

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA

**UNIDAD XOCHIMILCO
DIVISIÓN DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y DE LA SALUD
DOCTORADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS Y DE LA SALUD**



“Caracterización e identificación bioquímica y molecular de bacterias heterótrofas bentónicas con metabolismo respiratorio microaerófilico y capacidad de fijar el N₂”

T E S I S

**QUE PARA OBTENER EL GRADO DE
DOCTOR EN CIENCIAS BIOLÓGICAS Y DE LA SALUD**

P R E S E N T A

M. en C.A. José Roberto Angeles Vázquez

**CODIRECTORES DE TESIS:
Dra. María Jesús Ferrara Guerrero
Dr. Néstor Octavio Pérez Ramírez**

**ASESOR:
Dr. Daniel Martínez Gómez**

México, D.F. Febrero de 2015

El Doctorado en Ciencias Biológicas y de la Salud de la Universidad Autónoma Metropolitana pertenece al Padrón de Posgrados de Excelencia del CONACYT y cuenta con el apoyo del mismo Consejo con el convenio PFP-20-93.

El jurado designado por la Comisión del Doctorado en Ciencias Biológicas y de la Salud de la UAM (Unidades Cuajimalpa, Iztapalapa y Xochimilco),

aprobó la Tesis que presenta

José Roberto Angeles Vázquez

06 de febrero de 2015

Sinodales:

Dra. María Jesús Ferrara Guerrero (Presidente)



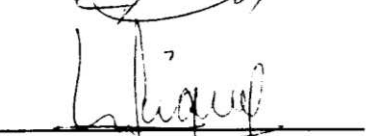
Dr. Néstor Octavio Pérez Ramírez (Secretario)



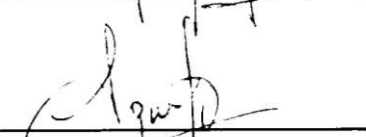
Dr. Daniel Martínez Gómez (Vocal)



Dra. María Soledad Vásquez Murrieta (Vocal)



Dr. Alejandro Alberto Azaola Espinosa (Vocal)



COMITÉ TUTORIAL

Dr. María Jesús Ferrara Guerrero

Profesor Titular "C", Departamento de El Hombre y su Ambiente
Universidad Autónoma Metropolitana-Xochimilco

Dr. Néstor Octavio Pérez Ramírez

Jefe de Investigación y Desarrollo, PROBIOMED, S.A de C.V.

Dr. Daniel Martínez Gómez

Profesor Titular "C", Departamento de Producción Agrícola y Animal
Universidad Autónoma Metropolitana-Xochimilco

SINODALES

Dra. María Soledad Vásquez Murrieta

Profesor Titular "B", Departamento de Microbiología
Escuela Nacional de Ciencias Biológicas, Instituto Politécnico Nacional

Dra. Alejandro Alberto Azaola Espinosa

Profesor Titular "C", Departamento de Sistemas Biológicos
Universidad Autónoma Metropolitana-Xochimilco

El presente trabajo se realizó en el Laboratorio de Ecología Microbiana del Departamento El Hombre y su Ambiente y en el Laboratorio de Microbiología Agropecuaria del departamento de Producción Agrícola y Animal de la División de Ciencias Biológicas y de la Salud. Universidad Autónoma Metropolitana Unidad Xochimilco.

Dedicatorias

A mi madre, que siempre buscó todos los medios para ayudarme a terminar este proyecto en mi vida, gracias por el aliento en los momentos difíciles y por tu gran ejemplo.

A mi hermano Ramón con toda mi gratitud, sin tu solidaridad no hubiera logrado concluir este propósito.

A Viridiana con todo mi cariño.

A Ana y Felipe por todo su respaldo y comprensión.

Agradecimientos

Quiero agradecer infinitamente a la Dra. María Jesús Ferrara Guerrero por la dirección de este proyecto, por buscar siempre los elementos para la ejecución de la presente investigación, por su apoyo incondicional y por incursionarme en este sorprendente universo de la bacteriología.

Al Dr. Néstor Octavio Pérez Ramírez por su invaluable formación en la biología molecular, parte medular de este proyecto.

Quiero agradecer al Dr. Daniel Martínez Gómez toda la disponibilidad, apoyo y asesoría para el desarrollo de la presente investigación.

Al Doctorado en Ciencias Biológicas de la Salud de la Universidad Autónoma Metropolitana, por el apoyo de movilidad realizado en el Instituto de Biología Molecular “Severo Ochoa” de la Universidad Autónoma de Madrid, España.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología por la beca de estudios otorgada (171708).

Al Instituto de Ciencia y Tecnología del Distrito Federal por beca complementaria de estudios otorgada (BI11-188).

Quiero agradecer al proyecto de Movilidad ECOS-ANUIES-CONACYT M10-A01, dentro del acuerdo México-Francia del CONACYT.

Mi enorme agradecimiento al M en C. Alfonso Esquivel Herrera por toda su asesoría en la parte estadística.

Al Dr. Miguel A. Ceballos del Centro de Ciencias Genómicas-UNAM, por la donación de la cepa *Rhizobium etli* CE-3, la cual sirvió de referencia para la amplificación del gen *nifH*.

Agradezco infinitamente los comentarios y correcciones que tan acertadamente fueron hechas al manuscrito de tesis por el jurado externo Dra. María Soledad Vásquez Murrieta y Dr. Alejandro Alberto Azaola Espinosa.

A mis compañeros de laboratorio, Olivia, Pavel, Erika y Melina con los que siempre compartí gratos momentos y horas de trabajo.

Contenido

1. Resumen.....	16
2. Introducción.....	20
3. Marco teórico y antecedentes.....	22
3.1. Descripción y posición taxonómica de bacterias microaeróbicas.....	22
3.2. Generalidades del bacteriobentos en sedimentos Marinos.....	23
3.3 Importancia ecológica del bacteriopláncton y bacteriobentos.....	24
3.4 Diversidad del bacteriopláncton y bacteriobentos en sedimentos y sistemas acuáticos.....	25
3.5 Dinámica de producción del bacteriopláncton y bacteriobentos.....	30
3.6 Influencia del oxígeno en las poblaciones bentónicas y planctónicas.....	31
3.7 Fijación de nitrógeno molecular en bacterias microaerobias.....	34
3.8 Importancia biotecnológica de las bacterias microaerobias.....	39
4. Planteamiento del problema.....	42
5. Hipótesis.....	43
6. Objetivos.....	43
7. Métodos y materiales.....	44
7.1 Descripción de las zonas de estudio.....	44

7.2. Toma de muestras de sedimento.....	46
7.3. Aislamiento, purificación y pruebas de tolerancia al O ₂ de los aislados bacterianos heterótrofos.....	47
7.4. Pruebas morfológicas y fisiológicas.....	47
7.5. Utilización de fuentes de carbono a pO ₂ de 21 y 4%.....	48
7.6. Producción de exoenzimas a pO ₂ de 21 y 4%.....	50
7.7 Identificación de esteres metílicos de los ácidos grasos.....	51
7.8. Fijación de N ₂ por Amplificación del gen <i>nifH</i>	52
7.9. Análisis molecular del segmento 16S rDNA.....	54
7.10. Análisis estadístico.....	56
8. Resultados.....	57
8.1. Tolerancia a la presencia de oxígeno y respuestas morfológicas y fisiológicas.....	57
8.2. Influencia del O ₂ sobre la utilización de fuentes de carbono.....	58
8.3. Influencia del oxígeno sobre la producción de enzimas extracelulares.....	61
8.4. Perfiles de ácidos grasos en membranas celulares.....	63
8.5. Amplificación del gen <i>nifH</i>	65
8.6. Análisis del segmento 16S rDNA.....	66
9. Discusión.....	68
10. Conclusiones generales.....	85
11. Perspectivas de la investigación.....	87

12. Bibliografia..... 89

Índice de figuras.

Figura 1. Proceso de descomposición de la materia orgánica en el sistema de transferencias tróficas (energéticas y materiales).....	25
Figura 2. Esquema de la participación del bacterioplancton en el flujo de materia orgánica en la columna de agua.....	28
Figura 3. Formación de productos intermediarios tóxicos durante la reducción del oxígeno a agua.....	33
Figura 4. Estructura del complejo nitrogenasa.....	35
Figura 5. Reacciones involucradas en el proceso de fijación biológica de nitrógeno.....	36
Figura 6. Regulón <i>nif</i> de <i>Klebsiella pneumoniae</i>	38
Figura 7. Frecuencia relativa en la utilización de las diferentes familias químicas como única fuente de carbono y energía.....	61
Figura 8. Frecuencia relativa en la producción de exoenzimas.....	62
Figura 9. Frecuencia de los AG a partir de su clasificación (saturados, monoinsaturados y poliinsaturados).....	65
Figura 10. Productos amplificados del gen <i>nifH</i> en catorce de los treinta aislados estudiados.....	66
Figura 11. Análisis de componentes principales a partir de sus respuestas a pO ₂ de 21 y 4%.....	69
Figura 12. Análisis Cluster basado en todas las pruebas fisiológicas y bioquímicas realizadas a pO ₂ de 21 y 4%.....	72
Figura 13. Índices medios de producción exoenzimática a pO ₂ de 21 y 4%.....	76

Figura 14. Análisis cluster basado en la diversidad de

ácidos grasos..... 79

Índice de tablas.

Tabla 1. Organismos fijadores de nitrógeno.....	39
Tabla 2. Familias químicas probadas como única fuente de carbono y energía.....	49
Tabla 3. Iniciadores utilizados para la amplificación del segmento <i>nifHD</i>	52
Tabla 4. Condiciones de amplificación del segmento <i>nifHD</i>	53
Tabla 5. Características de los iniciadores PolF y PolR utilizados para amplificar el gen <i>nifH</i>	53
Tabla 6. Condiciones de amplificación del segmento <i>nifH</i>	54
Tabla 7. Características de los iniciadores PolF y PolR utilizados para amplificar el gen <i>nifH</i>	55
Tabla 8. Condiciones de amplificación del segmento 16SrDNA.....	56
Tabla 9. Características fisiológicas de los aislados.....	58
Tabla 10. Respuestas a la oxidación de la glucosa y respiración de NO ₃ a pO ₂ de 21 y 4%.....	60
Tabla 11. Valores IMU e IME en cada uno de los aislados.....	63
Tabla 12. Ácidos grasos identificados y su frecuencia relativa	64
Tabla 13. Especies identificadas a partir las secuencias del segmento 16S rDNA.....	67
Tabla 14. Respuestas de utilización de aminoácidos a pO ₂ de 21 y 4%.....	73
Tabla 15. Respuestas de utilización de azúcares a pO ₂ de 21 y 4%.....	74

Tabla 16. Respuestas de utilización de ácidos orgánicos	
a pO2 de 21 y 4%.....	74
Tabla 17. Respuestas de utilización de ácidos grasos y alcoholes	
a pO2 de 21 y 4%.....	75
Tabla 18. Perfil de ácidos grasos de las especies identificadas así	
como los tipos de AG complementarios.....	81

1. Resumen

Se realizó un estudio sobre la caracterización fisiológica, química, molecular y de la capacidad de fijar el N₂ en treinta aislados bacterianos bentónicos microaeróbicos de vida libre procedentes de los sedimentos de tres diferentes ambientes acuáticos (Golfo de México, laguna de Sontecopaman, Veracruz y canales de la zona ecológica del lago de Xochimilco), se observó la influencia del O₂ sobre la capacidad de hidrolítica extracelular y sobre la utilización de compuestos orgánicos simples como única fuentes de carbono y energía.

La mayoría de los aislados estudiados presentaron un metabolismo microaerobio facultativo, debido a que presentaron una mejor producción de exoenzimas y utilización de una amplia gama de compuestos orgánicos de bajo peso molecular en condiciones de baja oxigenación. A partir de la caracterización molecular morfológica y fisiológica se identificaron diez especies bacterianas, las cuales presentaron una clara diferenciación según los diferentes sitios de estudio, las de origen dulceacuícola como *Caulobacter* sp, *Pseudomonas stutzeri*, *Ancalomicrobium adetum*, *Agrobacterium* sp, *Rhizobium* sp, *Delta Protobacterium*, *Sphingomonas* sp y las de origen marino *Bacillus* sp, *Micobacterium* sp, *Bacillus aquamaris*. Ocho secuencias del segmento 16S rDNA no tuvieron similitud con ninguna especie descrita, por lo que podría tratarse de nuevas especies del bacteriobentos microaerobio de vida libre.

Se observó que algunos tipos de ácidos grasos podrían servir como biomarcadores de especies del bacteriobentos ya que fueron exclusivos de ciertas especies ej.

Caulobacter sp presentó el AG C18:0, *Bacillus aquamaris* los tipos C15:0, C18:2n6c, C18:2n6t y C20:2 y *Bacillus* sp el C4:0.

Catorce aislados son diazotrofos ya que presentaron el gen *nifH* y por lo tanto juegan un papel importante en el reciclamiento de nitrógeno y en la productividad biológica en los ambientes acuáticos donde se encuentran.

Palabras clave: Bacteriobentos, FAME, *nifH*, 16s rDNA, sistemas acuáticos,

1. Abstract

A study was carried out on the physiological, chemical, molecular characterization and the N₂ fixing capacity of thirty free life benthic microaerophilic bacterial isolates from the sediments of three different aquatic environments (Gulf of Mexico, Sontecomapan lagoon, Veracruz and channels of the ecological zone of the lake of Xochimilco). The influence of the O₂ on the extracellular hydrolytic capacity and, the utilization of simple organic compounds as simply sources of carbon and energy were observed.

The majority of the isolates studied presented a facultative microaerobic metabolism, as they presented a better production of exo-enzymes and they use a large range of low molecular weight organic compounds in low oxygenation conditions. Ten bacterial species, showing clear differentiation according to the different sites of study, were identified from the morphologic and physiological molecular characterization: those of fresh water origin like *Caulobacter sp*, *Pseudomonas stutzeri*, *Ancalomicrobium adetum*, *Agrobacterium sp*, *Rhizobium sp*, *Delta Protobacterium*, *Sphingomonas sp*, and those of marine origin *Bacillus sp*, *Micobacteriumsp*, *Bacillus aquamaris*. Eight sequences of the segment 16S rDNA did not have similarity with any species described, reason why it could be new species of free life microaerobic bacterio-benthos.

It was observed that some types of fatty acids could be used as bacterio-benthos species biomarkers since they were exclusive of certain species (ex. *Caulobacter sp* presented the type AG C18:0, *Bacillus aquamaris* types C15:0, C18:2n6c, C18:2n6t and C20:2, and *Bacillus sp* type C4:0).

Fourteen isolates are diazotrophic since they presented the gene *nifH* and therefore they play an important role in the nitrogen recycling and the biological productivity in aquatic environments where they are living.

Key words: Bacterio-benthos, FAME, *nifH*, 16s rDNA, aquatic systems.

2. Introducción.

En los cuerpos de agua la actividad biológica y química son, junto con el oxígeno, indicadores de calidad. La distribución vertical del oxígeno en el sistema, está determinada por las condiciones físicas y químicas prevalecientes y a su vez, la distribución bacteriana está controlada por la disponibilidad en aceptores terminales de electrones, la biodisponibilidad de compuestos orgánicos y la producción biológica (Lipschultz y Owens 1996).

En los sistemas acuáticos someros, la degradación de la materia orgánica se realiza en los primeros centímetros de sedimentos, sobre todo en la interfase agua-sedimento en donde existe gran cantidad de compuestos orgánicos semidegradados sedimentados; y es en esta zona donde las bacterias microaerófilas juegan un papel importante en la degradación de dichos compuestos (Hansen *et al*, 1980).

Dentro de las comunidad bacteriana microaerófila, se encuentran muchos géneros diazotrofos que representan un potencial biológico de fijación de N₂ en los sistemas acuáticos, durante este proceso se satisface la demanda de compuestos nitrogenados que son elementos imprescindibles para el metabolismo de los productores primarios y secundarios (Musat *et al.*, 2006).

Algunas bacterias microaerófilas presentan una importancia biotecnológica como en el caso de algunos géneros de la familia Azotobacteriaceae, la cual agrupa géneros utilizados en la producción agrícola a gran escala, debido a su utilización como biofertilizantes nitrogenados (Reis *et al.*, 2000; Baldini *et al.*, 1997). Otro ejemplo representativo de la utilización de microorganismos microaerófilos son las especies del género *Clostridium* y *Rodobacter*, los cuales se utilizan en el proceso de fermentación alcohólica y en la industria avícola y acuícola (Atlas y Bartha, 2006).

De acuerdo al importante papel que desempeñan los microorganismos microaerófilos tanto ecológicamente como biotecnológicamente y debido a la escasez de información que existe sobre la diversidad de especies bacterianas microaerófilas presentes en ecosistemas acuáticos, el presente proyecto pretende identificar y caracterización fisiológica, química y molecular a treinta aislados bentónicos procedentes de los sedimentos de tres ecosistemas acuáticos (Lago de Xochimilco, Laguna de Sontecomapan, en el estado de Veracruz y zona costera del sureste del Golfo de México), así como evaluar su capacidad de fijar el N_2 .

3. Marco teórico y antecedentes

3.1. Descripción y posición taxonómica de bacterias microaeróbicas.

De acuerdo al manual Bergey (Holt *et al.*, 1994), la mayor parte de las bacterias microaeróbicas forman parte del grupo de los bastones helicoidales/vibroides y cocos Gram negativos, quimioorganotrofos o quimiolitótrofos (incluyendo los oxidadores de iones de hierro y sulfuros). Algunas de ellas pertenecen al grupo de las bacterias fotótrofas y algunas especies presentan potencialidad para fijar el nitrógeno molecular. Entre los microaeróbicos se encuentran también algunos patógenos (Ferrara-Guerrero y Angeles-Vázquez, 2008).

Las bacterias microaerobias se definen como aquellas que utilizan el O₂ como aceptor de electrones en la vía respiratoria de producción de energía y presentan un crecimiento óptimo a bajas concentraciones de oxígeno, utilizando a este como aceptor terminal de electrones para sus procesos metabólicos (Atlas y Bartha, 2006). La presión parcial de oxígeno necesaria para el desarrollo de este grupo metabólico fluctúa entre 0.05 y 7% (Ferrara-Guerrero y Bianchi, 2000; Reddy y Lodha, 1986).

Madigan *et al.*, (2011) define a los microorganismos microaerobios como organismos aeróbicos que pueden crecer solamente cuando la tensión de oxígeno es inferior a la del aire (pO₂ 21%).

Como este grupo metabólico está condicionado a bajas concentraciones de O₂, este es uno de los reactantes más importantes, su disponibilidad tiene un impacto muy grande en el potencial redox del ambiente, pero también en los procesos energéticos de los microorganismos. La oxidación del NAD (E₀'=-320mV) acoplado a la reducción del O₂ en agua (E₀'=-320mV) provoca un cambio de energía libre (ΔG°) de -220 kJ mol⁻¹,

mientras que la misma reacción acoplada con la reducción del CO₂ hasta CH₄ ($E_0' = -224\text{mV}$), provoca un cambio de energía libre de solo -15 kJ mol^{-1} (Thauer *et al.*, 1977).

Los procariotas tienen en su requerimiento de oxígeno o en su tolerancia a la presencia del mismo, por lo que pueden ser clasificados como aerobios o anaerobios. Los aerobios estrictos requieren siempre la presencia de O₂ y lo usan como principal aceptor terminal de electrones en su sistema de transporte electrónico (proceso oxidativo que permite la síntesis de ATP). Los aerobios facultativos pueden llevar a cabo una respiración aerobia o fermentación en presencia de oxígeno o una respiración aerobia o fermentación en ausencia de O₂ o una respiración aerobia en su presencia, ya que pueden utilizar aceptores terminales de electrones alternativos, como el nitrato o los sulfatos. Así, aunque no se requiere oxígeno, el crecimiento de los microorganismos facultativos es mejor en su presencia debido a su mayor producción de ATP durante la respiración aerobia.

En lo que se refiere a las bacterias microaeróbicas, los criterios para definir las son pocos satisfactorios, en general los microaeróbicos son microorganismos que requieren oxígeno como aceptor terminal de electrones, pero que crecen mejor a niveles de oxígeno significativamente más bajos que las concentraciones atmosféricas. Los anaeróbicos estrictos llevan a cabo la fermentación o respiración anaerobia y muchos mueren por exposición al O₂, aunque algunos son aerotolerantes y sobreviven (pero no crecen) en su presencia (Ferrara-Guerrero y Angeles-Vázquez, 2008).

3.2 Generalidades del bacteriobentos en sedimentos marinos

En los mares y océanos, solo el 10% de materia orgánica es remineralizada y degradada, en estos sistemas abiertos la penetración de O₂ hasta los sedimentos es

casi nula, llegándose incluso a encontrar procesos de sulfatorreducción a 150 o 200 m de profundidad, los compuestos orgánicos son degradados principalmente en la zona óxica, dejando gran material de compuestos orgánicos sin ser descompuestos, los cuales se acumulan en los sedimentos anóxicos o semióxicos que son grandes reservorios de nutrientes orgánicos e inorgánicos, justo en la interface agua-sedimento las actividades microbianas plántonicas y bentónicas tienen un papel relevante ya que en esta fracción se encuentran altas concentraciones de partículas orgánicas los cuales cuando son removidos por efectos de ciclones, tormentas o por cualquier episodio meteorológico son exportados a la columna de agua enriqueciendo la zona óxica (Azam y Long, 2001)

3.3 Importancia ecológica del bacterioplancton y bacteriobentos

Como ya se ha mencionado, las bacterias microaerobias utilizan el O_2 como aceptor terminal de electrones durante su metabolismo aerobio por lo que juegan un papel fundamental en el reciclado de la materia orgánica e inorgánica en los sistemas acuáticos (Azam y Long, 2001). Dentro de las principales funciones de las bacterias heterótrofas microaeróbicas se encuentra la vinculación entre los procesos de producción primaria y secundaria, ya que propician la reintroducción de compuestos inorgánicos en el sistema y producen biomasa microbiana susceptible de servir como alimento a organismos detritívoros. Con esta nueva concepción, el proceso de descomposición deja de tener un carácter terminal para adquirir uno central en el control del sistema (figura 1) regulando la dinámica de nutrientes del sistema, y actuando de vía de redistribución de la energía. Todo esto hace que tenga también importantes efectos en la estabilidad del ecosistema (Wetzel, 1999).

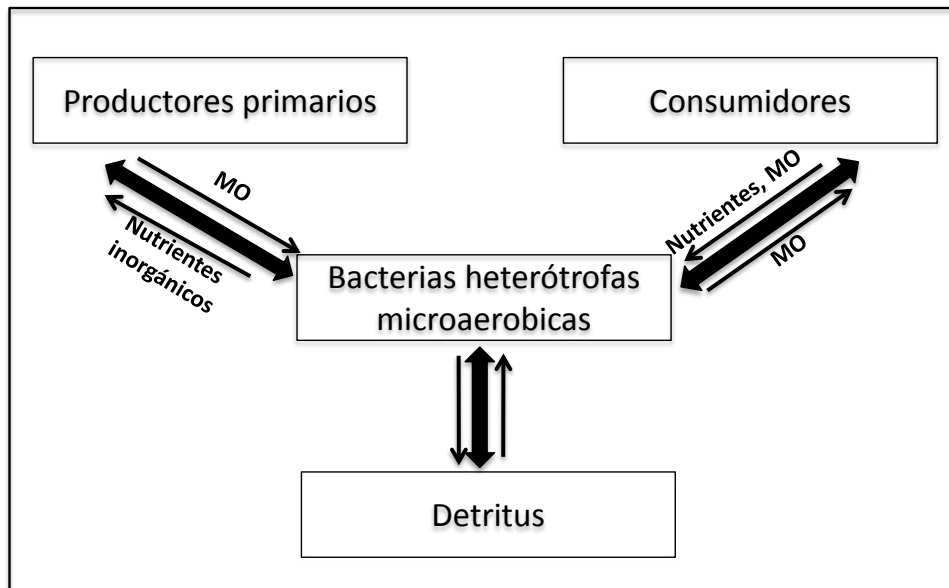


Figura 1. Proceso de descomposición de la materia orgánica en el sistema de transferencias tróficas (energéticas y materiales) (Álvarez, S. 2005).

3.4 Diversidad del bacterioplancton y bacteriobentos en sedimentos y sistemas acuáticos

Recientemente se ha encontrado nuevas especies bacterianas en ecosistemas microbianos bentónicos, principalmente sedimentos, en la zona de mínimo oxígeno (ZMO), constituida de un conjunto aún no claramente descrito, de grandes y diversas formas bacterianas principalmente filamentosas, similares en su forma a bacterias descritas a partir de fósiles del período precámbrico (Gallardo *et al.*, 2008).

En estudios realizados en los sedimentos de la provincia de Camagüey (Cuba), fueron aisladas 360 cepas de bacterias, pertenecientes a las familias Achromobacteriaceae, Azotobacteriaceae, Bacillaceae, Brucellaceae, Corynebacteriaceae, Cytophagaceae, Micrococcaceae, Neisseriaceae, Pseudomonadaceae y Spirillaceae; y en aguas eutróficas los géneros: *Azotobacter*, *Moraxella*, *Proteus* y *Citrobacter*. Igualmente, sólo encontramos en esta zona cepas pertenecientes a los géneros *Sarcina*,

Staphylococcus, *Yersinia* y *Neisseria*, y algunas cepas pertenecientes al grupo de las Enterobacterias (González, 2000).

También se han encontrado especies no antes descritas de bacteriobentos en sedimentos del mar de Chile pertenecientes a los géneros *Thioploca* y *Beggiatoa*. Investigaciones posteriores han demostrado que estas especies se encuentran asociados a procesos llevados a cabo en aguas de fondo y sedimentos con baja concentración de oxígeno, lo cual señala una abundancia de sulfuro de hidrógeno (H₂S) y de nitratos (NO₃⁺), es decir, de una molécula reducida y de una oxidada, las que al reaccionar, permiten a las bacterias obtener la energía suficiente para desarrollar sus actividades metabólicas y sintetizar materia orgánica viva fijando el dióxido de carbono presente en el agua en un proceso bioquímico que se denomina quimiosíntesis (Teske *et al.*, 1999).

La abundancia del bacterioplancton y bacteriobentos heterótrofo también ha sido estudiado en lagos antárticos y en lagos con latitudes templadas con similares características tróficas, encontrándose densidades comprendidas entre 10³-10⁶ cel UFC/ml⁻¹, incluso en los sistemas oligotróficos (Laybourn-Parry, 2002). Lo que se considera una elevada abundancia y conlleva a que el bacterioplancton heterótrofo pueda representar una significativa porción de la biomasa microbiana total (Mou *et al.*, 2007).

Recientemente se han comenzado a publicar los primeros estudios utilizando técnicas de taxonomía molecular que muestran la diversidad del bacterioplancton de los lagos antárticos, lo que abre una nueva puerta al estudio de la diversidad y sus variaciones asociadas a factores específicos en estos ecosistemas dominados por microorganismos (Pearce *et al.*, 2003; Pearce, 2000).

Un ecosistema está influenciado e incluso controlado, por las actividades microbianas. Los procesos metabólicos realizados por los microorganismos requieren la obtención de nutrientes del ecosistema y de su uso para conservar sus poblaciones, esta actividad es tan imprescindible que modifican gran parte de la actividad trófica y por consiguiente las características físicas y químicas del ambiente, por ejemplo, en sistemas acuáticos el oxígeno molecular es vital para la mayoría de los microorganismos pero resulta tóxico para otros. Si los organismos aerobios consumen el O_2 lo agotan en el ambiente convirtiéndolo en subóxico o anóxico, esta condición favorece el crecimiento de organismos microaerobios o anaeróbicos, que se encuentran en el ambiente pero que son incapaces de crecer en condiciones aeróbicas; por ello a medida que exista una sucesión de tipos metabólicos microbianos estos cambian las características del hábitat, lo que implica una dinámica trófica (Madigan *et al.*, 2011; Roszak y Colwell, 2002).

De igual manera, el bacteriopláncton juega un papel fundamental en la descomposición de la materia orgánica presente en la columna de agua así como el bacteriobentos en los sedimentos, dando como resultado el reciclamiento de las principales familias químicas como son el nitrógeno, fósforo, azufre y otros elementos traza, los cuales pueden ser aprovechados principalmente por el fitopláncton en la producción primaria (Murell, 2003; Legendre y Razzoulzadegan, 1999).

Así mismo, durante el proceso de mineralización de la materia orgánica se produce biomasa bacteriana la cual puede ser transferida a niveles tróficos superiores a través de los microdepredadores (Servais *et al.*, 1999; Azam, 1998), de manera que esta comunidad puede tener un efecto importante sobre el metabolismo y función del

ecosistema (Bacelar-Nicolau *et al.*, 2003). La participación del bacterioplancton en las redes tróficas acuáticas se esquematiza en la figura 2.

Este nuevo concepto ha confirmado que la actividad metabólica bacteriana es altamente significativa y ha cambiado el concepto sobre el papel de las bacterias en la transformación y flujos de carbono y nitrógeno en la columna de agua y sedimentos de ambientes marinos, pasando de ser simplemente mineralizadoras de partículas de detritus a recicladores y competidores por nutrientes orgánicos e inorgánicos junto con el fitopláncton (Zehr y Ward, 2002).

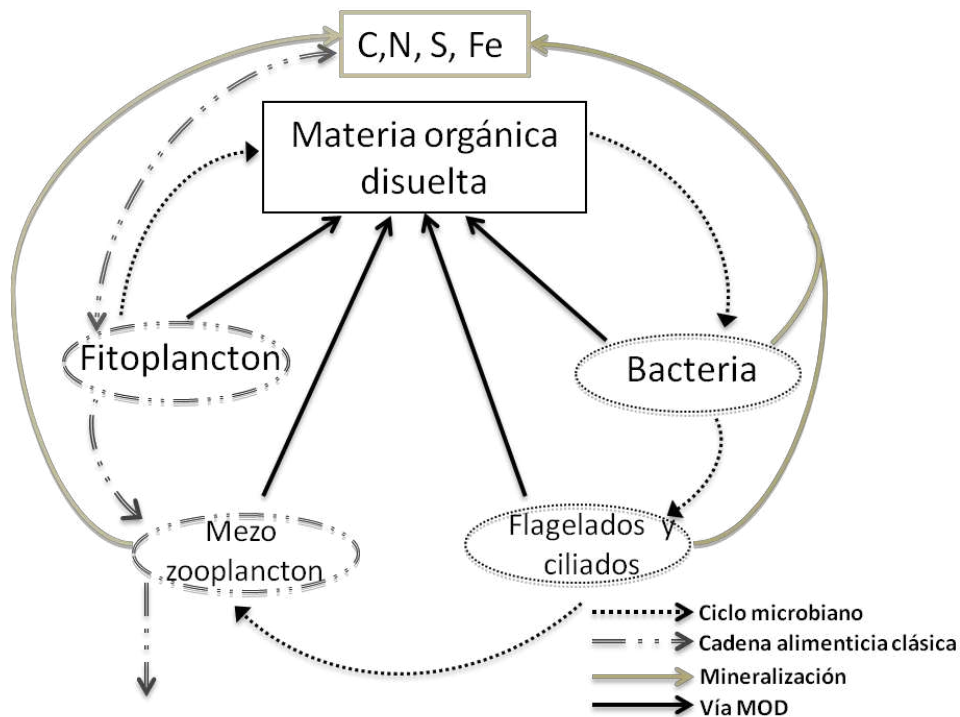


Figura 2. Esquema de la participación del bacterioplancton en el flujo de materia orgánica en la columna de agua (Mecalco, 2010).

La determinación de la composición de las poblaciones bacterianas, la abundancia de cada grupo metabólico y la discriminación de sus diferentes actividades es esencial para el entendimiento de la ecología planctónica y del balance entre la producción y

consumo de materia orgánica, así mismo su biomasa juega un papel importante en los procesos biogeoquímicos que toman lugar en los ecosistemas acuáticos (Morán *et al.*, 2007; Cotner y Biddanda, 2002).

En ambientes estuarinos como las lagunas costeras, los principales factores que controlan la abundancia y producción del bacterioplancton y bacteriobentos son la temperatura, la salinidad, disponibilidad de sustrato, concentración de nitrógeno y fósforo, depredación y lisis viral (Barrera-Alba *et al.*, 2008).

Particularmente, las lagunas costeras, a diferencia de las aguas oceánicas y costeras se caracterizan por presentar heterogeneidad tanto espacial como temporal determinada por la dinámica de entrada y mezcla de agua dulce y marina, ocasionando marcados gradientes en salinidad, concentración de nutrientes y turbidez, de manera que la distribución y abundancia del bacterioplancton presenta una distribución a lo largo del gradiente físico y químico el cual va del ambiente continental al marino (Almeida *et al.*, 2001).

Por otro lado, se ha demostrado que en los ecosistemas dulceacuícolas y marinos la abundancia y producción del bacterioplancton están correlacionados positivamente con la biomasa (clorofila *a*) o la producción fitoplanctónica (Azam y Cho, 1990); no obstante, esta relación no puede considerarse universal, ya que las zonas costeras y estuarios reciben partículas minerales y orgánicas tanto de fuentes autóctonas como alóctonas (Li *et al.*, 2004), de manera que el abastecimiento de sustrato alóctono proveniente de las descargas terrestres aunado a la fuente autóctona proveniente de los exudados fitoplanctónicos, pueden también ser el soporte de las demandas de nitrógeno y carbono del bacteriopláncton (Shiah y Ducklow, 1994).

Esto ha generado diversas interpretaciones en cuanto al papel que juega el

bacterioplancton y bacteriobentos, y si estos pueden actuar como enlace para la producción herbívora en la cadena alimenticia clásica por reciclamiento de carbono perdido en forma de exudados algales, heces y residuos alimenticios del zooplancton y la consecuente producción de biomasa, o como sumidero al competir con el fitoplancton por los nutrientes limitantes (Murell, 2003).

Actualmente, una de las mayores líneas de investigación en ecología microbiana es determinar la fracción de la comunidad bacteriana metabólicamente activa, debido al interés que existe en conocer los factores involucrados en la activación e inactivación de las células; esto puede conducir a obtener información acerca de los cambios en los microhábitats bacterianos los cuales pueden controlar este comportamiento (Dufour *et al.*, 1990) en este sentido se ha observado que existe un aumento en la fracción activa de la comunidad cuando aumenta la productividad del sistema (Lebaron *et al.*, 2001).

3.5 Dinámica de producción del bacteriopláncton y bacteriobentos

Recientemente se han realizado una serie de investigaciones para evaluar las diferentes fracciones del bacteriopláncton y bacteriobentos en ecosistemas acuáticos tropicales mexicanos en diferentes épocas del año, las cuales confirman la presencia de fracciones con alto y bajo contenido de DNA, las cuales pueden ser observadas a través de epifluorescencia y luz dispersada, se ha observado una mayor abundancia de células en la temporada de nortes (5.79×10^6 cel por mL), disminuyendo en lluvias y alcanzando el mínimo en la temporada de secas (4.70×10^6 cel por mL), sin embargo, estas diferencias no fueron estadísticamente significativas ($p > 0.05$).

Espacialmente, la distribución de la abundancia total y por fracciones del bacteriopláncton a lo largo del gradiente de salinidad presenta una tendencia significativa a disminuir en las zonas con mayor salinidad (Mecalco, 2010).

3.6 Influencia del oxígeno en las poblaciones bentónicas y planctónicas

Debido a su potencial redox positivo, el oxígeno molecular es uno de los reactantes más importantes en los ciclos biogeoquímicos. La disponibilidad del O_2 tiene un fuerte impacto en el potencial redox del ambiente, y por consiguiente en los procesos energéticos de los microorganismos. La oxidación del NAD ($E_0'=-320$ mV) acoplado a la reducción del oxígeno hasta agua ($E_0'=+818$ mV) provoca un cambio en energía libre (ΔG°) de -220 kJ mol⁻¹, mientras que la misma reacción acoplada con la reducción del CO_2 hasta CH_4 ($E_0'=-22$ mV) provoca un cambio de energía libre de solo -15 kJ mol⁻¹ (Ferrara-Guerrero y Angeles-Vázquez, 2008).

A pesar de que el O_2 es el principal aceptor terminal de electrones en su sistema de transporte electrónico, también presenta un efecto citotóxico ya que además de la forma gaseosa, el O_2 puede existir en varias formas altamente reactivas y tóxicas para las células, a menos de que posean mecanismos para destruirlas. La forma singulete del O_2 (1O_2) es un estado altamente energético que causa oxidación espontanea del material celular, en particular el bacteriopláncton expuesto a la zona fótica está expuesto a la forma singulete de oxígeno que se forman durante las reacciones fotoquímicas y fotótropas. Otras especies tóxicas del O_2 durante su reducción hasta agua en la respiración (figura 3) son el peróxido de hidrógeno (H_2O_2), los radicales peróxido (O_2^-), los hidróxilo ($^\circ OH$) y el radical hidroperoxilo (HO_2), estos son particularmente destructivos y reaccionan rápidamente con los componentes celulares (Munn, 2004).

En los sedimentos de los ecosistemas acuáticos las concentraciones de oxígeno disponible son bajas lo que permite que se formen biotopos con concentraciones de oxígeno menores a 5% (aproximada de 10 μM de O_2 disuelto en el agua) las cuales son consideradas zonas microoxicas. Un ejemplo de hábitats microoxicos es el que se presenta en los nódulos de raíces de leguminosas con concentraciones inferiores a 1 μM , estas condiciones de oxigenación promueve el crecimiento de bacteria simbióticas diazotrofas (e.j *Rhizobium* o *Bradyrhizobium*). Para su crecimiento las bacterias microaerobias requieren O_2 , sin embargo, en elevadas concentraciones éste actúan como inhibidor. Las oxidasas terminales de estas bacterias tiene aparentemente bajos valores de K_m (afinidad de una enzima por su sustrato) a concentraciones de O_2 por debajo de 1 μM (Imhoff, 2006).

Con tantas formas tóxicas derivadas del oxígeno no resulta sorprendente que los organismos hayan desarrollado enzimas para destruir estos compuestos, el superóxido y el peróxido de hidrógeno son las formas tóxicas más frecuentes, de modo que las enzimas que destruyen estos compuestos tienen una amplia distribución. La enzima catalasa ataca el peróxido de hidrógeno formando oxígeno y agua, otra enzima que destruye el peróxido de hidrógeno es la peroxidasa que difiere de la catalasa en que requiere un reductor, normalmente el NADH, para originar solo H_2O como producto, el superóxido es destruido por la enzima superóxido dismutasa que combina dos moléculas de superoxido para formar una molécula de peróxido de hidrógeno, y una molécula de oxígeno; la acción conjunta de la superóxido dismutasa y la catalasa puede por tanto convertir el peróxido de hidrógeno a agua, las enzimas que participan en la destrucción de derivados tóxicos del oxígeno se observan en la figura 3 (Madigan *et al.*, 2011).

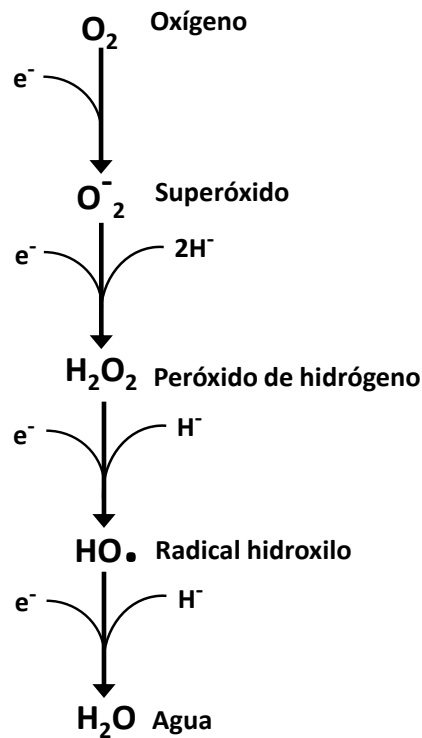


Figura 3. Formación de productos intermedios tóxicos durante la reducción del oxígeno a agua (tomado de Munn, 2004)

Los microorganismos aerobios y facultativos contienen por lo general, tanto superóxido dismutasa como catalasa. La superóxido dismutasa es imprescindible en las células aerobias y su ausencia en los anaerobios obligados se pensó que era la causa por la que el oxígeno resulta tóxico para estas células. Algunas *Archeas* anaerobias obligadas presentan la enzima superóxido reductasa que se encarga de la eliminación del superóxido, a diferencia de la superóxido dismutasa, la superóxido reductasa reduce el anión superóxido a H_2O_2 sin la producción de O_2 , con lo que se evita la exposición del organismos al O_2 .

3.7 Fijación de nitrógeno molecular en bacterias microaerobias

La fijación biológica del nitrógeno se define como el proceso de reducción del nitrógeno atmosférico hasta amoníaco, el cual es transformado posteriormente a su forma orgánica durante la biosíntesis celular. La incorporación directa del nitrógeno atmosférico se encuentra muy limitada en su distribución, esto ocurre solo en ciertas especies de bacterias y arqueas incluyendo fotótrofos y quimiolitótrofos, este proceso depende de la actividad de la enzima Nitrogenasa. La estequiometría global de reducción del nitrógeno en condiciones óptimas es la siguiente:

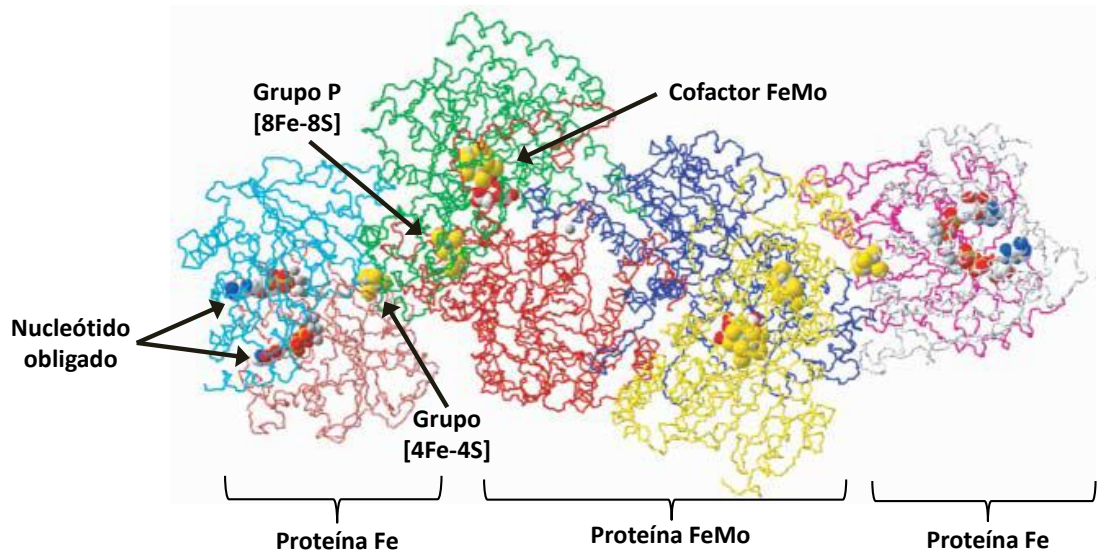


(Munn, 2004; Angeles-Vazquez, 2007).

La Nitrogenasa es la responsable de catalizar la reducción de N_2 a amonio y está constituida por dos metaloproteínas, la ferroproteína o nitrogenasa reductasa, y la ferromolibdoproteína o dinitrogenasa. La primera es un homodímero ($\alpha:\alpha$), y la segunda es un tetrámero ($\alpha:\alpha:\beta:\beta$) que contiene dos grupos fosfato, un grupo 8Fe-7S y el otro de Mo:7Fe-9S que constituye el cofactor conocido como FeMoco (cofactor hierro molibdeno), a nivel del cual ocurre la reducción del N_2 , aunque se desconoce cómo y dónde se une el sustrato para ser activado (Figura 4) (Black *et al.*, 2012).

La Fe-proteína, activada por ATP-Mg, transfiere los electrones a la nitrogenasa que a su vez los distribuye entre N_2 y protones para producir amonio e hidrógeno. Esta reducción de protones es siempre concomitante con la producción de amonio, supone

una pérdida de eficiencia del proceso en la parte correspondiente a la energía que se consume por parte de las células, estos procesos se explican en la figura 5 (Dixon y Kahn, 2004; Kim y Rees, 1992).



Tomado de Black *et al.*, 2012

Figura 4. Estructura del complejo nitrogenasa que es formado por Fe y proteínas MoFe, las subunidades de los dos dímeros de proteínas Fe son de color celeste, marrón, rosa y gris. Las subunidades α de la proteína MoFe son de color verde y amarillo, con β-subunidades en rojo y azul. Los grupos metálicos sensibles al oxígeno y los nucleótidos unidos a estos, se muestran en el espacio de relleno.

Algunas especies microbianas están provistas de una actividad hidrogenasa que recicla en parte la energía perdida por la liberación de hidrógeno (figura 5). La enzima nitrogenasa es fácilmente inactivada por oxígeno, de tal forma que todos los sistemas fijadores han desarrollado estrategias especiales para protegerse de concentraciones elevadas de este elemento y evitar su inactivación. Estas estrategias van desde la anaerobiosis total, como en el caso del género *Clostridium*, a la producción de gran cantidad de polisacáridos extracelulares que actúan como un filtro contra el oxígeno, la exclusión metabólica como en el caso de *Azotobacter* y la compartimentación, en el caso de las cianobacterias. En la simbiosis *Rhizobium*-leguminosa, la estructura del

nódulo crea el ambiente microaerobio adecuado y la leghemoglobina facilita el transporte de oxígeno al bacteroide para soportar el metabolismo aerobio requerido para obtener la energía necesaria para la reducción del N (Miletto *et al.*, 2008; Rachael *et al.*, 1999).

Algunas bacterias y arqueas fijadoras de nitrógeno producen nitrogenasas que no tienen molibdeno en condiciones en las que el Mo está ausente o escasea; estas nitrogenasas alternativas, contienen vanadio o hierro en lugar de Mo y carecen de cofactores similares al FeMo-co:FeVa-co en la nitrogenasa con vanadio, y en la nitrogenasa con hierro, una agrupación de hierro y azufre que se parece al FeMo-co y al FeVa-co, pero que carecen de Mo y V.

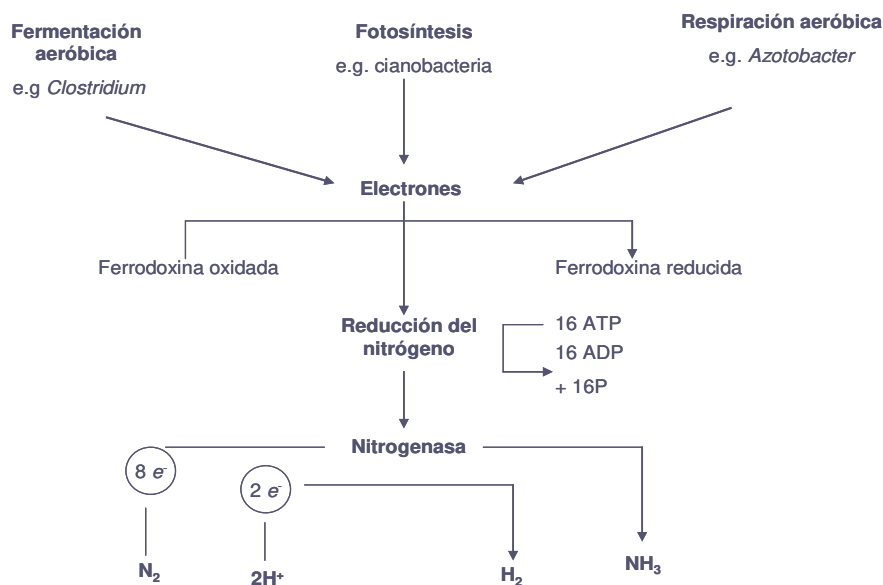


Figura 5. Reacciones involucradas en el proceso de fijación biológica de nitrógeno.

Tomado de Angeles-Vázquez, 2007

Las nitrogenasas alternativas no se sintetizan cuando hay presencia de suficiente molibdeno, ya el molibdeno es uno de los principales constituyentes de la Nitrogenasa.

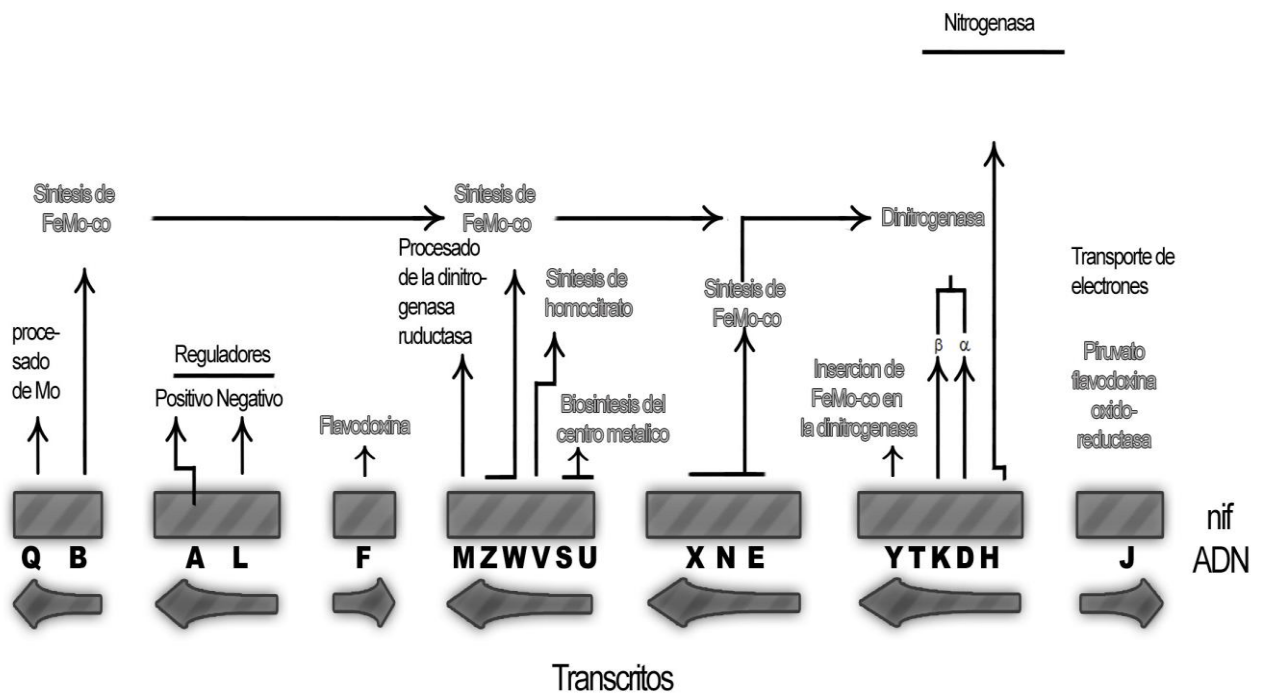
En cambio, las nitrogenasas alternativas parecen funcionar como un “sistema de seguridad” para mantener la fijación de N cuando en el ambiente escasea el molibdeno (Madigan *et al.*, 2011; Dixon y Kahn, 2004)

La principal limitante que afecta las propiedades de la enzima Nitrogenasa son las elevadas concentraciones de O₂, por lo que las condiciones microaerobicas son las óptimas para la fijación bacteriana del N₂ por la vía convencional de la reductasa de la dinitrogenasa ya que esta condición le permite contar sólo con el O₂ necesario para su respiración pero la nitrogenasa no se inhibe (Kim y Rees, 1992).

Los genes involucrados en la fijación biológica de N₂ es una secuencia de ADN altamente conservada que codifica los aminoácidos para la síntesis de la dinitrogenasa y la dinitrogenasa-reductasa. Los genes que involucran a todas las reacciones relacionadas con la fijación de N₂ son los llamados genes *nif*, que es gran regulón de 20 genes (figura 6), de este conjunto los genes *nifDKH* regulan las proteínas estructurales de la dinitrogenasa (la proteína Mo) y reductasa dinitrogenasa (la proteína de Fe), es por ello que para evidenciar la capacidad fijadora de nitrógeno en procariontes es necesario amplificar estos genes; el resto de los genes *nif* participan en la síntesis de FeMo-co y controlan las proteínas de transporte de electrones y una serie de genes reguladores (Santruckova *et al.*, 2010). El regulón *nif* se ilustra en la figura 6.

Diversos organismos que habitan en el suelo y sedimentos son capaces de fijar el nitrógeno aeróbicamente. El género *Azotobacter* incluye bacilos Gram negativos de gran tamaño, que son capaces de fijar el N₂ de forma libre (no simbiótica), en cultivos aeróbicos *in vitro* sin ninguna fuente de nitrógeno en el medio de cultivo, utilizando únicamente el N₂ contenido en el aire. La mayoría de las bacterias fijadoras de N₂ de vida libre son filogenéticamente alfa-beta o gamma protobacteria (Forchhammer, 2004).

Los restantes géneros clave de bacterias fijadoras de N_2 de vida libre, incluyen *Azomonas*, este género es más representativo en ambientes acuáticos (las cuales no producen quistes) y tienen forma de cocobacilar; así como los géneros *Derxia* y *Azospirillum*, el primero es un género propio de suelos ácidos los cuales presentan forma intermedia de entre bacilos y espirilos y forman asociaciones no simbióticas con plantas (Madigan, 2011). Los géneros de bacterias fijadoras de nitrógeno de vida libre



producto del gen *nif I*. Los ARNm que se transcriben se muestran por debajo de los genes, las flechas indican la dirección de la transcripción.

Tomado de Madigan *et al.*, 2011

Tabla 1. Organismos fijadores de nitrógeno.

Aerobios de vida libre/ anaerobios facultativos ^a			Anaerobios de vida libre			Simbióticos	
Quimiorganótrofos	Fotótrofos	Quimiolitótrofos	Quimiorganótrofos	Fotótrofos	Quimiolitótrofos ^c	Plantas leguminosas	Plantas no leguminosas
<i>Azotobacter</i>	Cianobacterias	Alcaligenes	<i>Clostridium</i>	<i>Chromatium</i>	<i>Methanosarcina</i>	Soja, guisante,	Alnus, Myrica
<i>Azomonas</i>		<i>Thiobacillus</i>	<i>Desulfovibrio</i>	<i>Thiocamsa</i>	<i>Metanococcus</i>	trébol, acacia,	Ceanothu,
<i>Agrobacterium</i>		<i>Acidithiobacillus</i>	<i>Desulfobacter</i>	<i>Chlorobium</i>	<i>Methanobacterium</i>	etc, en asociacion	Casuarina
<i>Klebsiella</i> ^b		<i>Strptomycetes</i>	<i>Desulfotomaculum</i>	<i>Chlorobacillum</i>	<i>Methanolobus</i>	con bacteria de	en asociación
<i>Beijerinikia</i>		<i>Thermoautotrophicus</i>		<i>Heliozacillus</i>	<i>Methanocaldococcus</i>	<i>Rhizobium</i>	con actiomicetos
<i>Bacillus polymyxa</i>				<i>Heliophilum</i>	<i>Methanospirillum</i>	<i>Bradyrhizobium</i>	de los géneros
<i>Mycobacterium flavum</i>				<i>Helioestis</i>		<i>Sinorhizobium</i>	<i>Frankia</i>
<i>Azospirillum lipoferum</i>				<i>Helicobacterium</i>		<i>Azorhizobium</i>	<i>Anabaena</i>
<i>Citrobacter freundii</i>				<i>Rhodospirillum</i>			
<i>Acetobacter diazotrophicus</i>				<i>Rhodopesuedomonas</i>			
<i>Methylomonas</i>				<i>Rhodomicrobium</i>			
<i>Methylococcus</i>				<i>Rhodopila</i>			
<i>Methylosinus</i>				<i>Rhodobacter</i>			
<i>Pseudomonas</i>				<i>Ectothiorhodospira</i>			

a La fijación de N₂ en unas pocas especies de algunos de los géneros listados.

b La fijación de N₂ sólo se produce en condiciones anóxicas.

c Todos son arqueas.

3.8 Importancia biotecnológica de las bacterias microaerobias

Uno de los principales grupos de micicroaerobios utilizados en la biotecnología son las bacterias capaces de fijar el nitrógeno molecular.

Los biofertilizantes e inoculantes microbianos son un componente vital de los sistemas sustentables, ya que constituyen un medio económicamente atractivo y ecológicamente aceptable de reducir los insumos externos y de mejorar la cantidad y calidad de los recursos internos. Dentro de estos biofertilizantes se encuentran las bacterias del género *Azotobacter*, las cuales están presentes en el suelos y sedimentos en elevadas concentraciones, asociadas al sistema radical de algunas especies vegetales acelerando el desarrollo y el rendimiento en los cultivos, debido fundamentalmente a su capacidad de sintetizar sustancias biológicamente activas como auxinas, citoquininas, giberelinas, aminoácidos y vitaminas además de fijar el N₂ (Martínez *et al.*, 1997).

La fijación de nitrógeno es el proceso mediante el cual el N_2 libre se combina químicamente con otros elementos para formar compuestos orgánicos, lo cual se realiza a través de las enzimas de los microorganismos y la idea de utilizar ese mecanismo para incrementar el rendimiento de los cultivos por medio de la inoculación del suelo con bacterias fijadoras de nitrógeno, data de finales del siglo pasado (Zher y Capone, 2006).

Además de su importancia en la fertilidad del suelo, sedimentos y columna de agua, es uno de los mecanismos de reposición del N_2 que se pierde mediante la desnitrificación, absorción por los cultivos, percolación y erosión, por lo tanto es un proceso básico en ecosistemas acuáticos y terrestres (Echegaray, 1995).

La fijación de una molécula de N_2 requiere aproximadamente 16 moléculas de ATP, por lo que los organismos fijadores deben disponer de abundante cantidad de sustrato (Postgate, 1987). Por otra parte, Grayston *et al.* (1998) calcularon que el total de exudados solubles alcanza 10 a 100 mg por gramos de raíces y se conoce que *Azotobacter* fija 10 a 15 mg de N_2 g^{-1} de sustrato carbonado consumido (Postgate, 1974).

Actualmente, se están realizando estudios con diferentes tipos de cepas de *Azotobacter chroococcum* en suelo foliar, incrementando, en la mayoría de los casos 53% el área foliar en plantas inoculadas con *A. chroococcum* (González, 2000).

Otro de los avances en cuanto al estudio de las bacterias microaerobias es sobre el grupo de las bacterias fototrofas capaces de fijar nitrógeno. El descubrimiento de fotoproducción de hidrógeno y de la capacidad de *Rhodospirillum rubrum* para fijar el nitrógeno ha llevado a una mayor comprensión de ambos procesos. El estudio de la base molecular del proceso de fijación de nitrógeno en este grupo permitió observar

que la adición de altas concentraciones de Mg^{2+} permite una mayor actividad de la nitrogenasa y mayor eficiencia en la tasa de fijación de N_2 (Ludden y Gary, 2002).

Actualmente se están realizando estudios sobre la degradación de metales pesados en la interfase agua-sedimento, principalmente sobre la degradación y toxicidad del cadmio y cobre, así como sobre la utilización y reciclaje de nutrientes en sedimentos costeros altamente productivos, mediante la incubación experimental en laboratorio de sedimentos tratados con Cu y Cd, encontrándose que los flujos de amonio y nitrito se vieron afectados diferencialmente por la presencia de Cd y Cu. El Cd inhibió la utilización del nitrito y activó la amonificación, mientras que el Cu estimuló la utilización del nitrito en la interfase agua-sedimento (Castro y Campos, 2004; Korda *et al.*, 1997; Moffett *et al.*, 1997).

Como ya se dijo, muchas especies bacterianas microaeróbicas no han sido identificadas y tampoco se conocen sus perfiles genéticos, por lo que se han utilizado metodologías moleculares como el DGGE para detectar alteraciones de la estructura microbiana en sedimentos contaminados por hidrocarburos, y para descubrir nuevas especies no descritas de microorganismos (Habe y Omori, 2008).

4. Planteamiento del problema

Como se ha mencionado anteriormente, no se conoce en su totalidad la diversidad de especies que constituyen el bacteriobentos, lo anterior por varias por varias razones, una de las más importantes radica en que los métodos para la obtención de las muestras, principalmente en ecosistemas marinos profundos, no están bien establecidas. Por otra parte, no se le ha dado la suficiente importancia a las investigaciones relacionadas con el bacteriobentos de vida libre, ya que, en los últimos años, el interés por el estudio en los microorganismos de importancia médica y biotecnológica ha sido mayor, dejando atrás los estudios de índole taxonómico, ecológico y biogeoquímico. Menos aún, se han realizado estudios sobre influencia que tiene el oxígeno sobre las propiedades metabólicas del bacteriobentos; por lo que en esta investigación nos hemos planteado las siguientes preguntas de investigación:

¿Cuáles son sus características fisiológicas y bioquímicas?

¿Sus características morfológicas, bioquímicas y fisiológicas cambian con la disponibilidad de oxígeno en el medio?

¿Su capacidad para hidrolizar compuestos orgánicos de cadena larga y para utilizar un solo compuesto orgánico como fuente de carbono y energía cambia cuando se encuentran en estrés de oxígeno?

¿Qué géneros bacterianos se encuentran presentes en cada cuerpo de agua estudiado?

¿Los aislados bacterianos de la colección son capaces de fijar el N_2 ?

5. Hipótesis

1. Las comunidades bacterianas microaerofilicas aisladas de sedimentos marinos y salobres son diferentes a las aisladas de sedimentos dulceacuícolas.
2. Las bajas concentraciones de oxígeno molecular favorecen un mayor índice de utilización de compuestos orgánicos.
3. Los aislados bacterianos microaerofilicos presentan un gene *nifH*.

6. Objetivos

Objetivo general:

Caracterizar, fisiológica, química y molecularmente treinta aislados microaerofilicos, procedentes de los sedimentos superficiales (0-10 mm de profundidad) costeros del suroeste del Golfo de México, de la laguna de Sontecomapan (Veracruz) y de los canales de la zona chinampera del lago de Xochimilco.

Objetivos específicos:

1. Caracterizar morfológicamente a los aislados obtenidos.
2. Evaluar la capacidad de hidrolizar compuestos orgánicos de cadena larga y utilizar un solo compuesto orgánico como fuente de carbono, bajo diferentes concentraciones de oxígeno (21, 4, 2 y 0% de oxígeno).
3. Identificar a las especies que representan los aislados bacterianos a través de la amplificación y secuenciación del segmento 16S rDNA.

7. Métodos y materiales

7.1. Descripción de las zonas de estudio

Zona lacustre de Xochimilco. La zona lacustre de Xochimilco es un Área Natural Protegida (ANP) que se localiza en la porción Centro y Norte de la Delegación Política de Xochimilco, entre las coordenadas geográficas 119° 15' 11" y 19° 19' 15" Latitud Norte y 99° 00' 58" y 99° 07' 08" Longitud Oeste. Coordenada Central aproximada: 19°17'N 99°04'W., con una altitud promedio de 2240 msnm (Juárez *et al*, 2003).

El sistema presenta una superficie de 2,657 ha; el agua de los canales y de la laguna es considerada de mala calidad debido a que son alimentados en parte, por agua tratada y residual, contiene gran cantidad de compuestos químicos inorgánicos y orgánicos como sales, metales pesados tóxicos (cadmio, cromo y plomo), y esenciales (cobre, hierro y manganeso), hidrocarburos, grasas, aceites, solventes industriales, herbicidas, pesticidas y desechos químicos producidos por actividades agrícolas (Sandoval, 2008; Solís, 2005). En la zona lacustre predominan sedimentos arcillosos con arenas de grano fino, con alrededor del 50 % de cenizas volcánicas, texturas que van de arenosas hasta limo-arcillosas, y retienen una alta cantidad de humedad. La profundidad varía considerablemente ya que en algunos canales y zonas inundadas es de 60 cm, y en algunas lagunas la profundidad alcanza de 3 a 6 m (INECOL, 2002).

De acuerdo a la clasificación de Köppen, modificada por García (1981), el clima es tipo C (W2) (w) b (i'), que corresponde a templado subhúmedo con lluvias en verano; la precipitación pluvial media anual es de 620.4 mm, y la mayor parte se concentra entre los meses de mayo y octubre; la temperatura media anual oscila entre los 12° y 18 °C, con poca variación de las temperaturas medias mensuales (entre 5 y 7 °C); entre noviembre y enero pueden presentarse heladas.

Laguna de Sontecomapan, Veracruz. La laguna de Sontecomapan pertenece a la región de la cuenca que forman el volcán de San Martín Tuxtla y la Sierra de Santa Martha, localizada en el sur del Estado de Veracruz en el Golfo de México, entre los paralelos 18° 30' -18° 34' N y los meridianos 94° 54'-95° 02' W, tiene un área de 8.9 Km² y presenta una importante población pesquera, sistemas de cultivo y granjas ganaderas (Rodríguez-Varela *et al.*, 2010). El fondo en general, es somero con una profundidad media de 1.5 m y de 2.0 m en los canales. Se conecta con el mar de manera permanente por medio de un canal de 137 m de largo de tipo mixohalino, y está influenciada por aguas dulceacuícolas por los varios ríos y arroyos que desembocan en ella. La precipitación total anual se encuentra entre los 3,000 y 4,000 mm, febrero y marzo son los meses más secos y septiembre el más lluvioso con más de 600 mm (González *et al.*, 1994).

La boca se encuentra en la porción noreste, en donde se presenta un fuerte intercambio de agua marina costera y de agua dulce de origen continental y en esta zona se ubica un importante depósito de sedimentos. En el extremo opuesto se presenta una formación de tipo basáltico llamada Roca el Morro y entre ambas se forma un valle que facilita la acumulación de nutrientes formando un surco fértil (Muciño-Márquez *et al.*, 2011).

En época de lluvias los afluentes de agua dulce aumentan el caudal, disminuyendo las concentraciones de sales dentro de la laguna hasta cero y por el contrario en algunas partes de la boca se observa un máximo de 35 g/lit. El cuerpo mayor de la laguna está rodeada en su totalidad por una franja de manglar principalmente constituido por *Rhizophora mangle* y *Avicennia* sp (Guerra-Martínez y Lara-Villa, 1995). Actualmente,

las prácticas agrícolas están sustituyendo a los manchones de selva lo que ha ocasionado el azolve de los ríos y de la laguna por arrastre eólico y fluvial.

Esta laguna tiene una gran importancia económica y biológica y desde febrero de 2004 sus manglares y humedales están incluidos como parte de la reserva de la Biosfera de los Tuxtlas (Calva *et al.*, 2005).

Golfo de México: El Golfo de México, es una región marítima del océano Atlántico que se encuentra casi completamente rodeada por el continente americano y por islas, posee extensas plataformas continentales que se adentran en el mar, las plataformas del Caribe son más reducidas y terminan en cimas que alcanzan de 2000 a 3000 metros de profundidad (Cabrera y Carranza., 2002). Se sitúa entre los 20°12' y 21°46' N y los 92°24' y 93°24' W con una salinidad superficial que varía de 34 a 36 PSU durante el verano; las salinidades de 34 g/lit se encuentran en las desembocaduras de los ríos San Pedro y Grijalva (SW del Golfo de México). Las concentraciones de oxígeno disuelto varían de 3.5 mg l⁻¹ en el agua de fondo durante el verano, hasta 6 mg l⁻¹ en la zona occidental durante el invierno (Salas de León *et al.*, 2004; Bessonov *et al.*, 1971).

7.2 Toma de muestras de sedimento

Se tomaron muestras de sedimento superficial (0-10mm de profundidad) en las tres zonas de muestreo. En el caso de los sistemas someros (Lago de Xochimilco y laguna de Sontecomapan) los sedimentos se colectaron utilizando un nucleador manual en acrílico (50 mm de d.i y 260 mm de largo). Los sedimentos profundos del Golfo de

México fueron obtenidos con una draga de caja tipo Van Veen a bordo del buque oceanográfico Justo Sierra (UNAM, México) (Romero y Negrete 2000).

Dos centímetros cúbicos de las muestras de sedimento superficial fueron colocados en un frasco ámbar estéril con glicerol al 20% y conservadas a -20°C hasta su procesamiento en el laboratorio (Ferrara-Guerrero, 1993).

7.3 Aislamiento, purificación y pruebas de tolerancia al O₂ de los aislados

Las poblaciones bacterianas heterotrófas microaeróbicas fueron evidenciadas utilizando el medio de cultivo SA500 (Ferrara-Guerrero y Bianchi, 2000), que es un medio mineral semisólido (2 g de agar /L) (anexo 1), con bajo contenido de sustratos orgánicos (0.5 gL⁻¹ de succinato de calcio como fuente de carbono); después de 5 resiembras sucesivas su pureza fue verificada por microscopía de contraste de fases y por la morfología colonial en placa. Los cultivos puros fueron conservados en el mismo medio de aislamiento líquido, enriquecido con un coctel de vitaminas de Balch (Balch *et al.*, 1979) y gasificado con una mezcla de gases 4% O₂ balance N₂ (patrón de calibración Praxair).

Las pruebas de tolerancia al O₂ de los aislados bacterianos puros, se realizaron haciendo una serie de incubaciones a diferentes pO₂: 21%O₂ y mezclas grado patrón de calibración marca Praxair de 4% de O₂ balance N₂ y 10% N₂/90% CO₂ (condición anóxica) (Ferrara-Guerrero *et al.*, 1993).

7.4 Pruebas morfológicas y fisiológicas

Para la caracterización morfológica de los aislados microaerobios se tomaron en cuenta la morfología colonial y celular, tamaño, forma, color, elevación, presencia de vacuolas

internas, movilidad y transparencia colonial; para la caracterización fisiológica se tomó en cuenta la respuesta a la tinción de Gram, presencia de la catalasa y citocromo oxidasa, formación de cápsulas, y fermentación de glucosa. La capacidad de oxidar la glucosa y de respirar los NO_3 se evidencio en cultivos incubados a pO_2 de 21 y 4% balance N_2 (Merck, 2000; Stanier *et al.*, 1996; Meynell y Meynell, 1979).

7.5 Utilización de fuentes de carbono a pO_2 de 21 y 4%

Con el objetivo de observar la influencia del oxígeno sobre la utilización de compuestos orgánicos simples como única fuente de carbono y energía cuando las bacterias se encuentran en estrés de oxígeno se probaron 11 aminoácidos, 5 azúcares, 7 ácidos orgánicos, 3 ácidos grasos y tres alcoholes a pO_2 de 21 y 4% (tabla 2).

El medio mineral de base utilizado se encuentra formulado en el anexo dos (Angeles-Vazquez, 2007). Los sustratos orgánicos se agregaron a una concentración de 2 g L^{-1} para los azúcares y 1 g L^{-1} para el resto de las familias químicas estudiadas; después de la inoculación los cultivos fueron incubados a temperatura ambiente y a 190 rpm (Stainer *et al.*,1996).

Tabla 2. Familias químicas probadas como única fuente de carbono y energía.

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

Para las pruebas a 4% de O₂ se utilizaron tubos de Hungate con 9 ml de medio mineral sin fuentes de carbono; los tubos fueron inoculados con 1 ml de cultivo celular en fase exponencial de crecimiento y gasificados con una mezcla de 4% balance N₂. Para las pruebas realizadas en condición aeróbica (pO₂ de 21%), los aislados fueron crecidos en viales de 5 ml conteniendo 3 ml de medio mineral base e inoculados con 0.3 ml de cultivo en fase exponencial.

Para ambas condiciones de oxigenación las respuestas positivas se leyeron por densidad óptica a 650 nm, utilizando como blanco el medio con el sustrato orgánico sin inocular.

Con las respuestas de los ensayos de utilización de las diferentes familias químicas, se calculó el índice medio de utilización de compuestos orgánicos (IMU) en ambas condiciones de oxigenación, este índice indica la proporción de aislados que son capaces de utilizar un solo sustrato orgánico como única fuente de carbono y energía el cual se calculó a partir de la siguiente formula:

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

Dónde:

P = suma de las respuestas positivas de cada uno de los sustratos probados.

N= número total de sustratos probados de cada familia química.

(Ferrara-Guerrero, 1993).

7.6 Producción de exoenzimas a pO₂ de 21 y 4%

Se probó la capacidad de los aislados bacterianos de producir 9 exoenzimas (fosfatasa, esculinasa, lipasa, amilasa, gelatinasa, ADNasa, lecitinasa y quitinasa), utilizando medios de cultivo específicos sólidos en placa (Lányg, 1987). Para los aislados de origen dulceacuícola se utilizó como el medio SA500 sólido (Ferrara-Guerrero *et al*, 1993), y para los de origen marino (laguna de Sontecomapan y Golfo de México) el medio marino ZoBell (Leon *et al.*, 2000), posteriormente los cultivos fueron incubados a pO₂ de 21 y 4%, durante 7 días, con la respuesta a los diferentes sustratos se calcúlo el índice de producción exoenzimática (IME) utilizando la siguiente fórmula:

$$IME = \frac{\Sigma RP}{NE}$$

Dónde:

RP= Frecuencia de respuestas positivas de la producción de exoenzimas por prueba.

Ne= número de exoenzimas probadas.

(Ferrara-Guerrero, 1993).

7.7 Identificación de esteres metílicos de los ácidos grasos

La identificación de los ácidos grasos (AG) presentes en las membranas celulares de los aislados bacterianos, fue realizada por cromatografía en fase gaseosa (Flindlay y Bobbs 1993; Badings y Joung 1983).

Para la extracción de los AG se hicieron cultivos masivos en placa, empleando el medio triptona extracto de levadura (Dunfield *et al.*, 1999), incubados en condiciones de baja oxigenación (pO_2 4%). El crecimiento celular fue recuperado lavando la superficie del agar con una solución de formaldehído al 5%. Las muestras fueron centrifugadas a 700g por 15 min a 4°C y el botón celular fue lavado dos veces con una solución de suero fisiológico (0.85% NaCl).

La biomasa obtenida fue congelada a -70°C durante 24 h y posteriormente liofilizada por 3 h a 7 kPa de vacío; 20 mg de la biomasa liofilizada fueron metilados con 0.1 ml de métoxido de sodio al 0.5 N y 0.9 ml de éter de petróleo. Una alícuota de 1 μ l fue inyectada en un cromatógrafo Perkin Elmer Autosystem 9000 equipado con un detector de ionización de flama, utilizando una columna capilar de 100 m de longitud en sílica fundida con base de siloxano y carbonato de alta resistencia térmica (SEG HTS). Como gas acarreador se utilizó Helio (4.6 flujo), y se utilizó como referencia un Standard de

37 componentes de ácidos grasos (FAME) SUPELCO® (Díaz-González *et al.*, 2002; Pérez *et al.*, 1997).

7.8 Fijación de N₂ por Amplificación del gen *nifH*

Para la amplificación del gen *nifH* se empleó una PCR anidada de acuerdo a lo establecido por Valdés *et al.* (2005), utilizando como control positivo a *Rhizobium etli* CE-3.

Paso 1. Se amplificó un segmento de 1.2 kb, el cual comprende el fragmento completo del gen *nifH* y la región del 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 en la siguiente tabla:

Tabla 3. Iniciadores utilizados para la amplificación del segmento *nifHD*.

Iniciador	Secuencia	Iniciador Invitrogen	Concentración final
IGK	(5'-3'): TAC GGY AARGCB GGY ATC GG	59270110	10 PM μl^{-1}
NDR-1	(5'-3'): TTG GAG CCG GCR TAN GCR	59270111	10 PM μl^{-1}

La formulación de la mezcla utilizada para la PCR en un volumen de 50 μl se muestra a continuación:

- **DNA** 50 ng
- **Mg²⁺** 1.5 mM
- **dNTPs** 200 μM
- **Iniciador IGK** 0.1 μM

- **Iniciador NDR-1**..... 0.1 μ M
- **Taq pol** 2.5 U

Las condiciones de amplificación se muestran en la siguiente tabla:

Tabla 4. Condiciones de amplificación del segmento *nifHD*.

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

Paso 2. En la segunda PCR se amplificó el espacio interno *nifH*, para lo cual se utilizaron los iniciadores PoIF y PoIR esperando tener fragmentos con un peso de 360 pb; la secuencia se muestra en la tabla 5.

Tabla 5. Características de los iniciadores PoIF y PoIR utilizados para amplificar el gen *nifH*

Iniciador	Secuencia	Iniciador Invitrogen	Concentración final
PoIF	(5'-3'): TGC GAY CCS ARR GCB GGY ATC GG	59270133	10 PM μ l ⁻¹
PoIR	(5'-3'): ATS GCC ATC ATY TCR CCG GA	59270109	10 PM μ l ⁻¹

La formulación de la mezcla para la segunda PCR en un volumen de 25 μ l fue la siguiente:

- **DNA** 50 ng
- **Mg²⁺** 50 mM
- **dNTPs** 200 μ M

- **Iniciador PolF** 0.1 μM
- **Iniciador PolR** 0.1 μM
- **Taq pol** 2.5 U

Las condiciones de amplificación se muestran en la tabla 6.

Tabla 6. Condiciones de amplificación del segmento *nifH*.

	Temperatura °C	Tiempo	Ciclos
Desnaturalización inicial	95	5 min	1
Desnaturalización	94	1 min	35
Alineación	56	1 s	35
Extensión	72	2 s	35
Extensión final	72	7 min	1

El segmento de 1200 pb correspondiente a los genes *nifHD* y el segmento de 360 pb correspondiente al *nifH* se evidenciaron por electroforesis en gel de agarosa al 1.2% teñido con bromuro de etidio ($1\mu\text{g } \mu\text{l}^{-1}$), las imágenes fueron observadas y registradas en un fotodocumentador marca BioRadChemiDoc™ XRS+ System.

7.9 Análisis molecular del segmento 16S rDNA

a) Extracción de ADN genómico. Para la extracción del ADN genómico se hicieron cultivos masivos en placa en condición microaerobia (4% O_2 balanceado con N_2), utilizando el medio de cultivo SA500 (Ferrara-Guerrero 2000), la biomasa bacteriana se obtuvo lavando la caja con agua deionizada estéril y el botón celular se obtuvo por centrifugación a 4500 rpm durante 15 min, a una temperatura de 4°C.

La extracción del DNA se realizó a partir de 20 mg de biomasa húmeda de acuerdo a lo establecido en el Short Protocols (2002) y por Angeles-Vázquez, 2007), y posteriormente cuantificado por espectrofotometría a longitudes de onda de 260 y 280 nm.

b) Ampliación y secuenciación del segmento 16S rDNA: La amplificación del segmento 16S rDNA se realizó según lo establecido por Gary *et al.* (2010) utilizando los iniciadores rD y fD1, cuyas características se marcan en la tabla 7.

Tabla 7. Características de los iniciadores PolF y PolR utilizados para amplificar el gen *nifH*

Iniciador	Secuencia	iniciador Invitrogen	Concentración final
rD1	(5'-3'): AAGGAGGTGATCCAGCC	59270075	10 PM μl^{-1}
fD1	(5'-3'): AGAGTTTGATCCTGGCTCAG	59270109	10 PM μl^{-1}

La mezcla para la PCR para un volumen de 50 μl se muestra a continuación:

- **DNA** 50 μg
- **Iniciador rD1** 0.1 μM
- **Iniciador fD1** 0.1 μM
- **Amortiguador** 10 X
- **dNTPs** 20 μM
- **MgCl:** 1.5 mM
- **Taq pol** 2.5 U

Las condiciones de amplificación del segmento 16S rDNA fueron de acuerdo a lo establecido por Puerta y Urueña (2005), y se muestran en la tabla 8.

Tabla 8. Condiciones de amplificación del segmento 16SrDNA.

	Temperatura °C	Tiempo	Ciclos
Desnaturalización inicial	95	5 min	1
Desnaturalización	94	1 min	35
Alineación	55	1 min	35
Extensión	72	2 min	35
Extensión final	72	3 min	1

Los productos de 1500 pb fueron visualizados en geles de agarosa al 1.2% y tenidos con bromuro de etidio ($1\mu\text{g}\ \mu\text{l}^{-1}$), el segmento fue purificado con el paquete QUAquick (Quiagen®). Los productos purificados fueron cuantificados a 650 nm; un volumen de 16 μl conteniendo 150 ng de producto purificado más 2 μl de iniciador (5 pM μl^{-1} concentración final) fue secuenciado a partir del nucleótido 50 desde el extremo 3' del oligonucleótido y hasta 500 bases en promedio para ambos iniciadores (Angeles-Vázquez, 2007). Los resultados de la secuenciación se analizaron en el programa DNA Star versión 4.0, las secuencias fueron comparadas en el NCBI (National Center Biotechnology Information).

7.10 Análisis estadístico

Para observar la influencia del O_2 sobre la respuesta fisiológica de los aislados, se realizó un análisis de componentes principales basado en las respuestas a la utilización de fuentes de carbono y producción exoenzimática a pO_2 de 21 y 4%. Las agrupaciones de las especies identificadas se realizó a través de un análisis Cluster usando como punto de unión la distancia euclidiana usando el método de varianza mínima de Ward (Pielou, 1984), usando el programa Statistica® package (StatSoft Inc. Tulsa, OK, USA).

8. Resultados.

8.1. Tolerancia a la presencia de oxígeno y respuestas morfológicas y fisiológicas

Se recuperaron 30 aislados bacterianos: 20 de origen dulceacuícola (lago de Xochimilco) y 10 marinas (laguna de Sontecomapan, Veracruz y Golfo de México). Los treinta presentaron un metabolismo microaerobico facultativo ya que crecieron tanto a pO_2 de 4 como a 21%, ninguno presento metabolismo anaerobio ya que no crecieron en condiciones anóxicas de 10% N_2 balance CO_2 (tabla 8).

La mayoría de los aislados dulceacuícolas (80%) Gram negativos, mientras que los de origen marino fueron en su mayoría Gram+ (90%) (tabla 8). Noventa por ciento de los aislados son oxidasa+ y sólo los aislados X10, X22, S54. Los aislados X9, X10, X42, S47 son catalasa positivos. La mayoría de ellos no forman capsulas con excepción de X9, X22, S47, GF69, todos presentaron movilidad y sólo tres fermentaron la glucosa (X10, X16, X43) (tabla 9).

No se observó ninguna influencia del estrés en oxígeno con respecto a la oxidación de glucosa y respiración de nitratos. Sin embargo el 85% de los aislados de origen dulceacuícola fermentan la glucosa, y sólo el 20% de los marinos realizan esta actividad (tabla 10).

Tabla 9. Características fisiológicas de los aislados.

Origen	Aislado	Gram	Oxidasa	Catalasa	Capsulas	Vacuolas internas	Fermentación de glucosa	4% O ₂ /N ₂	21% O ₂	10% N ₂ /CO ₂
Origen dulceacuícola	X2	-	+	-	-	-	-	+	+	-
	X4	-	+	-	-	-	-	+	+	-
	X5	-	+	-	-	-	-	+	+	-
	X6	-	+	-	-	-	-	+	+	-
	X9	-	+	+	+	+	-	+	+	-
	X10	-	-	+	-	+	+	+	+	-
	X12	+	+	-	-	+	-	+	+	-
	X13	-	+	-	-	-	-	+	+	-
	X15	-	+	-	-	-	-	+	+	-
	X16	+	+	-	-	-	+	+	+	-
	X17	-	+	-	-	-	-	+	+	-
	X18	+	+	-	-	-	-	+	+	-
	X20	-	+	-	-	-	-	+	+	-
	X22	+	-	-	+	-	-	+	+	-
	X26	-	+	-	-	-	-	+	+	-
	X28	-	+	-	-	-	-	+	+	-
	X36	-	+	-	-	-	-	+	+	-
	X39	-	+	-	-	+	-	+	+	-
	X41	-	+	-	-	-	+	+	+	-
	X42	-	+	+	-	-	-	+	+	-
X43	-	+	-	-	-	+	+	+	-	
X44	-	+	-	-	-	+	+	+	-	
Origen marino	S47	-	+	+	+	+	-	+	+	-
	S48	+	+	-	-	-	-	+	+	-
	S51	+	+	-	-	-	-	+	+	-
	S52	+	+	-	-	-	-	+	+	-
	S54	+	-	-	-	-	-	+	+	-
	S59	+	+	-	-	+	-	+	+	-
	S61	+	+	-	-	-	-	+	+	-
	GF65	+	+	-	-	-	-	+	+	-
	GF69	+	+	-	+	-	-	+	+	-
	GF74	+	+	-	-	-	-	+	+	-

8.2. Influencia del O₂ sobre la utilización de fuentes de carbono

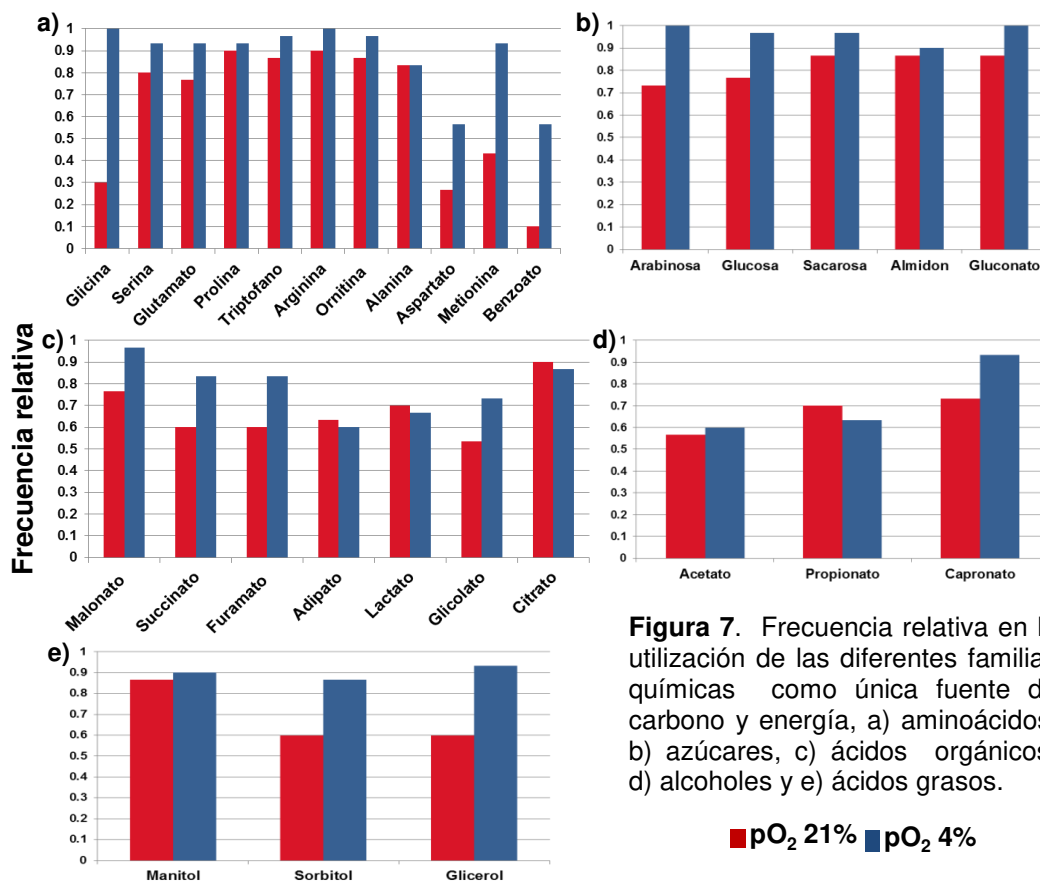
Las familias químicas más utilizadas fueron los aminoácidos y los azúcares, ya que presentaron la mayor frecuencia relativa de utilización (0.7 a 1.0) en las dos condiciones de oxigenación probadas, seguido por los ácidos orgánicos y los ácidos grasos que mostraron una frecuencia relativa (0.6 a 0.8), y la familia química menos utilizada correspondió a los alcoholes.

Las condición subóxica favoreció utilización de la mayor diversidad de fuentes de carbono (83%), solamente el adipato, lactato, citrato y propionato fueron mejor aprovechados en condiciones óxicas (13.3%) (figura 7).

Tabla 10. Respuestas a la oxidación de la glucosa y respiración de NO₃ a pO₂ de 21 y 4%.

Origen	Aislado	Oxidación de glucosa a pO ₂ 21%	Oxidación de glucosa a pO ₂ 4%	Reducción de nitratos a pO ₂ 21%	Reducción de nitratos a pO ₂ 4%
Origen dulceacuícola	X2	+	+	-	-
	X4	+	+	-	-
	X5	+	+	-	-
	X6	+	+	-	-
	X9	+	+	+	+
	X10	-	-	-	-
	X12	+	+	+	+
	X13	+	+	-	-
	X15	+	+	-	-
	X16	+	+	+	+
	X17	+	+	-	-
	X18	-	-	-	-
	X20	+	+	-	-
	X22	+	+	-	-
	X26	+	+	-	-
	X28	+	+	+	+
	X36	+	+	-	-
	X39	+	+	+	+
	X41	+	+	-	-
	X42	-	-	+	+
X43	+	+	+	+	
X44	+	+	-	-	
Origen Marino	S47	+	+	+	+
	S48	+	+	+	+
	S51	-	-	-	-
	S52	-	-	-	-
	S54	-	-	-	-
	S59	-	-	+	+
	S61	-	-	-	-
	GF65	-	-	-	-
	GF69	-	-	-	-
GF74	-	-	-	-	

El índice medio de utilización de compuestos de carbono (IMU) fue superior cuando los aislados se encuentran en condiciones de microaerobiosis (pO₂ de 4%) ya que el 80% utiliza la mayoría de los diferentes sustratos bajo esta condición, sólo los aislados X39, S51, S52, S61, GF65 y GF74 que corresponden al 20% del conjunto de aislados arrojaron el mismo índice IMU tanto en condiciones de microaerobiosis como en condiciones óxicas (pO₂ 4 y 21%), siendo en mayor parte de estos aislados de origen marino. No se presentaron valores IMU superiores cuando los aislados fueron sometidos a saturación de oxígeno, los índices IMU en cada uno de los aislados se muestran en la tabla 11.



8.3. Influencia del oxígeno sobre la producción de enzimas extracelulares

Se observó una mayor producción exoenzimática de los aislados en condición microaeróbica, ya que 5 exoenzimas de 8 probadas (fosfatasa, amilasa, gelatinasa, lecitinasa y quitinasa) presentaron una mayor frecuencia relativa. La capacidad de hidrolizar los lípidos fue superior en condiciones óxicas y la de hidrolizar el ADN y la esculina fue igual en ambas condiciones de oxigenación (figura 8).

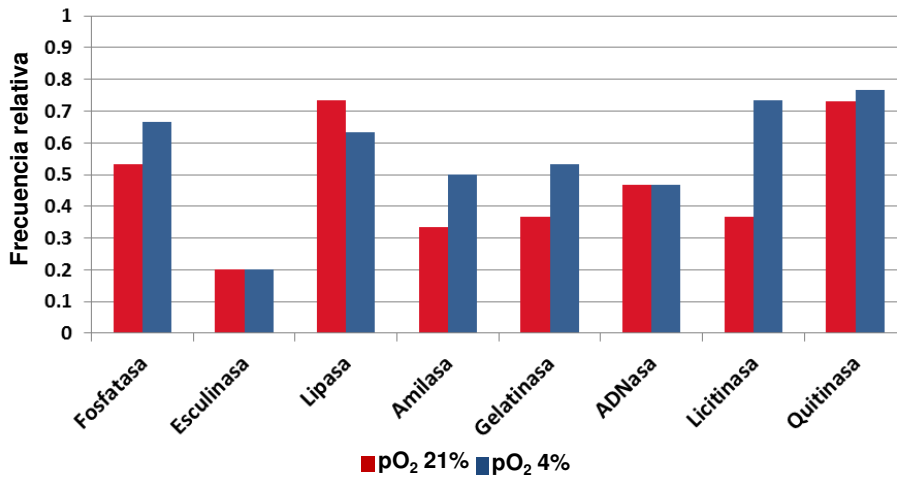


Figura 8. Frecuencia relativa de producción de las ocho exoenzimas probadas.

Catorce aislados produjeron valores de IME en condiciones subóxicas de 46.7%, y solamente siete aislados presentaron altos valores IME en condiciones aeróbicas (23.3%). Ocho aislados de la colección no se vieron afectados por las condiciones de oxigenación (tabla 11).

El aislado X44 no hidroliza ninguno de los compuestos orgánicos probados, en ninguna de las condiciones de oxigenación; por otro lado se observa que el aislado S54 mostró el IME más bajo (13%) y únicamente produce estas pocas exoenzimas cuando se encuentra sometido a condiciones óxicas (pO₂ de 21%), por el contrario X18 y X43 que presentan IMUS de 25 y 63% respectivamente.

Tabla 11. Valores IMU e IME en cada uno de los aislados

Origen	Aislado	IMU a pO ₂ de 21%	IMU a pO ₂ de 4%	IME a pO ₂ de 21%	IME a pO ₂ de 4%
Origen dulceacuícola	X2	76	100	63	63
	X4	76	93	63	50
	X5	76	83	63	30
	X6	76	90	63	63
	X9	69	90	50	64
	X10	72	90	50	75
	X12	76	76	25	25
	X15	76	100	63	88
	X16	79	97	75	75
	X18	55	66	0	25
	X20	86	69	63	75
	X22	52	86	50	38
	X26	79	90	13	63
	X28	83	66	25	63
	X36	76	69	50	63
	X39	83	83	38	0
	X41	76	62	38	63
	X42	72	93	63	63
	X43	72	93	0	63
	X44	69	93	0	0
Origen marino	S47	72	69	13	75
	S48	48	100	38	75
	S51	66	93	75	75
	S52	69	83	63	63
	S54	41	93	13	0
	S59	59	93	38	50
	S61	66	72	88	88
	GF65	69	90	100	88
	GF69	31	93	100	13
	GF74	62	97	13	88

8.4. Perfiles de ácidos grasos en membranas celulares

Fueron identificados 29 tipos de ácidos grasos, de los cuales 15 son saturados, 7 monoinsaturados y 7 poliinsaturados (tabla 11), los monoinsaturados fueron aquellos que se presentaron en la mayoría de los aislados, teniendo una frecuencia relativa (FR) mayor a 0.67, únicamente el AG C22:2 (*cis*-13-16-Docasadienoico) presentó una FR de 0.03. Por otro lado los AG poliinsaturados fueron lo que menos se presentan en el conjunto de aislados ya que presentaron FR de 0.02 a 0.3 (tabla 12).

Tabla 12. Ácidos grasos identificados y su frecuencia relativa en los 30 aislados de las tres diferentes áreas de estudio.

Saturados			Monoinsaturados			Poliinsaturados		
Nomenclatura	Nombre	FR	Nomenclatura	Nombre	FR	Nomenclatura	Nombre	FR
C4:0	Butírico	0.03	C14:1	Miristoleico	0.77	C18:2n6t	Linolelaídico	0.02
C6:0	Caproico	0.03	C15:1	<i>cis</i> -10-Pentadecanoico	0.83	C18:2n6c	Linoleico	0.13
C8:0	Caprílico	0.02	C16:1	Palmitoleico	0.93	C18:3n3	α -Linoleico	0.07
C10:0	Caprónico	0.02	C17:1	<i>cis</i> -10-Heptadecanoico	0.33	C20:2	<i>cis</i> -11,14-Eicosadienoico	0.07
C11:0	Undecanoico	0.01	C18:1n9c	Oléico	0.77	C20:3n3	<i>cis</i> -8,11,14-Eicosadienoico	0.07
C12:0	Laúrico	0.6	C18:1n9t	Elaídico	0.67	C20:4n6	Araquidónico	0.03
C13:0	Tridecanoico	0.02	C22:2	<i>cis</i> -13-16-Docosadienoico	0.03	C20:5n3	Eicopentanoico	0.3
C14:0	Mirístico	0.87						
C15:0	Pentadecanoico	0.04						
C16:0	Palmitico	0.47						
C17:0	Margárico	0.57						
C18:0	Esteárico	0.37						
C20:0	Araquídico	0.07						
C22:0	Behénico	0.27						
C23:0	Tricosanoico	0.07						

De los AG saturados los que presentan mayor FR son los tipos C12:0, C14:0 y C17:0 con una FR mayor a 0.57, los menos frecuentes fueron el C4:0, C6:0, C8:0, C10:0 y C11:0, de los poliinsaturados el C14:1, C15:1, C16:1 y C18:1n9c fueron los que presentaron un FR mayor, superior al 0.77, por último de los AG poliinsaturados con mayor frecuencia fueron el C18:2n6c y el C20:5n3 con un FR de 0.13 y 0.3, el resto presento FR menores a 0.07 (tabla 12).

En la mayoría de aislados de los tres ecosistemas estudiados se presentaron mayoritariamente los AG monoinsaturados, únicamente los aislados X16 y S47 (procedentes de los sedimentos del lago de Xochimilco y laguna de Sontecomapan) presentaron AG saturados (figura 9). Los AG menos frecuentes el conjunto de aislados fueron los poliinsaturados, solamente siete aislados (X20, X36, X43, X44, S47, S59, GF74) presentaron una FR mayor en relación a los AG saturados; los aislados GF65 y

GF69 procedentes de los sedimentos del Golfo de México no presentaron AG poliinsaturados (figura 9).

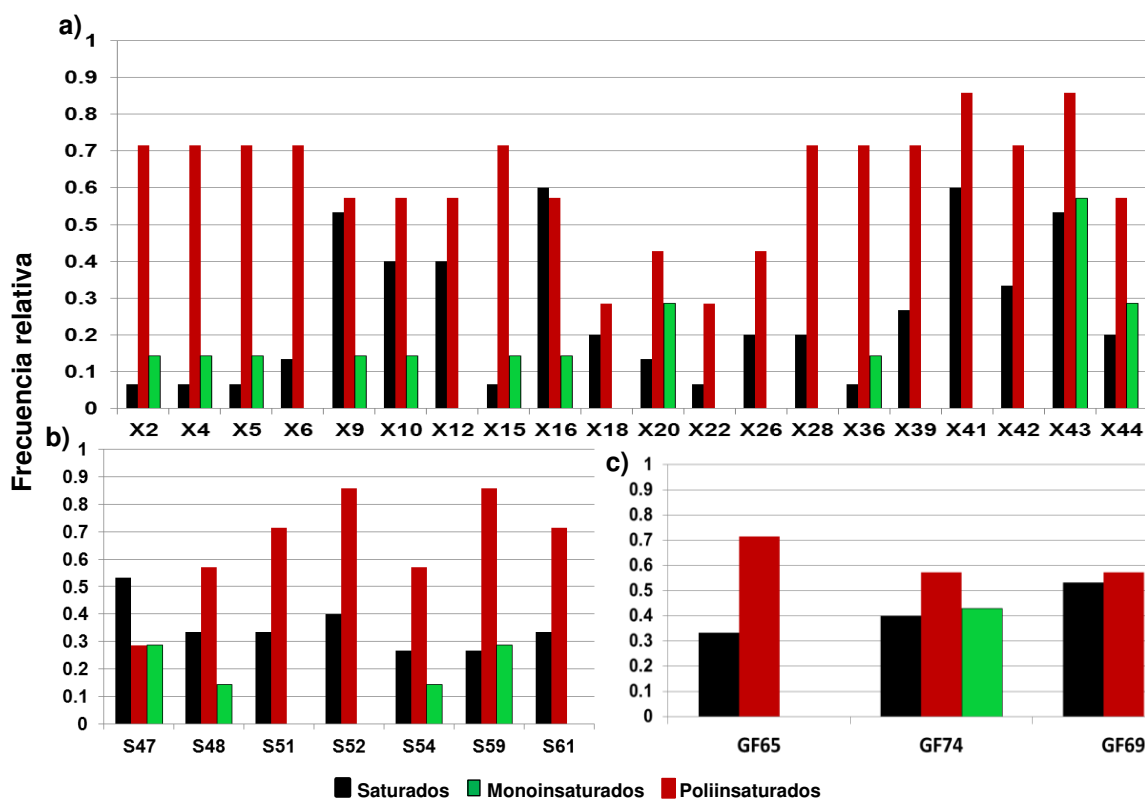


Figura 9. Frecuencia de los AG a partir de su clasificación (saturados, monoinsaturados y poliinsaturados) en cada aislado de las diferentes zonas de aislamiento a) Lago de Xochimilco b) laguna de Sontecomapan c) Golfo de México.

8.5. Amplificación del gen *nifH*

Para los aislados procedentes del Lago de Xochimilco se amplificó una banda de 360 pb correspondientes al gen *nifH* en los aislados X9, X10, X12, X15, X16, X18, X20, X22, X26, X28, X36, X39, para los aislados procedentes de los sedimentos de la laguna de Sontecomapan fue en los aislados S47 y S54. No se amplificó el gen *nifH* en ningún aislado procedente de los sedimentos del Golfo de México (figura 10)

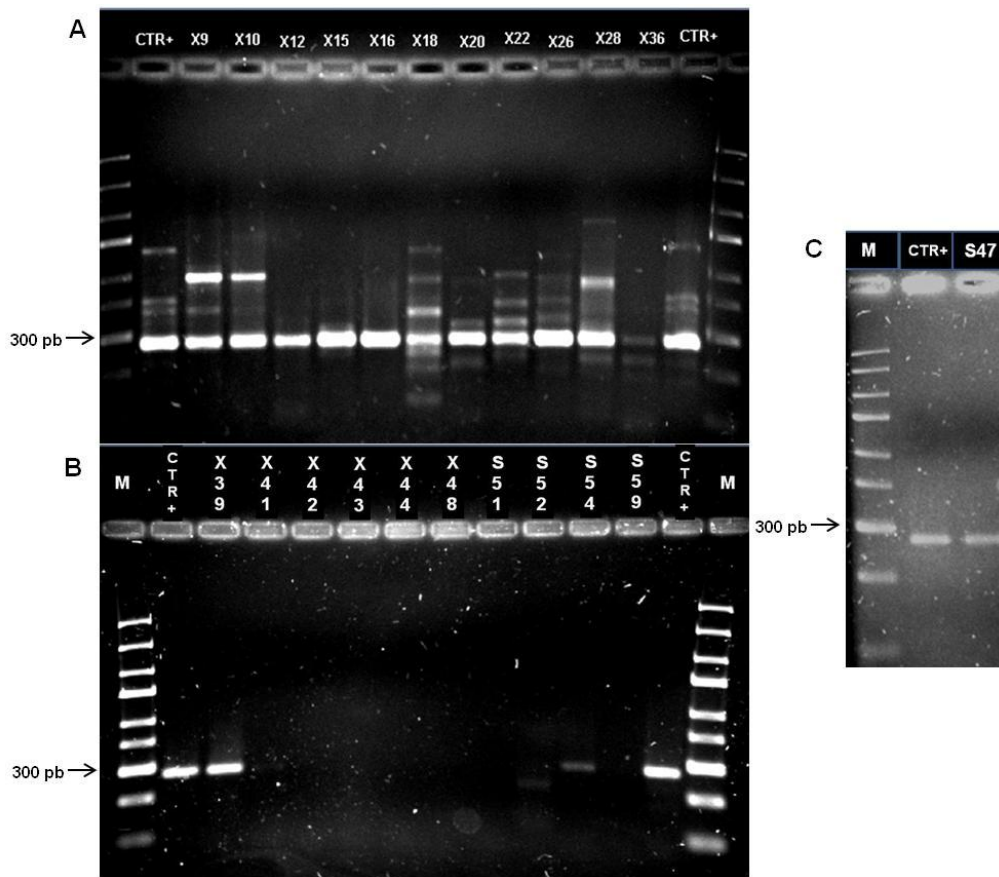


Figura 10. Productos amplificados del gen *nifH* en catorce de los treinta aislados estudiados, (X) aislados de sedimentos del Lago de Xochimilco, (S) aislados de sedimentos de la Laguna de Sontecomapan.

8.6. Análisis del segmento 16S rDNA

Los resultados de la secuenciación del segmento 16S rDNA identifican en los aislados diez especies: *Caulobacter* sp, *Pseudomonas stutzeri*, *Ancalomicrobium adetum*, *Agrobacterium* sp, *Rhizobium* sp, *Delta Protobacterium*, *Sphingomonas* sp, *Bacillus* sp, *Micobacterium* sp, *Bacillus aquamaris*. De acuerdo a la base de datos del Gene Bank, la secuencia el segmento 16S rDNA del aislado S59 solo describe a la secuencia como perteneciente a una bacteria marina. Las secuencias de 8 aislados de nuestra colección no presentaron similitud con ninguna de las secuencias registrada (tabla 13).

Tabla 13. Especies identificadas a partir las secuencias del segmento 16S rDNA donde se muestran las ocho especies identificadas y aquellos aislados que no presentaron similitud en las bases genéticas del GeneBank.

Origen	Aislado	Especie identificada	Porcentaje de similitud	Número de entrada (NCBI)
Origen dulceacuícola	X2	<i>Caulobacter sp</i>	98	DQ268804
	X4	<i>Caulobacter sp</i>	98	AM989012
	X5	<i>Caulobacter sp</i>	93	AM989010
	X6	<i>Caulobacter sp</i>	98	FM211816
	X9	<i>Pseudomona stutzeri</i>	98	FM869915
	X10	<i>Ancalomicrobium adetum</i>	87	AB095950
	X12	Uncultured	98	AY444981
	X15	<i>Caulobacter sp</i>	97	EU857422
	X16	Uncultured	92	FJ360278
	X18	Uncultured	96	HQ904389
	X20	Uncultured	93	JF234893
	X22	Uncultured	97	HM142806
	X26	<i>Agrobacterium sp</i>	95	AM940072
	X28	<i>Agrobacterium sp</i>	97	HQ222282
	X36	<i>Caulobacter sp</i>	99	AJ227777
	X39	<i>Rhizobium sp</i>	94	FJ444645
	X41	<i>Delta protobacterium</i>	97	DQ409898
X42	<i>Sphingomona sp</i>	94	DQ659593	
X43	Uncultured	96	EF6556481	
X44	Uncultured	94	FN794256	
Origen marino	S47	<i>Pseudomona stutzeri</i>	97	FR714937
	S48	Uncultured	99	HQ681987
	S51	<i>Bacillus sp</i>	98	AY690686
	S52	<i>Bacillus sp</i>	98	DQ448746
	S54	<i>Mycobacterium sp</i>	91	AJ968705
	S59	Bacteria marina	97	GU368094
	S61	<i>Bacillus sp</i>	98	DQ448746
	GF65	<i>Bacillus sp</i>	98	DQ448746
	GF69	<i>Bacillus aquamaris</i>	96	EU624438
GF74	<i>Bacillus sp</i>	96	EU746417	

9. Discusión

La mayor parte de los aislados bacterianos estudiados presentan un metabolismo respiratorio microaerobio facultativo, ya que la mayoría de ellos presentaron una mejor producción de exoenzimas y utilización de una amplia gama de compuestos orgánicos de bajo peso molecular en condiciones de baja oxigenación, a pesar de que también presentaron crecimiento aerobio éste fue en general bajo. Lo anterior se pudo observar en un análisis de componentes principales (figura 11) el cual separó a los aislados estudiados en función a su respuesta fisiológica ante las dos diferentes concentraciones de O_2 probadas (pO_2 de 21 y 4%). En el análisis se formaron tres grupos: en el grupo dos se reunieron la mayoría de los aislados por su preferencias al pO_2 de 4% los cuales utilizaron una mayor gama de compuestos orgánicos simples y producción de enzimas hidrolíticas bajo esta condición de O_2 ; por el contrario el grupo uno reúne a los aislados con mejor respuesta a utilizar fuentes de carbono simples y producción de exoenzimas a pO_2 de 21%, el grupo tres sólo reunió a cinco aislados con influencia marina los cuales presentaron la misma respuesta en tanto en condiciones aérobias y microaeróbias.

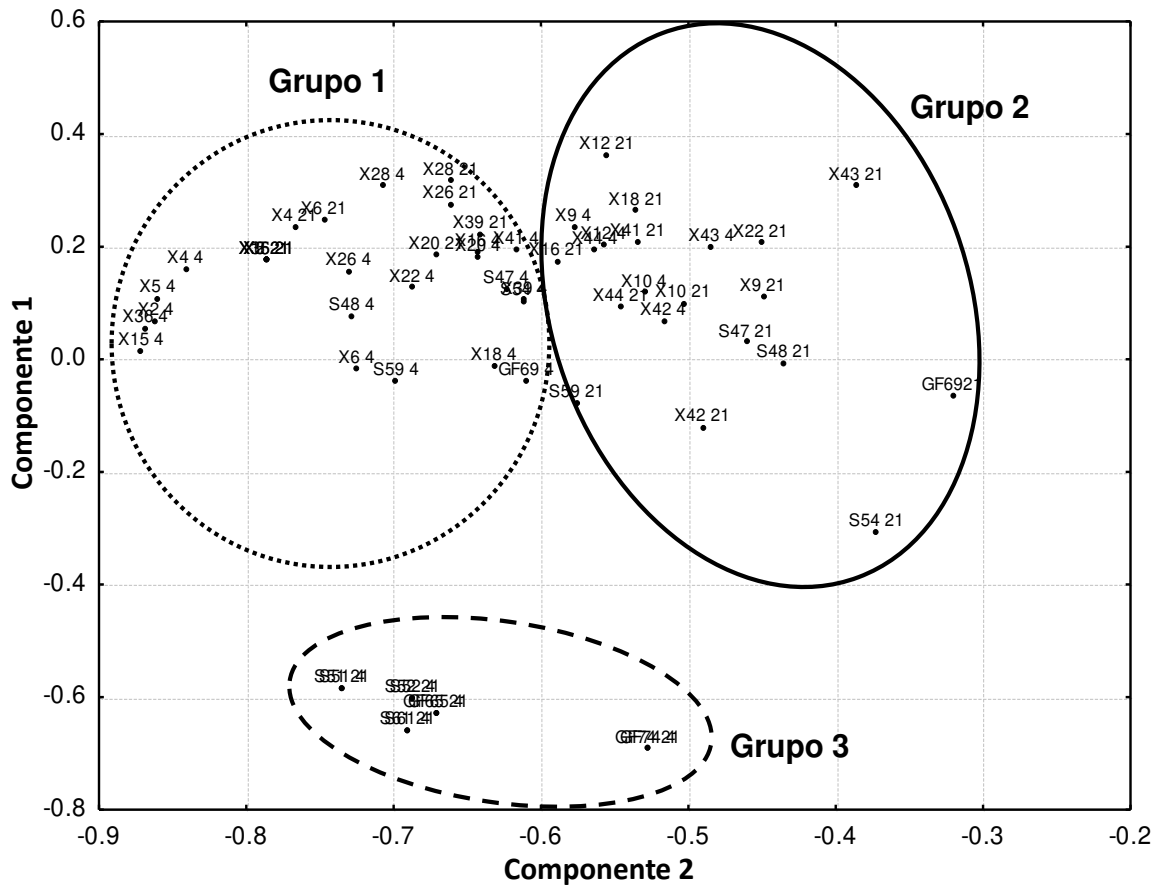


Figura 11. Análisis de componentes principales el cual muestra la formación de tres grupos a partir de sus respuestas a pO_2 de 21 y 4%.

La caracterización molecular mostró una correspondencia con la morfología celular así como con las respuestas fisiológicas, bioquímicas y químicas (99 pruebas realizadas a pO_2 de 21 y 4%), de tal modo que el análisis cluster reunió a los 30 aislados en cinco grupos que coinciden con las especies identificadas molecularmente y de acuerdo a su origen (marinos y/o dulceacuícolas), siendo *Bacillus sp*, *Pseudomona ztutzeri*, *Micobacterium sp* y *Baccilus aquamaris* las especies identificadas para los aislados provenientes del Golfo de México y laguna de Sontecomapan, las cuales se encuentran reunidas en su mayoría en los mismos fenones. Solo un aislado proveniente de la

laguna de Sontecomapan (S48), y del cual su secuencia del 16S rDNA aun no ha sido reportada, se reúne junto con los aislados de origen dulceacuícola (figura 12).

Por otro lado *Psuedomonas stutzeri*, *Ancalomicrobium adetum*, *Agrobacterium* sp, *Sphingomonas* sp, *Delta protobacterium*, *Rhizobium* sp y *Caulobacter* sp, fueron las especies que identificaron los aislados provenientes del lago de Xochimilco y que se reunieron en los mismos grupos dentro del clóster. Los aislados X12, X16, X18, X20, X22, X42 y X44 los cuales sus secuencias no han sido reportadas, se encuentran reunidas de manera indistinta en los diferentes grupos.

Los aislados X9 y S47 procedentes de diferentes ambientes (lago de Xochimilco y laguna de Sontecomapan), fueron identificadas como *Psuedomonas stutzeri*, debido a que esta especie se distribuye ampliamente en el medio ambiente, ocupando diversos nichos ecológicos, debido a su ubicuidad (Lalucat *et al.*, 2006).

En el grupo 1 se encuentran reunidos la mayoría de los aislados del género *Caulobacter* que presentaron un metabolismo microaerobio facultativo, ya que la mayoría de sus actividades fisiológicas las realizan mejor a bajas concentraciones de oxígeno (pO₂ 4%), el aislado X6, a pesar de pertenecer a este género, se reunió con los aislados del grupo dos (identificados como no cultivables), ya que a diferencia de los aislados del fenon uno, utiliza glicolato, manitol y glucosa en condiciones óxicas, mientras que la glicina no es utilizada por los miembros del fenon 1, este aislado (X6) tiene la capacidad de utilizar estos sustratos en ambas condiciones de oxigenación, y no utiliza el glicerol como fuente de carbono bajo ninguna condición de oxigenación. El género *Caulobacter* se encuentra conformado por 13 especies (Stewart *et al.*, 2005) lo que hace probable que los seis aislados identificados como *Caulobacter* sp puedan ser alguna de ellas.

Este mismo comportamiento se observó para *Bacillus* sp; debido a que la mayoría de los aislados se reunieron en el fenon 6 sin embargo, *Bacillus aquamaris* se reunió en el fenon dos junto con cinco aislados no identificados a la misma DMU de *Micobacterium* sp; a pesar de que se tratan de microorganismos pertenecientes a géneros muy diferentes se reúnen en el mismo fenon debido a que presentan valores IMU muy elevados a pO₂ de 4%, a diferencia de los aislados identificados como *Bacillus* sp con valores de IMU iguales en ambas condiciones de oxigenación (pO₂ 21 y 4%).

En los grupos dos y tres se reúnen aislados Gram positivos y negativos, que corresponden aquellas secuencias del 16S las cuales son identificados como aislados no cultivables, estos aislados se reúnen de manera indistinta en los diferentes fenones, a una DMU muy corta con especies que si fueron identificadas, sin embargo estos aislados no presentan ninguna similitud con dichas especies, se encuentran reunidas en los mismos grupos debido a que su respuesta a la tinción de Gram y a la utilización de algunas fuentes de carbono como única fuente de carbono y energía, por lo que dichos aislados podrían ser especies aun no descritas.

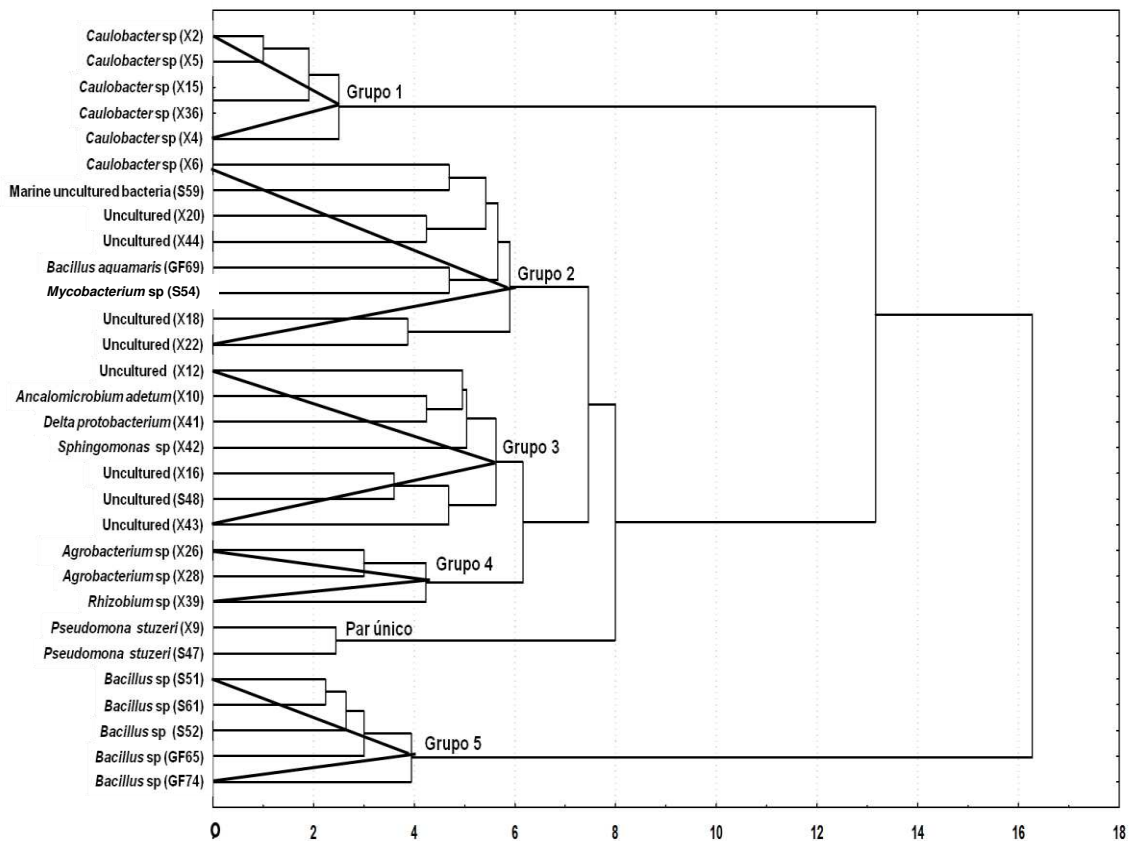


Figura 12. Análisis Cluster basado en todas las pruebas fisiológicas y bioquímicas realizadas (99) bajo pO_2 de 21 y 4%, el cual reúne a los 30 aislados en cinco grupos y un par, en donde se puede observar el agrupamiento de los géneros bacterianos reunidos a partir de la secuenciación del segmento 16S.

Algunas de las especies identificadas en condiciones de baja oxigenación (pO_2 de 4%) son capaces de utilizar algunas fuentes de carbono simples, lo que no ha sido reportado en los manuales de taxonomía Bergers (2008), como es el caso de *Caulobacter* sp, el cual es capaz de utilizar la glicina, metionina, capronato, sorbito, glicerol, *Pseudomona stutzeri* utiliza la glicina, arginina, aspartato, benzoato, malonato, furamato, adipato, acetato y sorbitol, *Ancalomicrobium adetum* utiliza glicina triptofano, ornitina, alanina, aspartato, benzoato, acetato, *Agrobacterium* sp utiliza la glicina, aspartato, metionina, malonato, glicerol, *Rhizobium* sp utiliza metionina, benzoato, almidon y glicerol, *Delta protobacterium*, utiliza glicina, serina, metionina, arabinosa,

succinato, furamato y citrato, *Sphingomona* sp utiliza glicina, aspartato, benzoato, glucosa, succinato, adipato y lactato, *Bacillus* sp utiliza almidón y citrato *Micobacterium* sp, utiliza serina, glutamato, prolina, aspartato, metionina arabinosa, glucosa, gluconato, malonato, succinato, furamato, adipato, lactato, glicolato, citrato, propionato, capronato, *Bacillus aquamaris* solo mostro la capacidad de utiliza la glicina, serina, glutamato, prolina, ornitina, aspartato, benzoato, arabinosa, glucosa, sacarosa, gluconato, malonato, succinato, lactato, citrato y sorbitol en condiciones de pO₂ de 4%, por último, de igual manera, el aislado identificado como bacteria marina no cultivada utiliza la glicina, glutamato, aspartato, metionina, benzoato, arabinosa, gluconato, furamato y adipato, la utilización de las diferentes familias químicas a pO₂ de cada una de las especies se observa en las tablas 14, 15, 16 y 17.

Tabla 14. Respuestas de utilización de aminoácidos como única fuente de carbono y energía a pO₂ de 21 y 4%.

	Glicina		Serina		Glutamato		Prolina		Triptofano		Arginina		Ornitina		Alanina		Aspartato		Metionina		Benzoato		
	pO ₂ 21%	pO ₂ 4%	pO ₂ 21%	pO ₂ 4%	pO ₂ 21%	pO ₂ 4%	pO ₂ 21%	pO ₂ 4%	pO ₂ 21%	pO ₂ 4%	pO ₂ 21%	pO ₂ 4%	pO ₂ 21%	pO ₂ 4%	pO ₂ 21%	pO ₂ 4%	pO ₂ 21%	pO ₂ 4%	pO ₂ 21%	pO ₂ 4%	pO ₂ 21%	pO ₂ 4%	
<i>Caulobacter</i> sp	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	-	-
<i>Pseudomona stutzeri</i>	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	-	+
<i>Ancalomicrobium adetum</i>	-	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	-	+	-	+	-	+	+	+	+	-	+
<i>Agrobacterium</i> sp	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	-	+
<i>Rhizobium</i> sp	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	+	-	-	+
<i>Delta protobacterium</i>	-	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+
<i>Sphingomona</i> sp	-	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	-	+
<i>Bacillus</i> sp	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	-	-	-
<i>Micobacterium</i> sp	-	+	-	+	-	+	-	+	+	-	+	+	+	+	+	-	-	+	+	-	+	+	+
<i>Bacillus aquamaris</i>	-	+	-	+	-	+	-	+	+	+	+	+	-	+	-	-	-	+	-	-	-	-	+
Bacteria marina	-	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+	-	+	+

Tabla 15. Respuestas de utilización de azúcares como única fuente de carbono y energía a pO₂ de 21 y 4%.

	Arabinosa		Glucosa		Sacarosa		Almidón		Gluconato	
	pO ₂ 21%	pO ₂ 4%	pO ₂ 21%	pO ₂ 4%	pO ₂ 21%	pO ₂ 4%	pO ₂ 21%	pO ₂ 4%	pO ₂ 21%	pO ₂ 4%
<i>Caulobacter</i> sp	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>Pseudomonas stutzeri</i>	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>Anca lomic robium adetum</i>	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+
<i>Agrobacterium</i> sp	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>Rhizobium</i> sp	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+
<i>Delta protobacterium</i>	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>Sphingomona</i> sp	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+
<i>Bacillus</i> sp	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>Micobacterium</i> sp	-	+	-	+	+	+	+	+	-	+
<i>Bacillus aquamaris</i>	-	+	-	+	-	+	+	+	-	+
<i>Bacteria marina</i>	-	+	+	+	+	+	+	+	-	+

Tabla 16. Respuestas de utilización de ácidos orgánicos como única fuente de carbono y energía a pO₂ de 21 y 4%.

	Malonato		Succinato		Furamato		Adipato		Lactato		Glicolato		Citrato	
	pO ₂ 21%	pO ₂ 4%	pO ₂ 21%	pO ₂ 4%	pO ₂ 21%	pO ₂ 4%	pO ₂ 21%	pO ₂ 4%	pO ₂ 21%	pO ₂ 4%	pO ₂ 21%	pO ₂ 4%	pO ₂ 21%	pO ₂ 4%
<i>Caulobacter</i> sp	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+
<i>Pseudomonas stutzeri</i>	-	+	+	+	-	+	-	+	+	+	+	+	+	+
<i>Anca lomic robium adetum</i>	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
<i>Agrobacterium</i> sp	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>Rhizobium</i> sp	+	+	+	+	+	+	+	-	+	-	+	+	+	+
<i>Delta protobacterium</i>	+	+	-	+	-	+	+	+	+	+	+	+	-	+
<i>Sphingomona</i> sp	+	+	-	+	+	+	-	+	-	+	+	+	+	+
<i>Bacillus</i> sp	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+
<i>Micobacterium</i> sp	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	+	+
<i>Bacillus aquamaris</i>	-	+	-	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	+
<i>Bacteria marina</i>	-	-	+	+	-	+	-	+	+	+	-	-	+	+

Tabla 17. Respuestas de utilización de ácidos grasos y alcoholes como única fuente de carbono y energía a pO₂ de 21 y 4%.

	Acetato		Propionato		Capronato		Manitol		Sorbitol		Glicerol	
	pO ₂ 21%	pO ₂ 4%	pO ₂ 21%	pO ₂ 4%	pO ₂ 21%	pO ₂ 4%	pO ₂ 21%	pO ₂ 4%	pO ₂ 21%	pO ₂ 4%	pO ₂ 21%	pO ₂ 4%
<i>Caulobacter</i> sp	+	+	+	+	-	+	+	+	-	+	-	+
<i>Pseudomonas stutzeri</i>	-	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+
<i>Ancalomicrobium adetum</i>	-	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>Agrobacterium</i> sp	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+
<i>Rhizobium</i> sp	+	+	+	-	+	-	+	+	+	+	-	+
<i>Delta protobacterium</i>	+	+	+	+	+	+	+	-	+	-	+	+
<i>Sphingomona</i> sp	-	+	+	-	+	+	+	+	+	-	+	+
<i>Bacillus</i> sp	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>Micobacterium</i> sp	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>Bacillus aquamaris</i>	-	+	-	-	+	+	+	+	-	+	+	+
<i>Bacteria marina</i>	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+

Lo anterior nos puede indicar que los sedimentos de los tres ambientes de donde fueron aislados presentan una elevada actividad mineralizadora de C y N orgánico, dejando disponibles una gran diversidad de sustratos asimilables que son aprovechados por las comunidades microbianas (Pool *et al.*, 2006).

Angeles-Vázquez (2007) estudió la utilización de las mismas familias químicas en los mismos ambientes, encontrando de igual manera una elevada utilización de fuentes de carbono en los aislados estudiados, lo anterior puede deberse a que los sedimentos de los sitios en estudio son ricos en materia orgánica, en los que se liberan compuestos asimilables que son aprovechados por la comunidad bacteriana y las redes tróficas y que además estos procesos se llevan a cabo mejor en condición de microaerobiosis.

Con respecto a la capacidad de producir exoenzimas se observó que el 46.6% de los aislados presentan un índice IME mayor cuando se encuentran a pO₂ del 4%, el 23.3% presenta un mayor índice en condiciones de saturación de oxígeno, el 26.7% presenta

los mismos índices IME en ambas condiciones de oxigenación, solo un aislado (X44) no produjo exoenzimas bajo ninguna condición de oxigenación (3.4%).

La mayor parte aislados de origen dulceacuícola (procedentes de los sedimentos del Lago de Xochimilco) mostraron mayores índices IME a pO₂ de 4%, en comparación a los de origen marino (laguna de Sontecomapan y Golfo de México) (figura 13).

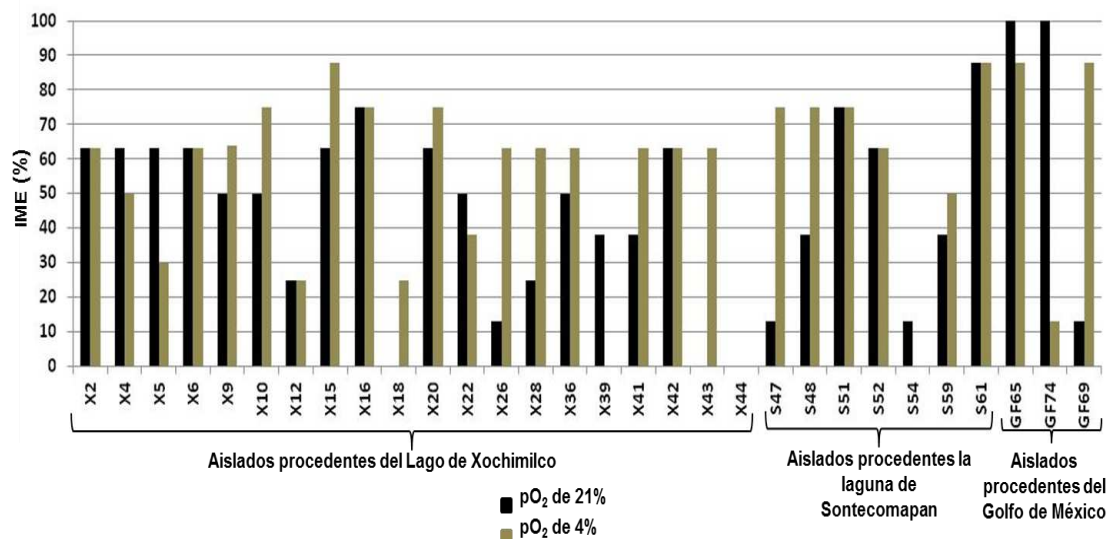


Figura 13. Índices medios de producción exoenzimática a pO₂ de 21 y 4% en los aislados del tres zonas de estudio.

Se observó que la mayor parte de las especies identificadas en el conjunto de treinta aislados, fueron capaces de producir algunas de las exoenzimas hidrolíticas probadas solo cuando se encuentran en condición microaerobia (pO₂ de 4%). Así, por ejemplo: *Caulobacter* sp, produce la almidasa, *Pseudomona stutzeri* la lecitinasa, *Ancalomicrobium adetum* la amilasa, gelatinasa y ADNasa, *Agrobacterium* sp, la fosfatasa, *Delta protobacterium* produce la esculinasa y almidasa, *Sphingomona* sp la fosfatasa, *Bacillus* sp la fosfatasa y lipasa, de igual manera, el aislado reportado como bacteria marina produjo la ADNasa sólo a pO₂ de 4%. Únicamente *Rhizobium* sp produjo exoenzimas hidrolíticas a saturación de O₂ (lipasa, lecitinasa y quitinasa). Las

especies identificadas como *Micobacterium* sp y *Bacillus aquamaris* no mostraron influencia del O₂ en la producción de exoenzimas.

A partir de lo anterior podemos pensar que las cepas obtenidas intervienen en la distribución y biodisponibilidad de nutrientes orgánicos e inorgánicos en los ambientes estudiados, al igual que han señalado Hernández-Estrada *et al.* (2013) y Álvarez (2005), quienes reportaron que los organismos del microplancton y el microbentos participan en la mineralización de compuestos orgánicos gracias a la presencia de exoenzimas específicas que catalizan la hidrólisis de compuestos de alto peso molecular; la descomposición de la materia orgánica depositada en los sedimentos enriquece el agua intersticial con formas solubles de nitrógeno (NH₄⁺, NO₂⁻ y NO₃), fósforo (HPO₄²⁻), azufre (SH⁻, SO₄²⁻ y H₂S) y hierro (Fe₂⁺ y Fe₃⁺), lo que contribuye a nutrir la columna de agua.

A pesar de que El-Hamdaoui *et al.* (2008), afirman que la presencia de iones salinos pueden ser potencialmente tóxicos para los microorganismos, provocando la disminución o inhibición de la actividad enzimática, en este estudio se observó que la salinidad no influyó sobre la producción exoenzimas ya que la mayoría de aislados con influencia salina presentaron los mayores índices IME, principalmente los provenientes de los sedimentos del Golfo de México (figura 13).

El análisis clúster realizado exclusivamente con los resultados obtenidos del análisis de la diversidad de ácidos grasos de las membranas celulares presentes en cada aislado, mostró que éstos se reúnen a partir de su semejanza en los perfiles de AG; por ejemplo la mayoría de aislados pertenecientes al género *Caulobacter* sp se reúnen en el mismo fenón (figura 14), ya que presentaron exactamente los mismos tipos de AG (principalmente, C14:0, C15:1, C16:1, C18:1n9c y C14:1). Sin embargo, el aislado X6

identificado de igual manera como *Caulobacter* sp, se reunió con *Rhizobium* sp (aislado X39) ya que X6 presenta el AG C20:5n3 y C18:0 que no presentan el resto de aislados identificados como *Caulobacter* y por el contrario, presento el AG C18:0 que no se encuentra presente en el resto de lo aislados identificados como *Caulobacter* sp. Lo anterior puede deberse a que en esta investigación solo se pudo identificar el género, por lo que estos seis aislados pudiera corresponder a alguna de las trece especies que conforman a este género, y los AG podrían constituir una herramienta en la diferenciación en miembros pertenecientes a un mismo género.

Un comportamiento parecido se observa con los cinco aislados identificados como *Bacillus* sp, ya que el aislado GF74 identificado como perteneciente a este género, se agrupa a parte con *Bacillus aquamaris*, debido a que presenta los AG C15:0, C18:2n6c, C18:2n6t y C20:2 que no se encuentran en los demás miembros de este género. Así como tampoco, presentan el AG C15:0 que si se encuentra en el resto de los aislados identificados como *Bacillus* sp.

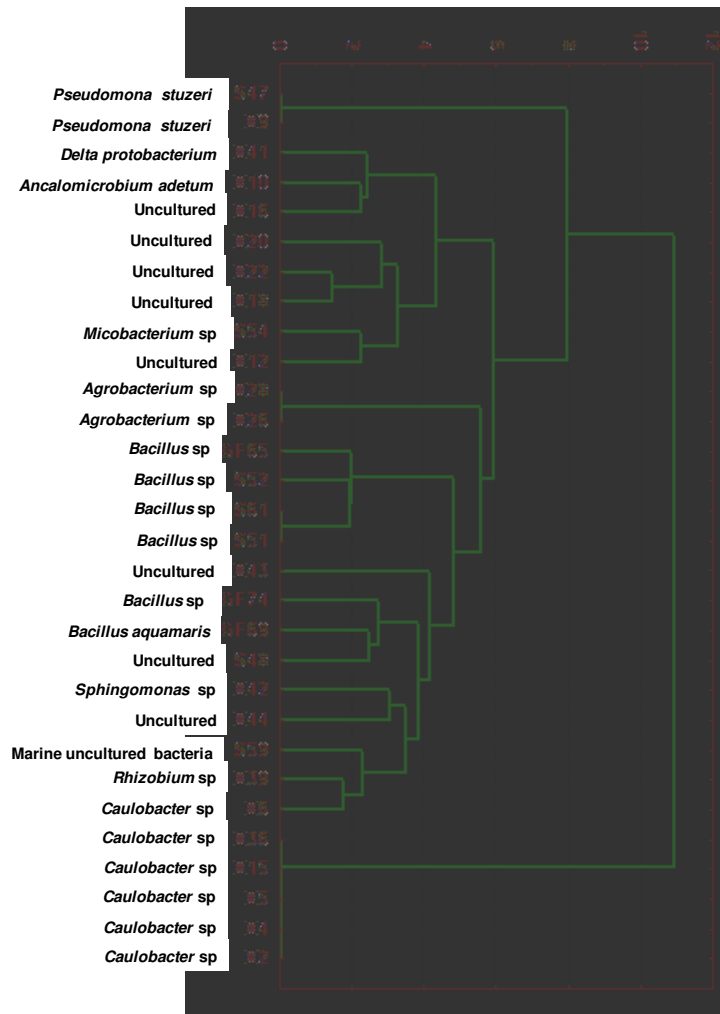


Figura 14. Análisis cluster basado en la diversidad de ácidos grasos en cada uno de los aislados y especies identificadas.

La presencia de ácidos grasos los cuales fueron exclusivos en ciertas especies podrían indicar que el estudio de los AG de las membranas celulares del bacteriobentos microaeróbico puede ser una herramienta poderosa para la detección y diferenciación de especies bacterianas microaerobias en los sedimentos, como lo informaron Hans *et al.* (2003) y Vainshtein *et al.* (1992) para algunas especies *Desulfovibrio*; Gordon *et al.* (2006) para el género *Desulfococcus*, y Zhadanov *et al.* (2006) para *Pseudomonas aurantiaca*. Ciertos grupos microbianos pueden ser identificados por la presencia de

ácidos grasos específicos como biomarcadores (por ejemplo, quinonas isoprenoides) y otras moléculas, que representan una herramienta para el estudio de la estructura y los cambios en las composiciones de la comunidad microbiana como resultado de los cambios ambientales y la introducción de contaminantes en sistemas acuáticos (Piotrowska y Mrozik, 2003; Munn, 2004; Paige *et al.*, 2002).

No obstante, existen pocos estudios sobre perfiles de ácidos grasos (AG) como herramienta complementaria en estudios de biología molecular que proporcionen diferenciaciones específicas a nivel de género o especie pertenecientes al bacteriobentos (Gordon *et al.*, 2006). En este contexto, esta investigación aporta una serie de AG que pueden servir como marcadores específicos de géneros y especies bacterianas ya que algunos solo se presentaron en las membranas de determinados aislados como fue el caso del AG C23:0 (tricosanoico) registrado en los aislados X9 y S47 identificados como *Pseudomona stutzeri*; el aislado GF65 identificado como *Bacillus* sp presentó el AG C4:0 (Butírico), que no presentó en el resto de aislados identificados como pertenecientes en este género (S52, S61 y S51), lo anterior puede deberse a que la identificación molecular solo nos permitió identificar el género, y la diferencia en los AG de las membranas celulares de cada aislado podrían indicar que éstos pertenecen a alguna de las 43 especies que constituyen a este género. En el caso de los aislados que no tuvieron identidad con las secuencias reportadas en el NCBI los AG característicos fueron el C6:0 (caproico) para el aislado X12, el C22:2 (*cis*13-16 docasadeinoico) para el aislado X43 y el C20:4n6 (araquidónico) presente en el aislado X44.

Lo anterior aporta un perfil más amplio a los estudios previos de AG presentes en ciertas especies de bacterias; en la tabla 18 se muestran los perfiles de AG obtenidos

en la presente investigación y que complementan los reportados en otras investigaciones.

Tabla 18. Perfil de ácidos grasos de las especies reportadas por diferentes autores y los identificados en la presente investigación.

Especie bacteriana	Perfil de AG reportado	Referencia	En este estudio
<i>Caulobacter sp</i>	i17:1n7c, i15:1n7c, i19, i19:1n7c	Sheridan <i>et al.</i> , 1994.	-
<i>Pseudomonas stutzeri</i>	i15:0, C15:0, i17:0, C17:0	Findlay y Bobbs 1993.	C23:0
<i>Ancalomicrobium adetum</i>	C16:0, C16:1 (en misma proporción)	Piotrowska y Mrozik 2003.	C16:0, C16:1
<i>Agrobacterium sp</i>	A15:0, C17:0	Piotrowska y Mrozik, 2003.	C17:0
<i>Rhizobium sp</i>	C16:1n8c, 16:1n5c	Piotrowska y Mrozik, 2003.	-
<i>Delta protobacterium Sphingomonas sp</i>	C16:1n9c	Piotrowska y Mrozik, 2003.	C16:1n9c
<i>Bacillus sp</i> y <i>B. aquamaris</i>	C18:2n6c, C18:3n3, C24:0, C26:0	Piotrowska y Mrozik, 2003	C18:2n6c, C4:0
Aislados no cultivables (X12, X43 y X44)	-	-	C6:0, C22:2 y C20:4n6

Se observó que a pesar de que existe una diferenciación química en los componentes de la membrana celular de los microorganismos Gramnegativos y Grampositivos, los tipos C12:0, C14:0, C16:0, C16:1, C17:0, C18:0, C18:1n9c y C18:1n9t (láurico, mirístico, palmítico, palmitoleico, eptadecanoico, esteárico, respectivamente) se pueden encontrar en ambos tipos de membranas. Entre las bacterias, la mayor parte de la información existente sobre los perfiles de AG corresponde a los géneros ya descritos anteriormente como *Azotobacter*, *Bradyrhizobium*, *Rhizobium* (con algunas especies microaeróbicas facultativas), *Actinobacteria*, *Vibrio*, *Bacillus*, *Ureibacillus* (aerobios

estrictos), *Clostridium* (especies anaerobias facultativas y estrictas) (Gagné *et al.*, 2001; Paige *et al.*, 2002).

Con respecto a la capacidad de fijar nitrógeno, se observó, que las especies identificadas que amplificaron el gene *nifH* fueron *Pseudomona stutzeri* (X9, S47), *Caulobacter* sp (X15, X36), *Agrobacterium* sp (X26, X28), *Ancalomicrobium adetum* (X10), *Rhizobium* sp (X39) y *Micobacterium* sp (S54), y en cinco aislados cuyas secuencias son desconocidas (X12, X16, X18, X20 y X22).

La especie *P. stutzeri* años atrás no había sido reportada como fijadora de nitrógeno debido a que, como lo señala Lalucat *et al.* (2006), fue clasificada equivocadamente ya que se ha demostrado por ensayos para evidenciar la actividad Nitrogenasa, estudios filogenéticos y la detección de genes *nifH*, que *P. stutzeri* presenta la capacidad de fijar nitrógeno molecular, lo anterior particularmente en variedades de cepas de *P. stutzeri* como la A15 y CTM9 miembros de genomovar 1 (Desnoues *et al.*, 1993), esta capacidad fijadora de nitrógeno coloca a esta especie con una alta capacidad de desnitrificar cuando se encuentran en ambientes limitados en nitrógeno (Lina *et al.*, 2014). Presentar ambas vías metabólicas confiere a *P. stutzeri* la habilidad de reasimilar el nitrógeno lo cual puede contribuir al aumento de la fertilidad de los sedimentos de donde fueron aisladas (lago de Xochimilco y laguna de Sontecomapan).

Dos de los aislados bacterianos identificados como *Caulobacter* sp y *Ancalomicrobium adetum*, descritos en el manual Bergers (2008), no han sido reportadas como fijadoras de nitrógeno, sin embargo en esta investigación se logró amplificar el gen *nifH*, lo que hace suponer que podrían ser subespecies aun no descritas. Una de las estrategias para identificar con exactitud un organismo diazotrofo es la generación de una sonda *nifHDK*, la cual brinde una señal positiva contra un organismo diazotrofo (ej.

de *Azospirillum brasilense*) que evidencie dicho operón responsable de las síntesis de la Nitrogenasa convencional (Andrade *et al.*, 1997; Fallik *et al.*, 1991; Vermeiren *et al.*, 1999).

En los aislados identificados como *Agrobacterium* sp y *Rhizobium* sp, que han sido reportados como eficientes fijadores de nitrógeno, se amplificó el gen *nifH*. Hasta 2013 *Agrobacterium* no era considerado diazotrofo ya que solo se le reconocía su capacidad promotora de crecimiento en asociación con leguminosas y otras plantas, sin embargo investigaciones más recientes han reclasificado la mayoría de las especies de este género *Agrobacterium* dentro del género *Rhizobium* además de demostrar la capacidad de fijar nitrógeno por la presencia de genes *nif* y por la incorporación natural de N¹⁵ (Dolatabadian *et al.*, 2014).

Podría ser cuestionable el aislamiento de las especies de *Rhizobium* de los sedimentos ya que las raíces de leguminosas son su principal hospedero, sin embargo, estas se encuentra en proceso de infección de la raíz presentan un corto periodo de vida libre, guiándose por una atracción quimiotáctica de la bacteria por la planta seguida de la inducción de cambios estructurales en los pelos radiculares. Esta atracción quimiotáctica se debe a que la planta exuda compuestos tales como aminoácidos y ácidos dicarboxílicos y compuestos de tipo flavonoide que actúan como atrayentes nutritivos que sirven como señales químicas para orientar a la célula a la raíz de la planta, es entonces cuando bacteria entra en contacto con los pelos radiculares jóvenes de la planta; por lo que es posible que durante este periodo de “invasión” se pudo este género de los sedimentos del lago de Xochimilco como fue ya reportado por Maróti y Kondorosi (2014).

Por último, los cuatro aislados no identificados que amplificaron el gen *nifH*, y que proceden de los sedimentos del Lago de Xochimilco, pueden ser especies nuevas de bacteriobentos microaerobio diazotrofo.

10. Conclusiones generales

- Los aislados bacterianos estudiados presentan un metabolismo respiratorio facultativo ya que crecieron en un intervalo de O₂ comprendido entre 21 y 4% pero la producción exoenzimática y utilización de fuentes de carbono fue a pO₂ de 4%.
- Se observó una clara diferenciación en la diversidad de la comunidad bacteriana de acuerdo a los diferentes sitios de estudio. Las especies de origen dulceacuícola fueron *Caulobacter* sp, *Pseudomonas stutzeri*, *Ancalomicrobium adetum*, *Agrobacterium* sp, *Rhizobium* sp, *Delta Protobacterium*, *Sphingomonas* sp, y las de origen marino a *Bacillus* sp, *Micobacterium* sp, *Bacillus aquamaris*.
- Las condiciones subóxicas (pO₂ 4%) favorecen la utilización de fuentes de carbono simples, como fuentes de carbono y energía, por lo que los resultados de este estudio podrían ayudar a reposicionar a algunas de las especies obtenidas en su clasificación taxonómica ya que hasta el momento han sido consideradas como aerobias estrictas o anaerobios facultativos.
- Se diferenciaron ácidos grasos (FAME) de las membranas celulares que podrían ser utilizados como biomarcadores para diferenciar diferentes especies pertenecientes al bacteriobentos microaerobio, algunos de ellos diazotrofos; incluso de especies que hasta el momento no habían sido cultivadas. Entre ellos se encuentran el C18:0 característico de *Caulobacter* sp, los tipos C15:0, C18:2n6c, C18:2n6t y C20:2 de *Bacillus aquamaris* y el C4:0 de *Bacillus* sp.

- Doce de los 30 aislados bacterianos obtenidos presentan el gene *nifH* que codifica para la síntesis de la enzima Nitrogenasa responsable de la catálisis de la fijación de nitrógeno molecular.
- Cinco aislados procedentes de los sedimentos del lago de Xochimilco podrían ser especies nuevas con alto valor biotecnológico por su aplicación como biofertilizantes ya que amplificaron el gen *nifH*.

11. Perspectivas de la investigación

Una de las interrogantes que se desprende de esta investigación está relacionada con los ocho aislados cuyas secuencias del 16S rDNA no han sido reportadas y por lo tanto podrían corresponder a especies aun no descritas. Para su identificación taxonómica es necesario emplear a futuro, técnicas moleculares que nos permitan establecer de manera más precisa su posición taxonómica. Como son la reacción extragénica palindrómica (REP), perfiles de restricción de polimorfismo de ADN ribosomal y polimorfismos de fragmentos específicos de amplificación. Dichos métodos podrían aplicarse también a los aislados que solo fueron identificados a nivel de género.

Otra estrategia que es empleada en la diferenciación genética son las denominadas secuencias RIC (Consenso Intergénico Repetitivo), que consiste en secuenciar fragmentos cortos de pares de bases (de 50 a 100), localizados en las regiones intergénicas del genoma en las bacterias. Los iniciadores están diseñados para amplificar desde la mitad de una secuencia RIC hacia afuera y terminar en la mitad complementaria de otra secuencia RIC próxima o distante; estas secuencias se intercalan a lo largo del genoma dentro de las regiones no codificantes; por lo tanto su ubicación en las bacterias pueden variar de manera inter e intra-especies, e incluso a nivel de subespecies (Katara *et al.*, 2012; Sauka *et al.*, 2011; Hernández *et al.*, 1997).

Sin embargo, una prueba más precisa sería la identificación de las enzimas especializadas que participan en la saturación o insaturación de los AG identificados como característicos; como son las enzimas Enz-B (enzima-biotina), ACP (proteína transportadora de acetato), ACT (acetil-CoA- transacilasa) y la M-ACP (malonil-ACP), las cuales ayudarían a diferenciar de manera más precisa a los aislados obtenidos,

sobre todo aquellos cuyas secuencias del 16S rDNA no presentaron semejanzas con especies descritas.

Con respecto a los aislados que amplificaron el gen *nifH*, especialmente en aquellos que sus secuencias del segmento 16S rDNA no han sido reportadas, se tendrían que secuenciar dicho gen para poder establecer si este corresponde al mismo operón de genes *nif* reportados en especies ya establecidas como fijadoras de nitrógeno.

Sin embargo, no basta con conocer la potencialidad fijadora de N₂ en los aislados basándose en el hecho de que fueron capaces de crecer sin ninguna fuente de nitrógeno y amplificar el gen *nifH*, es necesario cuantificar la incorporación de N₂ de manera directa, para ello es necesario emplear la técnica isotópica del ¹⁵N, ya que ofrece una cuantificación total de nitrógeno incorporado. (Valdés *et al.*, 2005; Campillo *et al.*, 2003).

Por otra parte una caracterización completa sobre las enzimas presentes en microorganismos microaerobios, son aquellas involucradas en la eliminación de metabolitos tóxicos derivados de la respiración aerobia (óxido nítrico) (Ferrara-Guerrero, 1993), por lo que la evaluación de isoenzimas de la superóxido dismutasa (SOD) ayudaría a confirmar el metabolismo microaerobio de los aislados estudiados, ya que esta cataliza la dismutación del ion superóxido en oxígeno y peróxido de hidrógeno. Debido a esto es una importante defensa antioxidante en la mayoría de las células expuestas al oxígeno.

12. Bibliografía

- Almeida, M.A., M.A, Cunha y F, Alcantara. 2001. Physiological responses of marine and brackish water bacterial assemblages in a tidal estuary (Ria de Aveiro, Portugal). *Aquatic Microbiol Ecol* 25: 113 – 125.
- Álvarez S. 2005. La descomposición de materia orgánica en humedales: la importancia del componente microbiano. *Ecosistemas* 14 (2): 17-29.
- Angeles-Vazquez, J.R. 2007. Tasas de fijación de nitrógeno atmosférico y caracterización química y molecular de bacterias diazotrofas microaerofilicas procedentes de sedimentos. Tesis Maestría, Universidad Autónoma Metropolitana-Xochimilco. México, D.F. 20-24 pp.
- Andrade, G., E, Esteban., L, Velasco., M.J, Lorite y E.J, Bedmar. 1997. Isolation and identification of N₂-fixing microorganisms from the rhizosphere of *Capparis spinosa* (L.) *Plant Soil* 197:19-23.
- Atlas, M.R y Bartha, R. 2006. Ecología microbiana y microbiología ambiental. Pearson Educación, Madrid. 231 p
- Azam, F y R.A Long, 2001. Oceanography sea snow microcosms. *Nature* 414: 495-498.
- Azam F. 1998. Microbial control of oceanic carbon flux: The plot thickens. *Science* 280: 694 – 696.
- Azam, F y B.C, Cho. 1990. Biogeochemical significance of bacterial biomass in the ocean's euphotic zone. *Mar Ecol Prog Ser* 63: 253 - 259.
- Bacelar-Nicolau, P.L.B., J.C, Nicolau., F, Marques., F, Morgado y R, Pastorinho. 2003 Azeiteiro UM 2003 Bacterioplankton dynamics in the Mondego estuary (Portugal). *Acta Oceanol* 24: 67–75
- Badings, T.F y C, Joung. 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. *J Chromatogr* 279:493-506.
- Baldini, J.I., L. Caruso, V.L.D. Baldani y S.R.J. Döbereiner.1997. Recent advances in BNF with non-legumes plants. *Soil Biol Biochem* 29:911-922.
- Barrera-Alba, J.J., S.M, Flores., G.A, Oliveira y F.M, Prado. 2008. Bacterial and phytoplankton dynamics in a sub-tropical estuary. *Hydrobiologia* 598: 229– 246
- Black, M. P., B, Moolhuijzen., R, Chapman., H, Barrero., M, Hungria y M, Bellgard. 2012. The genetics of symbiotic nitrogen fixation: comparative genomics of 14 Rhizobia strains by resolution of protein clusters. *Genes* 3:138-166; doi:10.3390.

- Balch, W., G.E, Foy., L.J, Magrum y B.S, Wolfe, 1979. Metanogens: reevaluation of a unique biological group. *Microbiological* 43: 260-296.
- Bergey, 2008 Manual of determinative bacteriology. Volume 1. Ed. Spring-Verlag, Michigan .1157-198p.
- Bessonov, N., A, Elizaron y O, González. 1971. Resultados de las investigaciones Cubano-Soviéticas en el Banco de Campeche. Coloquio sobre Investigaciones y Recursos del Mar Caribe y Regiones Adyacentes. UNESCO-FAO, París. pp 53-60.
- Cabrera, R.M y A, Carranza-Edwards. 2002. The beach environment in Mexico as a potential source of placer minerals. *Mar Georesour Geotechnol* 20:187-198.
- Calva, J.J.D., A.V, Botello y V.G, Ponce. 2005. Composición de hidrocarburos alifáticos en sedimentos de la laguna de Sontecomapan, Ver., México. *Hidrobiología* 15: 97-108.
- Campillo, R.R., U, C, Segundo., I.N, Pino y A. B, Montenegro. 2003. Estimation of biological nitrogen fixation in forange legumes using ^{15}N labeling methodology. *Agric Tec* 63 (2): 120-135.
- Castro-González, M y N.H, Campos. 2004. Efecto del cadmio y el cobre sobre el flujo de nitrógeno y fósforo en la interfase agua-sedimento en una laguna costera tropical. *Rev Acad Colomb Cienc* 28 (109): 535-54. ISSN: 0370-3908.
- Cotner, J y B.A, Biddanda. 2002 Small players, large role: Microbial influence on biogeochemical processes in pelagic aquatic ecosystems. *Ecosystems* 5: 105 – 121.
- Desnoues, N., M, Lin., X. W, Guo., L.Y, Ma., R, Carreno-Lopez y C, Elmerich. 2003. Nitrogen fixation genetics and regulation in a *Pseudomonas stutzeri* strain associated with rice. *Microbiol* 149:2251-2262.
- Díaz-Gonzáles, G., R, Gutiérrez., R, Pérez., S, Vega y León., M.G, Prado Gonzáles., G, Urban y G, Ramírez. 2002. Detección de adulteraciones en la grasa de leche pasteurizada mexicana. *Rev Salud Animal* 24:54-59.
- Dixon, R y D, Kahn. 2004. Genetic regulation of biological nitrogen fixation. *Nature Rev* 2: 221-231.
- Dufour, P., J.P, Torreton y M, Colon. 1990. Advantages of distinguishing the active fraction in bacterioplankton assemblages: some examples. *Hydrobiologia* 207: 295 - 301.
- Dunfield, K.E., L.J.C, Xavier y J.J, Germida. 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.

- Dolatabadian, A.S., M.M, Ghanati., G, Faezeh y M, Peter. 2014. *Agrobacterium rhizogenes* transformed soybean roots differ in their nodulation and nitrogen fixation response to genistein and salt stress. *Word J Microb Biot* 5:326. doi: 10.3389/fmicb.2014.00326
- Echegaray, A. A. 1995. Ciclo del nitrógeno y fases que lo constituyen. *Agromicrobiología. Tesis de Matría. Colegio de Postgraduados en Ciencias Agrícolas. Montecillo, México.* p. 7-35.
- El-Hamdaoui, A., I, Bonilla y L, Bolaños. 2008. Salinidad: efectos del estrés salino sobre la fijación de nitrógeno en leguminosas. *Universidad Autónoma de Madrid, España.* p. 235.
- Fallik, E., Y. K, Chan y R.L, Robson. 1991. Detection of alternative nitrogenases in aerobic gram-negative nitrogen-fixing bacteria. *J Bacteriol* 173:365-371.
- Ferrara-Guerero, M.J y Angeles Vázquez J.R. 2008. Bacterias microaerobias: Su papel en ecosistemas acuáticos estratificados. *En De las bacterias al clima: un enfoque ecológico.* Signoret Piollon M (eds). *Universidad Autónoma Metropolitana-Xochimilco. México, D.F.* p. 27-51.
- 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. *Rev Ciencias Marinas.* 26 (2):331-39.
- Ferrara-Guerrero, M.J. 1993. Distribution des bactéries microaérophiles dans les sédiments de lagunes côtières Méditerranéennes. Comparaison avec la distribution des bactéries aérobies et anaérobies. Étude des potentialités métaboliques. *Tesis Doctoral. Université de Aix-en-Provence,* 218 p
- Ferrara-Guerrero, M.J., D.G, Marty y A, Bianchi. 1993. Isolation and enumeration of anaerobic and microaerophilic bacteria in aquatic habitats. *In Handbook of Methods in Aquatic Microbial Ecology.* P.F. Kemp, B.F. Sherr, E.B. Sherr and J.J (eds.). *Cole. Lewis Publishers, Miami* p. 9-19.
- Findlay, H.R y C.F, Bobbs. 1993. Analysis of microbial lipids to determinate biomass and detect the response of sedimentary microorganism to disturbance. p. 347-357. *En Kemp P.F, Sherr B.F, Sherr E.B y Cole J.J (eds.) Handbook of Methods in Aquatic Microbial Ecology.* *Lewis Publishers, Miami.*
- Forchhammer, K. 2004. Global carbon/nitrogen control by PII signal transduction in cyanobacteria: from signals to targets. *FEMS Microbiol Rev* 28: 319–333.
- Gagné, A., M, Chicoine., A. Morin y A, Houde. 2001. Phenotypic and genotypic characterization of esterase-producing *Ureibacillus thermosphaericus* isolated from aerobic digester of swine waste. *Can J Microbiol* 47(10): 908-915.

- Gallardo, V.A., E. Klingelhoefter, W. Arntz y M. Graco. 2008. First report of the bacterium *Thioploca* in the Benguela. *J Mar Biol Ass U K* 78: 1.007-1.010.
- García, E. 1981, Modificación al Sistema de Clasificación de Köppen, para adaptarlo a las condiciones de la República mexicana, 3a edición, Ofset Larios, México, 252p.
- Gary, D.W., J. D, Lewis., C, Hoffmann., Y, Chen., R, Knight., K, Bittinger., J.H, Jun., C.R, Berkowsky., L, Nessel., H. Li y F.D, Buschman. 2010. Sampling and pyrosequencing methods for characterizing bacterial communities in the human gut using 16S sequence tags. *BMC Microbiol* 10:26 doi: 10.1186/1471-2180-10-206
- Grayston, S.J., S, Wang., C.D, Campbell y A, Edwards. 1998. Selective influence of plant species on microbial diversity in the rhizosphere. *Soil Biol Biochem* 30: 369-378.
- Gonzalez, P.M. 2000. Efecto de un inoculante microbiano a partir de cepas de *Azotobacter choococum* sobre el rendimiento en secuencias de cultivos hortícolas. Tesis de Maestría. Universidad de Camaguey, Cuba. 17-22 pp.
- González, F.A., B.A, Vázquez., F.S, y V.G, Ponce. 1994. Presencia de metales en sedimentos recientes y organismos de la laguna Sontecomapan, Veracruz, México. *Hidrobiol* 4 (1-2): 35-43.
- Gordon, W., C, Lynsey., J. R, Watt., C. F, Richard., R. P, Jhon y J.W, Andrew. 2006. A comparison of stable isotope probing of DNA and phospholipid fatty acids to study prokaryotic functional diversity in sulfate-reducing marine sediment enrichment slurries. *Environ Microbiol* 8 (9):1575-1589.
- Guerra-Martínez, S.L y M.A, Lara-Villa. 1995. "Florecimiento" de *Ceratium furca* (peridinales: Ceratiaceae) en un ambiente salobre: laguna de Sontecomapan, Mexico. *Rev Biol Trop* 44(1): 23-30
- Habe-Hirosh y Omori-Toshio. 2008. Genetics of polycyclic aromatic hydrocarbon metabolism in diverse aerobic bacteria. *Biosc Biotech and Biochem* 67 (2) 225-243 ISSN 0916-8451.
- Hans, H., G. L. Mikhail., V, Gogotova y S, Erko. 2003. Reclassification of *Desulfobacterium macestii* as *Desulfomicrobium macestii* comb. nov. *Int J Syst Bacteriol* 53: 1127–1130.
- Hansen H.P., K. Grasshoffand y J. Petersen. 1980. *In-situ* registration of oxygen utilization at sediment water interfaces. *Marin Chem* 24: 47-54.
- Holt, J.G., N.R, Krieg., P.H.A, Sneath y S.T, Williams. 1994. *Bergey's manual of determinative bacteriology*. Williams y Wilkings. Baltimore London.

- Hernández-Estrada, H.A., M.J, Ferrara-Guerrero., J.R, Angeles-Vázquez., Ponce-Mendoza, A y M.G, Figueroa-Torres. 2013. Evaluation of microbial enzyme activities in Sontecomapan lagoon, Veracruz, Mexico. *E-Bios* 2: (4): 50- 60.
- Hernández, F.J., L.R, Mariño., C.M, Orozco y J, Narvaez 1997. Uso de la Reacción en Cadena de la Polimerasa para caracterizar aislamientos nativos de *Bacillus thuringiensis*. *Rev Corpoica* 2: (1) 1-10.
- Imhoff, F.J. 2006. The phototrophic alpha-proteobacteria. p. 41–64. En: Dworkin, M., Falkow, S., Rosenberg, E., Schleifer, K.H. y Stackebrandt, E. (eds). *The Prokaryotes*. Vol. 5. 3ra ed. Springer. New York, USA.
- INECOL (Instituto de Ecología). 2002. Informe Final. Programa rector de restauración ecológica área natural protegida zona sujeta a Conservación ecológica Ejidos de Xochimilco y San Gregorio Atlapulco. México.
- Juárez, F., S, Silva y G, Cifuentes. 2003. Microbiological indicator of water quality in the Xochimilco canals, México City. *Salud Pública Mex* 45: 389-395.
- Katara, J., R, Deshmukh., N.K, Sing y S, Kaur. 2012. Molecular typing of native *Bacillus thuringiensis* isolates from diverse habitats in India using REP-PCR and ERIC-PCR analysis. 2012. *J Gen Appl Microbiol* 58: 83-94.
- Kim, J y D.C, Rees. 1992. Structural models for the metal centers in the Nitrogenase molybdenum-iron protein. *Science* 57: 1667-1682.
- Korda, A., P, Santas., A, Tenente y R, Santas. 1997. Petroleum hydrocarbon bioremediation: sampling and analytical techniques, *in situ* treatments and commercial microorganisms currently used. *Appl Microbiol Biotech* 48: 677-686.
- Lalucat, J., A, Bennasar., R, Bosch., E, García-Valdes y J.N, Palleron. 2006. Biology of *Pseudomonas stutzeri*. *Microbiol Mol Rev* 70(2): 510-547.
- Lányi B. 1987. Classical and rapid identification methods for medically important bacteria. En *Methods in microbiology*, R R Colwell y R Grigorva (eds). vol. 19. Academic Press, London, New York. P 1-68.
- Laybourn-Parry, J. 2002. Survival mechanisms in Antarctic lakes. *Philosophical Transactions of The Royal Society* 357: 863-869.
- Legendre, L y F, Rassoulzadegan. 1999. Plankton and nutrients dynamics in marine waters. *Ophelia* 41 (1): 153 - 172.
- Lebaron, P., P. H, Servais., C, Agogué., F, Courties y F, Joux. 2001. Does the high nucleic acid content of individual bacterial cells allow us to discriminate between active cells and inactive cells in aquatic systems. *App Environ Microbiol* 67(4): 1775 - 1782.

- León, J., F, Pellon., V, Unda., D, Janeth., C, Anaya y V, Mendoza. 2000. Producción de enzimas extracelulares por bacterias aisladas de invertebrados marinos. Rev Peruana Biol 7 (2): 122-139.
- Li, W.K.W., E.J.H, Head y W.G, Harrison. 2004. Macroecological limits of heterotrophic bacterial abundance in the ocean. Deep Sea Res 51: 1529 - 1540.
- Lina, M., C. Moreno., A.Pérez., M. Ramírez y M. Franco. 2014. Effect of storage temperature on the viability of symbiotic nitrogen fixing bacteria used in the preparation of biological inoculants for crop pea (*Pisum sativum*) and soybean (*Glycine max*). Rev Colomb Biotecnol 15 (2) 45-56.E
- Lipschultz F y N.J.P Owens, 1996. An assessment of nitrogen fixation as a source of nitrogen to the North Atlantic. Ocean Biogeochem 35: 261-274.
- Ludden, P.W y P.R, Gary. 2002. Nitrogen fixation by photosynthetic bacteria. Photosynth Res 73: 115-118.
- Madigan, M.T., J.F, Martinko y J, Parker. 2011. Biología de los microorganismos. Prentice Hall. Madrid, España. 150 p.
- Martínez, R., B, Dibut., I, Casanova y M, Ortega. 1997. Acción estimuladora de *Azotobacter chroococcum* sobre el cultivo del tomate en suelos Ferralítico Rojos. Agrotecnia de Cuba 27(1): 23-26.
- Maróti, G y É, Kondorosi. 2014 Nitrogen-fixing *Rhizobium*-legume symbiosis: are polyploidy and host peptide-governed symbiont differentiation general principles of endosymbiosis Front Microbiol 5:326 doi: 10.3389/fmicb.2014.00326
- Mecalco, H.A. 2010. Dinámica del bacteriopláncton y su relación con la biomasa fitoplanctónica en dos lagunas costeras del estado de Veracruz. Tesis, Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa. México, D.F. 56p.
- Merck. 2000. Microbiology manual. 4a. ed. Frankfurt am Main. 189 p.
- Meynell, G.G y E, Meynell. 1979. Theory and practice in experimental bacteriology. 2a. ed. Cambridge University Press, KU. 347 pp.
- Miletto, M., A, Loy., A.M, Antheunisse., R, Loeb., P.L.E, Bodelier y H.J, Laanbroek. 2008. Biogeography of sulfate-reducing prokaryotes in river floodplains. FEMS Microbiol Ecol 64:395–406.
- Moffett, J.W., L.E, Brand., P.L, Crott y K, Barbeau. 1997. Cu speciation and cyanobacterial distribution in harbors subject to anthropogenic Cu inputs. Limnol Oceanograph 42(5): 789-799.

- Mou, X., E, Robert y A.M. Mary. 2007. Bacterioplankton assemblages transforming dissolved organic compounds in coastal seawater. *Environ Microbiol* 9:8 2025–2037 doi:10.1111/j.1462-2920.2007.01318
- Morán, G.X.A., A, Bode., L.A, Suárez y E, Nogueira. 2007. Assesing the relevante of nucleic acid content as an indicador of marine bacterial activity. *Aquatic Microbiol Ecol* 46: 141 - 152
- Muciño-Márquez, R.E., M.G, Figueroa-Torres y A, Esquivel-Herrera. 2011. Variación nictemeral de la comunidad fitoplanctónica y su relación con las especies formadoras de florecimientos algales nocivos en la boca de la laguna costera de Sontecomapan, Veracruz, México. *CICIMAR Oceánides* 26(1): 19-31.
- Munn, C.B. 2004. *Marine Microbiology. Ecology and aplications*. Bios Scientific Publischer, Londres. 282 p.
- Murrell, M.C. 2003. Bacterioplankton dynamics in a subtropical estuary: evidence for substrate limitation. *Aquat Microb Ecol* 32: 239 - 250.
- Musat, F, J. Hardeer y I.F. Weddel. 2006. Study of nitrogen fixation in microbial communities of oil-contaminate marine sediment microcosm. *Environ Microbiol* 8:10 1834-1843.
- Paige, E.A., M. L, Chow., C.S.K., J, Arnold., J, Lu., M, McDermott and J, Davis. 2002. Cultivation-dependent characterization of bacterial diversity from British Columbia forest soils subjected to disturbance. *Can J Microbiol* 48:643-654.
- Pearce, D, J.C, van der Gast., B, Lawley y J. C, Ellis-Evans. 2003. Bacterioplankton community diversity in a maritime Antarctic lake, determined by culture-dependent and culture-independent techniques. *FEMS Microbiol Ecol* 45: 59-70.
- Pearce, D. A. 2000. A method to study bacterioplankton community structure in Antarctic lakes. *Polar Biol* 23: 352-356.
- Pérez, F., G, Díaz., G, Prado., T, Gutiérrez., L, González y R, Acacia. 1997. Manual de técnicas de análisis por cromatografía de gas líquido para la determinación de ácidos grasos, triglicéridos y esteroides. Laboratorio de Lácteos, Departamento de Producción Agrícola y Animal, Universidad Autónoma Metropolitana-Xochimilco. México, D. F. p 65.
- Pielou, E.C. 1984. *The interpretation of ecological data*. Wiley-Interscience, New York. 201 p.
- Piotrowska, Z. S y A, Mrozik. 2003. Signature lipid biomarker (SLB) analysis in determining changes in community structure of soil microorganisms. *Pol J Environ Stud* 12 (6): 669-675.
- Postgate, J.R. 1974. Prerequisites for biological nitrogen fixation in freelifving

- organismes. *En* The Biology of nitrogen fixation. A. Quispel (eds.) North-Holland Ed., la Haya. p. 674-686.
- Postgate, J.R. 1987. Nitrogen fixation. Edward Arnold (ed). London, 265 pp.
- Pool, C., J, Ingwersen., M, Stemmer., M.H, Gerzabek y E, Kandeler. 2006. Mechanism of solute transport affect small-scale abundance and function of soil microorganism in the detritosphere. *App Microbiol Biotech* 57: 583-595.
- Puerta, C y P, Ureña. 2005. Prácticas de biología molecular. Primera edición. Pontificia Universidad Javeriana (ed), Bogotá, Colombia.
- Rachael, J., D.Z, Miklos y M, Mike. 1999. The signal transduction protein GlnK is required for NifL-dependen nitrogen control of *nif* genes experection in *Klepsiella pneumonia*. *J Bacteriol* 181(4):1156.
- Reddy, A.T y M.L. Lodha. 1986. Nitrate-ammonification in groundnut *Rhizobium* strain 6050 grown microaerobically. *Biochem Physiol Pflanzen* 44: 149-158.
- Reis V.M, J.L. Baldani, V.L, Baldani y J. Doberienner. 2000. Biological dinitrogen fixation in Gramineae and palm trees. *Crit Rev Plant Sci* 19: 227-247.
- Rodríguez-Varela, A.C., A, Cruz-Gómez y H, Vázquez-López. 2010. List of the ichthyofauna in the Sontecomapan lagoon, Veracruz México. *Biocyt* 3 (9) 107-121.
- Romero, J.J y R, Negrete. 2000. Muestreo microbiológico. *En* Métodos de muestreo en la investigación oceanográfica. A Granados Barba, V Solis-Weiss, Bernal-Ramírez (eds) Posgrado en Ciencias del Mar y Limnología, UNAM, México. p. 189-200.
- Rozak, D.B y R.R, Colwell. 2002. Survival strategies of bacteria in the natural environment. *Microbiol Rev* 51: 365-379.
- Salas de León, D., A, Montreal-Gómez., M, Signoret y J, Aldeco. 2004. Anticyclonic-cyclonic eddies and their impact on near-surface chorophyll stocks and oxigen supersaturation over the Campeche Canyon, Gulf of Mexico. *Jour Geophys Res* 109: C05012-C5029.
- Sandoval, C.J. 2008. Evaluación de la calidad de agua en los canales de Xochimilco para su recuperación ecológica. Tesis de Maestría en Ciencias Biológicas, Instituto de Ecología, Universidad Nacional Autónoma de México. Mexico, D.F. 46 p.
- Santruckova, H., E, Rejmenkova., B, Pivnickova y J.M, Snider. 2010. Nutrient enrichment in tropical wetlands: shifts from autotrophic to heterotrophic nitrogen fixation. *Biogeochem* 101:295–310.
- Sauka, D.H., J.I, Basile y G, Benintende. 2011. Evidence of *Bacillus thuringiensis* intra-serovar diversity revealed by *Bacillus cereus* group-specific repetitive extragenic

- palindromic sequence-based PCR genomic fingerprinting. *J Mol Microbiol Biotechnol* 21(3-4):184-90.
- Servais, P., C, Courties., P, Lebaron y Troussellier, M. Troussellier. 1999. Coupling bacterial activity measurements with cell sorting by flow cytometry. *Microbiol Ecol* 38: 180 – 189: 29-33. DOI 10.1111/j1574-6988.
- Sheridan, K.H, G. Helen., A.O. David, J.F. Larry y J.K Michael. 1994. Accuracy, reproducibility, and interpretation of fatty acid methyl ester profiles of model bacterial communities. *App Environ Microbiol* 60: 2483-2493.
- Shiah, F.K y H.W, Ducklow. 1994. Temperature and substrate regulation of bacterial abundance, production and specific growth rate in Chesapeake Bay, USA. *Mar Ecol Prog Series* 103: 297 - 308.
- Short Protocols in Molecular Biology, Frederick M, R Brent, E R Kingston, D D Mora, J G Siedman, A J Smith, K Struhl. 2002. 4 ed. A compendium of methods from current protocols in molecular biology. Ed Board, New York.
- Solís, S.G.A. 2005. Aislamiento y caracterización de *Vibrio cholerae* de los canales de Xochimilco. Tesis de licenciatura en Biología, Universidad Nacional Autónoma de México. México, D.F. 86p.
- Stanier, R.Y., N.J, Palleroni y M, Doudoroff. 1996. The aerobic pseudomonads, a taxonomy study. *J Gen Microbiol* 43:159-271.
- Stewart, E.J., M, Richard., P, Gregory y T, Francois. 2005. Aging and death in an organism that produces by morphologically symmetric division. *PLoS Biol* 3 (2).
- Teske, A, M.L. Sogin, L.P. Nielsen y H. Jannasch. 1999. Phylogenetic relationships of a large marine *Beggiatoa*. *Sys Appl Microbiol* 18: 517-526.
- Thauer, R.K, K. Jungermann y K, Decker. K. 1997. Energy conservation in chemotrophic anaerobic bacteria. *Bacteriol Rev* 41(1):100-80
- Valdés, M., N.O, Pérez., P, Estrada de los Santos., J, Mellado., P, Cabriales., J.J, Normand y M.A, Hirsch. 2005. Non-*Frankia* actinomycetes isolated from surface-sterilized roots of *Casuarina equisetifolia* fix nitrogen. *Appl Environ Microbiol* 71: 460-466.
- Vainshtein, M. B., H. Hippe y R. M, Kroppenstedt. 1992. Cellular fatty acid composition of *Desulfovibrio* species and its use in classification of sulfate-reducing bacteria. *System Appl Microbiol* 15: 554–566.
- Vermeiren, H.A., G, Willems., R, Schoofs, V, de Mot, V, Keijers, W.L, Hai y J, Vanderleyden.1999. The rice inoculant strain *Alcaligenes faecalis* A15 is a nitrogen-fixing *Pseudomonas stutzeri*. *Syst Appl Microbiol* 22:215-224

- Wetzel, R.G. 1999. Biodiversity and shifting energetic stability within freshwater ecosystems. *Archiv für Hydrobiologie. Spec. Issues Advanc. Limnol.* 54: 19-32.
- Zhadanov, R. I., A. S, Shmyrina, T.V, Zarubina, A, Kraus and W, Lorenz. 2006. Fatty acid profiles of DNA-bound and whole-cell lipids of *Pseudomonas aurantiaca* drastically differ. *Dokl Biochem Biophi* 410 (1): 292-296.
- Zehr, J.P y B.B, Ward. 2002. Nitrogen cycling in the ocean: new perspectives on processes and paradigms. *Appl Environ Microbiol* 68: 101 -1024.
- Zehr, J.P y D.G, Capone. 2006. Problems and promises of assaying the genetic potential for nitrogen fixation in the marine environment. *Microbial Ecol* 32: 263-281.

**Publicación aceptada en la revista Terra Latinoamericana derivada de la presente
investigación**

TERRA LATINOAMERICANA

*Difusión Científica de la Sociedad Mexicana
de la Ciencia del Suelo A.C.*

27 de noviembre de 2014

Estimado, Dra. María Jesús Ferrara-Guerrero

Le comunico que su trabajo fue aceptado para su publicación:

PHYSIOLOGICAL DIVERSITY AND CHARACTERIZATION OF BENTHIC MICROAEROBIC BACTERIA.

Diversidad fisiológica y caracterización de bacterias microaeróbicas bénticas.
(Characterization of benthic microaerobic bacteria)

José Roberto Ángeles-Vázquez, Néstor Octavio Pérez-Ramírez, Facundo Rivera-Becerril, Daniel Martínez Gómez, Alfonso Esquivel-Herrera, Marc Pagano, María Jesús Ferrara-Guerrero^{2*}.

Estimado(a) Autor, se le invita a pagar la publicación con un costo de \$2,200.00 100/00M.N, ya que este órgano difusor se sostiene de las contribuciones.

Le pido envíe su comprobante de transferencia o ficha de depósito en efectivo en una versión pdf junto con la información correspondiente para la elaboración de su factura de ser posible el mismo día del pago, o bien a más tardar dos días después, en virtud de que la factura que se extiende es electrónica y debe coincidir con la fecha del depósito.

De preferencia realizar los pagos antes de los días 25 de cada mes.

Favor de enviar el comprobante a la Dra. Catarina Loreda tesorera de la SMCS (catarina.loredo@uaslp.mx) con copia para terra.latin@gmail.com. Si el aviso de pago lo realiza antes de las 15:00 horas, Usted recibirá la factura el mismo día a través de su cuenta de correo electrónico. Si dicho aviso es posterior a las 15:00 horas, la factura será entregará al día siguiente.

Facturas que sean solicitadas después de cinco días de efectuado el pago ya no podrán ser enviadas, debido al orden consecutivo de la facturación.

Cuenta **0189356592** Bancomer a nombre de Sociedad Mexicana de la Ciencia del Suelo.
Cuenta interbancaria **012700001893565926**

ATENTAMENTE

<LA REVISTA TERRA LATINOAMERICANA SE ENCUENTRA EN EL ÍNDICE DE REVISTAS DEL CONACYT>
Departamento de Suelos, UACH Carr. México-Tezcoco km 38.5 Apartado Postal 45, Estado de México Tel. y Fax 01 (595) 95 21721 e-mail: terra.latin@gmail.com

**PHYSIOLOGICAL DIVERSITY AND CHARACTERIZATION OF
BENTHIC MICROAEROBIC BACTERIA.**

Diversidad fisiológica y caracterización de bacterias microaeróbicas bénticas.

(Characterization of benthic microaerobic bacteria)

**José Roberto Angeles–Vázquez^{1,2}, Néstor Octavio Pérez-Ramírez⁴, Facundo Rivera-Becerril², Daniel
Martínez Gómez³, Alfonso Esquivel-Herrera², Marc Pagano⁵ y María Jesús Ferrara-Guerrero^{2*}.**

¹ Doctorado en Ciencias Biológicas y de la Salud. Universidad Autónoma Metropolitana.

²Departamento el Hombre y su Ambiente. Calzada del Hueso 1100, Colonia Villa Quietud, CP.

04960, México, D.F.

*Autor responsable (fgmd6735@correo.xoc.uam.mx)

³Departamento de Producción Agrícola y Animal. Universidad Autónoma Metropolitana –

Xochimilco

⁴PROBIOMED, S.A de C.V. Cruce de carretera Acatzingo-Zumpahuacan S/N, CP. 52400,

Tenancingo, Estado de México.

⁵ Aix-Marseille University, Mediterranean Institute of Oceanography (M I O), 13288,

Marseille, Cedex 9, France; Université du Sud Toulon-Var, 83957, La Garde Cedex,

France CNRS-INSU/IRD UM 110

RESUMEN

Los ésteres metílicos de los ácidos grasos (FAME) de las membranas celulares de procariontes se han estudiado poco en comunidades bacterianas de vida libre que habitan en los sedimentos de ecosistemas acuáticos. La escasez de información es mayor cuando se trata de la comunidad bacteriana microaeróbica que habita en las zonas subóxicas de los sedimentos y/o cuerpos de agua estratificados. Por lo anterior en el presente trabajo se reporta la diversidad de los FAME, molecular y fisiológica de 15 cepas bacterianas microaeróbicas bentónicas aisladas de tres ecosistemas acuáticos mexicanos. Se realizó un análisis del perfil FAME, una amplificación del segmento 16S rDNA y un fisiológico a diferentes pO₂. Dos cepas presentaron un metabolismo microaeróbico estricto y las otras 13 microaeróbico facultativo. Las especies identificadas fueron *Caulobacter* sp, *Ochrobactrum anthropi*, *Sphingobium* sp, *Bacillus firmus*, *Bacillus* sp, *Pseudomonas stutzeri*, y *Sphingomonas* sp. Cuatro ácidos grasos fueron característicos de las cepas de sedimentos lagunares (C20:4n6, C22:6n3 and C23:0) y tres de marinos (C22:0, C22:1n9 and C24:0). Algunos fueron característicos de un género o especie: el C22:6n3 de *Ochrobactrum anthropi*, el C6:0 de *Caulobacter* sp y el C22:0 de *Sphingobium* sp y *Sphingobium amiense*.

Palabras clave: bacterias heterótrofas, ésteres metílicos de ácidos grasos (FAME), 16SrDNA, caracterización fenotípica, sedimentos.

SUMMARY

Fatty acids methyl esters (FAME) of prokaryotes cell membranes have been scarcely studied in free-living bacterial communities from aquatic ecosystem sediments.

Lack of information is even bigger for the microaerobic bacterial communities from suboxic areas of sediments or stratified water bodies. Thus, the presented work reports the FAME, the phenotypical and molecular diversity of 15 benthic microaerobic bacterial strains isolated from three aquatic Mexican ecosystems. A FAME profile analysis, an amplification of segment 16S rDNA and physiological assays to different pO₂ were performed. Two of the strains presented strict microaerobic metabolism and the other 13 a facultative microaerobic one. The species identified were *Caulobacter* sp, *Ochrobactrum anthropi*, *Sphingobium* sp, *Bacillus firmus*, *Bacillus* sp, *Pseudomonas stutzeri* and *Sphingomonas* sp. Four fatty acids were characteristic of lagoon sediment strains (C20: 4n6, C22: 6n3 and C23:0) while three were from marine origin (C22: 0, C22: 1n9 and C24: 0). Some of them are characteristic of one genus or species: C22: 6n3 for *Ochrobactrum anthropi*, C6: 0 for *Caulobacter* sp, and C22: 0 for *Sphingobium* sp and *Sphingobium amiense*.

Index words: Fatty acid methyl esters (FAME), heterotrophic bacteria, 16SrDNA, phenotypic characterisation, sediments.

INTRODUCTION

Molecular oxygen has many different functions in the metabolism of microorganisms; it is the most important chemical agent which controls the redox potential in aquatic ecosystems, and it is the main terminal electrons receptor for aerobic microorganisms, either heterotrophic or chemolithotrophic. Due to this, oxygen concentration is one of the main environmental variables modifying microorganism distribution (Ferrara-Guerrero and Bianchi, 1990; Atlas and Bartha, 2006). Not only molecular oxygen is fundamental for the cell, but also the origin of multiple toxic reactions, that induce cellular responses of diverse forms. Bacteria respond to the favourable oxygen concentrations with positive aerotaxis, and to the unfavourable ones with negative aerotaxis. In many biotopes like soils and sediments, the aerobic bacteria constitute a considerable part of the microbial population (Garrity *et al.*, 2004), nevertheless in stratified ecosystems there is a group of microaerobic bacteria that present their better development at pO₂ from 0.2 to 7% (Ferrara-Guerrero *et al.*, 1993).

In the sediments, the concentration of available oxygen is low, allowing the formation of microoxic biotopes (i.e. with oxygen concentrations smaller than 5%, approximately 10 mM of dissolved O₂). An example of microoxic habitats is that of nodules of leguminous roots with oxygen concentrations smaller than 1 μM; these conditions of poor oxygenation promote the growth of diazotrophic symbiotic bacteria (e.g. *Rhizobium* or *Bradyrhizobium*). For their growth, microaerobic bacteria require O₂, nevertheless high concentrations of this gas act as an inhibitor. On the other hand, terminal oxides of these bacteria have apparently low values of K_M (affinity of an enzyme for its substrate) at O₂ concentrations below 1 mM (Imhoff, 2006).

Microaerobic bacteria are part of a very diverse group exhibiting great physiological importance which is very difficult to isolate because of their critical oxygen demands. The group of microaerobic bacteria has a fundamental role in nitrogen recycling in aquatic ecosystems since many of them are involved in the molecular nitrogen fixation (N₂) (Reimers, 1989), and in organic matter mineralization as in the case of some saprophytes described by Barrera-Escorcía and Namihira-Santillán (2004). Some of the genera with farming importance are *Azotobacter*, *Bradyrhizobium*, and *Rhizobium* used intensively in agricultural activities since they contribute up

to 50% of plant nitrogen needs (González *et al.*, 1992; Dibut-Álvarez, 2009). *Helicobacter pylori*, the causal agent of the peptic ulcer, is an example of microaerobic species of medical importance (Bergers, 2000). Little is known about the chemical characteristics from cellular membranes of microaerobic bacteriobenthos. The largest part of the information on this subject is found for aerobic and anaerobic groups from land environments (Buyer *et al.*, 2002; Jafra *et al.*, 2006), but not from sediments of aquatic environments. Specifically, the information on the fatty acid methyl esters (FAME) profiles of cellular membranes from free-living microaerobic bacteria is not very abundant. However, the FAME analysis of microaerobic bacteriobenthos cell membranes can be a powerful tool for detecting and differentiating bacterial species from sediments, as reported by Vainshtein *et al.* (1992) and Hans *et al.* (2003) for some *Desulfovibrio* species; by Gordon *et al.* (2006) for the genus *Desulfococcus*, and by Zhadanov *et al.* (2006) for *Pseudomonas aurantiaca*. However, careful standardization of growth conditions is needed, because membrane composition is strongly affected by environmental conditions and by the nature of culture medium (Buyer *et al.*, 2002). Certain microbial taxonomic groups can be identified by the presence of specific biomarker fatty acids (e. g. isoprenoid quinones) and other molecules, which represent a tool for studying the structure and changes in microbial community compositions as a result of environmental changes and the introduction of pollutants into aquatic systems (Thompson *et al.*, 1993; Paige *et al.*, 2002; Piotrowska and Mrozik, 2003; Mrozik *et al.*, 2005; Munn, 2004).

Among bacteria, the largest part of the available information existing on the FAME profiles corresponds to genre already described like *Azotobacter*, *Bradyrhizobium*, *Rhizobium* (with some facultative microaerobic species), *Actinobacteria*, *Vibrio*, *Bacillus*, *Ureibacillus* (strict aerobic), *Clostridium* (with strict and facultative anaerobic species) (Hamamoto *et al.*, 1994; Graham *et al.*, 1995; Dunfield *et al.*, 1999; Gagné *et al.*, 2001; Paige *et al.*, 2002) due to their medical, ecological and economical importance; and only few studies exist about fatty acids (FA) profiles of some benthic bacterial genre (Gordon *et al.*, 2006). In this context, this investigation aims to studying the diversity of the benthic bacteria populations with diazotrophic microaerophilic metabolism isolated from sediments of three aquatic environments, through their responses to different physiological,

and biochemical tests their molecular identification through 16S rDNA sequencing analysis and through the characterization of their FAME profiles.

MATERIAL AND METHODS

The sediment samples were collected in three Mexican aquatic ecosystems: a) Xochimilco Lake, located SE from Mexico City (98° 57' and 99° 22' W, 19° 03' and 19° 36' N), at an altitude of 2500 m. It is formed by canals which are currently fed by treated wastewater sewages from the city, and its mud is used for culture purposes in inter canals areas known as 'chinampas' (Juarez *et al.*, 2003).

b) Sontecomapan Lagoon, located at the South of Veracruz State (95° 00' and 95° 00' W, 18° 30', 18° 34' N), presents an irregular shape and an area of 891 ha. In this shallow water body (2 m average depth), there is water exchange between the lagoon and the ocean through a natural mouth at NW of the lagoon (Reséndez, 1982).

c) An area Southwest from the Gulf of Mexico (20° 12' and 21° 46' N, 92° 24' and 93° 24' W), within San Pedro and Grijalva River plumes, with a salinity of 36 PSU (Suárez and Gasca, 1992; Salas de León *et al.*, 2004).

Sediment Samples

Upper layer sediments (0 -10 mm depth) from shallow sites (ten from Sontecomapan Lagoon and seven from canals of 'chinampas' sites of Xochimilco Lake) were collected with an acrylic hand corer (50 mm i.d. and 260 mm length). Two millilitres of sediment were taken from the corer using a sterile syringe without point and preserved at -20°C with 18 mL of a sterile 20% glycerol solution, until processing in the laboratory (Ferrara-Guerrero *et al.*, 2007).

Sediment samples from river plumes were collected with a Van Veen grab during cruises on the Oceanographic Ship Justo-Sierra (UNAM, Mexico). A 2 cm³ subsample of each grab launch was taken using a sterile syringe without point, avoiding disturbing the surface (Ferrara-Guerrero *et al.*, 1993). The salinity of the interstitial water was measured with a refractometer ATTAGO® model 3T with temperature compensator. The interstitial water was obtained from

the not-disturbed sediment cores using a 5 mm outer diameter (o.d.) and a 10 cm long capillary tube, with a series of millimeter perforations throughout the first centimeter of the capillary tube tip and, the least upper bound connected to a hose connected to a syringe of 50 mL.

Fifty three bacterial isolates from the upper layer sediments of Xochimilco Lake were obtained; 43 of them were able to grow in suboxic conditions. From Sontecomapan Lagoon, 37 bacterial isolates were obtained (18 grew optimally in suboxic conditions), and 37 from the Gulf of Mexico (17 of them were microaerobic).

Tests of tolerance to oxygen (pO_2 of 0.4 and 21%), and capacity to fix molecular nitrogen were performed to the 78 isolates able to grow in suboxic conditions. Following their response to this test, only 15 isolates (5 from each ecosystem) were selected since they grew at pO_2 of 4%, presented the capacity to fix N_2 and did not respire sulphates.

Cultivation and Purification of Microaerophilic Diazotrophic Bacteriobenthos

In this study, in order to capture a diverse array of microaerophilic bacteria able to fix N_2 , a semisolid mineral medium (2 g bacteriological agar L^{-1}) was used, with 0.5 g L^{-1} calcium succinate (Sigma) as only source of carbon, no nitrogen source and pH 7.5 (Ferrara-Guerrero *et al.*, 1993; Ferrara-Guerrero and Bianchi, 2000). For isolating microaerobic bacteria with capability to fix the N_2 , the method of serial of decimal dilutions in 0.9% of NaCl solution was used. An aliquot of 1 mL of each dilution was inoculated into 9 mL of the semisolid growth medium, previously liquefied in warm bath, and incubated at 20°C for two weeks (Ferrara-Guerrero *et al.*, 1993). The microaerobic microbial growth is observed in the form of sub superficial rings of growth. The ring of growth was extracted with a sterile Pasteur pipette under a continuous N_2 flow, in order to avoid oxygen in the culture medium, and then transferred to Hungate tubes gasified with a mix of gases with 4% O_2 and 96% N_2 (v/v) (Praxair[®], standard calibration), containing 9 mL of liquid mineral medium enriched with 0.1 ml L^{-1} of Balch's vitamin solution (Balch *et al.*, 1979), and incubated at 25°C at 70 rpm during seven days. The mixed bacterial cultures were purified by series of decimal dilutions in mineral liquid medium gasified with pO_2 of 4%. The purity of the bacterial culture was verified in plates incubated in suboxic atmosphere (manometer Bioxon[®] jars for anaerobic cultures), and by observation in phase contrast microscope 100x (Olympus Bimax 50). Pure

cultures were conserved in Hungate tubes containing 9 mL of enriched liquid growth medium and at pO₂ 4%.

Tolerance to Different Oxygen Concentrations

To determine oxygen tolerance of microaerophilic isolates, they were incubated in jars for anaerobic cultures at different pO₂ (21% O₂ and 4% O₂ balance 96% N₂) and anoxic conditions (10% N₂ balance 90% CO₂) (PRAXAIR®).

Morphological and Physiological Tests

The characterization of microaerophilic isolates included four morphological (colonial form, cell form, mobility, coccoid bodies presence), and eight physiological (Gram-stain response, capsule formation, cytochrome oxydase and catalase activities, nitrate and sulphate respiration, glucose oxidation and fermentation) tests (Meynell and Meynell, 1979; Stanier *et al.*, 1996; Merck, 2000), incubated under low oxygen atmosphere (pO₂ 4%), using jars for anaerobic cultures.

Methyl Esters Determination

FAME type and concentration of pure bacterial isolates cell membranes were determined according to the gaseous phase chromatography method (Badings and Joung, 1983; Findlay and Dobbs, 1993). Concerning fatty acid (FA) extraction, five Petri dishes with triptone-yeast extract solid medium to obtain massive cultures of each pure bacterial isolate (Dunfield *et al.*, 1999), were incubated under low oxygen conditions (pO₂ 4%). Bacterial biomass was then collected by washing with 3 to 4 mL of 5% formaldehyde solution, and then centrifuged at 6500 rpm for 15 min at 4°C. The cell button was washed with a physiological solution (0.85% NaCl) twice. Biomass obtained was deep frozen for 24 h at -70°C, and then lyophilized for 3 h at 7 kPa vacuum. Twenty milligrams of dry weight were methylated with 0.1 mL of sodium metoxide 0.5 N and 0.9 mL of nanograde petrol (Díaz-González *et al.*, 2002). A 1 µL aliquot was injected in a gas chromatograph (Perkin Elmer Autosystem 9000 Model), equipped with a flame ionization detector and a smelt silica 100 m long capillary column with syloxene and a high thermal resistance carbonate (SEG HTS) base, aluminium covered and using Helium (4.6) as a carrying gas. As a standard, a mix of 37 fatty acids methyl acids (FAME) SUPELCO® (47885-U) was used (Pérez *et al.*, 1997). The

separation temperatures of the fatty acids methyl esters were 140°C (5 min) to 240°C at 4°C hold 15 min.

The percentage of the concentration and the relative frequency for each FA, was calculated by dividing the number of times each FAME type appeared by the whole number of isolates (15).

Extraction of DNA, and Amplification and Sequencing of the 16S rDNA

The extraction of the genomic DNA was accomplished from 20 mg of humid biomass using the commercial purification kit Fast DNA for Spin Kit Soil (Ros *et al.*, 2006). The amplification of the segment 16S rDNA was carried out considering 50 ng of genomic DNA, using the universal primers rD1 (5' -AAGGAGGTGATCCAGCC- 3') and fD1 (5' -AGAGTTTGATCCTGGCTCAG- 3') (William *et al.*, 1991). The amplification conditions were: 10 min at 95 °C; 35 cycles, each consisting of 1 min at 95 °C, 1 min at 45 °C, and 1 min at 72 °C; and finally 10 min at 72 °C (Laguerre *et al.*, 1994; Puerta and Urueña, 2005). The amplified products (1500 bp) were visualized by means of electrophoresis in 1.2% agarose stained with ethidium bromide solution; the amplicon was purified with the QUIaquick (Quiagen®) package and sequenced. The results of the sequencing were analyzed in DNA Star version 4.0® and DNA Man® programs.

Statistical Analysis

The results of 93 morphological, physiological and chemical tests performed to each of the bacterial isolates were submitted to Cluster Analysis with Euclidean distance as a similarity measure, using Ward's minimal variance method as an algorithm for groups formation (Pielou, 1984), and the Statistica® package (StatSoft Inc. Tulsa, OK, USA). To determine the contribution of each FA to the total variance of FA composition in the bacterial isolates, a principal component analysis, based on the methyl esters diversity (37), was done. To define with precision the criteria for the FA classification according to its frequency and abundance, an Olmstead-Tukey graph was used, in which the frequency and the abundance were represented as a scatterplot, and the two axes were divided according to their corresponding median. The resulting quadrants correspond to dominant, frequent, rare and abundant FA; this approach has been successfully used for vegetal and animal communities' classification (Sokal and Rohlf, 1995).

The bacterial strains with microaerophilic metabolism used as references in all morphological, physiological and chemical tests were *Azospirillum lipoferum* DSM2292 (Terrand *et al.*, 1979) and *Magnetospirillum magnetotacticum* DSM3856 (Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH, Braunschweig Germany) (Maratea and Blakemore, 1981).

RESULTS AND DISCUSSION

Tolerance to Different Oxygen Concentrations

The isolates presented the capacity to grow in oxic and suboxic conditions (pO_2 of 21 and 4%). No isolate grew under strict anaerobic conditions (10% N_2 /90% CO_2) (Table 1).

Morphological and Physiological Tests

All isolates were motile rods, 60% exhibited capsule and only 33.3% refractive bodies. Sixteen percent of bacterial isolates were Gram-negative, 20% of them presented cytochrome oxydase enzyme and all of them were positive for catalase activity. Only three isolates from Xochimilco Lake did not respire nitrate; by contrast, none used sulfate as a terminal electrons acceptor. Six isolates were able to oxidize glucose, and only one was unable to ferment it (Table 1).

Fatty Acids Identification

The FAME analysis performed in each one of the 15 pure bacterial isolates, proved the existence of 31 different types of FA in cell membranes (Figure 1). The highest variability was found in isolates from Sontecomapan Lagoon (26 types), followed by those from the Gulf of Mexico (22), and Xochimilco Lake (19).

The relative frequency of FAME according to its percentage concentration (% w/w) was calculated. The most representative FAs from Xochimilco Lake were the C8:0, C18:1n9C, C20:2, C20:5n3 and C22:6n3 (Figure 1a), and for Sontecomapan Lagoon and Gulf of Mexico isolates were C11:0, C12:0, C13:0, C14:0, C16:0, C16:1, C17:0, C18:0 and C18:1n9c (Figures 1b and 1c). The FA which showed the highest concentration percentages were C10:0, C14:1, C16:0, C16:1 and C18:1n9c types, in the three environments (Table 2).

The lowest percentages of FAME were found in isolates from the Gulf of Mexico; only C14:1 showed a concentration higher than 30%, in contrast with the others which mainly were less than 10% (Figure 1c).

Some FAME types were characteristic of the bacterial isolates from an ecosystem in particular. In this way, the C6:0, C20:4n6, C22:6n3 and C23:0 were identified in Xochimilco Lake isolates (X1, X4, X19 and X35), and C22:0, C22:1n9 and C24:0 in the Sontecomapan Lagoon (S47, S55 and S56), while no characteristic FAME were found in the isolates from the Gulf of Mexico. The FAME diversity and percentage concentration, in the three study regions, are shown in table 2.

Statistical Analysis

A cluster analysis was performed considering morphological and physiological variables as well as FAME profiles from the 15 bacterial isolates, including two collection strains (*A. lipoferum* and *M. magnetotacticum*). At a Euclidean distance of 28, two phenons and three pairs (Figure 2) were identified. The pair 1 and phenon 1 gathered the majority of isolates from Sontecomapan lagoon sediments, where the salinity fluctuated between 5 and 18 PSU. Phenon 1b gathered majority of isolates from Sontecomapan Lagoon and the Gulf of Mexico, where the salinity fluctuated between 14 and 36 PSU. The group (a) of phenon 1, clusters the strains GF73 (*Bacillus* sp), GF70 (*Pseudomona stutzeri*) and G69 (*Bacillus* sp). Even when the strains GF69 y GF73 are Gram positive and do not produce oxidase, the strain GF69 is closely linked to a *P. stutzeri* (GF70) due to the fact that they do not oxidize glucose, there is no capsule and their fatty acids profile is wide (13 and 11 respectively), while *Bacillus* sp shows less diversity (8), additionally to GF69 that shares 8 fatty acids with GF 70 and only five with GF73. On the other hand, phenon 2 was integrated by bacterial isolates from Xochimilco Lake sediments, which is a freshwater ecosystem. Furthermore, pairs 1 and 3 gathered isolates able to ferment/or oxidize glucose, thus differing from phenons 1 and 2 in which only some of them are capable of doing so.

The principal component analysis (PCA) based on FAME diversity provided 4 groups. Group 2 included the highest number of isolates (9), all obtained from Gulf of Mexico and Sontecomapan Lagoon (Figure 3); this group showed highest FAME diversity (23 types), in which the more representative types were: C12:0, C16:1, C17:0 and C18:1n9c. The groups 1 and 3 presented the lowest diversity with 8 and 9 FA-types respectively. The group 1 gathered isolates with FAME considered as characteristics (C6:0, C23:0 and C22:0) of isolates X1, X35 and S47; the presence or not of one of these FAs is the feature that separates one isolate from the other and from the rest of

the isolates of the group. Something similar happened regarding group 4, which presented the FAsC20:4n6 and C22:6n3.

In group 3, the reference strains (*A. lipoferum* and *M. magnetotacticum*) and isolate X11, all characterized by the FAsC20:0, C18:1n9t, C18:1n9c and C15:1, were gathered. In general, the four axes explained 78.3% of the cumulative percentage of variance. The eigenvectors 1 represented 57.3%, the 2 the 24.9%, the 3 the 53.4% and the 4 the 68.7%.

According to Olmstead-Tukey's plot, in which FA of isolates from each study site are classified by categories (abundant, dominant, rare and frequent), the main part of FA reported as rare were found in isolates from Xochimilco Lake and Gulf of Mexico (Figures 4 and 6). It should be otherwise, the majority of FAME in isolates from Sontecomapan Lagoon was reported as frequent (Figure 5).

No fatty acid of the bacterial isolates from the three areas in study was placed in the category of abundant, and four of them were classified as dominant (C18:1n9c, C14:1, C16:0, C16:1); from those, the isolates from Gulf of Mexico and Sontecomapan lagoon shared the types C14:1 and C16:1.

Amplification and Sequencing of the 16S rDNA.

Sequences of the 16S rDNA showed that the whole isolates presented high levels of similarity (98 to 100%) with eight sequences reported in the National Center for Biotechnology Information (NCBI), which correspond to eight bacterial species: *Caulobacter* sp, *Ochrobactrum anthropi*, *Sphingobium* sp, *Bacillus firmus*, *Bacillus* sp, *Pseudomonas stutzeri*, and *Sphingomonas* sp. The sequences of the isolates X4, X19 and S46 did not match with any sequence described in the NCBI. The isolated S47, which so far had been reported as uncultured, could correspond to the genre *Ochrobactrum* since in the dendrogram it joined the same euclidean distance (14) a *O. anthropi* and in the NCBI records it presented an 89% similarity with this genre (Table 3).

All the strains presented a facultative microaerobic metabolism since they grew in aerobic and microaerobic conditions and were not able to grow in strict anaerobic conditions. Most of them showed presence of cytochrome oxydase enzyme, and thus, none could be able to survive under

oxygen saturation conditions. Generally, microaerophilic microorganisms are well adapted to suboxic microhabitats of sediments (Munn, 2004).

According to the obtained results, it is difficult to establish the composition of the microbial native communities of the suboxic sediments, since their bacterial populations are not formed by a simple group but they belong to numerous genera, many of which are characteristic of soil ecosystems. In marine ecosystems, the most common bacterial metabolism is the facultative anaerobic chemolithotrophic one, because O₂ gradient in these systems is more variable than in deep waters and sediments (Acuña *et al.*, 2011).

Taxonomic studies in different aquatic ecosystems (lakes, lagoons, rivers and oceans) indicate that the more common bacteria in these environments belong to *Pseudomonas*, *Aeromonas*, *Vibrio*, *Bacillus*, *Caulobacter*, *Acetobacter*, *Rhodobacter*, *Micrococcus*, *Flavobacterium*, *Planococcus*, *Spirillum*, *Alcaligenes*, *Azospirillum*, *Aquaspirillum*, and *Magnetospirillum*, where the two last genera are the most reported (Miravet *et al.*, 2003; Lin *et al.*, 2011).

However, in this investigation, only the genres *Pseudomonas* (isolated from the Gulf of Mexico sediments), *Bacillus* (isolated from Sontecomapan Lagoon and Gulf of Mexico sediments) and *Caulobacter* (from Xochimilco channels sediments) were found; which gathering in the different phenotypes formed in cluster (Figure 2) according to their marine or fresh water origin. These results suggest that salinity is a determining factor in the physiological diversity of the microaerobic bacterial community.

The origin of isolates S63 (*Bacillus firmus*) and S46 (unknown) corresponds to zones near to Sontecomapan Lagoon mouth, where the salinity ranges between 30 and 40 PSU, and the connection with marine water is permanent; possibly due to this, these isolates grouped in the same phenon than those from the Gulf of Mexico (GF75 *Sphingomonas* sp. and GF67 *Bacillus firmus*). Although, pairs 1 (S56 and S55 *Sphingobium* sp) and 2 (*A. lipoferum* and *M. magnetotacticum*) were joined at the same Euclidean distance of 12 for presenting similar morphological and physiological characteristics; they formed an independent cluster due to their FAME diversity. Pair 1 presented 28 types and the collection strains only 19. The most representative FAME in pair 1

were types C12:0, C14:0, C14:1 and C15:0, while for the collection strains were types C12:0, C18:0 and C18:1n9c.

The FA analysis has been widely used for taxonomic classification and bacterial phylogeny, as reported by Piotrowska and Mrozik (2005) who stated that these molecules could be used as powerful taxonomic tool. Regarding this, Zhadanov *et al.* (2006) described important differences in FA of *Pseudomonas aurantiaca*, which mainly correspond to types C16:0, C16:1 and C18:1, that were identified in *Pseudomonas stutzeri* (GF70) isolates from Gulf of Mexico (Table 2).

Our results are consistent with those obtained by Frolova *et al.* (2005), Jaison *et al.* (2006) and Gordon *et al.* (2006), who reported the FAs C13:1, C14:0, C15:0, C15:1, C16:0, C16:1 and C:17 as characteristic of microorganisms and proteobacteria from marine sediments. Furthermore, some of the identified species presented unique FA for them.

Although the sequence of the segment 16S rDNA of isolates X4 and S46 any match with of the reported in the NCBI, some of their cell membrane fatty acids match with those reported by Blazina *et al.* (2010) as characteristic of the genera *Vibrio*, *Halomonas* and *Pseudoalteromonas* (Table 3).

In the principal component analysis, the groups formation was determined by their FAME diversity; this confirms that the FAME composition can differentiate a marked group of isolates, as it is the case of the isolate S47, which belongs to the group 1 with only 4 types of characteristic FAME of bacteria isolated from Sontecomapan Lagoon sediments. This could be the explanation to the fact that this isolate was plotted far from the origin and this marks it as distinctively different from the other isolates.

On the other hand, the strains utilized as a reference (*A. lipoferum* and *M. magnetotacticum*) were gathered in group 3 together with isolate X11 (*Caulobacter* sp), in spite of being different genera they share the presence of the FA C20: 0, C18: 1n9t and C15:1 in their cell membranes, the reason could be that these fatty acids are not markers of the presence of a specific genus.

The majority of the isolates from marine origin gather in group 2, which shows FAME's largest variation. Group 3 gathers the isolates from Xochimilco freshwater system (Figure 3).

The Olmstead-Tukey analysis show that the FAME characteristics of each environment are found in the category of rare (Figures 4, 5, and 6); particularly, these FAME types could be in relation with some strict microaerophilic benthic bacterial genera (S63 and GF73).

In contrast, it was observed that the Olmstead-Tukey diagrams from Sontecomapan Lagoon and Gulf of Mexico allowed the distinction of FAME according to the before mentioned categories, and even some subgroups could be distinguished within some quadrants. These results suggest that FAME profiles of microaerophilic bacteria can be better understood by plotting them in this type of graph, which means that this chemotaxonomic approach is a precise tool for characterizing benthic bacterial communities and their relationship with the environment.

CONCLUSIONS

Even when the genre identified have been reported so far as strict aerobics or faculty anaerobics, the collection of strains showed facultative microaerobic metabolism since 100% of them grew well in aerobic and suboxic conditions (pO_2 4%), and did not grow in strict anaerobic conditions. Characteristic FAME that can be considered as a good chemotaxonomic tool and could be used as biomarkers of facultative microaerophilic bacteria presence in sediments from freshwater are C20:4n6, C22:6n3 and C23:0, and for brackish water C22:0, C22:1n9 and C24:0. Due to extreme difficulty in culturing this type of bacteria, FAME analysis might increase the opportunity to study bacterial diversity in a wide variety of ecosystems, even if not cultivable forms are present.

In this research profiles of fatty acids of cell membrane of *Ochrobactrum anthropi* (C8:0, C11:0, C18:2n6t y C23:0) and *Sphingobium* sp (C22:0), have been established, which hadn't been reported before.

In spite of a clear chemical differentiation in the components of the cell membrane of the microorganisms Gram negative and Gram positive, it was clearly observed that C12:0, C14:0, C16:0, C16:1, C17:0, C18:0, C18:1n9c y C18:1n9t (lauric, myristic, palmitic, palmitoleic, heptadecanoic, stearic, oleic and eadadic acid methyl esters) can be found in both kinds of membranes.

In this study we observed that the diversity of microaerobic benthic bacteria was influenced principally by salinity, thus *Bacillus* and *Sphingobium* genera prevailing in brackish sediments and *Caulobacter* in freshwater sediments.

Acknowledgments. This investigation was funded by CONACYT, Mexico (39634-F/A-1) and Mobility Program ECOS-ANUIES (agreement 189448). JRAV is grateful for the scholarship granted (171708) by the CONACYT in order to pursue studies of doctorate within the Program of Doctorate in Biological Sciences and of the Health (UAM). The authors are thankful for the valuable support granted by Dr. Rey Gutiérrez Tolentino (Department of Agricultural and Animal Production), for the FAME profiles analysis.

REFERENCES

- Acuña, A. J., C. F. Torres, G. N. Pucci and O. H. Pucci. 2011. Evaluación el tiempo de vida de bacterias potencialmente patógenas en sedimentos marinos. *Revista de la Sociedad Venezolana de Microbiología* 31:68-87.
- Atlas, M. R. and R. Bartha, 2006. *Ecología microbiana y microbiología ambiental*. Pearson Educación. Madrid, España.
- Badings, T. F. and C. Joung. 1983. Glass capillary gas chromatography of fatty acid methyl esters. A study of conditions for the quantitative analysis of short and long-chain fatty acid in lipid. *Journal of Chromatographic* 279: 493-506.
- Balch, W. E., G. E. Fox, L. J. Magrum, C. R. Woese and R. S. Wolfe. 1979. Metanogens: reevaluation of a unique biological group. *Microbiology* 43: 260-296.
- Barrera-Escorcia, G. and P. E. Namihira-Santillan. 2004. Microbiological contamination in Akumal coastal zone, Quintana Roo state, Mexico. *Hidrobiológica* 14:27-35.
- Bergers, A. 2000. Scientists discover how *Helicobacter* survives gastric acid. *BMJ* 320:268.1 68: ISSN 2044-6055.
- Blazina, M., M. Najdek, A. Ruso and D. Fucks. 2010. Adaptational changes in cellular fatty acids of cultured bacteria as a response to trophic differences. *Acta Adriatica* 51(2): 131 – 140.
- Buyer, J. S., D. P Roberts and E. Russek-Cohen, 2002. Soil and plant effects on microbial community structure. *Canadian Journal of Microbiology* 48:955-964.
- Danilo, L., G. de Socio, R. Frassanito and D. Rotilio. 1996. Effect of atrazine on *Ochrobactrum anthropi* membrane fatty acid. *Applied and Environmental Microbiology* 62 (7): 2644-2646.
- Díaz-González, G., R. Gutiérrez, N. Pérez, S. Vega y León, M. González, G. Prado, G. Urbán, A. Ramirez and M. Pinto. 2002. Detección de adulteraciones en la grasa de leche pasteurizada mexicana. *Revista de Salud Animal* 24: 54-59.

- Dibut-Álvarez, B. 2009. Biofertilizantes como insumos en agricultura sostenible. Ed. Universitaria. La Habana Cuba.
- Dunfield, K. E., L. J. C. Xavier and J. J. Germida. 1999. Identification of *Rhizobium leguminosarum* and *Rhizobium* sp. (Cicer) strains using a custom Fatty Acid Methyl Ester (FAME) profile library. *Journal Applied of Microbiology* 86: 78-86.
- Ferrara-Guerrero, M. J. and A. Bianchi. 1990. Distribution of microaerophilic bacteria through the oxic-anoxic transition zone of lagoon sediments. *Hydrobiologia* 207: 147-152.
- Ferrara-Guerrero, M. J., D. G. Marty and A. Bianchi. 1993. Isolation and enumeration of anaerobic and microaerophilic bacteria in aquatic habitats. pp. 9-19. *In*: P.F. Kemp, B.F. Sherr, E.B. Sherr and J.J (eds.). *Handbook of methods in aquatic microbial ecology*. Cole-Lewis Publishers, Miami.
- Ferrara-Guerrero, M. J. and 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): 335-367.
- Ferrara-Guerrero, M. J., M. M. Castellanos-Páez and G. Garza-Mouriño. 2007. Variation of benthic heterotrophic bacteria community with different respiratory metabolisms in Coyuca de Benítez coastal lagoon (Guerrero, Mexico). *Revista de Biología Tropical* 5(1):157-169.
- Findlay, H. R. and C. F. Dobbs. 1993. Quantitative description of microbial communities using lipid. pp. 347-357. *In*: P.F. Kemp, E. B. Sherr, E. B. Sherr and J. J. Cole (eds.). *Handbook of methods in aquatic microbial ecology*. Cole-Lewis Publishers. Miami.
- Frolova, G. M., K. K. Pavel, A. A. Shparteeva, O. I. Nedashkovskaya, N. M. Gorshkova, G. Ivanova, and V. V. Mikhailov. 2005. Lipid composition of novel *Shewanella* species isolated from Fear Eastern Seas. *Microbiology* 41 (6): 664-669.
- Gagné, A., M. Chicoine, A. Morin and A. Houde. 2001. Phenotypic and genotypic characterization of esterase-producing *Ureibacillus thermosphaericus* isolated from aerobic digester of swine waste. *Canadian Journal of Microbiology* 47(10): 908-915.
- Garrity, G.M., J.A. Bell, and T.G. Libum. 2004. Taxonomic outline of the prokaryotes *Bergey's Manual of systematic Bacteriology*. 2da Ed. Springer. New York, USA.
- González-López, J., C. Lluch-Pla y Rueda. 1992. *Biología del Nitrógeno. Interacción Planta-Microorganismo*. Ed. Rueda. Madrid, España.
- Gordon, W., C. Lynsey, J. R. Watt, C. F. Jhon, P. E. Richard, R. P. Jhon and J.W. Andrew. 2006. A comparison of stable isotope probing of DNA and phospholipid fatty acids to study prokaryotic functional diversity in sulfate-reducing marine sediment enrichment slurries. *Environmental Microbiology* 8 (9):1575-1589.
- Graham, P.H., M. J. Sadowsky, S. W. Tighe, J. A. Thompson, R. A. Date, J. G. Howieson and R. Thomas. 1995. Differences among strains of *Bradyrhizobium* in fatty acid-methyl ester analysis. *Canadian Journal of Microbiology* 41: 1038-1042.

- Hamamoto, T., N. Takata, T. Kudo and K. Horikoshi. 1994. Characteristic presence of polyunsaturated fatty acids in marine psychrophilic vibrios. *FEMS Microbiology Letter* 119: 77-82.
- Hans, H., G. L. Mikhail, V. Gogotova and S. Erko. 2003. Reclassification of *Desulfobacterium macestii* as *Desulfomicrobium macestii* comb. nov. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 53: 1127–1130.
- Imhoff, F. J. 2006. The phototrophic alpha-proteobacteria. pp. 41–64. *In*: M. Dworkin, M., S. Falkow, E. Rosenberg, K. H. Schleifer y E. Stackebrandt (eds.). *The Prokaryotes*. Vol. 5. Springer. New York, USA.
- Jafra, S., J. Przysowa., R. Czajkowski., A. Michta., P. Garbeva and J.M. van der Wolf. 2006. Detection and characterization of bacteria from the potato rhizosphere degrading *N*-acyl-homoserine lactone. *Canadian Journal of Microbiology* 52: 1006–1015.
- Jaison, F., S. Arankawa, K. Chicaiki and S. Stefan. 2006. Microbial diversity of cold-seep sediments in Sagami Bay, Japan. as determined by 16S rRNA gene and lipid analyses. *FEMS Microbiology Letter* 57: 429-441.
- Juárez, F., S. Silva and G. Cifuentes. 2003. Microbiological indicator of water quality in the Xochimilco canals, México City. *Salud Pública de México* 45: 389-395.
- Laguerre, G., R. Allard, M. F. Revió and N. Amarger. 1994. Rapid identification of rhizobia by restriction fragment Length polymorphism analysis of PCR-amplified 16S rRNA genes. *Applied Environmental Microbiology* 60: 56-63.
- Lin, W., C. Jugler, D. Schüler and X. Pan. 2011. Metagenomic analysis reveals unexpected subgenomic diversity of magnetotactic bacteria within the phylum Nitrospirae. *Applied Environmental Microbiology* 77 (1): 323.
- Maratea, D. and R.P. Blakemore. 1981. *Aquaspirillum magnetotacticum* sp. nov. a magnetic spirillum. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 31:542-455.
- Merck, S. A. 2000. *Microbiology manual*. Deutscher Akreditierungs Rat. Berlin, Germany.
- Meynell, G. G. and E. Meynell. 1979. *Theory and practice in experimental bacteriology*. Cambridge University Press. Cambridge.
- Miravet, M. E., D. Enríquez, G. M. Lugioyo, Y. Delgado, R. Núñez, H. Cabrera and J. Martí. 2003. First registers on heterotrophic marine bacteria and fungus isolated from coral reef waters bordering SW Cuba shelf. *Eceanológica* 1: 68-75.
- Munn C. B. 2004. *Marine microbiology. Ecology and applications*. BIOS Scientific Publishers, London, New York.
- Mrozik, A., Labuzek, S. and Piotrowska, Z. S. 2005. Changes in fatty acid composition in *Pseudomonas putida* and *Pseudomonas stutzeri* during naphthalene degradation. *Microbiological Research* 160/149-157.
- Paige, E.A., M. L. Chow, C. S. Arnold, K. Lu, J. M. McDermott and J. Davis. 2002. Cultivation-dependent characterization of bacterial diversity from British Columbia forest soils subjected to disturbance. *Canadian Journal of Microbiology* 48:643-654.
- Pérez, F., G. Díaz, G. Prado, T. Gutiérrez, L. González and R. Acacia. 1997. Manual de técnicas de análisis por cromatografía de gas-líquido para la determinación de ácidos grasos, triglicéridos y esteroides. Laboratorio de

- Lácteos. Departamento de Producción Agrícola y Animal, Universidad Autónoma Metropolitana-Xochimilco. México. D. F.
- Pielou, E. C. 1984. The interpretation of ecological data. Wiley-Interscience, New York.
- Piotrowska, Z. S. and A. Mroziak. 2003. Signature lipid biomarker (SLB) analysis in determining changes in community structure of soil microorganisms. *Polish Journal of Environmental Studies* 12 (6): 669-675.
- Puerta, C. and Ureña, C. P. 2005. *Prácticas de biología molecular*. Primera edición. Pontificia Universidad Javeriana. Bogotá.
- Puerta, C. J. and Ureña, C. P. 2005. *Prácticas de biología molecular*. Pontificia Universidad Javeriana. Bogotá, Colombia
- Reimers, C.E. 1989. Control of benthic fluxes by particulate supply. pp. 217-233. *In*: W.H. Berger, V. S. Smetacek and G. Wefer (eds.). *Productivity of the ocean: present and past*. John Wiley and Sons. Chichester, Nueva York.
- Reséndez, M. 1982. Hidrobiología e ictiofauna de la laguna de Sontecomapan Veracruz, México. *Anales del Instituto de Biología*, Universidad Nacional Autónoma de México, Serie Zoología 1: 385-417.
- Ros, M., M. Gobeain, J. L. Moreno, T. Hernández, C. García, H. Insam and J. A. Pascual. 2006. Molecular and physiological bacterial diversity of a semi-arid soil contaminated with different levels of formulated atrazine. *Applied Soil Ecology* 34: 93-102.
- Salas de León, D., A. Montreal-Gómez, M. Signoret and J. Aldeco. 2004. Anticyclonic-cyclonic eddies and their impact on near-surface chlorophyll stocks and oxygen supersaturation over the Campeche Canyon, Gulf of Mexico. *Journal of Geophysical Research* 109. doi: 10.1029/2002JC001614. (Disponible en línea desde mayo 8 de 2004).
- Sokal, R. R and F.J. Rohlf. 1995. *Biometry: the principles and practice of statistics in biological research*. W. H. Freeman and Co. New York.
- Stanier, R. Y., N. J. Palleroni and M. Doudoroff. 1996. The aerobic pseudomonads, a taxonomy study. *Journal of General Microbiology* 43: 159-271.
- Suárez, E and R. Gasca. 1992. Pteropods (Gastropoda: Thecosomata and Pseudothecosomata) from surface waters (0-50 m) in the southern Gulf of Mexico. *Anales del Instituto de Ciencias del Mar y Limnología*, Universidad Nacional Autónoma de México 19 (2):113-122.
- Terrand, J. J., N. R. Krieg and J. Döbereiner. 1979. A taxonomic study of the *Spirillum lipoferum* group with descriptions of a new genus, *Azospirillum* gen. nov. and two species, *Azospirillum lipoferum* (Beijerinck) comb. nov. and *Azospirillum brasiliense* sp. nov. *Canadian Journal of Microbiology* 24:967-980.
- Thompson, I.P., Mark, J.B., Richard, J.E and J.P. Kevin. 1993. Subgrouping of bacterial populations by cellular fatty acid composition. *Science Direct* 102: 75-84.
- Vainshtein, M. B., H. Hippe and R. M. Kroppenstedt. 1992. Cellular fatty acid composition of *Desulfovibrio* species and its use in classification of sulfate-reducing bacteria. *Systematic and Applied Microbiology* 15: 554-566.

William, G.W., Susan, M., Barns, D. A., Pelletier and D.J. Lane. 1991. 16S Ribosomal DNA amplification for phylogenetic study. *Journal of Bacteriology* 173(2): 697-703.

Zhadanov, R. I., A. S. Shmyrina, T.V. Zarubina, A. Kraus and W. Lorenz. 2006. Fatty acid profiles of DNA-bound and whole-cell lipids of *Pseudomonas aurantiaca* drastically differ. *Doklady Biochemistry and Biophysics* 410 (1): 292-296.

Table 1. Respiratory metabolism and physiological characterization of 15 bacterial isolates from aquatic sediments. The numerals indicate the isolate number from each environment.

Sample sites	Xochimilco Lake (X)					Sontecomapan Lagoon (S)					Gulf of Mexico (GF)				
	1	4	11	19	35	46	47	55	56	63	67	69	70	73	75
Morphological and physiological tests															
21% O ₂ growth	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
4%O ₂ /96%N ₂ growth	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
10%N ₂ /90% CO ₂ growth	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Motility	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Capsules	-	+	-	-	+	+	+	-	+	+	+	-	-	+	+
Refractive bodies	-	-	-	-	-	+	-	-	+	+	+	-	-	+	-
Gram reaction	-	-	-	+	-	-	+	-	-	+	+	+	-	+	-
Oxydase	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-
Catalase	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Reduction of nitrate	+	-	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Reduction of sulfate	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Glucose oxidation	-	+	-	+	+	-	+	+	-	-	-	-	-	+	-
Glucose fermentation	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Table 2. Fatty acids (FA) profiles in the membranes of bacterial isolates from each study zone and proportional concentration in percentage.

FA	Xochimilco Lake (X)					Sontecomapan Lagoon (S)					Gulf of Mexico (GF)				
	1	4	11	19	35	46	47	55	56	63	67	69	70	73	75
1 C6:0	30.7														
2 C8:0	45.9				11.3		9.71							1.64	
3 C10:0				10.7				1.63	0.3		2.27			6.56	
4 C11:0					15.8		6.52	0.52	0.21						
5 C12:0						2.03		2.07	0.61	0.28	3.73	0.17	0.41	2.99	
6 C13:0								1.77			4.18	0.31		2.22	
7 C14:0	23.4							4.45	0.33	9.2	3.96	4.17	1.58	7.72	2.73
8 C14:1				13				39.9	1.71	49.8		42.3		49.73	68.5
9 C15:0								1.84	1.26	2.33	3.3	1.47			0.6
10 C15:1			23			36.1			1.06	5	26				0.31
11 C16:0						0		21.8	8.12	20	1.55	30.2	20.1		16.6
12 C16:1						49.7		7.47	5.35	9.62	47	10.4	27	8.95	5.22
13 C17:0						4.59		3.7	2.37	0.52	5.94	6.7		8.95	3.31
14 C17:1								1.49	5.04	0.24			2.36		0.96
15 C18:0		4.29						1.13	2.22	0.98		2.11	0.52	4.57	0.68
16 C18:1n9c		51.5	35.8	32.3				4.89	39.4	0.26		0.86	43.7	3.55	0.77
17 C18:2n6c		8						2.79	26.2	1.48			2.99		0.28
18 C18:2n6t					44.9		9.1	1.24	0.54						
19 C18:1n9t			20.5							0.21		0.44	1.34		
20 C18:3n3								0.88	4.08					1.45	
21 C18:3n6									0.09		1.91				
22 C20:0			20.6						0.34	0.13		0.29			
23 C20:2		6.7		7.8								0.28			
24 C20:4n6		10.1													
25 C20:5n3		9.26		11.9			4.86							1.66	
26 C22:0							16.1	2.39	0.2						
27 C22:1n9							28.4								
28 C22:6n3		10.1		11.9											
29 C23:0					27.8										
30 C24:0							9.19								
31 C24:1				12.1			6.8								

Table 3. Identification of bacterial isolates following sequencing of the 16S rDNA, and FA that were unique in some of the species identified.

Strain number	Sequence similarity (%)	Closest matching organism in GenBank	Accession number (NCBI)	Characteristic fatty acid
X1	100	<i>Caulobacter</i> sp.	KP165519	C6:0
X4		Unknown	KP165520	C20:4n6, C22:6n3
X19		Unknown	KP165521	C22:6n3
X11	100	<i>Caulobacter</i> sp.	KP165522	C6:0
X35	99	<i>Ochrobactrum anthropi</i>	AM490618	C22:6n3
S46		Unknown	KP165523	
S47	89	Uncultured	KC993423	C22:2, C20:1n9, C24:0
S55	100	<i>Sphingobium</i> sp.	KP165524	C22:0
S56	100	<i>Sphingobium</i> sp.	KP165525	C22:0
S63	99	<i>Bacillus firmus</i>	KP165526	
GF67	100	<i>Bacillus firmus</i>	KP165527	
GF69	97	<i>Bacillus</i> sp.	KP165528	
GF70	98	<i>Pseudomonas stutzeri</i>	KP165539	
GF73	100	<i>Bacillus</i> sp.	KP165530	
GF75	99	<i>Sphingomonas</i> sp.	KP165531	

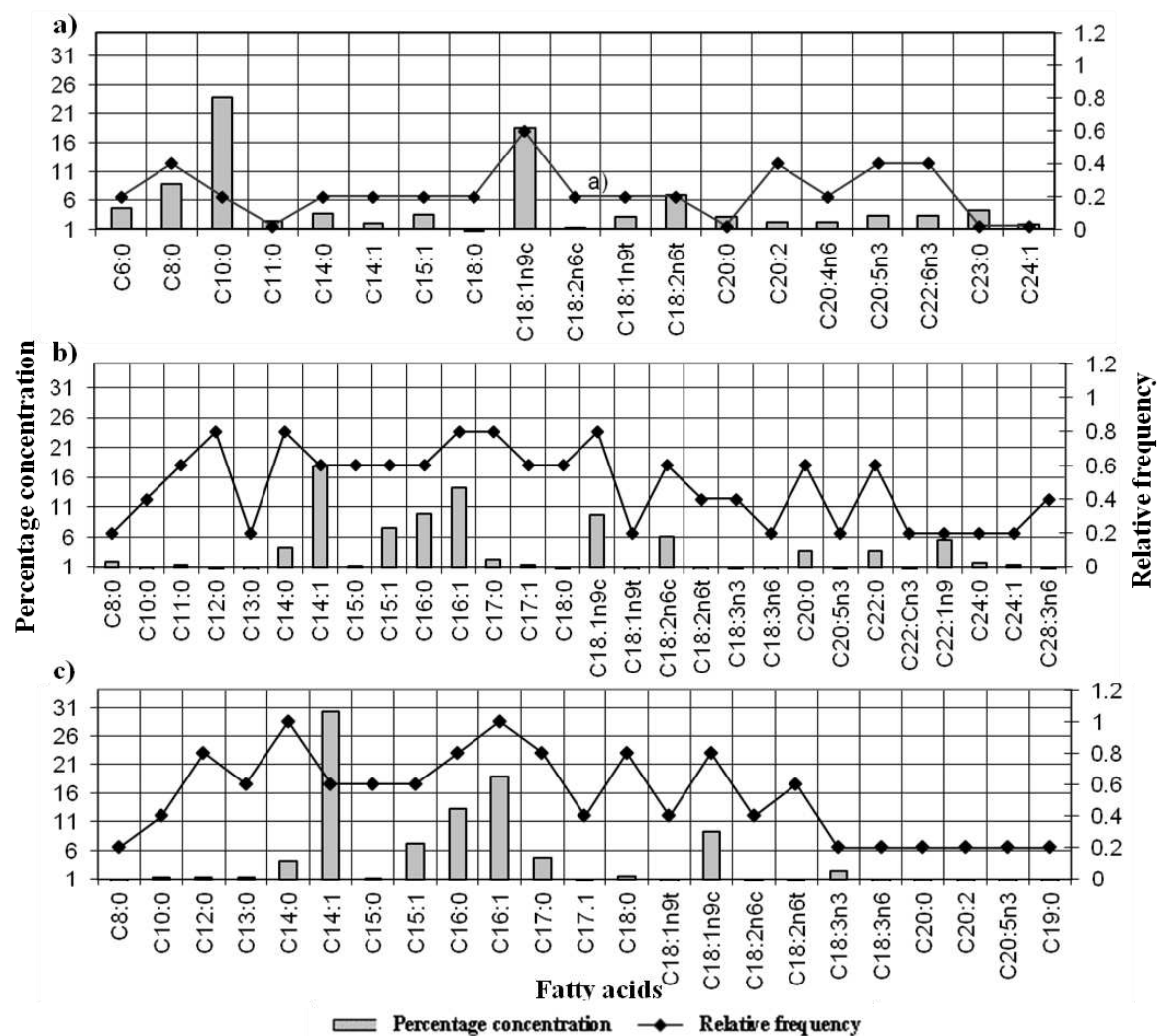


Figure 1. Relative frequency and concentration (% p/p) of the different methyl esters identified in the microaerophilic bacteria community isolated from superficial sediments of canals of Xochimilco Lake (a), Sontecomapan Lagoon (b) and Gulf of Mexico (c).

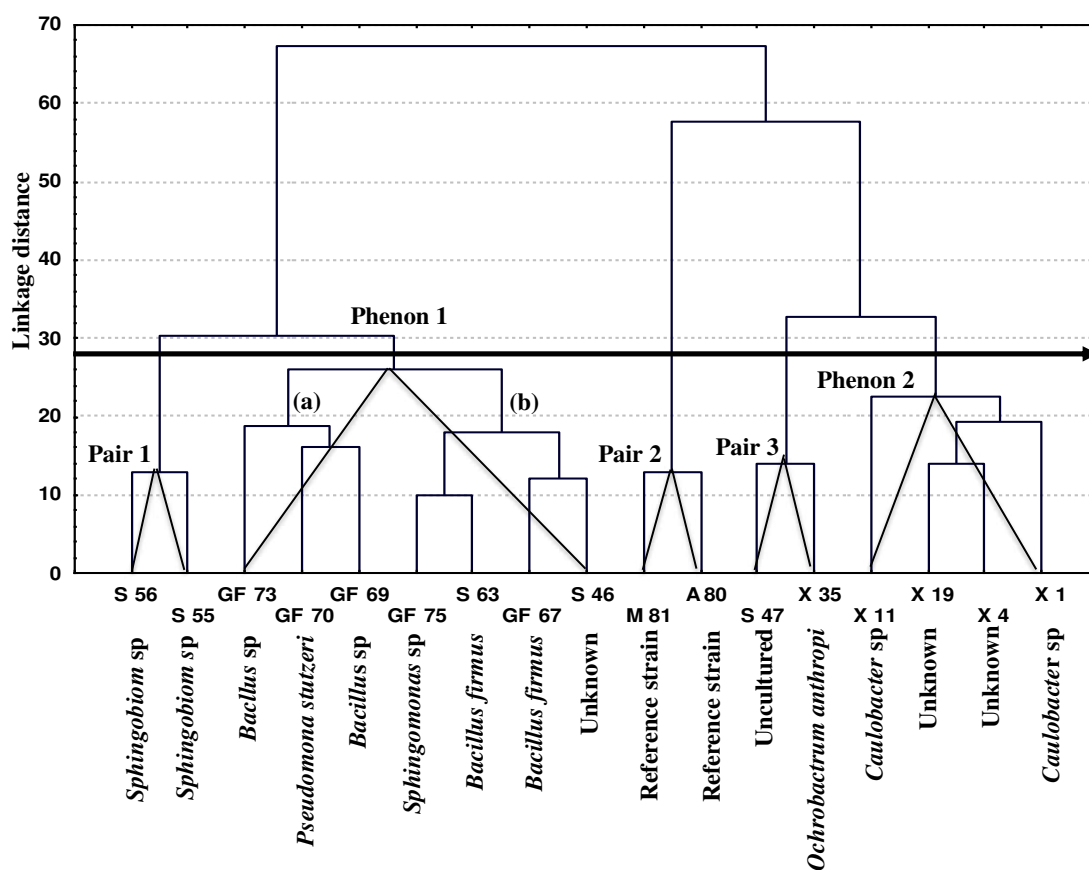


Figure 2. Dendrogram elaborated considering the different morphological, physiological and fatty acids tests done on the 15 bacterial isolates from the three study sites. Xochimilco Lake (X), Sontecomapan Lagoon (S), Gulf of Mexico (GF), and collection strains: *Azospirillum lipoferum* (A80, DSM2292) and *Magnetospirillum magnetotacticum* (M81, DSM3856).

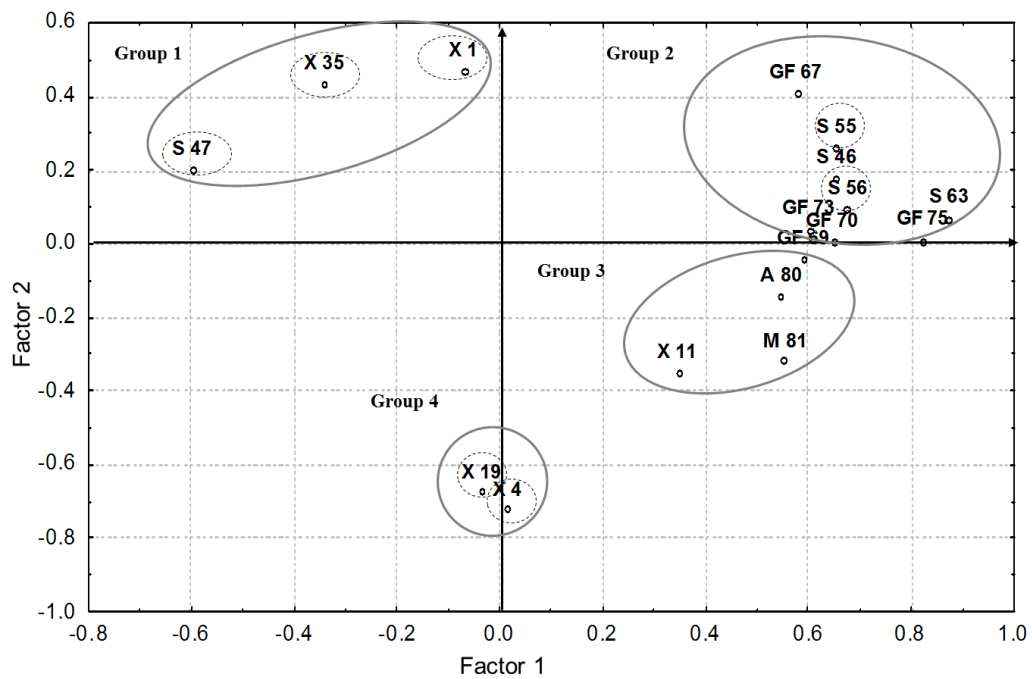


Figure 3. Score plot of principal component analysis based on diversity of the fatty acids methyl esters present in cell membranes of 15 bacterial isolates from Xochimilco Lake (X), Sontecomapan Lagoon (S) and Gulf of Mexico (GF) sediments; bacterial isolates with characteristic fatty acids are shown within a dotted circle.

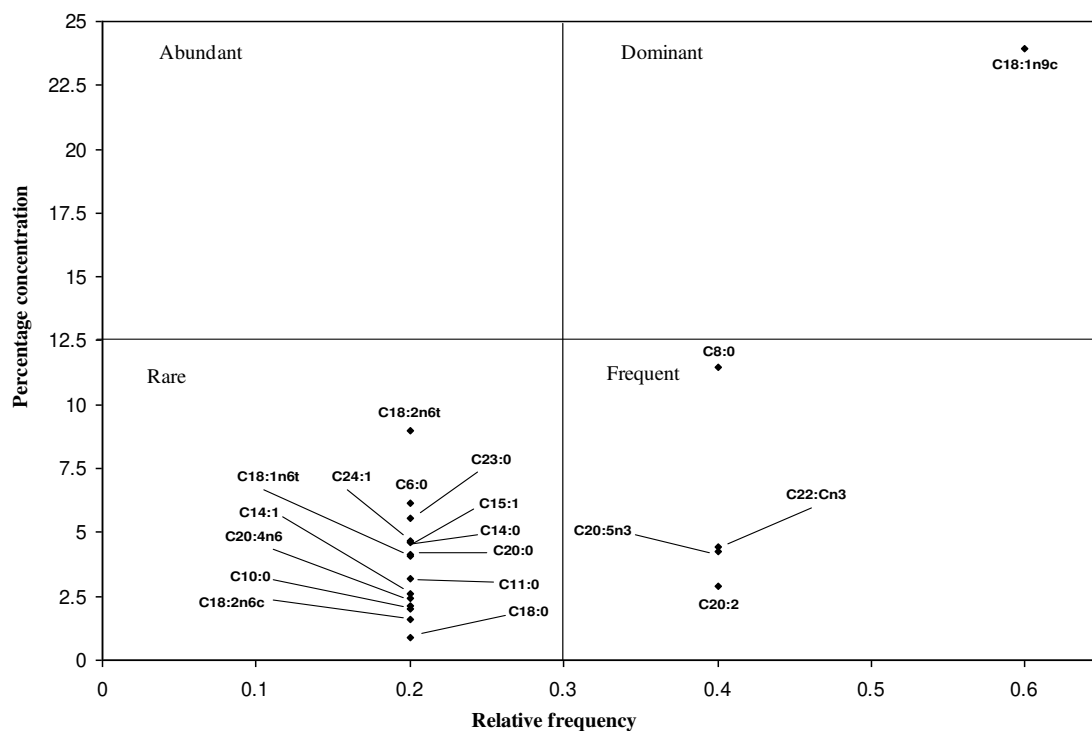


Figure 4. Tukey' plot in which categorization of fatty acids present in isolates from Xochimilco Lake is shown.

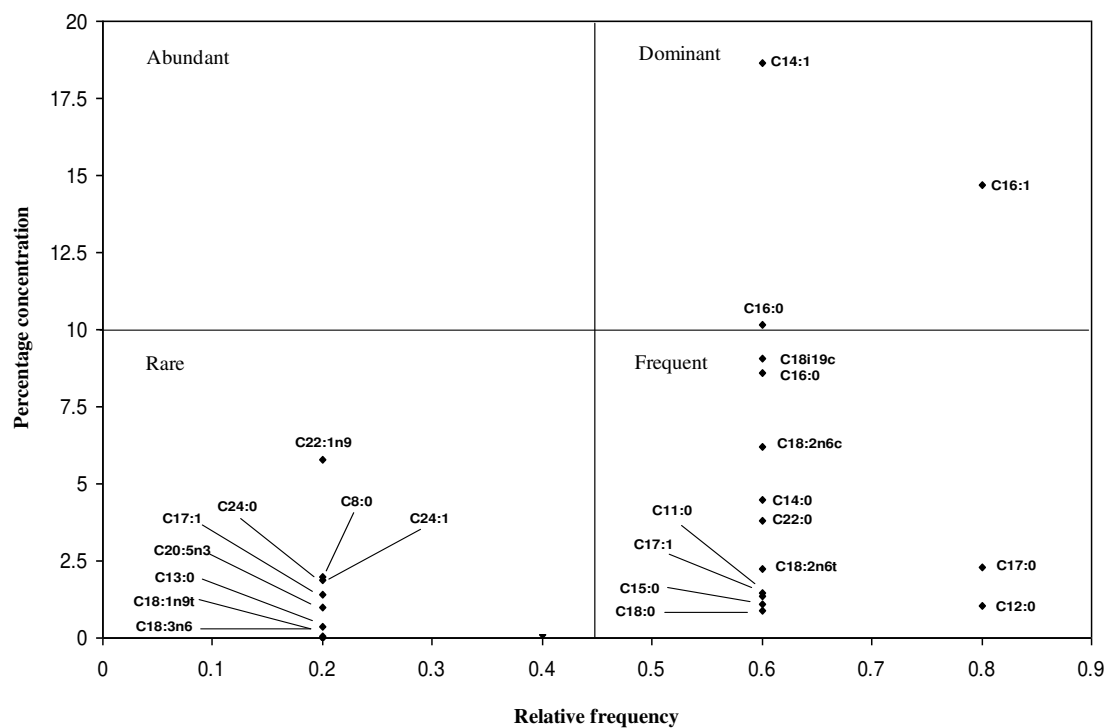


Figure 5. Tukey' plot in which categorization of fatty acids present in isolates from Sontecomapan Lagoon is shown.

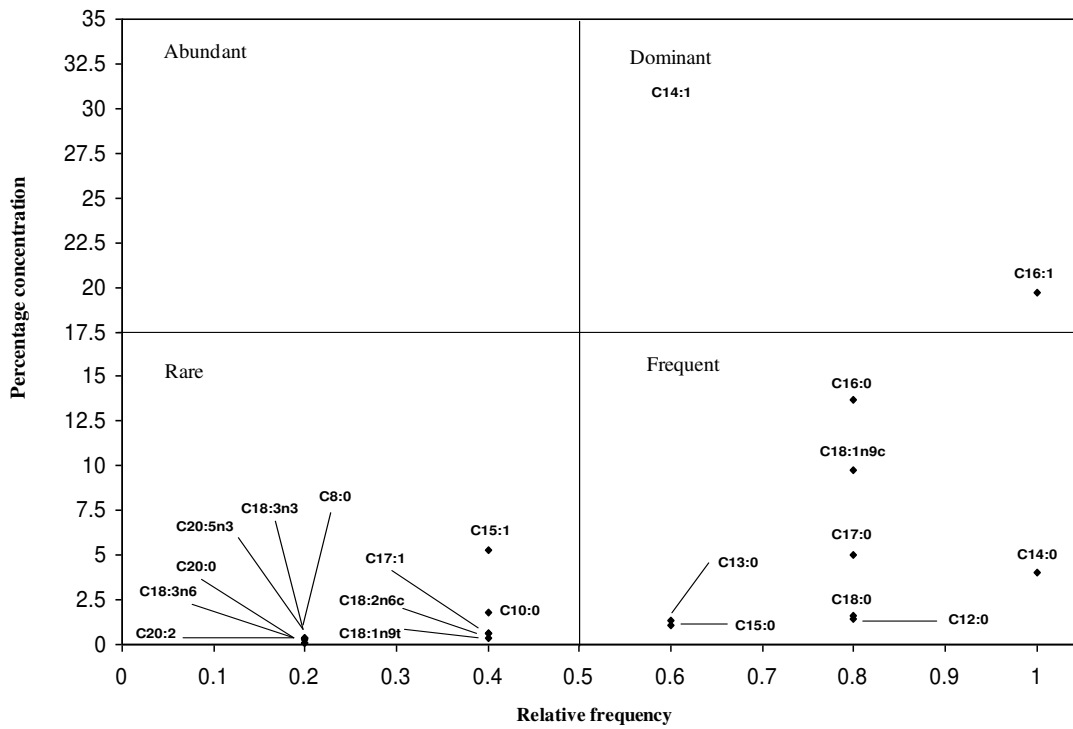


Figure 6. Tukey diagram in which categorization of fatty acids present in isolates from Gulf of Mexico is shown.