

Evaluación de actividades enzimáticas microbianas en la laguna de Sontecomapan, Veracruz, México.

Evaluation of microbial enzyme activities in Sontecomapan lagoon, Veracruz, Mexico.

¹Hernández-Estrada HA, ¹Ferrara-Guerrero MJ*, ¹Angeles-Vázquez JR, ³Ponce-Mendoza A, ²MG Figueroa-Torres.

¹Laboratorio de Ecología Microbiana.

²Laboratorio de Ficología.

Universidad Autónoma Metropolitana-Xochimilco. Depto. El Hombre y su Ambiente. Calzada del Hueso No. 1100. Col. Villa Quietud, México, D.F. 04960, Del. Coyoacán. Tel. 5483 7000 ext. 3114.

³Centro Nacional de Investigaciones Disciplinarias de Conservación y Mejoramiento de Sistemas Forestales (INIFP). Av. Progreso No. 5, Barrio Sta. Catarina, México D.F. 04010, Del. Coyoacán. Tel. 38718700 ext. 604.

* Email: fgmd6735@correo.xoc.uam.mx

RESUMEN

La estimación de actividades enzimáticas en sistemas acuáticos constituye un instrumento de evaluación de la diversidad funcional de la microbiota, los flujos de carbono, la tasa de reciclamiento de nutrientes y del estado de salud del ecosistema. La actividad hidrolítica microbiana es fundamental para entender los procesos de producción nueva y regenerada en ecosistemas acuáticos; sin embargo, las técnicas para determinar esta actividad han sido desarrolladas sobre todo en suelos agrícolas, por lo que en este estudio se adecuaron las técnicas para determinar *ex situ* las actividades enzimáticas microbianas: deshidrogenasa (ADH), celulasa (AC), fosfatasa ácida y alcalina (AFaC y AFaI) y quitinasa (AQ) en agua de fondo y sedimentos superficiales de la laguna de Sontecomapan, Veracruz, en época de nortes y secas. Se determinó, igualmente, la capacidad del bacterioplankton y bacteriobentos de producir enzimas extracelulares (celulasa, fosfatasa, quitinasa, amilasa, ADNasa, lecitinasa y esculinasa) y se midieron las variaciones de los parámetros físicos y químicos en las diferentes estaciones de muestreo en las épocas climáticas antes mencionadas. El análisis de componentes principales mostró que la mayor actividad hidrolítica microbiana se presentó en los sedimentos, sólo la ADH y AF fueron mayores en agua de fondo en temporada de secas. De igual manera, la producción de enzimas extracelulares bacterianas fue mayor en el agua de fondo. El análisis estadístico mostró que bajos valores de oxígeno y de Eh promovieron una alta expresión de la ADH, AFaC y AFaI, mientras que la AQ fue inhibida

por el pH alcalino y las altas salinidades. Tanto la actividad hidrolítica microbiana como bacteriana en los sedimentos superficiales, mostraron una alta correlación con la concentración de la materia orgánica.

Palabras clave: Agua de fondo, hidrólisis, microbentos, microplankton, sedimentos.

ABSTRACT

The estimation of enzymatic activities in aquatic systems constitutes an instrument of evaluation of the functional diversity of the microbiota, the carbon flows, the nutrients recycling rate and the ecosystem health level. The microbial hydrolytic activity is fundamental to understand the processes of new and regenerated production in aquatic ecosystems; nevertheless, the techniques for determining this activity have been mainly developed on agricultural grounds. Reason why in this study the techniques were adapted with the aim to determine *ex situ* the dehydrogenase (DHA), cellulase (CA), acid and alkaline phosphatase (AcFA and AlFA) and chitinase (QA) microbial enzymatic activities, in bottom water and superficial sediments of Sontecomapan lagoon, Veracruz, at north winds and dry seasons. The capacity of bacterioplankton and bacteriobenthos to produce extracellular enzymes (cellulase, phosphatase, chitinase, amylase, DNAase, lecitinase and esculinase) was also determined, and the variations of the physical and chemical parameters in the different sampling

Actividad enzimática microbiana en Sontecomapan, Ver.

Hernández-Estrada HA, Ferrara-Guerrero MJ, Angeles-Vázquez JR, Ponce-Mendoza A, MG Figueroa-Torres.

stations at two climatic times were measured. The principal components analysis showed that the greater microbial hydrolytic activity appeared in the sediments, only the DHA and the FA were higher in bottom water in dry season. In the same way, the bacterial extracellular enzyme production was greater in the bottom water. The statistical analysis showed that low oxygen and Eh values lead to a high expression of the DHA and FA (acid and alkaline), whereas the QA was inhibited by an alkaline pH and high salinities. Both microbial and bacterial hydrolytic activity in superficial sediments showed a high correlation with the organic matter concentration.

Key words: Bottom water, hydrolysis, microbenthos, microplankton, sediments.

INTRODUCCIÓN

En todos los ecosistemas, los microorganismos (bacterias, hongos, protistas-algas y protozoos) son los más abundantes y transforman una gran cantidad de materia y energía. La tasa de reciclamiento de nutrientes (C, N, P) es controlada ya sea de forma directa mediante degradación hidrolítica de compuestos orgánicos, o indirecta modificando la retención o movimiento de los nutrientes (e. g. modificaciones en el potencial redox) (Álvarez 2005). Los balances biogeoquímicos en ecosistemas costeros permiten evaluar las cargas, los flujos y el destino de los nutrientes, así como el metabolismo neto del ecosistema. La descomposición de la materia orgánica (MO) depositada en los sedimentos enriquece el agua intersticial con formas solubles de nitrógeno (NH_4^+ , NO_2^- y NO_3^-), fósforo (HPO_4^{2-}), azufre (SH^- , SO_4^{2-} y H_2S) y hierro (Fe^{2+} y Fe^{3+}) (Morán-Villa 2007). El resultado de la descomposición de la MO es la liberación y acumulación de monómeros solubles, oligómeros y macromoléculas, siendo las bacterias, el microplancton y el microbentos (invertebrados microscópicos y larvas del plancton y del bentos), los principales organismos que participan en la mineralización de compuestos orgánicos gracias a la presencia de exoenzimas específicas que catalizan la hidrólisis de compuestos de alto peso molecular (Curticapean y Dragan 2007). La actividad enzimática constituye así un paso crítico y fundamental en el procesamiento del detrito

(Álvarez 2005).

El carbono detrítico es el recurso eutrófico principal de muchos sistemas acuáticos, su entrada a la red trófica está mediada por microorganismos heterótrofos cuya actividad colectiva puede ser expresada como tasas de degradación de carbono orgánico particulado (COP), asimilación de carbono orgánico disuelto (COD) y producción de biomasa. El potencial enzimático en los sedimentos refleja, por consecuencia, la actividad de la microbiota, la influencia de diferentes factores físicos, químicos y antropogénicos y la intensidad de la actividad enzimática (Curticapean y Dragan 2007).

Es muy complejo analizar la fracción microbiana que lleva a cabo la mayor parte de los procesos de descomposición y mineralización de la MO, sin embargo, actualmente se han desarrollado técnicas para estudiar el funcionamiento *in situ* de estas comunidades (Álvarez 2005). El conocimiento del papel que juegan las comunidades microbianas en los suelos y sedimentos puede ayudar a entender el funcionamiento del sistema ya que la principal función del microbentos en los sedimentos, radica en su participación en el ciclo de nutrientes detrítales (Caldwell 2005).

La oxidación microbiana de sustancias orgánicas bajo condiciones aeróbicas está ligada a una cadena de transporte de electrones, acoplada a la síntesis de ATP, que tiene al oxígeno como aceptor final de electrones y que se conoce como fosforilación oxidativa. En la ruta principal del transporte electrónico desde los sustratos orgánicos hasta el oxígeno molecular, participan cuatro tipos de enzimas de oxidación-reducción, entre las que se encuentran las deshidrogenasas piridín-dependientes, que necesitan NAD o NADP como coenzimas y las deshidrogenasas flavín-dependientes que contienen FAD o FMN como grupo prostético. Así, la actividad deshidrogenasa total de los microorganismos depende de las actividades de las diferentes deshidrogenasas y tiene un papel fundamental en las etapas iniciales de la oxidación de la materia orgánica.

Conocer la actividad hidrolítica microbiana es fundamental para entender los procesos de regeneración de sistemas acuáticos; sin embargo, existe muy poca información sobre las técnicas para

determinar las actividades exoenzimáticas en ecosistemas acuáticos (Frutos 2004).

Esto es una limitante cuando se quiere conocer y diagnosticar el estado de conservación de los ecosistemas acuáticos que presentan problemas de vulnerabilidad ecológica; por lo que los objetivos de este trabajo fueron: 1) adecuar las técnicas para determinar la actividad hidrolítica microbiana *ex situ* a través de las enzimas deshidrogenasa, celulasa, fosfatasa y quitinasa en agua de fondo y sedimentos superficiales lagunares, y 2) determinar la potencialidad hidrolítica del bacterioplanton y bacteriobentos presentes en la laguna de Sontecomapan, Veracruz.

MATERIAL Y MÉTODOS

Zona de estudio

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 al sur del Estado de Veracruz en el Golfo de México (Fig. 1), entre los paralelos 18° 30' -18° 34' N y los meridianos 94° 54' -95° 02' O, tiene un área de 8.9 Km² y cuenta con una importante población pesquera, áreas de cultivo y algunas zonas de actividad pecuaria. La laguna en general, es somera con una profundidad promedio de 1.5 m. Se conecta con el mar de manera permanente a través de una boca, presenta mixohalinas influenciadas por aguas dulceacuícolas y marinas (González et al. 1994).

Muestreo

Sedimento

La obtención de la muestra de sedimento para la evaluación de las actividades enzimáticas microbianas, se hizo por buceo libre utilizando nucleadores manuales de policarbonato de 17 cm de largo y 4.5 cm d.i., evitando perturbar la superficie del sedimento. Con ayuda de un émbolo se cortó e l primer centímetro de sedimento para obtener submuestras de dos centímetros cúbicos utilizando una jeringa hipodérmica estéril con la punta cortada. Las muestras fueron preservadas en bolsas de

plástico con cierre hermético en refrigeración. Para el análisis de las actividades enzimáticas bacterianas de sedimento, se tomaron dos centímetros cúbicos de sedimento que fueron preservados en frascos estériles conteniendo 18 ml de glicerol al 50% y congelados a -21°C hasta su procesamiento.

Para obtener la concentración de materia orgánica y determinar la textura de los sedimentos, las muestras de sedimento fueron colocadas en bolsas de plástico herméticas y conservadas a temperatura ambiente.

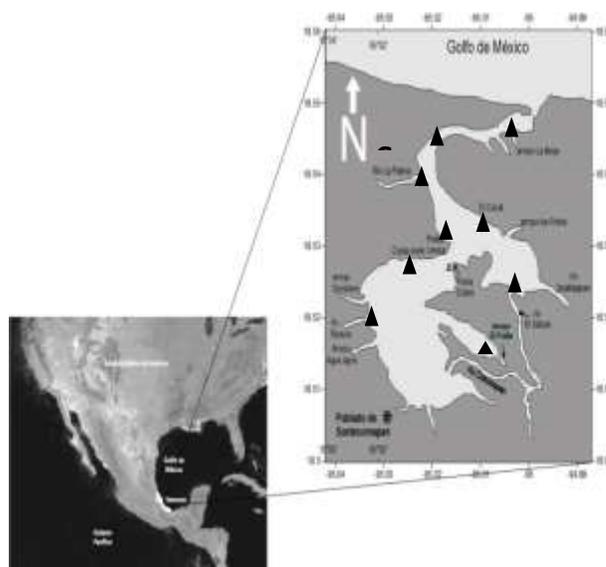


Fig. 1. Ubicación de las estaciones de muestreo en la laguna de Sontecomapan, Veracruz.

Agua

Las muestras de agua de fondo para actividades enzimáticas microbiana y bacteriana se obtuvieron con una botella van Dorn horizontal de 1L. Para las actividades enzimáticas microbianas y bacterianas 150 ml de la muestra de agua se fijaron en un volumen igual de glicerol estéril al 50%, y almacenada a -20°C hasta su procesamiento en laboratorio.

Para nutrientes nitrogenados y fosfatados disueltos, las muestras fueron filtradas con membranas Whatman GF/F y preservada a -20°C

para su posterior análisis en laboratorio. El agua de poro fue obtenida a partir de los núcleos de sedimento no perturbado utilizando un tubo capilar de 5 mm d.e. y 10 cm de largo con una serie de perforaciones milimétricas a lo largo del primer centímetro de la punta del tubo capilar y el extremo superior conectado a una manguera unida a una jeringa de 50 mL. El agua obtenida fue filtrada a través de una membrana Millipore GF/F de 25 mm de diámetro. La muestra de agua fue almacenada a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ en frascos tipo penicilina previamente gasificados con N_2 , hasta su procesamiento.

Parámetros físicos y químicos

El porcentaje de materia orgánica (MO) se determinó por el método de titulación propuesto por Walkey y Black (1934), la clasificación granulométrica por el método de Bouyoucos (Villegas et al. 1978), los sólidos suspendidos (MES) se evaluaron con la técnica propuesta por Strickland y Parsons (1972), y el oxígeno disuelto por la técnica de Winkler (1998).

El pH y Eh en agua de fondo fueron medidos con un potenciómetro ATAGO S/Mill-E[®] y un multiparamétrico YSI 556 MPS[®], respectivamente. En sedimento, el Eh se determinó con el uso de un potenciómetro Thermo Orion[®] 250A+ y un minielectrodo redox de vidrio Sentek[®] (5 mm d.e.).

La concentración de compuestos inorgánicos nitrogenados fue determinada por los métodos espectrofotométricos recomendados por Aminot y Chaussepied (1983); los nitratos (N-NO_3^-) en agua de fondo por el método de reducción por cadmio. La concentración de nitritos (N-NO_2^-) y amonio (N-NH_4^+) por el método de Koroleff (1969). La determinación de los compuestos fosfatados (fósforo total y ortofosfatos) en agua de fondo y de poro se hizo con un espectrofotómetro HACH[®] utilizando kits específicos para agua marinas (método de digestión con persulfato 8190 con rango de detección de 0.02 a 1.10 mg L^{-1} ; método de aminoácidos 8178 con rango de detección de 0.23 a 30 mg L^{-1} respectivamente).

La concentración de nitratos en agua de poro se determinó con el método de reducción con cadmio

utilizando un kit Hach para el método 8171 con un rango de sensibilidad de 0.1 a 10 mg L^{-1} .

Actividades enzimáticas microbianas y bacterianas

El método para la determinación de la actividad deshidrogenasa (ADH), se basa en la valoración del idonitrotetrazolio formazán (INTF) formado cuando 3 g de sedimento ó 3 mL de agua de fondo son incubados con 0.2 mL de 2-p-iodofenil-3-p-nitrofenil-5-feniltetrazolio (INT) al 0.4% , durante 20 horas a 20°C en oscuridad (García et al. 1993). La curva patrón fue preparada a partir de un patrón primario de INTF de $60\text{ }\mu\text{g mL}^{-1}$ y una gama de concentraciones de 0 a $60\text{ }\mu\text{g mL}^{-1}$, por duplicado a 490 nm de longitud de onda.

Para la estimación de la actividad celulasa, se siguió el método de Somogy-Nelson (Nelson 1994), en el que los azúcares son oxidados por compuestos cúpricos (Cu^{2+}) en solución alcalina. Los azúcares reductores son oxidados por el sulfato de cobre (Cu^{2+}) que se reduce hasta Cu_2O el cual forma un complejo de color azul al reaccionar con el reactivo de Nelson (García e Ibañez 1994). Se utilizó una curva patrón de azúcares reductores de glucosa a partir de un patrón primario 1 mM , en un rango de 0.5 a 10 mM y por duplicado. La estimación de la actividad celulasa se determinó espectrofotométricamente a 540 nm de longitud de onda utilizando cinco gramos de sedimento secado a temperatura ambiente y tamizado sobre malla de 0.2 mm de diámetro ϕ ó 5 mL de agua de fondo (García e Ibañez 1994).

Las fosfatasa son enzimas que catalizan la hidrólisis de ésteres y anhídridos del ácido fosfórico. Las fosfatasa alcalina y ácida pertenecen al grupo de las monoésterfosfato hidrolasa que son dos enzimas inespecíficas que catalizan la hidrólisis de glicerofosfatos y se diferencian por su pH óptimo de actuación. La medición de la actividad fosfatasa se basa en la determinación espectrofotométrica del p-nitrofenol liberado cuando 1 gr de sedimento seco ó 1 mL de agua de fondo son incubados a $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ durante una hora con una disolución tamponada (pH 6.5 para la fosfomonoesterasa ácida y pH 11 para la alcalina) de p-nitrofenilfosfato; el método colorimétrico para medir el p-nitrofenol liberado se

basa en el hecho de que las disoluciones alcalinas de este compuesto tienen un color amarillo (Tabatabai y Bremer 1969). La curva patrón utilizada se preparó a partir de una solución patrón primario de p-nitrofenol de $1000 \mu\text{g mL}^{-1}$ y una gama de concentraciones de 0 a $250 \mu\text{g mL}^{-1}$ por duplicado.

En el caso de la actividad quitinasa, la determinación tiene como fundamento la valoración espectrofotométrica a 590 nm de longitud de onda, de la N-acetilglucosamina que se forma por hidrólisis enzimática cuando una muestra de 5 gr de sedimento seco ó 5 mL de agua de fondo son incubados en presencia de una cantidad conocida de quitina (10 mL de una suspensión al 5% de quitina) (Rodríguez et al. 1983).

Para evidenciar la producción de enzimas extracelulares por el bacterioplancton y bacteriobentos heterótrofo, se utilizaron ocho sustratos orgánicos específicos con agar ZoBell como medio base (MB) (ZoBell 1941); la producción de fosfatasa fue observada en un medio base, conteniendo 1% de una solución p-nitrofenilfosfato de sodio (Sigma) (Tramer 1952); la hidrólisis de proteínas añadiendo 4 g L^{-1} de gelatina al MB (Lányi 1987) y la producción de amilasa añadiendo 10 g L^{-1} de almidón; la hidrólisis del ADN en agar ADNasa de BBL® (Jeffries et al. 1957). Para la de la esculina añadiendo 0.1 % de esculina y 0.1 % de sal férrica (Cowan y Steel 1974); la de hidratos de carbono de cadena larga como la quitina añadiendo 4 g L^{-1} de quitina coloidal; la hidrólisis de ácidos grasos por la producción de lecitinasas añadiendo al medio de base (MB) 10 % de clara de huevo; las lipasas por la producción de tweeneyesterasa, añadiendo 10 ml L^{-1} de tween 80 (Lányi 1987), y de la celulasa en medio MB líquido con una tira de papel arroz (Angeles-Vázquez 2007). Todos los análisis de producción de enzimas microbianas fueron realizados por cuadruplicado.

Análisis estadístico

El análisis de componentes principales (ACP) nos permite evaluar simultáneamente diferentes variables. La gráfica del ACP representa la ordenación de las variables enzimáticas y fisicoquímicas de acuerdo a los ejes 'x' y 'y', los

cuales representan los vectores "eigen" con la mayor varianza (vector "eigen" 1 y 2 respectivamente). Al mismo tiempo se le adicionaron las variables categóricas de época del año, salinidad y sitios de muestreo. ACP fue realizado con la función 'dudi.pca' usando el paquete 'ade4' (Dray et al. 2007) en el programa R 2.15.3 (R Core Team, 2013).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Caracterización físico-química del agua de fondo y sedimentos superficiales

La temperatura media no presentó una variación entre el agua de fondo y el sedimento en ambas estaciones climáticas; pero en época de secas fue mayor que en época de nortes cuando la profundidad media fue menor (Tabla 1).

Tabla 1. Valores medios \pm D.S. de los valores de la medición de los parámetros físicos-químicos en el agua de fondo (af) y en los sedimentos superficiales (s) (1 cm de profundidad) de las diferentes estaciones de muestreo, y en las dos temporadas del año estudiadas.

Parámetros	Biotopo	Nortes	Secas
Profundidad (cm)	af	115.6 ± 37.7	133.6 ± 136.6
Temperatura (°C)	af	23.3 ± 1.5	30.7 ± 2.2
	s	22.2 ± 1.8	30.9 ± 2.6
Salinidad (g L^{-1})	af	14.2 ± 12.2	20.8 ± 8.9
	s	19.3 ± 13.0	7.9 ± 9.4
Oxígeno (mg L^{-1})	af	3.8 ± 0.8	5.6 ± 0.9
	s	9.0 ± 0.8	7.9 ± 0.6
pH	af	8.9 ± 0.7	8.0 ± 0.4
	s	45.3 ± 41.5	95.2 ± 71.3
Eh (mV)	af	-35.3 ± 74.5	-50.0 ± 160.0
	s	0.04 ± 0.04	0.01 ± 0.02
N-NH ₄ ⁺ (mg L^{-1})	af	0.05 ± 0.04	0.09 ± 0.05
	s	0.01 ± 0.02	0.002 ± 0.002
N-NO ₂ ⁻ (mg L^{-1})	af	0.01 ± 0.01	0.06 ± 0.03
	s	0.03 ± 0.02	0.22 ± 0.27
N-NO ₃ ⁻ (mg L^{-1})	af	0.3 ± 0.2	0.7 ± 0.5
	s	4.2 ± 2.3	4.5 ± 2.7
PO ₄ ³⁻ (mg L^{-1})	af	5.3 ± 2.5	5.3 ± 2.4
	s		

En las dos épocas del año se observó una clara diferencia entre la salinidad del agua de fondo y el agua de poro, siendo mayor en el agua de poro en época de nortes y en agua de fondo en época de secas. La concentración de oxígeno fue igualmente mayor en el agua de fondo en la época de secas coincidiendo con los valores de Eh más electronegativos en el agua de poro. El pH fue en general básico tanto en agua de fondo como en agua de poro, a excepción del agua de fondo que presentó valores medios de pH neutros en la época de secas (Tabla 1).

Las concentraciones de N (NH_4^+ , NO_2^- , NO_3^-), presentaron valores contrastantes entre los diferentes sitios muestreados. La concentración de nitrógeno en forma de amonio en temporada de nortes en ambos biotopos no presentó diferencias. En época de secas la concentración de amonio en agua de poro fue mayor que la del agua de fondo y que a la temporada de nortes (Tabla 2). En temporada de nortes en la estación el Sábalo se presentó la mayor concentración de N-NO_2^- (0.079 mg L^{-1}) en agua de fondo, mientras que en agua de poro el máximo valor se mostró en Punta Levisa (0.032 mg L^{-1}); en época de secas hubo un aumento

en agua de poro con valores que van de 0.012 a $0.089 \text{ mg L}^{-1} \text{ N-NO}_2^-$; en esta época del año en agua de fondo las concentraciones de nitritos fueron muy bajas (0.0002 a $0.0044 \text{ mg L}^{-1} \text{ N-NO}_2^-$). Solo el nitrato fue relativamente alto en agua de poro en ambas épocas del año (Tabla 2).

Los valores de sólidos suspendidos en agua de fondo fueron mucho más elevados en época de Nortes que en secas (Tabla 2), por la resuspensión de sedimento en esta época del año, los valores mayores se encontraron en las desembocadura de los ríos y en el estero El Fraile y los menores en la zona del canal de navegación.

En ambas épocas del año predominaron los sedimentos de tipo areno-limosos, aunque la mayor proporción de limos y arcillas se encontró en época de secas (Tabla 1), por la baja resuspensión del sedimento. El mismo comportamiento se observó en los valores del porcentaje de materia orgánica.

Actividad hidrolítica microbiana en agua de fondo.

Los resultados del análisis de componentes principales (ACP), mostraron que existe una ligera

Tabla 2. Variación de la textura, concentración de materia orgánica en los sedimentos superficiales y sólidos suspendidos (MES) en el agua de fondo en cada una de las estaciones de muestreo y en las dos temporadas del año estudiadas. nd= no determinada

Estación	Secas					Nortes				
	Arenas (%)	Arcillas (%)	Limos (%)	MO (%)	MES (mg L^{-1})	Arenas (%)	Arcillas (%)	Limos (%)	MO (%)	MES (mg L^{-1})
El Real	98	0.4	1.6	0.08	0.04	51	8	41	0.7	20.21
Chancarral	35.6	12.4	52	1.19	0.03	78	10	12	0.58	30.86
C. Norte	96	0.4	3.6	0.19	0.03	97	2	2	0.25	38.15
R. Basura	20	10.4	69.6	4.73	0.03	45	8	47	1.67	77.14
El Cocal	70	6.4	23.6	1.22	0.10	nd	nd	nd	nd	91
P. Levisa	70	6.4	23.6	3.19	0.02	87	4	9	0.3	NA
La Boya	70	10.4	19.6	1.47	0.13	75	10	15	0.94	167.9
El Fraile	32	14	54	2.19	0.05	43	7	51	2.17	82.91
La Palma	85.6	4.8	9.6	1.39	0.11	91	3	6	0.78	14.71
R. Sábalo	71.6	10.8	17.6	2.93	0.03	59	5	36	0.46	91.25

Actividad enzimática microbiana en Sontecomapan, Ver.

Hernández-Estrada HA, Ferrara-Guerrero MJ, Ángeles-Vázquez JR, Ponce-Mendoza A, MG Figueroa-Torres.

relación entre la ADH, la concentración de O₂ y la salinidad en agua de fondo (Fig. 2). Como puede observarse en las Tablas 1 y 3, la mayor ADH ($65.5 \pm 41 \mu\text{g mL}^{-1}$ INTF), de oxígeno ($5.6 \pm 0.9 \text{ mg L}^{-1}$), y de salinidad ($20.8 \pm 8.8 \text{ ppm}$) en agua de fondo se encontraron en época de secas, debido a que en esta época del año la oxigenación del agua de fondo se vio favorecida por la constante entrada de aguas costeras por la boca favoreciendo la actividad heterotrófica de la comunidad microbiana heterotrófica bentónica.

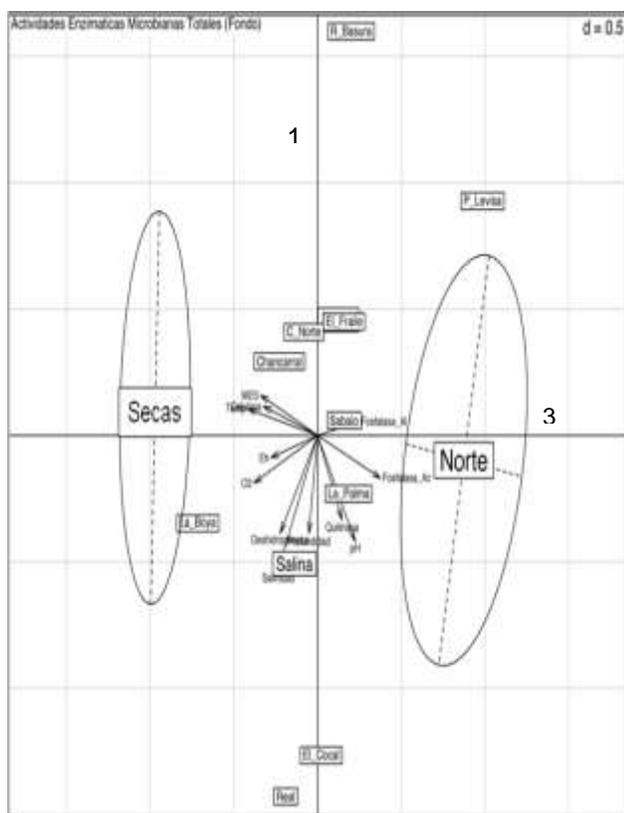


Fig. 2. Relación entre actividad exoenzimática microbiana y las características físicas y químicas (vectores) del ambiente, de acuerdo a un análisis estadístico PCA, en agua de fondo, en los diferentes sitios de muestreo (cuadrados), en época de nortes y secas (elipses). Los números cercanos a cada eje son los porcentajes de varianza da cada vector "eigen". La escala de la gráfica está dada por una retícula cuya medida está dada en la esquina superior derecha.

El MES y la temperatura se relacionaron principalmente en la época de seca (Fig. 2), mientras que la AFAC en época de nortes (Tabla 2). En época de nortes se obtuvo la mayor AFAC ($2.1 \pm 0.9 \mu\text{g mL}^{-1}$ p-nitrofenol) ya que en esta temporada la temperatura media del agua fue de $30.7 \pm 2.2^\circ\text{C}$, que son las adecuadas para una óptima acción catalizadora de los grupos fosfato (Wood 1977). Sin embargo, una característica de los materiales suspendidos en la columna de agua es que retienen los grupos fosfato, impidiendo que este elemento quede disponible para el microplancton, debido al hecho de que el fósforo se encuentre unido a moléculas orgánicas de alto peso molecular lo que impide la catálisis de la reacción por la AFAC (López 2006).

Por otro lado, se observó que bajos valores de Eh y bajas concentraciones de oxígeno permiten una mayor AFAC en agua de fondo en época de nortes, sobre todo en las estaciones el Sábalo y Punta Levisa (Fig. 2). Sin embargo, los valores observados en AFAC en ambas épocas del año fueron bajos debido a que los valores medios de pH fueron de 7.9; se ha reportado que el máximo aprovechamiento del fosfato (HPO_4^{2-}) se lleva a cabo en un rango de pH entre 6 y 7 ya que en un ambiente ácido éstos se precipitan como fosfatos de hierro y aluminio bastante insolubles y a un pH alcalinos esta precipitación ocurre por compuestos de fosfatos de calcio igualmente insoluble (Wood 1977).

En época de nortes se observó la influencia de los valores alcalinos de pH sobre la baja AQ ($0.3 \pm 0.2 \mu\text{g mL}^{-1}$ N-acetilglucosamina), sobre todo en la estación la Palma; sin embargo, esta actividad también pudo haber sido inhibida por las altas concentraciones de salinidad como lo reportaron El-Hamdaoui et al. (2008), quienes afirmaron que la presencia de iones salinos puede ser potencialmente tóxica para los microorganismos, provocando la disminución o inhibición de la actividad enzimática. Esto concuerda con la baja AQ encontrada en época de secas cuando la salinidad en agua de fondo fue mayor que en época de nortes.

A pesar de que los valores de la actividad celulolítica (AC) fueron mucho menores al resto de las actividades enzimáticas, se pudo observar que las concentraciones más altas fueron influenciadas

positivamente por las temperaturas más altas en temporada de secas, principalmente en la estación el Chancarral; no obstante en época de nortes, no se observó la influencia de ninguna variable físico-química sobre la AC. Lo anterior se puede deber a que en la temporada de secas existe una mayor concentración de residuos orgánicos constituidos de compuestos celulolíticos depositados en los sedimentos. Los bajos valores de la AC encontrados en este estudio puede deberse a que la celulosa es un sustrato fibroso, resistente y con una compleja constitución de macromoléculas (polisacáridos y hemicelulosas), que son compuestos heteropolisacáridos de alto peso molecular constituidos por diferentes unidades de monosacáridos (pentosas, hexosas y ácidos úricos), lo que hace que estos polisacáridos sean difíciles de hidrolizar, debido a que solamente algunas bacterias y hongos de vida libre presentan las enzimas necesarias para romper enlaces β -1,4-glucosídicos. Esto unido a que la actividad hidrolítica de la celulosa es óptima en un medio de pH neutro (6.5 a 7.5) (Deng y Tabatabai 1994; Gutiérrez et al., 2008), diferente a las condiciones alcalinas que prevalecen en esta laguna (Tabla 2) (Fig. 2).

Actividad hidrolítica en sedimento

En los sedimentos se observó un incremento en las concentraciones de la ADH ($82.1 \pm 38.6 \mu\text{g INTF}$), presentando correlación con las mayores concentraciones de MO ($1.9 \pm 1.4 \%$) en temporada de nortes, lo que coincide con lo publicado por Acosta y Paolini (2005) (Fig. 3), quienes afirmaron que el tipo de MO o los compuestos incorporados en ella son capaces de activar la biomasa microbiana autóctona del sedimento; además, de que la ADH es un reflejo de la eficiencia de la actividad oxidativa de los compuestos orgánicos del sedimento. Esta relación se presentó principalmente en la época de nortes.

La AC presentó un ligero aumento en ambas temporadas del año, en comparación con la encontrada en agua de fondo, debido a que las enzimas celulolíticas se asocian rápidamente al material particulado como las arcillas, MO y sustancias húmicas disminuyendo o inhibiendo

completamente su actividad (Gutiérrez et al. 2008).

Por otro lado, las actividades fosfatásicas (ácida y alcalina) no presentaron cambios en el sedimento, manteniéndose casi en los mismos niveles que en agua de fondo en temporada de nortes. En época de secas ambas actividades presentaron concentraciones muy bajas en comparación con las encontradas en agua de fondo. El ACP mostró una correlación inversa con la temperatura a diferencia de los obtenidos en el agua de fondo (Fig. 3).

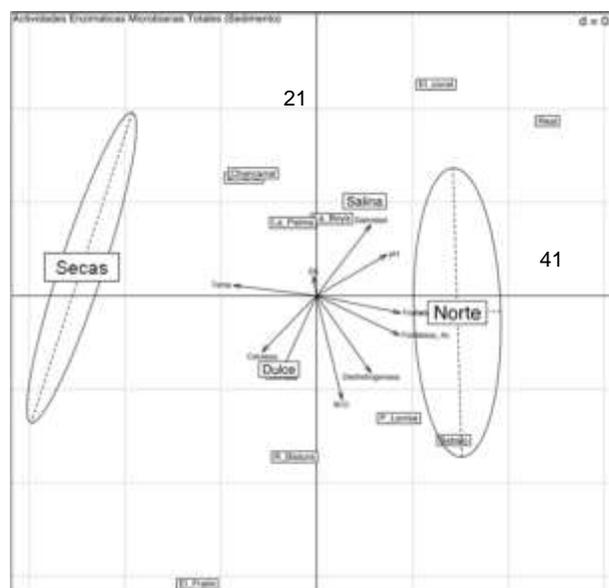


Fig. 3. Relación entre actividad exoenzimática microbiana y las características físicas y químicas del ambiente (vectores), de acuerdo a un análisis estadístico PCA, en sedimentos superficiales (1 cm de profundidad), en los diferentes sitios de muestreo (cuadrados), en época de nortes y secas (elipses). Los números cercanos a cada eje son los porcentajes de varianza de cada vector "eigen". La escala de la gráfica está dada por una retícula cuya medida está dada en la esquina superior derecha.

Al igual que en el agua de fondo la AQ fue baja; a pesar del gran interés que se tiene sobre la actividad quitinasa en suelos y sedimentos, los trabajos realizados con esta enzima son muy escasos y, por ello, son muy pocos los escenarios y situaciones en los que se ha estudiado la AQ, por lo que no se conoce a fondo cuál o cuáles son los

factores que afectan al método de determinación (García et al. 2003).

Actividades exoenzimáticas bacterianas.

Con respecto a la capacidad de hidrolizar compuestos orgánicos de alto peso molecular por parte del bacterioplancton y bacteriobentos heteótrofo, se observó que en agua de fondo durante la temporada de secas, hubo una mayor capacidad de hidrolizar: >glúcidos (esculinasa), >ácidos grasos > proteínas > compuestos orgánicos fosfatados; tal vez debido a que en esta época existe una mayor concentración de compuestos orgánicos incorporados al sistema por los aportes pluviales que nutren constantemente la columna de agua de estos elementos fácilmente asimilables.

Por el contrario, en la época de nortes fueron >las proteínas, >los glúcidos >los compuestos orgánicos fosfatados, los mayormente hidrolizados. En ambas temporadas, no se evidenció la capacidad de hidrolizar los ácidos nucleicos, el almidón, la quitina y la celulosa.

Por otro lado, en el sedimento, en época de

secas, se observó una buena expresión enzimática de: >amilasa, >lipasa, >lecitinasa y >fosfatasa.

Estos resultados concuerdan con lo reportado en investigaciones recientes que han demostrado que la descomposición de compuestos orgánicos se realiza por una compleja asociación microbiana, principalmente por bacterias; al inicio son utilizados los materiales orgánicos más asequibles (mono y disacáridos, aminoácidos, proteínas), lo que se ve reflejado en una alta actividad de las enzimas extracelulares como gelatinasa, esculinasa y fosfatasa.

Posteriormente, son hidrolizados por otros grupos microbianos anaerobios los compuestos más complejos como la celulosa, lignina y quitina. Así, la descomposición de estos materiales en el agua de fondo y en el sedimento constituye un proceso biológico básico en el que el carbono es recirculado en el sistema.

Por lo anterior, podemos decir que la comunidad bacteriana presente en este ecosistema juega un papel fundamental en la descomposición de la materia orgánica soluble y particulada presente en la columna de agua y en los sedimentos, dando

Tabla 3. Medias y desviaciones estándar de las actividades exoenzimáticas microbianas *ex situ*. ADH (actividad deshidrogenasa); AC (actividad celulasa); AQ (actividad quitinasa); AFac y AFAI (actividades fosfatasa ácida y alcalina).

Act. enzimática ($\mu\text{g ml}^{-1}$)	Biotopo	Nortes	Secas
ADH (INTF*)	af	41.6 ± 36.6	65.5 ± 41.0
	s	82.1 ± 38.6	46.9 ± 17.3
AC (glucosa)	af	0.02 ± 0.01	0.1 ± 0.06
	s	0.14 ± 0.06	0.4 ± 0.44
AQ (N-acetilglucosamina)	af	1 ± 2.5	0.3 ± 0.2
	s	0.3 ± 0.1	0.4 ± 0.4
AFac (p-nitrofenol)	af	2.1 ± 0.9	1 ± 0.4
	s	1.7 ± 0.5	0.002 ± 0.002
AFAI (p-nitrofenol)	af	1.3 ± 0.5	0.9 ± 0.4
	s	1.3 ± 0.5	0.0009 ± 0.0005

*Iodonitrotetrazolio formazán

como resultado el reciclamiento de nutrientes inorgánicos como el nitrógeno, fósforo, azufre y otros elementos traza, los cuales pueden ser aprovechados principalmente por los productores primarios como el fitoplancton (Murrell, 2003).

CONCLUSIONES

La variabilidad registrada de las actividades exoenzimáticas microbianas está ligada a la época del año y al contenido de carbono disponible en la laguna de Sontecomapan. La actividad de la deshidrogenasa y de las fosfatasa fueron las más representativas en el ecosistema estudiado, mientras que la celulosa y la quitina, a pesar de ser los biopolímeros más abundantes, fueron los sustratos más difíciles de hidrolizar, ya que son compuestos de alto peso molecular que, en general, son mineralizados por la microbiota anaerobia. Los valores de las actividades enzimáticas presentados en esta investigación fueron muy bajas en comparación con estudios en suelos agrícolas.

AGRADECIMIENTOS

Esta investigación fue apoyada por el Programa de Movilidad ECOS-ANUIES-CONACYT (189448).

BIBLIOGRAFÍA

Acosta Y y J Paolini. 2005. Actividad de la enzima deshidrogenasa en un suelo calciorthids enmendado con residuos orgánicos. *Agronomía Tropical* 55 (2): 217-232.

Álvarez S. 2005. La descomposición de materia orgánica en humedales: la importancia del componente microbiano. *Ecosistemas* 14 (2): 17-29.

Aminot A y M Chaussepied. 1983. Manuel des analices chimiques en milieu marin. CNEXO, BNDO/Documentation. Francia. p.396.

Ángeles-Vázquez JR. 2007. Tasas de fijación de nitrógeno atmosférico y caracterización química y molecular de bacterias diazotrofas microaerófilas procedentes de sedimentos. Tesis de Maestría. Ciencias Agropecuarias. Universidad Autónoma Metropolitana-Xochimilco, México. 74 p.

Caldwell B. 2005. Enzyme activities as a component of soil diversity: a review. *Pedobiología* 49: 637-644.

Cowan ST y KF Steel. 1974. The principles of microbial classification. The philosophy of classification. *Journal of General Microbiology* 12:314-321

Curcapean M, M Dragan. 2007. The enzymatic activity from the sediment of the Gilau Dam Reservoir-Cluj Counti. *Journal of Biochemical and Biophysical Methods* 69 (3): 261-271.

Deng SP y MA Tabatabai. 1994. Cellulase activity of soils. *Soil Biology and Biochemistry* 26:1347-1354.

Dray S y AB Dufour. 2007. The ade4 package implementing the duality diagram for ecologist. *Journal of Statistical Software* 22:1-20.

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.

Fernández L, M Sagardoy y M Gómez. 2008. Estudios de la fosfatasa ácida y alcalina en suelos de la región pampeana norte del área sojera Argentina. *Ciencias del Suelos* 26 (1): 35-40.

Frutos MD, J Blasco y A Gómez. 2004. Actividad fosfatásica en salinas de la Bahía de Cádiz. *Ciencias Marinas* 30 (3): 403-416.

García C, T Hernández, F Costa, B Ceccanti y G Masciandro. 1993. The dehydrogenase activity in a soil as an ecological marker in process of perturbed system regeneration. p. 27-30. En: *Proceedings of the Sixth International Symposium Environmental Biogeochemistry, Salamanca, Spain, 27-30 septiembre.*

García A y JJ Ibañez. 1994. Seasonal fluctuations and crop influence on microbiota and enzyme activity in fully developed soils of central Spain. *Arid Soil Research and Rehabilitation* 8: 161-178.

García C, F Gil, T Hernández y C Trasar. 2003. Técnicas de análisis de parámetros bioquímicos en suelos: medida de actividades enzimáticas y biomasa microbiana. Mundi-Prensa. España. 215-237 p.

González FA, BA Vázquez, FS Villanueva y VG Ponce. 1994. Presencia de metales en sedimentos recientes y organismos de la laguna Sontecomapan, Veracruz, México. *Hidrobiológica* 4 (1-2): 35-43.

Gutiérrez V, A Pinzón, J Casas y M Martínez. 2008. Determinación de la actividad celulolítica del suelo proveniente de cultivos de *Stevia rebaudiana* Bertoni. *Agronomía Colombiana* 26 (3): 497-504.

Jeffries CD, DF Holtman y DG Guse. 1957. Rapid method for determining the activity of microorganisms on nucleic acids. *Journal of Bacteriology* 73:590-591.

Koroleff F. 1969. Direct determination of ammonia in natural waters as indol-phenol blue. *ICES, C.M. 1969/C: 9 Hydro Community.*

Lányi B. 1987. Classical and rapid identification methods for medically important bacteria. Prentice Hall Inc.

Actividad enzimática microbiana en Sontecomapan, Ver.

Hernández-Estrada HA, Ferrara-Guerrero MJ, Ángeles-Vázquez JR, Ponce-Mendoza A, MG Figueroa-Torres.

- California, USA. 137 p.
- López R. 2006. Evaluación del efecto de molibdeno sobre algunos parámetros bioquímicos del suelo y la planta en Andisoles del sur de Chile. Tesis de Doctorado. Universidad de la Frontera de Chile. 115 p.
- Morán-Villa V. 2007. Influencia de los parámetros físicos y químicos sobre las tasas de fijación de nitrógeno atmosférico y de desnitrificación en la laguna de Sontecompan, Veracruz. Tesis de Maestría en Ciencias Agropecuarias. Universidad Autónoma Metropolitana-Xochimilco. México. 75 p.
- Murrell MC. 2003. Bacterioplankton dynamics in a subtropical estuary: evidence for substrate limitation. *Aquatic Microbial Ecology* 32: 239-250.
- Nelson N. 1994. A photometric adaptation of the Somogy method for determination of glucose. *Journal Biological Chemistry* 153: 375-380.
- R Development Core Team. 2013. R: A language and environment for statistical computing. R foundation for statistical computing. Vienna, Austria. ISBN 3-900051-07-0, URL <http://www.R-project.org>
- Rodríguez R, G Godoy, G Morgan y RA Shelby. 1983. The determination of soil chitinase activity: conditions for assay and ecological studies. *Plant and Soil* 75: 95-106.
- Strickland DHJ y TR Parsons. 1972. A practical Handbook of seawater analysis. Fisheries research Boar of Canada. Ottawa. 321 p.
- Tabatabai MA y JM Bremer. 1969. Use of p-nitrophenyl phosphate for assay of soil phosphatase activity. *Soil Biology Biochemistry* 1: 301-307.
- Tramer J. 1952. Simple and rapid method for the estimation of bacterial phosphatases using disodium para-nitrophenylphosphate as substrate. *Journal Dairy Research* 19: 275-287.
- Villegas M, N Aguilera y L Flores. 1978. Método simplificado de análisis para la clasificación granulométrica de los minerales del suelo. UNAM. *Revista del Instituto de Geología* 2 (2): 188-193.
- Walkey A y IA Black. 1934. An examination of Degtjareff method for determining soil organic matter and a proposed modification of the chromic titration method. *Soil Science* 34: 29-38.
- Winkler M. 1998. Tratamiento biológico de aguas desecho. México. Limusa-Noriega. 31 p.
- Wood W. 1977. Bioquímica. Fondo Educativo Interamericano. México. 125-139 p.
- ZoBell CE. 1941. Studies on marine bacteria. I. The cultural requirements of heterotrophic aerobes. *Journal Marine Research* 44:42-75.