

Caracterización de las poblaciones bacterianas desnitrificantes de la Laguna de Sontecomapan, Veracruz (México).

*¹Ferrara-Guerrero MJ, ¹Angeles-Vázquez JR, ¹Morales-Nieto MG, ¹Figueroa-Torres MG, ²Pagano M.

¹Departamento El Hombre y su Ambiente. Universidad Autónoma Metropolitana-Xochimilco. Calzada del Hueso 1100, Col. Villa Quietud 04960, Distrito Federal.

²Centre d'Océanologie de Marseille, (LOPB), UMR 6535 - Campus de Luminy Case 901. 13288 Marseille Cedex 09

fgmd6735@correo.xoc.uam.mx

RESUMEN

El ciclo biogeoquímico del nitrógeno consta de múltiples transformaciones de compuestos nitrogenados que son catalizadas por microorganismos. Este ciclo controla la productividad biológica de los ecosistemas marinos e involucra una serie de reacciones de oxidación-reducción muchas de las cuales son utilizadas en el metabolismo de los microorganismos. La actividad microbiana de reducción del nitrato ha sido estudiada ampliamente porque es el principal mecanismo de pérdida del papel fertilizador del nitrógeno y por ser un proceso que contribuye al enriquecimiento de la atmósfera con N₂O. Debido a que las bacterias desnitrificantes con metabolismo microaerobio son un grupo microbiano que ha sido muy poco estudiado, este trabajo contribuye al conocimiento de su diversidad fenotípica y química. Se obtuvieron 21 aislados bacterianos con capacidad desnitrificante a partir de muestras de agua de fondo y de sedimentos superficiales (0 a 5 mm de profundidad). Todas las pruebas fisiológicas para la caracterización fenotípica fueron realizadas a diferentes concentraciones de oxígeno (pO₂ 0, 2, 4 y 21%) para determinar sus preferencias en oxígeno. Se determinaron los ésteres metílicos (FAME) de los ácidos grasos de sus membranas celulares. El análisis cluster de los resultados reunió a los 21 aislados en 5 grupos o fenones por su diversidad fisiológica y sobre todo por la diferencia en la composición química de sus membranas. Por su tolerancia al oxígeno pueden clasificarse como bacterias con metabolismo microaerobio estricto y anaerobio aerotolerante, se identificaron 34 ácidos grasos (AG) en sus membranas celulares; en su mayoría fueron del grupo de los saturados y solo 12 de ellos fueron insaturados.

Palabras clave: Bacterias microaerobias, ésteres metílicos, fisiología, laguna costera, tolerancia al oxígeno.

INTRODUCCIÓN

En los ecosistemas marinos el ciclo del nitrógeno controla la disponibilidad de nutrientes nitrogenados y la productividad biológica junto con la fijación atmosférica del CO₂. Además, en muchos ecosistemas el nitrógeno inorgánico es el nutriente limitante más común (Zehr y Ward 2002), debido a

que los microorganismos consumen nitrógeno en cualquiera de sus formas para sus procesos metabólicos.

En general, ya sea por medio de los aportes alóctonos o autóctonos, las bacterias ocupan un papel primario en el ciclo del nitrógeno, liberando nitrógeno inorgánico (NH₃⁺) durante la descomposición de materia orgánica. De esta forma, algunas otras pueden usar el Nitrógeno Inorgánico Disuelto (NID) tan eficientemente como la materia orgánica y pueden incluso, competir con el fitoplancton por el nitrógeno inorgánico (Kirchman y Wheeler 1998, Goldman y Dennette 2000, Zehr y Ward 2002). Las bacterias además pueden ocupar simultáneamente el DIN mientras liberan NH₄⁺ durante la descomposición de la materia orgánica. Y pueden estar compitiendo por NH₄⁺, regenerando NH₄⁺ o ambos, gracias a los diferentes miembros del asa microbiana responsables de diferentes procesos (Kirchman 2000).

En el ciclo del nitrógeno las bacterias y cianobacterias catalizan las conversiones químicas entre los diversos estados de oxidación del nitrógeno, incluyendo el nitrógeno gaseoso (N₂), amonio (NH₄⁺), nitrito (NO₂⁻) y nitrato (NO₃⁻); este proceso es conocido como nitrificación y en él intervienen bacterias del género *Nitrosomonas* que transforman el NH₃⁺ a NO₂⁻ empleando el oxígeno como oxidante, y *Nitrobacter* que oxida el NO₂⁻ a NO₃⁻. El ciclo del nitrógeno se cierra con las bacterias desnitrificantes de los géneros *Alcaligenes*, *Paracoccus*, *Pseudomonas*, *Moraxella*, *Spirillum*,

Poblaciones bacterianas desnitrificantes de la Laguna de Sontecomapan, Veracruz

*¹Ferrara-Guerrero MJ, ¹Angeles-Vázquez JR, ¹Morales-Nieto MG, ¹Figueroa-Torres MG, ²Pagano M.

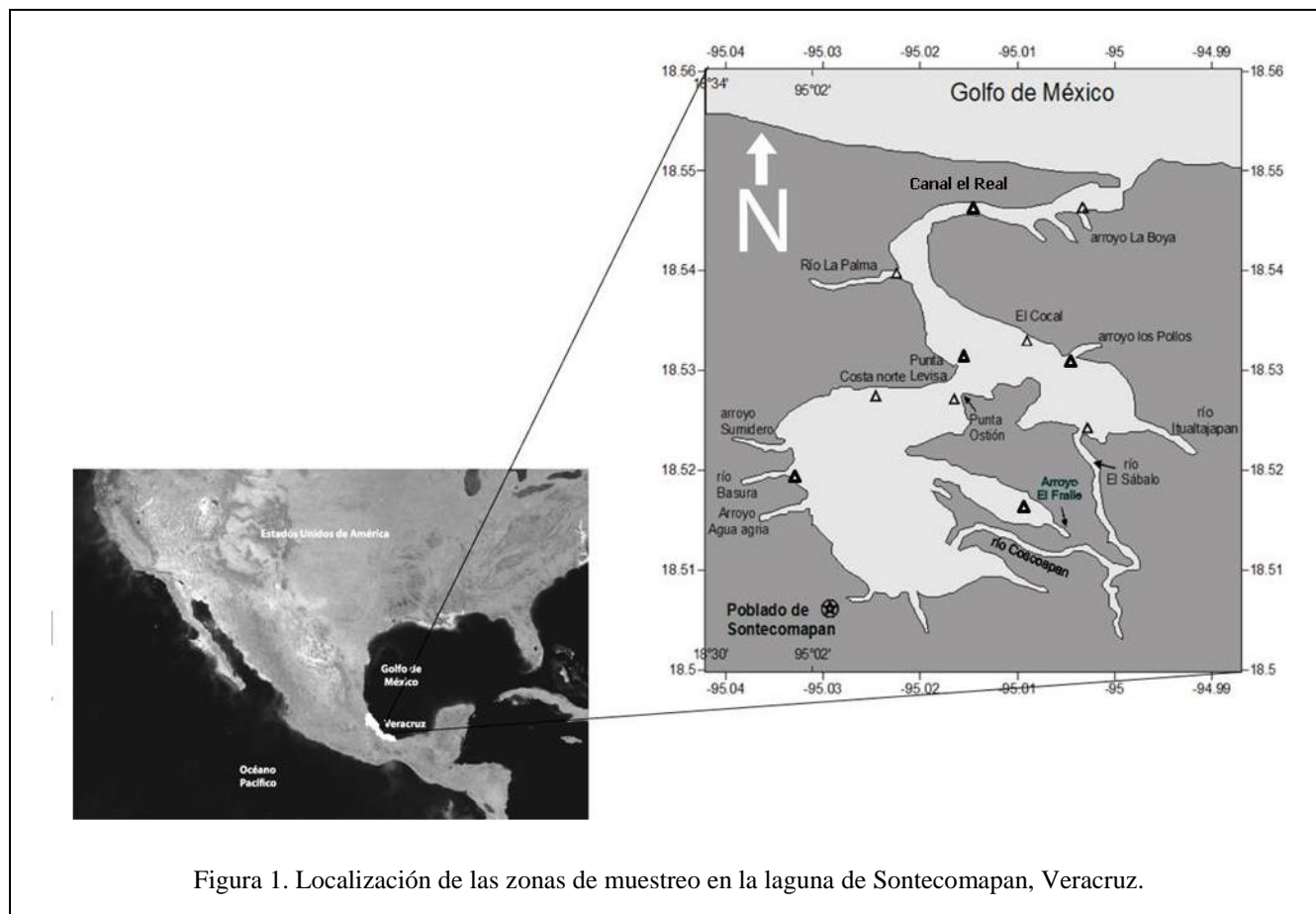


Figura 1. Localización de las zonas de muestreo en la laguna de Sontecomapan, Veracruz.

Thiobacillus y *Bacillus* que utilizan el NO_3^- como oxidante para sus procesos metabólicos en lugar del oxígeno molecular, reduciendo el nitrógeno hasta su forma gaseosa (N_2). Tanto durante el proceso de desnitrificación como en el de nitrificación se produce N_2O que es un gas invernadero y una fuente de NO estratosférico, importante en la destrucción de la capa de ozono (Williams *et al.* 1978, Cervantes-Carrillo *et al.* 2000, Spiro y Stigliani 2004, Mora-Revelo *et al.* 2007).

En el grupo de bacterias desnitrificantes también existen especies que poseen la característica de ser microaerobias; es decir, que poseen un metabolismo tanto aerobio como anaerobio aerotolerante, las cuales utilizan el oxígeno como aceptor de hidrógeno en la vía respiratoria de producción de energía pero que muestran un crecimiento óptimo a bajas concentraciones de oxígeno (Ferrara-Guerrero y

Bianchi 1989). Este grupo microbiano ha sido muy poco estudiado a nivel mundial y en nuestro país, por lo que la presente investigación aporta conocimiento sobre la diversidad y fisiología de la población bacteriana desnitrificante microaerobia proveniente de la columna de agua y los sedimentos de la Laguna de Sontecomapan, Veracruz (México).

La laguna de Sontecomapan está localizada al sureste del estado de Veracruz, en las coordenadas $18^\circ 30'$ y $18^\circ 34'$ N y los meridianos $99^\circ 00'$ y $99^\circ 04'$ O, se encuentra dividida de manera natural en varias zonas: la barra que comprende desde la playa hasta roca Morro, el canal el Real que al abrirse conforma mayoritariamente la laguna (Fig. 1). La laguna tiene una extensión de 12 Km y un ancho de 1.5 Km y una profundidad media de 1.5 m, una transparencia de 60 cm, es predominantemente mesohalina (5 a 18‰) en la parte sur, polihalina en la región central (25-30‰) y

Poblaciones bacterianas desnitrificantes de la Laguna de Sontecomapan, Veracruz

*1Ferrara-Guerrero MJ, 1Angeles-Vázquez JR, 1Morales-Nieto MG, 1Figuroa-Torres MG, 2Pagano M.

eurihalina (30-40‰) en la boca de comunicación con la línea de costa. Los sedimentos son principalmente areno-arcillosos (Contreras 1985).

MATERIAL Y METODOS

El aislamiento y purificación de los aislados bacterianos se realizó a partir de muestras de agua de fondo y sedimentos superficiales (0 a 5 mm de profundidad). Las muestras de agua de fondo fueron tomadas con una botella van Dorn horizontal y conservadas a -18°C en frascos de vidrio estériles conteniendo glicerol al 20%, hasta su procesamiento. Se tomaron muestras de sedimento no perturbados, por medio de buceo libre con un nucleador manual de 20 cm de largo y 5 cm de diámetro. Los primeros 5 mm de sedimento fueron colocados en un frasco estéril conteniendo 45 ml de glicerol al 20% y conservados a -18°C hasta su procesamiento.

Aislamiento de bacterias

El aislamiento de bacterias desnitrificantes microaeróbicas, se realizó por el método de serie de diluciones decimales (de 10^{-1} a 10^{-6}) utilizando una solución salina (0.9% de NaCl); una alícuota de 1 ml de cada dilución decimal fue inoculada en 9 ml de caldo marino de nitratos (Bioxon) por triplicado e incubado 48 h a temperatura ambiente. La presencia de bacterias desnitrificantes se detectó transfiriendo 1 ml del medio de cultivo en un tubo de prueba estéril y agregando unas gotas de los reactivos A y B de Griess (Ramírez-Gama 2003). Con el fin de aislar las bacterias desnitrificantes microaerobias, de los tubos que presentaron crecimiento de bacterias desnitrificante, se tomó una alícuota de 1 ml que fue inoculada en 9 ml de medio específico (g l^{-1} : 2 KNO_3 , 0.5 $\text{C}_4\text{H}_4\text{O}_4\text{Ca}$, 10 NaCl, y mg l^{-1} : 0.05 biotina, 0.5 tiamina, 0.1 MgCl_2 , 0.05 MnCl_2 ; 5 ml de lactato de sodio, pH 7.3) contenido en tubos de Hungate (Bellco®) gasificados con pO_2 de 4% balance N_2 (Ferrara-Guerrero *et al.* 1993), hasta la obtención de aislados puros. Los tubos fueron incubados a temperatura ambiente por ocho días. La pureza de los aislados fue verificada por microscopía de contraste de fases 1000x (microscopio Olympus Bimax60), y en cultivos en

cajas de Petri con medio sólido incubadas baja pO_2 (4% $\text{O}_2/96 \text{ N}_2$) en jarras de anaerobiosis (BIOXON®).

Estudio fenotípico

Todas las pruebas se realizaron por triplicado a partir de cultivos de ocho días de incubación en medios específicos líquidos y sólidos incubados en atmósfera de baja oxigenación.

a) Caracteres morfológicos.

Se observaron las características coloniales, agrupación y morfología celular, respuesta a la tinción de Gram, presencia de esporas y cápsula, movilidad en medio 2,3,5trifenil-tetrasodium (TTC) al 0.2% y la capacidad de acumular poli- β -hidroxibutirato (PHB) (Meynell y Meynell 1979).

b) Caracteres fisiológicos.

Se evaluó la tolerancia a la presencia de oxígeno (pO_2 de 2, 4 %, $\pm 0.3\%$ rel. balance N_2 y aerobiosis), y a la ausencia de oxígeno (p CO_2 10% balance N_2), a la salinidad (0, 10, 20 y 60‰ de NaCl), y a la temperatura (4, 25 y 40°C). El crecimiento fue detectado por colorimetría a una longitud de onda de 650 nm en un espectrofotómetro Shimadzu de doble as de luz.

c) Metabolismo respiratorio.

Se observó la presencia de las enzimas catalasa (peróxido de hidrógeno al 30%) y citocromo oxidasa (Kovacs 1956), la facultad de oxidar y fermentar la glucosa (Hugh y Leifson 1953) y de respirar los nitratos y sulfatos (Ramírez-Gama *et al.* 2003).

Análisis de los ésteres metílicos de los ácidos grasos (FAME)

La biomasa bacteriana para la determinación de ácidos grasos (AG) fue obtenida en medio de cultivo específico sólido enriquecido e incubado a pO_2 de 4% durante ocho días a temperatura ambiente. La biomasa celular fue recuperada lavando las cajas de Petri con formaldehído al 5%, la suspensión fue centrifugada a 700 g durante 45 min a 4°C . El botón celular fue resuspendido dos veces en 10 ml de una solución

fisiológica (NaCl al 0.85%) y centrifugado nuevamente. La biomasa bacteriana obtenida fue almacenada a -70°C durante 24 h (Angeles-Vázquez 2007). Los ácidos grasos (AG) fueron identificados por cromatografía en fase gaseosa (Bading y Joung 1983), tomando como referencia el estándar FAME (Fatty Acid Methyl Ester) de 37 componentes (Pérez *et al.* 1997, Díaz-González *et al.* 2002). Para realizar el análisis de AG la biomasa celular fue liofilizada durante 3hrs a bajo vacío (7 kPa) y a una temperatura de -50°C ; 20 mgs del producto liofilizado fueron metilados con 0.1 ml de metóxido de sodio 0.5 N y 0.9 ml de éter de petróleo nanogrado. Una alícuota de 1 μl fue inyectada al cromatógrafo de gases (Perkin Elmer modelo Autosistem 9000) con un detector de ionización de flama y un capilar de 100 m de longitud en sílica fundida con base de siloxano-carbonato de alta resistencia térmica SEG HTS (SUPELCO). Se utilizó como gas acarreador Helio 4.6.

Análisis estadístico.

Con los resultados se realizó un análisis de conglomerados, índice de similitud y distancia Euclidiana de Ward, utilizando el programa estadístico STATISTIC® (1999).

Tabla 1. Origen de los aislados bacterianos desnitrificantes.

Clave	Estación	Nivel
Sf2	costa norte	agua de fondo
Sf4	río la Palma	agua de fondo
SD5	costa norte	agua de fondo
SD7	costa norte	agua de fondo
Sf8	río el Sábalo	agua de fondo
Sf10	río la Palma	agua de fondo
Sf11	río el Sábalo	agua de fondo
Ss13	arroyo la Boya	agua de superficie
Ss15	río la Palma	agua de superficie
Ssd16	arroyo los Pollos	sedimento
Sf18	río Basura	agua de fondo
Sf20	costa norte	agua de fondo
Sf21	línea de costa	agua de fondo
Ss24	río la Palma	agua de superficie
Ssd26	estero el Fraile	sedimento
Ss27	la barra	agua de superficie
Ss28	costa norte	agua de superficie
Sf30	estero el Fraile	agua de fondo
Ss31	frente al cocal	agua de superficie
Ss32	línea de costa	agua de superficie

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Se obtuvieron 21 aislados bacterianos microaerobios puros con potencialidad desnitrificante, que junto con dos cepas de colección microaerobias (*Azospirillum lipoferum* DSMZ 2291 y *Magnetospirillum magnetotactium* DSMZ 3856) y tres anaerobias facultativas (*Escherichia coli*, *Enterococcus* spp y *Bacillus subtilis* de la colección del IMSS) (Tabla 1), se les aplicaron 101 pruebas fenotípicas y la determinación FAME de sus membranas celulares. Un porcentaje muy alto de los aislados (96%) fueron capaces de crecer tanto en condiciones aeróbicas como microaeróbicas, pero solamente el 61.5 de ellos creció en condiciones anaeróbicas. El 92.3% de ellos forman colonias de apariencia lisa, 84.6% brillantes, 11.5% fueron incrustantes, 57.7% con bordes regulares, 92% convexa, 89% forma microcolonias y el 81% tuvieron consistencia filante, el color predominante fue el beige (61.5%) y en un porcentaje menor el blanco (11.8%). Las formas vibroides Gram negativas predominaron (65.8%) sobre los cocobacilos (20.2%) y las formas filamentosas (13%), el 54% fueron móviles, 11.5% esporulados y solo el 27% fueron capaces de acumular el poli- β -hidroxibutirato (PHB) como material de reserva.

Todos los aislados bacterianos soportan

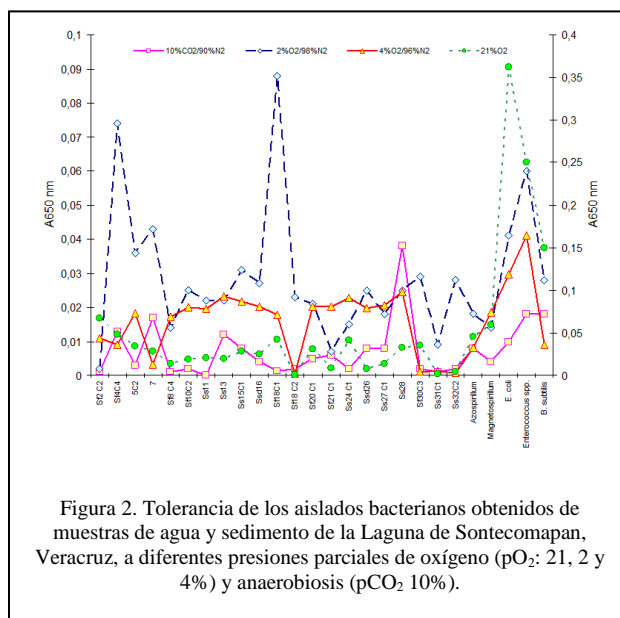


Figura 2. Tolerancia de los aislados bacterianos obtenidos de muestras de agua y sedimento de la Laguna de Sontecomapan, Veracruz, a diferentes presiones parciales de oxígeno ($p\text{O}_2$: 21, 2 y 4%) y anaerobiosis ($p\text{CO}_2$ 10%).

Poblaciones bacterianas desnitrificantes de la Laguna de Sontecomapan, Veracruz

*1Ferrara-Guerrero MJ, 1Angeles-Vázquez JR, 1Morales-Nieto MG, 1Figuroa-Torres MG, 2Pagano M.

salinidades de entre 0 y 60‰ y toleran temperaturas de entre 35 y 40°C, solamente el 85% de ellos crecieron a 4°C. El 96% de los aislados fueron capaces de crecer tanto en condiciones de saturación de oxígeno (pO₂ 21%) como de microaerobiosis (pO₂ de 2 y 4%) y solamente el 61.5% creció en condiciones anaeróbicas (Fig. 2). Por otro lado, solamente el 15.4% de los aislados presentaron un citocromo oxidasa y el 54% catalasa, todos respiraron los nitratos y ninguno los sulfatos, todos oxidan la glucosa y el 92.3% la fermentan.

Para analizar la diversidad de la población bacteriana desnitrificante existente en el agua de fondo y en los sedimentos de la laguna de Sontecomapan, Veracruz, se empleó el método de taxonomía numérica, la cual según O'Brien y Colwell (1987), puede ser simplemente considerada como "el agrupamiento de organismos por métodos

estadísticos"; en los cuales se emplean programas de computación en donde se evalúan todas las pruebas realizadas a cada organismo, basadas en el las respuestas positivas, lo que da como resultado la formación de grupos o clusters basados en las similitudes que existen entre ellos.

El análisis estadístico de conglomerados elaborado a partir de los resultados de todas las pruebas fenotípicas y químicas realizadas con base a Pielou (1984), agrupó a los 21 aislados y las cinco cepas utilizadas como referencia, en cinco fenones y tres pares (Fig.3).

a) El fenómeno 1 reúne a cinco aislados bacterianos provenientes de sedimentos tanto de zonas dulceacuícolas como de la barra y la línea de costa (SD5C2, Ssd16, Ss24C1, Ss27 y Ss32C2, costa norte, arroyo los Pollos, río la Palma, la barra y la línea de costa, respectivamente). Forman

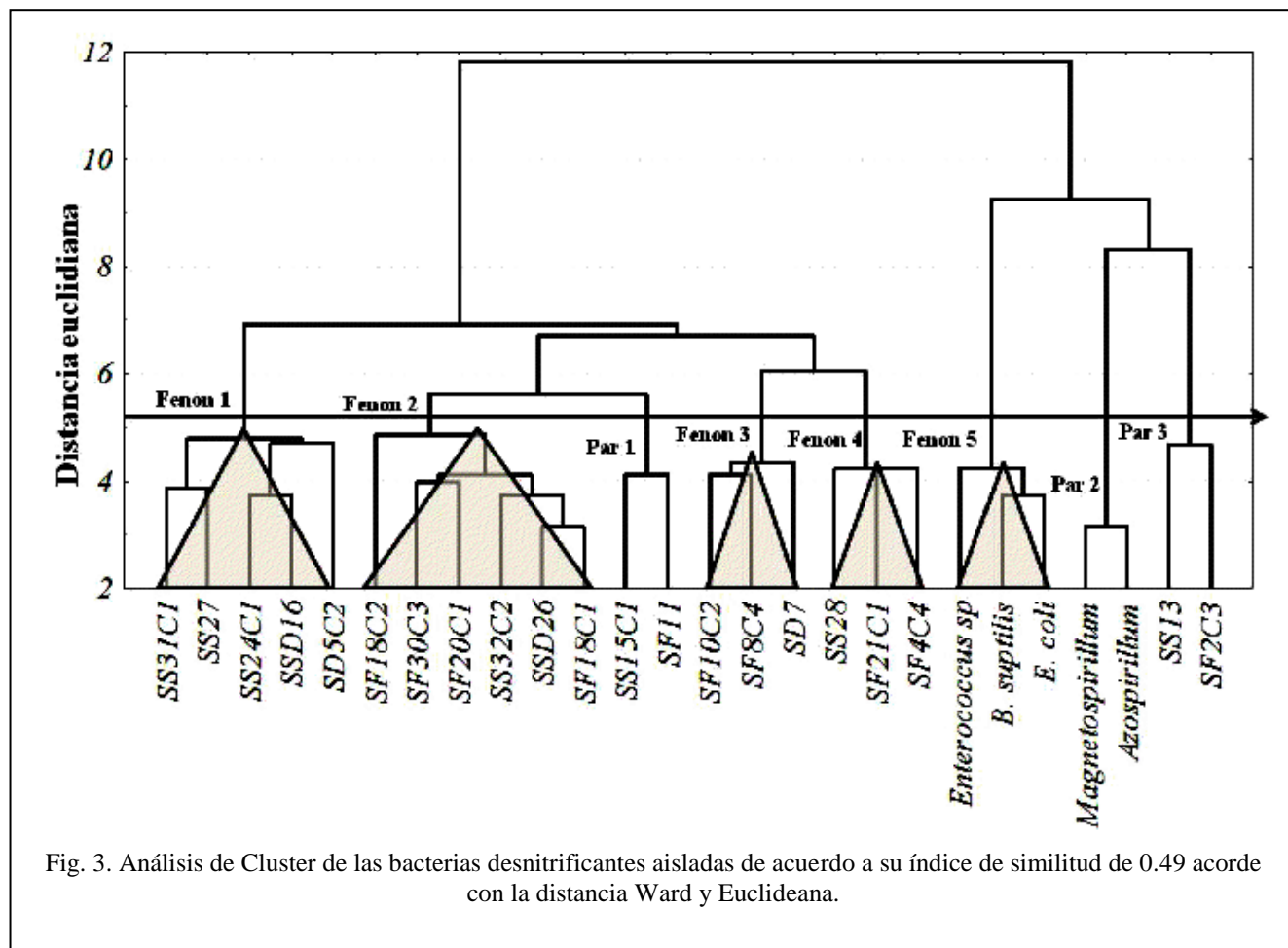


Fig. 3. Análisis de Cluster de las bacterias desnitrificantes aisladas de acuerdo a su índice de similitud de 0.49 acorde con la distancia Ward y Euclideana.

Poblaciones bacterianas desnitrificantes de la Laguna de Sontecomapan, Veracruz

*1Ferrara-Guerrero MJ, 1Angeles-Vázquez JR, 1Morales-Nieto MG, 1Figuroa-Torres MG, 2Pagano M.

microcolonias lisas, mucosas, de bordes regulares, filantes y pigmentadas, son pleomórficos, Gram negativas, miden hasta 5.5 μm de largo, oxidan la glucosa, respiran los nitratos, producen la enzima catalasa, toleran salinidades de 0 a 60 gL^{-1} y temperaturas de 4 a 40 $^{\circ}\text{C}$, y su mejor crecimiento se obtuvo a bajas presiones parciales de oxígeno (Fig. 2). Los ácidos grasos que tienen en común son los tipos C8:0, C12:0, C14:0, C15:0, C16:0, y C20:0, C20:3n3 y C24:1. Este grupo posee la menor diversidad de AG en sus membranas celulares.

b) El fenón 2 agrupa al mayor número de aislados, cuatro de los cuales fueron aislados del agua de fondo del río Basura (Sf18C1, Sf18C2), costa norte (Sf20C1), estero el Fraile (Sf30C3 y) y dos de los sedimentos superficiales de estero el Fraile (Ssd26) y de la línea de costa (Ss32C2). Las colonias que forman son mucosas, brillantes con bordes regulares y de color beige. Son bastones pleomórficos, con dimensiones celulares que pueden llegar a medir hasta 29 μm de largo, Gram negativos, presentan la enzima catalasa, oxidan la glucosa y respiran los nitratos. Su mejor crecimiento se presenta en condiciones de microaerobiosis (Fig. 2), toleran salinidades de 10 a 60 % y temperaturas de 25 a 40 $^{\circ}\text{C}$ y son móviles. Comparten los ácidos grasos C8:0, C10:0, C12:0, C13:0, C14:0, C14:1, C15:0, C15:1, C16:0, C16:1, C17:0, C20:0 y C24:1, y los AG C18:0, C18:2n6c y C20:3n6 son los más representativos en este grupo.

c) El par uno agrupa los aislados Sf11 y Ss15C1 provenientes de agua de fondo y de los sedimentos superficiales de las desembocaduras de los ríos el Sábalo y la Palma, forman microcolonias mucosas, con bordes lisos y pigmento beige, son cocobacilos con dimensiones celulares que van de 0.9 a 2.9 μm de largo y de 0.5 a 1.5 μm de ancho. Son Gram negativos, producen la enzima catalasa y respiran los nitratos. Toleran salinidades de 0 a 60‰ y temperaturas de 4 a 40 $^{\circ}\text{C}$ y su crecimiento óptimo es microaerófilico (pO_2 2 y 4%) (Fig. 2). Presentan en sus membranas celulares los AG tipo C8:0, C12:0, C13:0, C14:0, C15:0, C16:0, C17:0, C17:1, C20:0 y C24:1. Los AG que separan a este par de los demás son C18:1n9t y C20:2 que solo se encuentran en los aislados que conforman este par.

d) El fenón 3 agrupa a los aislados SD7, Sf8C4 y Sf10C2 (sedimentos de costa norte y agua de fondo de la desembocadura de los ríos el Sábalo y la Palma, respectivamente), forman microcolonias pigmentadas, lisas, brillantes y filantes, son bacilos Gram negativos, que presentan vacuolas intracelulares y una longitud de hasta 5.5 μm de largo, fermentan y oxidan la glucosa, respiran los nitratos, toleran salinidades entre 10 y 60 gL^{-1} y temperaturas de entre 25 y 40 $^{\circ}\text{C}$; al igual que el par 3 y el fenón 4 su mejor crecimiento es en condiciones de baja oxigenación (Fig. 2). Los AG que comparten son los C8:0, C12:0, C14:0, C14:1, C15:0, C15:1, C16:0, C17:0, C20:0, C20:3n3, C20:4n6, C22:1n9 y C24:1. Este par es el único que posee los ácidos grasos C20:4n6 y C22:1n9 en sus membranas celulares.

e) El fenón 4 se encuentra formado por los aislados Sf4C4 proveniente del agua de fondo de la desembocadura del río la Palma, Sf21C1 del agua de fondo de la línea de costa y Ss28 del sedimento de la estación costa norte. Forman colonias pigmentadas de consistencia suave y bordes regulares y son mucosas, son células pleomórficas con presencia de vacuolas, Gram negativas, con dimensiones celulares que van de 0.9 a 29.2 μm de largo, oxidan la glucosa y respiran los nitratos, toleran un amplio rango de salinidades y temperaturas de 25 a 40 $^{\circ}\text{C}$. Su crecimiento óptimo se presenta en anaerobiosis, y pO_2 de 2 y 4 % por lo que este grupo se considera como anaerobio aerotolerante (Fig. 2). Comparten entre ellos los AG de los tipos C8:0, C12:0, C13:0, C14:0, C14:1, C15:0, C16:0, C17:0, C17:1, C24:1 y los ácidos grasos que los diferencian son los C10:0, C11:0 y C18:3n6.

f) El fenón cinco agrupa las cepas de referencia *Escherichia coli*, *Enterococcus* sp y *Bacillus subtilis* (Colección del IMSS). Forman colonias: lisas, brillosas, cóncavas, con borde regular, filantes y con pigmento beige soluble en agua, son bacilos esporulados y sus dimensiones celulares van de 1 a 5.5 μm de largo (Holt *et al.* 1994), oxidan la glucosa, respiran los nitratos, poseen la enzima catalasa y sólo el 66% presentan la enzima citocromo oxidasa. Toleran salinidades de 0 a 60 gL^{-1} , temperaturas de 4 a 40 $^{\circ}\text{C}$ y su óptimo

crecimiento se da a una pO_2 de 21%, por lo que se consideran aerobios facultativos (Fig. 2). Este fenómeno comparte la mayor diversidad de ácidos grasos C8:0, C12:0, C13:0, C14:0, C14:1, C15:0, C15:1, C16:0, C16:1, C17:0, C17:1, C18:0, C18:1n9c, C18:1n9t, C18:2n6c, C20:0, C20:2, C20:3n3, C22:0 y C24:1. Los AG que separan a este grupo son el C18:2n6c y el C20:2.

g) En el par dos se agruparon las dos cepas de colección *Azospirillum lipoferum* y *Magnetospirillum magnetotactium*, son espirilos Gram negativas que miden hasta 29 μm , forman colonias lisas, opacas, y producen pigmento amarillo soluble en agua, oxidan la glucosa, respiran los nitratos y poseen una enzima citocromo oxidasa. Toleran salinidades entre 0 a $60gL^{-1}$ y temperaturas de 4 a $40^\circ C$ y su crecimiento óptimo se obtuvo en condiciones microaeróbicas. En lo que respecta a los ácidos grasos que comparten son: C14:1, C15:1, C16:1, y C18:3n3. Cabe resaltar que este grupo posee pocos ácidos grasos a diferencia de los pares y fenones anteriormente descrito y el C18:1n9c caracteriza a estas cepas y no se encontró en los pares y fenones anteriormente descritos.

h) El par 3 (Fig. 3) formado por un aislado

proveniente de agua de fondo (Sf2C3) y otro de sedimentos superficiales (Ss13) de la zona de entrada de aguas marinas a la laguna (arroyo la Boya y costa norte) (Fig.1), forman microcolonias incrustantes, de consistencia rugosa, son bacilos con vacuolas al interior, Gram negativo que fermentan y oxidan la glucosa, respiran los nitratos y presentan la enzima catalasa. Toleran salinidades de 0 a $60gL^{-1}$ y su crecimiento óptimo se encontró en condiciones microaeróbicas (pO_2 de 2 y 4%) (Fig. 2). Los AG de sus membranas celulares son los C12:0, C14:0, C14:1, C17:0, C24:0 y el C20:5n3 es característico de este par de aislados.

En el análisis del perfil de ésteres metílicos de lo AG de las membranas celulares de los aislados bacterianos se identificaron 34 AG (Fig. 4) y los más representativos fueron los tipos C14:1, C15:1, C16:0, C16:1, C17:1 y C18:1n9c, se puede observar que el mayor porcentaje de AG pertenece a los saturados (C14:1 Miristoleico, C15:1 cis-10-Pentadecanoico, C16:0 Palmítico, C16:1 Palmitoleico, C17:1 cis-10-Heptadecanoico), y solo una pequeña parte de ellos fueron del grupo de los insaturados (C18:1n9c Oleico, C18:2n6c Linoleico, C20:3n3 cis-11, 14, 17-Eicosatrienoico).

De acuerdo a los resultados obtenidos en la

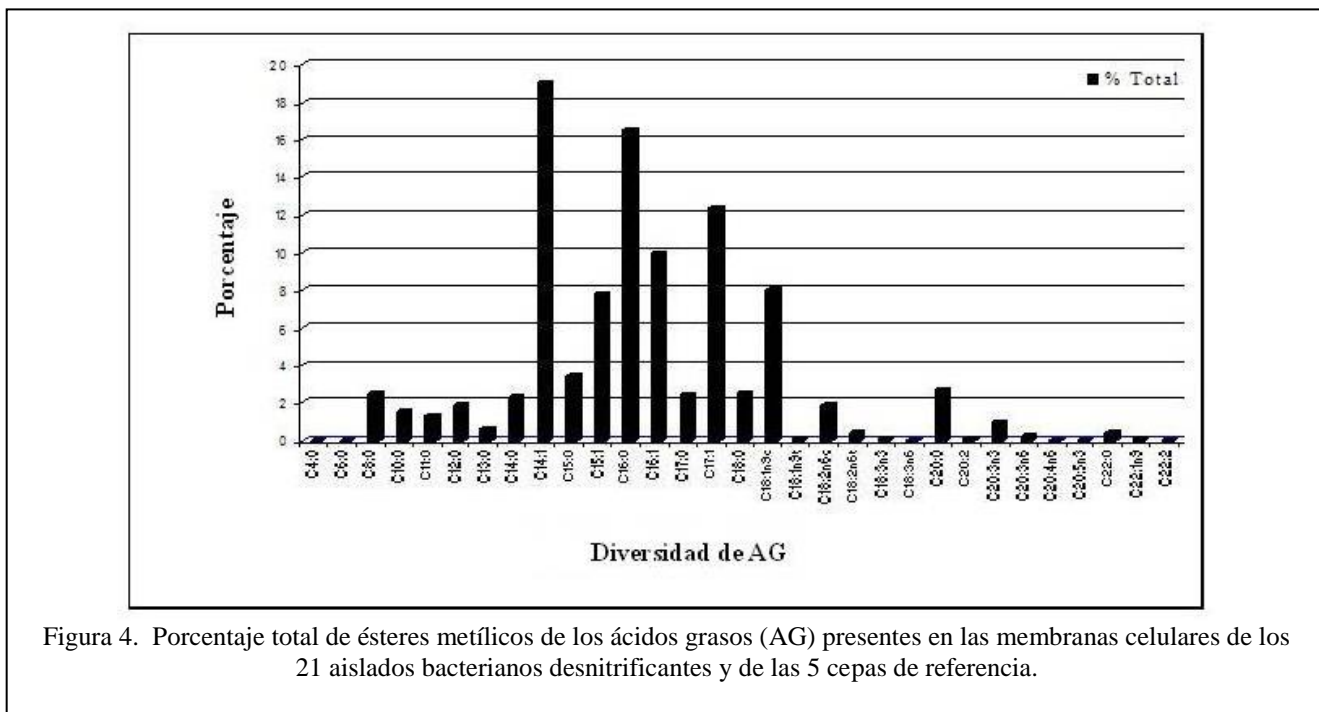


Figura 4. Porcentaje total de ésteres metílicos de los ácidos grasos (AG) presentes en las membranas celulares de los 21 aislados bacterianos desnitrificantes y de las 5 cepas de referencia.

Poblaciones bacterianas desnitrificantes de la Laguna de Somtecomapan, Veracruz

*1Ferrara-Guerrero MJ, 1Angeles-Vázquez JR, 1Morales-Nieto MG, 1Figuroa-Torres MG, 2Pagano M.

caracterización fenotípica del par tres y del fenón tres y de acuerdo al Bergey's Manual (Holt *et al.* 1994), los aislados agrupados podrían pertenecer al género *Pseudomonas*, ya que se caracterizan por ser bacilos rectos y curvos, Gram negativas, quimioorganótrofos, no fermentadores que crecen entre 4 y 43°C, poseer las enzimas catalasa y normalmente oxidasa, crecer muy bien en medios que contengan NO₃⁻, y se ha reportado que miembros de este género habitan en ambientes terrestres y acuáticos. Sin embargo, cabe señalar que el género *Pseudomonas* ha sido descrito como aerobio estricto, y en el caso de los aislados bacterianos obtenidos durante esta investigación los agrupados en el Par 3 presentaron un metabolismo respiratorio lento microaerobio estricto y los reunidos en el fenón 3 anaerobio aerotolerante (Fig. 2). Debido a la escasa información encaminada a estudios sobre bacterias microaerobias se presume que en este género podrían encontrarse bacterias que posean la capacidad de crecer mejor en condiciones microaeróbicas.

Con respecto a las bacterias agrupadas en el Par 1 y en los Fenones 1, 3 y 4, se observó que sus características fenotípicas son similares a las reportadas en el Manual Bergey's para la familia Spirilaceae (Holt *et al.* 1994), ya que presentan forma celular en espiral de 1.4-1.7 µm de ancho y de 14-60 µm de largo, sin formación de cuerpos cocoides, Gram negativas y móviles y normalmente

aeróbicamente en medios que contengan ciertos suplementos de crecimiento. En cuanto al par uno, ambos aislados fueron microaerobios estrictos. El Fenón 4 fue conformado por aislados bacterianos con metabolismo respiratorio anaerobio aerotolerante y los Fenones uno y dos por aislados con metabolismo microaerobio estricto. También se menciona que algunas especies pertenecientes a esta familia reducen los NO₃⁻ a NO₂⁻ y la temperatura óptima de crecimiento es de 30°C, además de que presentan oxidasa positiva y catalasa negativa. Sin embargo, es necesario resaltar que ninguno de los aislados bacterianos agrupados en estos fenones posee un citocromo oxidasa y son catalasa positiva. Se ha reportado igualmente, que los miembros de esta familia provienen de zonas estuarinas, al igual que los aislados conglomerados en los fenones 1, 2 y 4.

El análisis estadístico de componentes principales realizado únicamente en los AG en las membranas celulares de los 21 aislados y las cinco cepas de referencia, arrojó la formación de cuatro grupos (Fig. 5). El aislado bacteriano SD5 quedó separado del grupo 1 debido a que presenta la menor diversidad de AG (4), los cuales se encuentran también presentes en los grupos 1 y 2 (C8:0 y C12:0) y los otros 2 (C11:0 y C22:1n9) son característicos de este aislado (Tabla 2). El grupo 1 se reúnen los aislados con mayor diversidad de ácidos grasos saturados y dos insaturados (C20:4n6

Tabla 2. Ácidos grasos con mayor % (peso/peso) en las membranas celulares de los aislados bacterianos conglomerados en los diferentes grupos formados en el análisis estadístico de componentes principales.

Grupo	Aislados bacterianos agrupados	AG con mayor % (peso/peso) en las membranas celulares
1	Ss11, Ss13	C12:0, C13:0, C14:0, C15:0, C17:0, C17:1, C20:0, C20:4n6, C20:5n3, C24:1
2	Sf2_C3, Sf4_C4, SD7, Sf8_C4, Ss15_C1, Ssd26, Ss24_C1, Ss27, Ss28, Ss31_C1, <i>Bacillus subtilis</i> , Ss332_C2	C8:0, C12:0, C14:0, C16:0, C20:0, C24:1
3	Sf10_C2, Sf18_C1, Sf18_C2, Sf20_C1, Ssd26, Sf30_C3, <i>Escherichia coli</i> , <i>Enterococcus</i> sp	C:120, C14:0, C14:1, C15:0, C15:1, C16:0, C16:1, C17:0, C24:1
4	<i>Azospirillum lipoferum</i> DSMZ 2291 <i>Magnetospirillum magnetotacticum</i> DSMZ3856 SD5_C2	C14:1, C15:1, C16:1, C18:0, C18:1n9c, C18:3n3 C8:0, C11:0, C12:0, C22:1n9

son microaerobias, pero pueden también crecer

y C:20:5n3). Son característicos de este grupo los

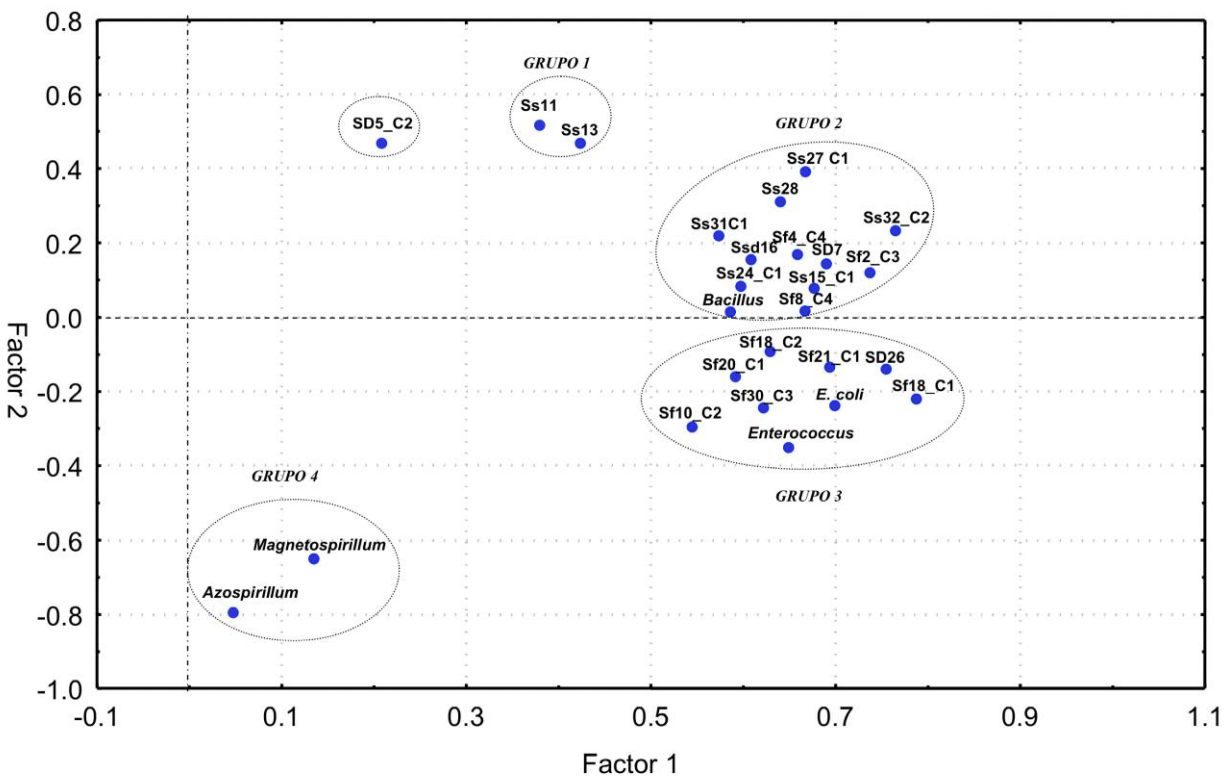


Fig. 5. Análisis de componentes principales basado en la diversidad de AG presentes en las membranas celulares de los 21 aislados bacterianos y de las cinco cepas de referencia.

AG C20:4n6, C17:1, C13:O y C20:5n3. En el grupo 2 quedaron agregados todos aquellos aislados bacterianos que presentan en sus membranas celulares los AG más frecuentes.

El grupo 3 presenta también una amplia gama de AG pero tres de los nueve son característicos del grupo (C14:1, C15:1 y C16:1). Tres de los seis AG que presentan las cepas de referencia del grupo 4 son característicos de ellas (C18:3n3, C18:1n9c y C18:0).

A pesar de que en el análisis cluster las cepas de referencia (*E. coli*, *Enterococcus* sp y *B. subtilis*) quedaron agrupadas en el fenón 5 debido a que presentaron respuestas diferentes a las pruebas fenotípicas aplicadas con respecto al resto de los aislados obtenidos, en esta investigación el análisis de componentes principales las agrupa con los aislados de los grupos 2 y 3 por presentar el mismo tipo de AG en sus membranas celulares. Solamente las cepas de *A. lipoferum* y *M. magnetotacticum*

(ambas clasificadas como microaerobias estrictas) fueron diferentes fenotípica y bioquímicamente al resto de los aislados, debido a que el primero es un diazotrofo de origen terrestre y el segundo es un espirilo que habita en cuerpos de agua dulce someros, con abundancia de hierro.

En general, el análisis FAME de las membranas celulares, mostró que el mayor porcentaje de ácidos grasos identificados son saturados, lo cual coincide con lo reportado por Song *et al.* (1999) quienes mencionan que en general, las membranas celulares bacterianas están constituidas en su mayor parte, por ácidos grasos saturados. Por su parte O'Leary (1962), reportó que los ácidos grasos saturados como los C16:0, C16:1, C18:0, se encuentran en las especies *Pseudomonas aeruginosa*, *Corynebacterium diphtheriae* y *Lactobacillus acidophilus*. Por otra parte, los grupos 1, 2, 4, 5 y la cepa SD5_C2 (Tabla 2), se caracterizan por presentar una cadena

hidrocarbonada constituida por carbonos sp^3 los cuales suelen ser sólidos y sirven de soporte a la célula, a la vez de ser reguladores de los procesos de osmorregulación (O'Leary, 1962).

Se pudo observar que este tipo de análisis químico junto con los análisis moleculares y bioquímicos, son de gran importancia en la clasificación taxonómica de los diferentes grupos microbianos. Por otra parte, el análisis de los perfiles de ésteres metílicos de los ácidos grasos de las membranas celulares es una herramienta útil que puede ser utilizada como biomarcador de la presencia de un grupo bacteriano en el medio natural, sobretodo para aquellos que por sus características fisiológicas son difícilmente cultivables, como es el caso de las bacterias microaerobias.

CONCLUSIONES

Durante esta investigación se pudo constatar que la mayor parte de los aislados bacterianos provenientes del agua de fondo y de los sedimentos superficiales de la laguna de Somtecomapan presentaron capacidad desnitrificantes y tuvieron un metabolismo respiratorio microaerobio estricto o anaerobio aerotolerante ya que cuando se les mantuvo en condición aerobia estricta su crecimiento fue muy bajo.

El análisis de los ésteres metílicos de los ácidos grasos de las membranas celulares, es una herramienta importante para la clasificación taxonómica de éste grupo bacteriano y pueden ser utilizados como biomarcadores de la presencia de las diferentes poblaciones bacterianas desnitrificantes microaerobias en ambientes naturales.

BIBLIOGRAFÍA

- Angeles-Vázquez JR. 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 p.
- Badings TF y C de Joung. 1983. Glass capillary gas chromatography of fatty acid methyl ester. A study of condition for the quantitative analysis of short a long-chain fatty acid in lipid. *Journal of Chromatography* 279:493-506.
- Cervantes-Carrillo F, J Pérez-Trevilla, y J. Gómez. 2000. Avances sobre la eliminación biológica del nitrógeno de las aguas residuales. *Revista Latinoamericana de Microbiología* 42:73-82.
- Contreras F. 1985. *Lagunas costeras mexicanas*. Centro de Ecodesarrollo. Secretaría de Pesca. D. F. 253 p.
- Díaz-González G, R Gutiérrez, N Pérez, S Vega y León, M González, G Prado, G Urbán, A Ramírez y M Pinto. 2002. Detección de adulteraciones en la grasa de leche pasteurizada mexicana. *Revista de Salud Animal* 24: 54-59.
- Ferrara-Guerrero MJ y A Bianchi. 1989. Comparison of culture methods for enumeration of microaerophilic bacteria in marine sediments. *Reserch in Microbiology Institute Pasteur/Elsevier* 140:255-261.
- Ferrara-Guerrero MJ, DG. Marty y A Bianchi. 1993. Isolation and enumeration of anaerobic and microaerophilic bacteria in aquatic habitat. p. 9-19. En Kemp PF, BF Sherr, EB Serr y J J Cole (eds). *Handbook of methods in aquatic microbial ecology*. CNRS Press. Boca Raton, Fla.
- Goldman JC y MR Dennett. 2000. Growth of marine bacteria in batch and continuous culture under carbon and nitrogen limitation. *Limnology and Oceanography* 45: 789-800.
- Holt JG, NR Krieg, HAP Sneath, JJ Staley y ST Williams. 1994. *Bergey's manual of determinative bacteriology*. Williams y Wilkins. U.S.A.
- Hugh R. y E Leifson. 1953. The taxonomic significance of fermentative versus oxidative metabolism of carbohydrates by various Gram negative bacteria. *Journal of Bacteriology*. 66:24-26.
- Kirchman DL y PA Wheeler. 1998. Uptake of ammonium and nitrate by heterotrophic bacteria and phytoplankton in the sub-Artic Pacific. *Deep-Sea Research* 45:347-365.
- Kirchman DL. 2000. Uptake and regeneration of inorganic nutrients by marine heterotrophic bacteria. p. 261-288. En Kirchman D L (ed.). *Microbial ecology of the oceans*. Wiley-Liss. New York.
- Kovacs N. 1956. Identification of *Pseudomonas pyocyana* by oxidasa reaction. *Nature*. 178:703.

- Meynell GG y E Meynell. 1979. Theory and practice in experimental bacteriology. 2°. Ed. Cambridge University Press. G.B. 347p.
- Mora-Revelo SG, F Gavi-Reyes, JJ Peña-Cabriales, J Pérez-Moreno, L Tijerina-Chávez y H Vaquera-Huerta. 2007. Desnitrificación de un fertilizante de lenta liberación y urea + fosfato monoamónico aplicados a trigo irrigado con agua residual o pozo. Revista Internacional de Contaminación Ambiental. <http://scielo.org.mx/scielo.php?visitedo=9/11/2012>
- O'Brien M y R Colwell. 1987. Characterization test for numerical taxonomy studies. En Methods in microbiology. vol 19. Academic Press. London.
- O'Leary WM. 1962. Fatty acids of bacterial. Journal of Bacteriology 26:421-447.
- 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. Universidad Autónoma Metropolitana-Xochimilco. México DF.
- Ramírez-Gama MB, CC Mejía, MO Velázquez, RGTsuzuki, GLVierna, y I Müggenburg. 2003. Manual de prácticas de microbiología general. Facultad de Química, UNAM. Mexico. 290 p.
- Song B, MM Häggblom, J Zhou, JM Tiedje y NJ Palleroni. 1999. Taxonomic characterization of denitrifying bacteria that degrade aromatic compounds and description of *Azoarcus toluvorans* sp. nov. and *Azoarcus toluclasticos* sp. nov. International Journal of Systematic Bacteriology 49:1129-1140.
- Spiro T.G. y WM Stigliani. 2004. Química medioambiental. 2a. Ed. Pearson Prentice Hall. Madrid. 504 p.
- Williams DR, JJ Rowe, P Romero y RG Eagon. 1978. Denitrifying *Pseudomonas aeruginosa*; some parameters of growth and active transport. Applied and Environmental Microbiology 36:257-263.
- Zehr JP y BB Ward. 2002. Nitrogen cycling in the ocean: new perspectives on processes and paradigms. Applied and Environmental Microbiology 68: 1015-1024.

Pilou EC. 1984. The interpretation of ecological data. Wiley-Interscience. NY. 254 p.

Poblaciones bacterianas desnitrificantes de la Laguna de Somtecomapan, Veracruz

*1Ferrara-Guerrero MJ, 1Angeles-Vázquez JR, 1Morales-Nieto MG, 1Figuroa-Torres MG, 2Pagano M.