar la proporción de  $N_2$  fijado en función del  $C_2H_2$  reducido se consideró la reacción hidrogenasa de la nitrogenasa de acuerdo a lo establecido por Capone (1993). Los nM de  $N_2$  fijado se estimaron a partir de los valores de  $C_2H_4$  producidos por cada uno de los aislados.



fijado por hora se muestran en la figura 15, en donde se observan los niveles más altos en los aislados X1, S55 y S63; éste último presentó el valor más elevado ( $0.065 \text{ nM L}^{-1}\text{h}^{-1}$ ); los aislados X1 y S56 presentaron un fijación entre 0.042 y 0.051; el aislado con los más bajos niveles de fijación de  $\text{N}_2$  fue el GF70 con  $0.012 \text{ nM L}^{-1}\text{h}^{-1}$ . La cepa de referencia *Magnetotacticum* fue el que alcanzó el valor más alto ( $0.069 \text{ nM L}^{-1}\text{h}^{-1}$ ).



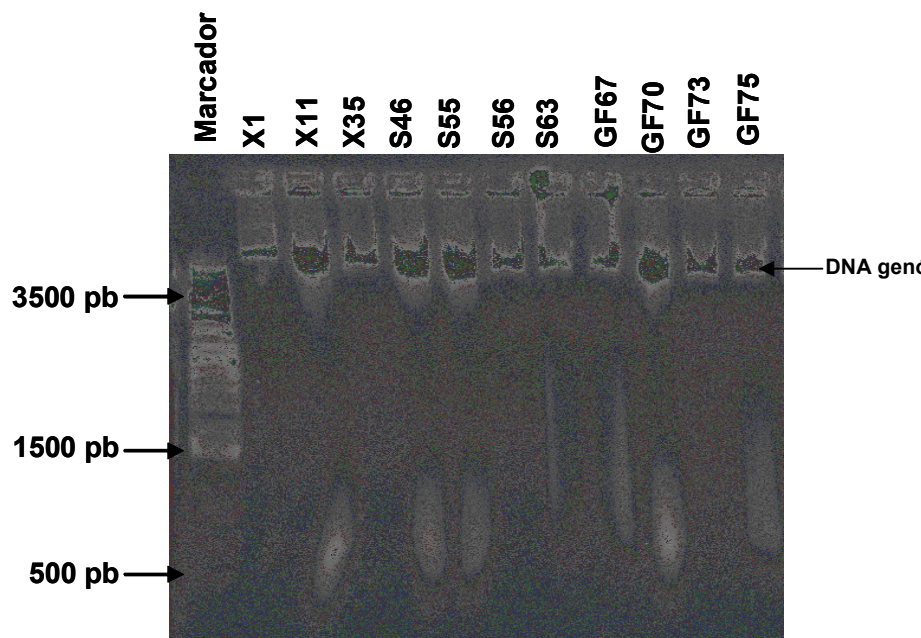
**Figura 15.**  $\text{N}_2$  fijado ( $\text{nM L}^{-1}\text{h}^{-1}$ ) en aislados bacterianos.

**Extracción de ácidos nucleicos y amplificación del segmento 16S rDNA.** La extracción de DNA a partir de los cultivos bacterianos rindió 0.3 a  $3.14 \text{ ng } \mu\text{L}^{-1}$ . Las lecturas de densidad óptica y la concentración de DNA cuantificado se muestran en la tabla 15. La integridad del DNA purificado se observó en un gel de agarosa al 1.2% teñido con bromuro de etidio ( $1 \mu\text{g } \mu\text{L}^{-1}$ ) (Figura 16).

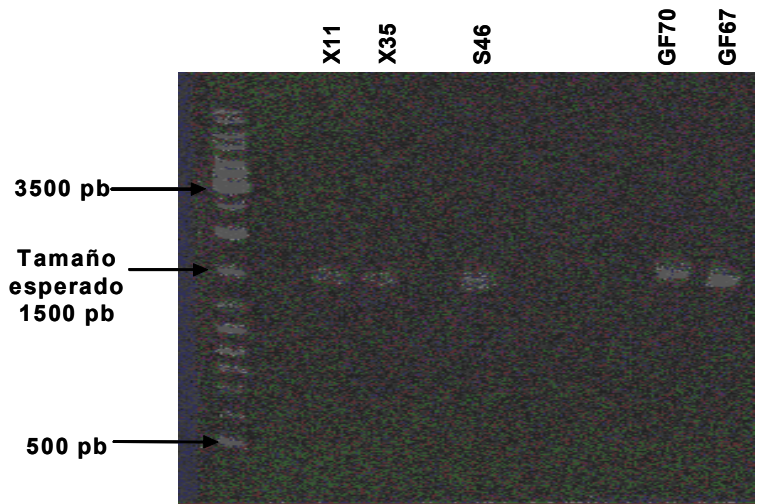
**Tabla 15.** Valores de DO y concentración de DNA extraído de cada uno de los aislados bacterianos.

Aislados	DO 260 nm	DO 280 nm	Relación 260/280	Factor de dilución	ng uL <sup>-1</sup>
X1	0.0067	0.0039	1.71	33.3	11.5
X11	0.0105	0.0088	1.19	33.3	17.5
X35	0.0084	0.0072	1.17	33.3	14
S46	0.0081	0.0063	1.28	33.3	13.5
S55	0.0087	0.006	1.45	33.3	14.5
S56	0.008	0.0048	1.66	33.3	13.3
S63	0.0139	0.0098	1.41	33.3	23.1
GF67	0.0114	0.0077	1.48	33.3	19
GF70	0.0013	0.0009	1.44	33.3	2.16
GF73	0.0112	0.0076	1.47	33.3	18.6
GF75	0.0072	0.0042	1.71	33.3	12

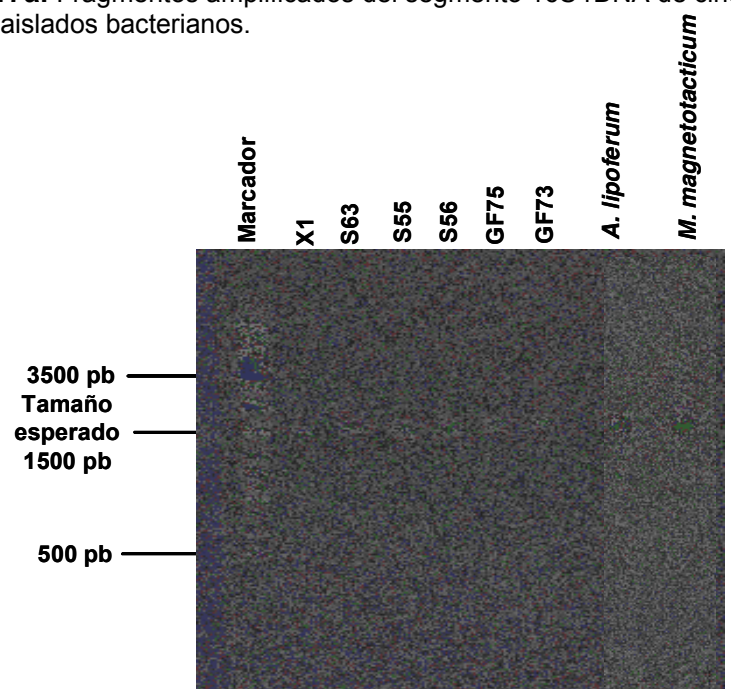
A partir de cada muestra de DNA de los once aislados se logró amplificar el segmento 16S rDNA, visualizado a través de una banda con un peso de 1500 pb (Figuras 17a y 17b).



**Figura 16.** Gel de agarosa al 1.2%, en donde se muestra la integridad del DNA genómico procedente de cada uno de los aislados bacterianos microaerobios.



**Figura 17a.** Fragmentos amplificados del segmento 16S rDNA de cinco de los once aislados bacterianos.



**Figura 17b.** Fragmentos amplificados del segmento 16S rDNA de seis aislados microaerobios más el de las dos cepas de referencia.

**Cuantificación de productos PCR del segmento 16S rDNA.** Se obtuvieron valores de productos PCR de 2.16 a 23.1 ng  $\mu\text{L}^{-1}$ , calculados a través de la densidad óptica (Tabla 16).

**Tabla 16.** Valores de DO y concentración de producto PCR del segmento 16S rDNA.

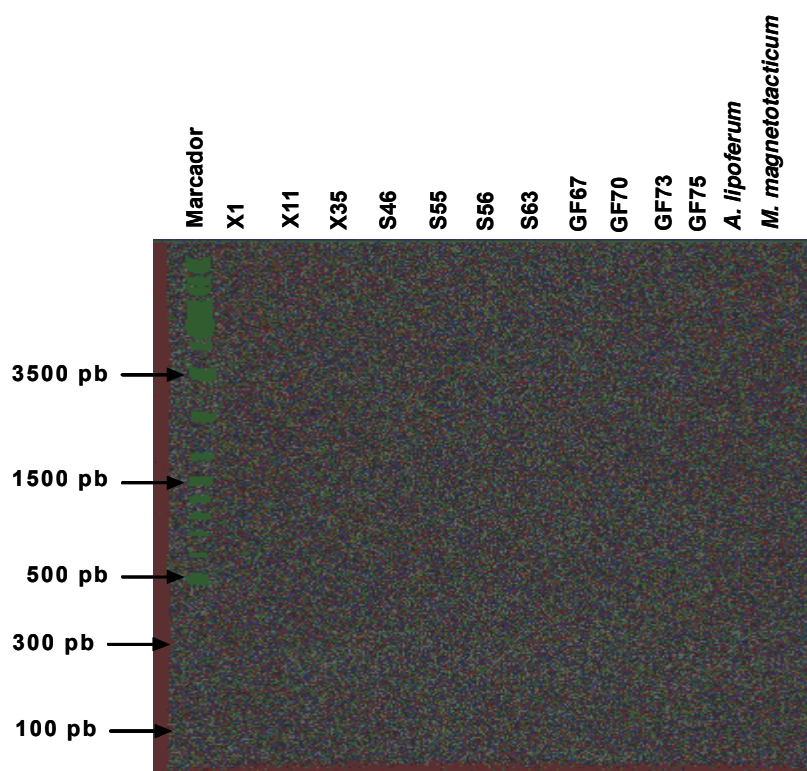
Aislado	DO 260 nm	DO 280 nm	Relación 260/280	Factor de dilución	ng $\mu\text{L}^{-1}$
X1	0.0067	0.0039	1.71	33.3	11.5
X11	0.0105	0.0088	1.19	33.3	17.5
X35	0.0084	0.0072	1.17	33.3	14
S46	0.0081	0.0063	1.28	33.3	13.5
S55	0.0087	0.006	1.45	33.3	14.5
S56	0.008	0.0048	1.66	33.3	13.3
S63	0.0139	0.0098	1.41	33.3	23.1
GF67	0.0114	0.0077	1.48	33.3	19
GF70	0.0013	0.0009	1.44	33.3	2.16
GF73	0.0112	0.0076	1.47	33.3	18.6
GF75	0.0072	0.0042	1.71	33.3	12

**Secuenciación del segmento 16S rDNA.** De acuerdo con los datos obtenidos por la secuenciación del segmento 16S rDNA, la colección de aislados está conformada por siete especies bacterianas, según sus elevados niveles de similitud (98, 99 y 100%). La secuencia del aislado S46 no coincidió con alguna secuencia descrita y contenida en las bases de datos (Tabla 17).

**Amplificación del gen *nifH* por PCR.** Con el empleo de los iniciadores IGK, NDR-1, PolR y PolF no se logró amplificar en ninguno de los aislados el fragmento de 360 pb correspondiente al gen *nifH*; sólo se obtuvo un amplicon en las cepas de referencia (Figura 18).

**Tabla 17.** Porcentaje de similitud y especies identificadas con base en secuencia del 16S rDNA de los once aislados.

Aislado	Nº de bases	Kb secuenciadas	Similaridad (%)	Organismo	Nº de accesoión
X1	1500	1356	100	<i>Caulobacter</i> sp	AJ22777
X11	1500	1500	100	<i>Caulobacter</i> sp	CP00073
X35	1500	1388	99	<i>Ochrobacterium anthropi</i>	AM4906
S46	1500	----	No cultivado	No identificado	----
S55	1500	1322	100	<i>Sphingobium</i> sp.	AY68902
S56	1500	1448	100	<i>Sphingobium amiense</i>	AB09736
S63	1500	1476	99	<i>Bacillus firmus</i>	DQ0734
GF67	1500	1426	100	<i>Bacillus firmus</i>	EF0326
GF70	1500	1487	98	<i>Pseudomonas stutzeri</i>	CP0003
GF73	1500	1459	100	<i>Bacillus</i> sp.	DQ4487
GF75	1500	1417	99	<i>Sphingomonas</i> sp.	AB0255



**Figura 18.** Gel de agarosa al 1.2% en donde se aprecia la amplificación del segmento *nifH* exclusivamente en las cepas de referencia.

### 3.4.5. Discusión

Como se puede observar en la figura 9 todos los aislados bacterianos microaerobios que constituyen la colección, fueron halotolerantes ya que son capaces de presentar en mayor o menor grado, crecimiento tanto en ecosistemas de agua dulce como en salinos, aunque la mayor tolerancia a la salinidad correspondió a 20 ppm de NaCl.

En los aislados provenientes del lago de Xochimilco este desarrollo puede deberse a que en estas aguas se encuentran presentes concentraciones de ácidos orgánicos provenientes de las zonas agrícolas circundantes, que precipitan y disuelven el calcio, magnesio y principalmente el sodio (Bastida, 1986; Garzon, 2002). El caso de los aislados provenientes de la laguna de Sontecomapan esta tolerancia a altas concentraciones de NaCl se entiende ya que la laguna es considerada como polihalina (Contreras, 1985).

Por otra parte, los aislados S46 y S56 presentaron un buen desarrollo a concentraciones de NaCl de 40 y 60 ppm, ya que ambos provienen de zonas muy cercanas a la boca de la laguna en donde se llevan a cabo los intercambios de agua de mar y de la laguna. En los aislados procedentes de sedimentos del Golfo de México, a pesar de que su mayor crecimiento se presentó a 20 ppm de sal, el aislado GF70 presentó un desarrollo óptimo a 60 ppm, ya que en estas aguas la salinidad presenta un rango de 34 hasta 40 ppm (Turcott, 1994; y Bessonov *et al.*, 1971).

El crecimiento bacteriano en los sustratos orgánicos probados fue superior en los aislados procedentes del lago de Xochimilco, donde los sedimentos son ricos en materia orgánica, además de ser un sitio con prácticas agrícolas en las chinampas que lo rodean, lo que permite que los desechos de estas actividades se vierten de manera directa a los canales (Juárez *et al.*, 2003). Por lo anterior, en los sedimentos se presenta una elevada actividad mineralizadora de C y N orgánico, dejando disponible una gran diversidad de sustratos asimilables que son aprovechados por las comunidades microbianas (Pool *et al.*, 2006). Esta situación propicia que los aislados posean una elevada capacidad de utilización de fuentes de carbono, principalmente azúcares y aminoácidos.

La laguna de Sontecomapan también presenta sedimentos ricos en materia orgánica por la cercanía de cultivos y sistemas ganaderos en las zonas adyacentes que, en temporadas de lluvias se lavan y acarrean materia orgánica que es depositada en la cuenca lagunar, todo lo anterior

aunado al aporte orgánico de los diversos ríos que desembocan en dicha laguna. Estas características, acompañadas de la hidrodinámica y temperatura promedio de 24°C (García-Cubas y Reguero, 1995), hacen más favorables los procesos biológicos principalmente los detritívoros, que conlleva a una diversidad y liberación de nutrientes disponibles para los microorganismos presentes en el ecosistema.

Otra de las explicaciones por la que los aislados presentan una alta utilización de dichos compuestos, puede atribuirse a que en los sedimentos de este tipo de ambientes lagunares, ricos en materia orgánica, se crea un mosaico de microhábitats con compuestos orgánicos disponibles, lo que genera la formación de biopelículas que participan en múltiples procesos ecológicos relevantes de la producción primaria (Olapade y Leff, 2005; Fajana *et al.*, 2005).

Por el contrario, los aislados de origen marino mostraron una menor capacidad para utilizar las diferentes familias químicas probadas. Principalmente los aislados GF67 y GF73 que proceden de los sedimentos del Cañón de Campeche donde las profundidades son superiores a los 1500 m, por lo que se presenta una escasez de materia orgánica y en consecuencia, los procesos biológicos tienen otra dinámica y limitan la disponibilidad de compuestos orgánicos asimilables. El aislado GF71 mostró una elevada utilización de los cuatro grupos de compuestos probados, debido a que procede de la desembocadura del río Grijalva donde ocurre un aporte alóctono de materia orgánica.

Lo anterior también se ve reflejado en la producción de una gran diversidad de exoenzimas producidas por los aislados bacterianos microaerobios de la colección, ya que se obtuvieron valores IME comprendidos entre 72.9 y 86% en los diferentes sitios de muestreo. De acuerdo con lo reportado por Kao *et al.* (2006) y Sunita *et al.* (2006), esta síntesis exoenzimática revela que los microorganismos son capaces de hidrolizar compuestos orgánicos simples y de cadena larga, proporcionándoles a los microorganismos la facultad de hidrolizar una mayor diversidad de compuestos orgánicos, lo cual se ve reflejado en la síntesis de biomasa, por consecuencia en la aceleración de los ciclos de los nutrientes.

Una amplia producción de enzimas hace más sensible a los microorganismos a la utilización de una amplia variedad de sustratos; por lo que los aislados bacterianos microaerobios presentan una elevada capacidad quimiorganótrofa que les permite hidrolizar la mayor parte de la materia orgánica que se encuentre presente en los sedimentos, lo que les

permite participar fuertemente al enriquecimiento nutricional de la columna de agua.

La falta de capacidad para hidrolizar la celulosa por parte de todos los aislados bacterianos que constituyen la colección, a pesar de ser el compuesto orgánico más abundante en los ecosistemas acuáticos, se puede deber a la complejidad en su estructura química, ya que se trata de un polisacárido lineal de alto peso molecular constituido por la unión de entre 300 y 15,000 unidades de glucosa, que se encuentra presente en las paredes celulares de los vegetales. Esta complejidad química hace que sea un compuesto de difícil degradación para los microorganismos con metabolismo aerobio, prefiriendo éstos la utilización de compuestos más simples, lo que da como resultado, que la celulosa no sea producida.

De igual manera Sakami *et al.* (2005), reportan que la actividad hidrolítica extracelular se lleva a cabo por microorganismos presentes en los sedimentos, sugiriendo que este tipo de análisis puede ayudar a comprender las condiciones ambientales de los sitios de estudio, como la calidad de la materia orgánica y la actividad biológica.

La capacidad de fijar  $N_2$  en los aislados que presentaron actividad nitrogenasa (X1, X11, S55, S56, S63, GF70) mostró valores significativos (Figura 15). De acuerdo a lo reportado por Musat *et al.* (2006), la capacidad fijadora de nitrógeno en comunidades microbianas de sedimentos marinos con equivalentes de 18 nM por  $m^2$  de  $N_2$  fijado; estos valores son relacionados con los obtenidos en esta investigación, los resultados de hasta  $0.065 \text{ nmol } N_2 \text{ L}^{-1} \text{ h}^{-1}$  son significativos. Resultados semejantes fueron reportados por Falcón *et al.* (2004) quienes evaluaron las tasas de fijación de nitrógeno en el bacteriobentos del Océano Pacífico y Atlántico, reportando valores de  $0.05$  a  $0.06 \text{ nmol } N_2 \text{ L}^{-1} \text{ h}^{-1}$ . Los datos coinciden ampliamente con los valores que arrojaron los aislados X1, S55, S56 y S63, capaces de fijar  $0.059$  a  $0.065 \text{ nmol } N_2 \text{ L}^{-1} \text{ h}^{-1}$  (Figura 15).

Cuando los microorganismos diazotrofos se encuentran asociados a la rizósfera, en donde la interacción de éstos es más estrecha con otros microorganismos, las tasas de fijación de  $N_2$  son elevadas, esto se ve reflejado en los estudios realizados por Leblanc *et al.* (2005) y Bostrom *et al.* (2007) quienes estudiaron la fijación de nitrógeno en la rizósfera de leguminosas, obteniendo valores muy por encima de los reportados en esta investigación ( $20 \text{ nmol } m^2 \text{ h}^{-1}$ ). Sin embargo nuestros valores de actividad nitrogenasa no son comparables con los mencionados ya que la escala en tiempo y el volumen son menores, además de que se parte de cultivos puros y no de asociaciones simbióticas.



En cuanto al análisis molecular de los aislados bacterianos, se esperaba obtener el amplicón que evidenciara la presencia del gen *nifH* en los aislados bacterianos que mostraron la capacidad de reducir el  $C_2H_2$ . Lo anterior se puede deber a que los aislados no presentan la nitrogenasa convencional que está constituida por dos subunidades: la dinitrogenasa (codificada en el gen *nifH*) y la reductasa de la dinitrogenasa (codificada en el gen *nifD* y *nifK*) (Baldini *et al.*, 1997). La fijación de nitrógeno entonces se puede atribuir a que los aislados pudieran presentar nitrogenasas alternativas codificadas por genes distintos.

Dylworth y Loneragan (1991) y Lehman *et al.* (1996) reportan nitrogenasas alternativas en miembros del género *Azotobacter* que contienen vanadio que son codificadas por los genes *vnf*. Estas nitrogenasas a diferencia de las convencionales carecen del molibdeno; su descripción demuestra que tienen propiedades similares al complejo nitrogenasa codificado por genes *nif* como la capacidad de reducir el  $C_2H_2$ . Considerando lo anterior, se podría explicar que nuestros aislados fueron capaces de reducir el  $C_2H_2$  sin la presencia de la nitrogenasa convencional.

Se ha estudiado la efectividad de las nitrogenasas alternativas en donde se ha demostrado que la tasa de producción de etileno es superior a la tasa del complejo nitrogenasa-hierro-molibdeno (Schneider *et al.*, 1995). Probablemente sea esta la razón por la cual nuestros aislados presentaron una producción de  $C_2H_4$  y por ende una mayor estimación en la fijación de  $N_2$ . Las nitrogenasas alternativas catalizan la producción de etano ( $C_2H_6$ ) junto con el etileno como producto de la reducción del  $C_2H_2$ , a diferencia de la nitrogenasa convencional que cataliza de manera exclusiva para la producción de  $C_2H_4$  (Oda *et al.*, 2005).

Sin embargo, en las cepas de referencia se amplificó una banda de 300 pb que corresponde al gen *nifH*. Esto es consistente con el hecho de que *M. lipoferum* ha sido reportado como microorganismo diazotrofo; *M. magnetotacticum* también presentó la banda, a pesar de que no ha sido reportada como fijador de nitrógeno molecular, presentando los niveles más altos de producción de etileno lo que sugiere que esta cepa presenta un elevado potencial diazotrofo.

Finalmente, la secuencia del segmento 16S rDNA del aislado S4 procedente de los sedimentos de la laguna de Sontecomapan no presentó similitud con ninguna de las especies ya descritas, por lo que se puede tratar de una especie nueva.

## Literatura citada.

- Balch, W., Foy, G.E., Magrum, L.J., and Wolfe B.S. 1979. Metanogen reevaluation of a unique biological group. *Microbiological*. 43: 26-296.
- Baldini, J. I., Caruso, L., Baldani, V.L.D., Goi, S. R., y Döbereiner, J, 1999. Recent advances in BNF with non-legumes plants. *Soil Biochem. Biochem.* 29:911-922.
- Bastida, N.A. 1986. Estudio físico, económico y social de Xochimilco. Escuela Normal Superior de México. p. 26-28.
- Bessnov, N., Elizaron, A y González O. 1971. Resultado de las investigaciones Cubano-Soviéticas en el Banco de Campeche. Coloquio sobre investigaciones y recursos de Mar Caribe y regiones adyacentes. UNESCO-FAO, Paris Francia. p 23-60.
- Bostrom, H.K., Riemann, L., Kuhl, M. y Hagstrom, A. 2007. Isolation and gene quantification of heterotrophic N<sub>2</sub>-fixing bacterioplankton in the Baltic Sea. *Environmental Microbiology*. 9:1 152-164.
- Church, J.M., Short, M. C., Jenkins, D.B., Karl M.D., y Zehr, P.J. 2000. Temporal patterns of nitrogenase gene (*nifH*) expression in the oligotrophic North Pacific Ocean. *Appl. Environ. Microbiol.* 71 (9) 5362-5370.
- Capone, G. 1993. Determination of nitrogenase activity in aquatic samples using the acetylene reduction procedure. p. 347-358 *En Handbook of methods in Aquatic Microbial Ecology*, Ed. Lewis Publishers Boca Raton, Fla.
- Contreras, F. 1985. Lagunas Costeras Mexicanas. Centro de ecodesarrollo. Secretaría de Pesca, Distrito Federal, México. 253 p.
- Dilworth, J. H y Loneragan, J. F. 1991. An alternative nitrogenase is not expressed in molybdenum-deficient legume root nodules. *New Phytologist* 118: 303-308.
- Ferrara-Guerrero, M.J. y A. Bianchi. 1990. Distribution of microaerophilic bacteria through the oxic-anoxic transition zone of lagoon sediment. *Hydrobiologia* 207: 147-152.

- Ferrara-Guerrero, M.J. 1993. Distribution des bactéries microaérophiles dans les sédiments de lagunes côtières Méditerranéenne. Comparaison avec la distribution des bactéries aérobies anaérobies. Étude des potentialités métaboliques. Tesis Doctoral Univ. de Aix-Provenza, Francia. 218 pp
- Fazi, S., Amalfitano, S., Pernthaler, J and Puddu, A. 2005. Bacterial communities associated with benthic organic matter in headwater stream microhabitats. *Environ. Microbiol.* 7:10 1633-1640.
- Falcón, I.L., Carpenter, J.E., Cipriano, F., Bergman, B. y Capone, G. 2004. N<sub>2</sub> fixation by unicellular bacterioplankton from the Atlantic and Pacific Oceans: phylogeny and in situ rates. *Appl. Environ. Microbiol.* 70 (2) 765-770.
- García-Cubas, A y Reguero, M. 1995. Moluscos de la laguna de Sontecomapan Veracruz, México: sistemática y ecología. *Hidrobiología.* 5:1 24-32.
- Garzon, L.L. 2002. Xochimilco hoy. Gobierno del Distrito Federal delegación Xochimilco. Boletín informativo.
- Guerrero, R y Berlanga, M. 1994. Bacterias magnetotácticas, evolución y ecología. *Actualidad SEM.* 29:20.
- Juárez, F. Silva, S y Cifuentes, G. 2003. Microbiological indicator of water quality in the Xochimilco canals, México City. *Salud Pública,* 4 389-395.
- Kao, M.C., Chen, F.K., Lui, J.K., Chou, M.S y Chen, C.S. 2006. Enzymatic degradation of nitriles by *Klebsiella oxytoca*. *Appl. Microbiol. Biotech.* 71: 228-233.
- Lányi, B. 1987. Classical and rapid identification methods for medically important bacteria. p. 1-68. En Colwell, RR y R. Grigorva (eds) *Methods in microbiology*, vol. 19. Academic Press, London, New York.
- Laguerre, G., Allard, R, M., Revió F., y Amarger, N, 1994. Rapid identification of rhizobia by restriction fragment length polymorphism Analysis of PCR-Amplified 16S rRNA genes. *Appl. Environ. Microbiol.* 60: 56-63.

- Lipschultz, F. y Owens, N.J.P. 1996. An assessment of nitrogen fixation as a source of nitrogen to the North Atlantic Ocean. *Biogeochemistry* 35: 261-274.
- Lui, W., Marsh, L.T., Cheng, H., y Forney, J.L. 1997. Characterization of microbial diversity by determining terminal restriction fragment length polymorphisms of genes encoding 16S Rna. *Applied and Environmental Microbiology*. 63:11 4516-4522.
- Laria, S.G., Hernández, F.R e Hidalgo, C.J. 2003. Fijación de nitrógeno e *Azospirillum* sp. Cámara Agropecuaria y Agroindustrial de Salvador, Ed. Fiagro. San Salvador. pp 23-48.
- Leblanc, A.H., Robert, L., McGraw., Nygren, P. y Roux, L.C. 2000. Neotropical legume tree *Inga edulis* form N<sub>2</sub> fixing symbiosis with fast-growing *Bradyrhizobium* strains. *Plant Soil* 275: 123-133.
- Lehman, L. R., Petrovich, R., Shah, K V., Roberts, P. G y Ludden, W. 1996. Purification and characterization of the alternative nitrogenase from the photosynthetic bacterium *Rhodospirillum rubrum*. *Bacteriol* 178 (5) 1445-1450.
- Marin, A.V., Teixeira, S.R.K. y Baldani, I.J. 2003. Characterization of amplified polymerase chain reaction *glnB* and *nifH* gene fragments of nitrogen-fixing Burkholderia species. *Letters in Applied Microbiology* 36: 77-82.
- Musat, F., Hardeer, J. y Weddel, F. 2006. Study of nitrogen fixation in microbial communities of oil-contaminate marine sediment microcosm. *Environ. Microbiol.* 8:10 1834-1843.
- Neefs, J.M., va de Peer, Y., Hendrinks, L., y Wachter, R. 1999. Composition of small ribosomal sub unit RAN sequences. *Nucl Ac Res.* 18: 2237-2330.
- Olapade, O.A y Leff, L.G. 2006. Influence of dissolved organic matter and inorganic nutrients on the biofilm bacterial community on artificial substrates in a northeastern Ohio, USA, stream. *Canadian Journal of Microbiology*. 52: 540-549.
- Oda, Y., Samanta, K. S., Rey, E. F., Wu, L., Yan, T., Zhou, J y Harwood, C. 2005. Functional genomic analysis of three nitrogenase isozymes

in the photosynthetic bacterium *Rhodospseudomonas palustris*. *J. Bacteriol.* 187 (22) 7784-7794.

Pool, C., Ingwersen, J., Stemmer, M., Gerzabek, M.H y Kandeler, E. 2000. Mechanism of solute transport affect small-scale abundance and function of soil microorganism in the detritusphere. *Appl. Microbiol. Biotech.* 57: 583-595.

Raynaud, X., Lata, C. J., y Leadley, W.P. 2006. Soil microbial loop and nutrient uptake by plants: a test using a coupled C:N model of plant-microbial interactions. *Plant Soil.* 287: 95-116.

Stanier, R. Y., Adelverg, E.A., e Ingraham, J.L. 1976. The microbial world. Prentice-Hall, Inc. Englewood Clifs, New Jersey. 853 p.

Stefan, W., Walter, A. y Alfred, P. 1996. Diversity of uncultured microorganisms associated with the seagrass *Halophila stipulacea* estimated by restriction fragment length polymorphism analysis of PCR-amplified 16S rRNA genes. *Appl. Environ. Microbiol.* 62: 766-771.

Short Protocols in Molecular Biology, Frederick, M., Brent, R., Kingston, R., Mora, D, D., Siedman, J.G, Smith, A, J., y Struhl, K. 1999. Fourth edition. A compendium of methods from, current protocols molecular biology. Board (ed).

Schneider, A., Müller, A., Krahn, E., Hagen, R.W., Wuassink, H y Knüttel, H.K. 1995. The molybdenum nitrogenase from wild-type *Xanthobacter autotrophicus* exhibits properties reminiscent of alternative nitrogenases. *European J. Bioch.* 230: 666-675.

Sunita, G., Alok, K.P y Lata. 2006. Microbial biomass, P-nutrition and enzymatic activities of wheat soil in response to phosphorus enriched organic and inorganic manures. *J. Environ. Sci. Health* 41: 177-187.

Sakami, T., Yokoyama, H. y Ishihi, Y. 2005. Microbial hydrolytic enzyme activity in the sediments of a net cage aquaculture area. *Fish. Sci.* 71: 271-278.

Turcott, V. 1994. Caracterización de la zona de estudio. En: Signoret, M y Pérez, R. (eds). *Productividad planctónica en aguas del Golfo de*

*México y Mar Caribe Noroccidental*. Primer informe al CONACYT (Julio-agosto 1994). México.

- Valdés, M., Pérez, N. O., Estrada de los Santos, P., Mellado, J., Cabriales, P., J. J., Normand, P., y Hirsch M.A, 2005. Non-Frankia actinomycetes isolated from surface-sterilized roots of *Casuarina equisetifolia* fix nitrogen. *Appl. Environ. Microbiol.* 71: 460-466.
- Wolfgang, M., Oliver, S., Sabine, K., Norbert, K., Michael, W., Judith, M., Marianne, B., y Karl, H.S. 2005. Bacterial phylogeny based on comparative sequence analysis (review). *Inter Science*. 19: 554-558.
- Young, J.P.W. 1992. Phylogenetic classification of nitrogen-fixing organisms. p.43-86. in G. Stacey, H.J. Evans, y R.H. Burris (eds.), *Biological nitrogen fixation*. Chapman and Hall, New York, N.Y. p 43-86.
- Zehr, J.P., Mellon M. T and Zani S. 1998. New nitrogen-fixing microorganisms detected in oligotrophic oceans by amplification of nitrogenase (*nifH*) genes. *Appl. Environ. Microbiol.* 6 (9) 3444-3450.

#### Capítulo IV. Conclusiones generales.

Los resultados derivados del presente proyecto de investigación, permiten concluir lo siguiente:

- La colección de los once aislados bacterianos involucra los metabolismos microaerobio estricto y microaerobio facultativo.
- A partir de las pruebas de tolerancia al oxígeno, los aislados no se desarrollan en condiciones de saturación de  $O_2$  ya que no presentan la citocromo oxidasa, enzima que interviene en la desintoxicación de especies reactivas.
- Los resultados del análisis Cluster sugieren que la salinidad es un factor determinante en la diversidad de la comunidad bacteriana microaerofílica con potencialidad de fijar el  $N_2$ , debido a que la mayoría de los aislados se agruparon con base en su procedencia (ecosistema dulceacuícola o marino).
- Se identificaron 25 tipos de ésteres metílicos de ácidos grasos (FAME) en el conjunto de aislados; perfiles característicos fueron detectados en los aislados con influencia marina y dulceacuícola; estos perfiles pueden ser una herramienta quimiotaxonómica para diferenciar e identificar aislados bacterianos.
- Los AG C6:0 y C23:0 fueron exclusivos del bacteriobente proveniente de la laguna de Sontecomapan, en tanto que C20:5n3 fue identificado exclusivamente en aquellos originarios del Golfo de México. Esta característica también fue observada en los fosfolípidos identificados a través del estándar BAME; los tipos C10:0, 3-OH 12:0, 14:0 y 15:0 fueron detectados solamente en las membranas de los aislados del Golfo de México.
- La mayoría de los aislados tolera concentraciones de salinidad hasta de 20 ppm, lo cual se atribuye a su origen salobre y marino en donde se presentan aguas polihalina y eurihalinas. En los aislados del lago de Xochimilco la tolerancia a dicha salinidad se deba a la disolución y precipitación de sodio y magnesio llevada a cabo en los suelos circundantes a la laguna en presencia de ácidos orgánicos.

- La elevada utilización de fuentes de carbono por parte de las especies de bacteriobentos aislado puede deberse a que los sedimentos de los sitios en estudio son ricos en materia orgánica en los que se liberan compuestos asimilables que pueden ser aprovechados por la comunidad bacteriana.
- Los aislados presentaron una elevada actividad heterótrofa ya que fueron capaces de utilizar los diferentes sustratos de carbono y de sintetizar la mayor parte de exoenzimas probadas, fundamentalmente para hidrolizar compuestos orgánicos simples y de cadena larga.
- Se obtuvieron valores significativos de actividad nitrogenasa (ARN) en casi todos los aislados capaces de reducir el acetileno, con valores comprendidos entre 0.059 y 0.069  $\text{N}_2 \text{ L}^{-1} \text{ h}^{-1}$ , incluyendo las cepas de colección.
- No fue amplificado el fragmento del gen *nifH* a partir de ninguno de los aislados, por lo que el potencial de fijación de nitrógeno estimado a través de la reducción de acetileno, puede ser atribuido a la presencia de nitrogenasas alternativas.
- La cepa de referencia de *M. magnetotacticum*, no registrada hasta ahora como diazotrofa, posee un segmento que podría corresponder al gen *nifH*, además de reducir significativamente  $\text{C}_2\text{H}_2$ .
- De acuerdo con la secuenciación del segmento 16S rDNA, la colección de once aislados está conformada por siete especies bacterianas que corresponden a *Caulobacter* sp, *Ochrobacterium anthropi*, *Sphingobium* sp, *Sphingobium amiense*, *Bacillus firmus*, *Bacillus* sp y *Pseudomonas stutzeri*.
- El aislado S46, procedente de los sedimentos de la laguna de Sontecomapan, podría tratarse de una especie nueva debido a que no presentó una alta similitud con ninguno de los organismos contenidos en las bases de datos.