



CENTRO DE INVESTIGACIONES BIOLÓGICAS
DEL NOROESTE, S.C.

Programa de Estudios de Posgrado

BACTERIAS DIAZOTRÓFICAS Y DENITRIFICANTES ASOCIADAS
A RAÍCES DEL MANGLE NEGRO: CARACTERIZACIÓN DE LAS
COMUNIDADES A NIVEL MOLECULAR Y SU PRODUCCIÓN DE
MOLECULAS SEÑAL TIPO ACILO HOMOSERINA LACTONAS.

TESIS

Que para obtener el grado de

Maestro en Ciencias

Uso, manejo y preservación de los recursos naturales
(Orientación en Biotecnología)

Presenta

Ana Lidia Flores Mireles

La Paz, B.C.S., noviembre del 2005

ACTA DE LIBERACION DE TESIS

En la Ciudad de La Paz, B. C. S., siendo las 9:00 horas del día 24 del Mes de Noviembre del 2005, se procedió por los abajo firmantes, miembros de la Comisión Revisora de Tesis avalada por la Dirección de Estudios de Posgrado del Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, S. C., a liberar la Tesis de Grado titulada:

BACTERIAS DIAZOTROFICAS Y DESNITRIFICANTES ASOCIADAS A RAÍCES DEL MANGLE NEGRO: CARACTERIZACION DE LAS COMUNIDADES A NIVEL MOLECULAR Y SU PRODUCCIÓN DE MOLÉCULAS SEÑAL TIPO ACILO HOMOSERINA LACTONAS.

Presentada por el alumno:

Ana Lidia Flores Mireles

Aspirante al Grado de MAESTRO EN CIENCIAS EN EL USO, MANEJO Y PRESERVACION DE LOS RECURSOS NATURALES CON ORIENTACION EN **Biotecnología**

Después de intercambiar opiniones los miembros de la Comisión manifestaron su **APROBACION DE LA TESIS**, en virtud de que satisface los requisitos señalados por las disposiciones reglamentarias vigentes.

Gina
Dra. Gina Holguin Zefhuss

LA COMISION REVISORA

Yoav
Dr. Yoav B. Bashan

INSERTAR NOMBRE
DIRECTOR DE TESIS

Stephen C. Winans
Dr. Stephen C. Winans

INSERTAR NOMBRE
CO-TUTOR

INSERTAR NOMBRE
CO-TUTOR

Thelma Rosa Castellanos Cervantes
DRA. THELMA ROSA CASTELLANOS CERVANTES,
DIRECTORA DE ESTUDIOS DE POSGRADO

COMITÉ TUTORIAL

Dra. Gina Holguin Zehfuss

Director de Tesis

Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, La Paz, B. C. S.

Dr. Yoav B. Bashan

Co-tutor

Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, La Paz, B. C. S.

Dr. Stephen C. Winans

Co-tutor

Universidad de Cornell, Ithaca, N.Y.

COMITÉ REVISOR

Dra. Gina Holguin Zehfuss

Dr. Yoav B. Bashan

Dr. Stephen C. Winans

MIEMBROS DEL JURADO DE LA DEFENSA DE TESIS

Dra. Gina Holguin Zehfuss

Dr. Yoav B. Bashan

Dr. Stephen C. Winans

Dr. Humberto Mejía

RESUMEN

Los manglares son ecosistemas que juegan un importante papel como zonas de crianza, refugio y alimentación para numerosos organismos y sostienen una cadena alimenticia muy extensa basada en el detritus. Adicionalmente, los manglares exportan nutrientes a ecosistemas marinos adyacentes tales como comunidades de pastos marinos y arrecifes de coral.

Los manglares de áreas semiáridas son generalmente deficientes de nitrógeno, sin embargo, son altamente productivos. Esta aparente paradoja puede ser explicada por la alta actividad de fijación biológica de nitrógeno asociada a sedimentos y a raíces, tanto aéreas como subterráneas, hojas en descomposición, que puede contribuir hasta con un 60% del los requerimientos de nitrógeno del manglar. La desnitrificación en manglares es importante porque permite la mineralización de materia orgánica bajo condiciones anaerobias y microaerofílicas, las cuales prevalecen en un ecosistema de manglar. Considerando la importancia de las comunidades diazotróficas y desnitrificantes en manglares la disponibilidad de nitrógeno, y la ausencia de información en la literatura con respecto a la composición y diversidad de estas comunidades en ecosistemas de manglar, nosotros realizamos un análisis de la diversidad molecular de las bacterias fijadoras de nitrógeno y desnitrificantes utilizando T-RFLP de los genes *nifH* (para la fijación de nitrógeno) y de *nirS* y *nirK* (para la desnitrificación). Se encontraron resultados relevantes donde la diversidad de bacterias fijadoras de nitrógeno fue mayor que el de bacterias desnitrificantes en los 3 sitios de estudio. Cuando comparamos la diversidad entre los tres sitios, se encontró que el sitio 3, el cual tuvo la mayor concentración de materia orgánica, el porcentaje de arena en la rizósfera, así como la baja concentración de oxígeno, también tuvo la mayor diversidad de *nifH*. Esas condiciones en el sedimentos que rodea la raíces, son apropiadas para la fijación de nitrógeno, deben haber favorecido la competitividad del grupo diazotróficos de otros grupos bacterianos, permitiendo la proliferación de las fijadoras de nitrógeno así como la transferencia lateral de genes *nifH* a otros grupos, circunstancias que inducen la diversidad del pool genético. Como para el gen *nirS*, su mayor diversidad se encontró en el sitio 2, caracterizado por tener una alta concentración de oxígeno en el sedimento a diferencia de los otros dos sitios. Esto concuerda con la mayoría de los reportes en la literatura que en la NirS es más dominante que NirK en bacterias que colonizan ambientes aerobios. Es posible, entonces que las condiciones aerobias en la

rizósfera del sitio 2 favorecieran la colonización de las bacterias desnitrificantes que contengan NirS. Esto es importante hacer notar, como sabemos, el manglar de Balandra no ha sufrido grandes disturbios recientemente tanto natural o inducido por la mano del hombre y que las condiciones biogeoquímicas que prevalecen en la rizósfera pudieron haber existido por lo menos 10 años.

Estudios recientes revelan la asombrosa habilidad de las bacterias para responder a cambios ambientales, apagando o prendiendo genes a conveniencia. Moléculas señal de diferentes tipos, es el medio utilizado por las bacterias para regular estas respuestas. Las acilo homoserina lactonas, AHLs, utilizadas por bacterias Gram negativas, pueden activar la expresión de diversos procesos bacterianos, desde síntesis de antibióticos, hasta conjugación y movimiento en enjambre, entre otros.

Al analizar la producción de moléculas señal tipo AHLs en bacterias diazotróficas y desnitrificantes aisladas de raíces de mangle, encontramos que la mayoría produce AHLs, sintetizando varios tipos de éstas moléculas. Encontramos que la composición del medio de cultivo es determinante para la síntesis de AHLs y que el someter a las cepas a estrés nutricional puede llegar a incrementar la síntesis hasta 20 veces.

Interesantemente, al crecer juntas algunas de las cepas en medio sin glucosa, observamos interacciones sinérgicas en relación a la síntesis de AHLs. Por ejemplo, al crecer juntas la cepa diazotrófica *Paracoccus* sp. AG4BC con la desnitrificante *Arthrobacter* sp. 61K, o con la cepa diazotrófica *Pseudomonas* sp. LR6b, la concentración de AHLs en el cultivo se incrementa hasta 5 veces.

Fascinantemente, encontramos que la mayoría de los aislamientos presentan tanto el gen *nifH* y el gen *nirK* juntos en la misma célula. Los ensayos de reducción de acetileno y desnitrificación revelan que ambos de esos genes son funcionales.

ABSTRACT

Mangrove ecosystems play an important role as refuge, feeding and breeding areas for many organisms and sustain an extensive food web based on detritus. Additionally, mangroves export nutrients to adjacent marine ecosystems such as sea grass communities and coral reefs.

Mangroves of semi-arid areas are generally nitrogen deficient, but nonetheless, highly productive. This apparent paradox can be explained by the high biological nitrogen fixing activity that takes place in sediments, rhizosphere, decomposing leaves, aerial roots and bark, which can contribute from 40-60% of the total nitrogen required by the ecosystem. Denitrification in mangroves is important because it allows mineralization of organic matter under anaerobic or microaerophilic conditions, which prevail in a mangrove ecosystem. However, high denitrification rates could cause a significant loss of nitrogen from the ecosystem. Considering the importance for mangroves of both diazotrophic and denitrifying bacterial communities in regard to the availability of nitrogen, and the lack of information in the literature regarding the composition and diversity of such communities in mangrove ecosystems, we performed an analysis of the molecular diversity of nitrogen fixers and denitrifiers using T-RFLP of *nifH* (for nitrogen fixation) and of *nirS* and *nirK* (for denitrification). Results revealed that the diversity of nitrogen fixers was higher than for denitrifying bacteria in the three sampling sites. When comparing the diversity between the three sites, it was found that site 3, which had the highest concentration of organic matter and percentage of sand in the rhizosphere, as well as the lowest oxygen concentration, had also the highest *nifH* diversity. These conditions in the sediment surrounding the roots, fitting for nitrogen fixation, must have favored the competitiveness of diazotrophs over other

bacterial groups, allowing the proliferation of nitrogen fixers as well as the lateral transfer of *nif* genes to other bacterial groups, circumstances that can induce gene pool diversity. As for *nirS*, the highest diversity was found in site 2, characterized by having a higher concentration of oxygen in the sediments than the other two sites. According to most reports in the literature NirS is more dominant than NirK in bacteria that colonize aerobic environments. It is possible then that aerobic conditions in the rhizosphere of site 2 favored the colonization of denitrifying bacteria carrying NirS. It is important to note that, as far as we know, the mangrove of Balandra has suffered no major recent disturbances either natural or human-induced and that the biogeochemical conditions that prevail now in the rhizosphere could have existed for the last ten years.

Recent studies reveal the amazing ability of bacteria to respond to environmental changes, turning on and off genes on their convenience. Signal molecules of different types, is one way to regulate these responses. Acyl homoserine lactones (AHLs) used by Gram-negative bacteria, can activate the expression of various bacterial processes such as synthesis of antibiotics, conjugation, swarming, among others.

When analyzing the production of AHLs by diazotrophic and denitrifying bacteria isolated from mangrove roots, we found that most of them produce AHLs, and of different types. We found that the composition of the culture medium influences the synthesis of these molecules and that exposing the strains to nutritional stress can increase the synthesis of these molecules up to 20 times.

Interestingly, when growing together some of the strains in medium without glucose we observed synergic interactions between them in relation to AHL synthesis. For example, when growing together the diazotrophic bacterium *Paracoccus* sp. AG4BC with the denitrifying *Arthrobacter* sp. 61K, or with the nitrogen fixer

Pseudomonas sp. LR6b, the concentration of AHLs in the culture supernatant increased up to five times.

Fascinatingly, we found that most of the denitrifying isolates had both *nifH* and *nirK* genes together in the same cell. Acetylene reduction and denitrification assays revealed that both of these genes are functional.

DEDICATORIA

Con todo mi amor le dedico esta tesis:

A mi papa Isidro Flores Pedroza, mi mama Lidia Mireles Banda y a mi Hermano Josué Edgar Flores Mireles que son mis héroes y siempre han estado creyendo en mí y apoyándome incondicionalmente, mostrándome que no hay límites cuando uno quiere seguir sus sueños.

A mi familia entera: A mami Cuca por recibirme con los brazos abiertos. A mi papi Pablo que no tuve la oportunidad de decirte que te quiero mucho y despedirte de esta vida. A todos mis tíos y tías que de alguna manera siempre me han apoyado en los momentos de gloria como en la enfermedad.

A mi asesora, mi super amiga Gina Holguin que desde que la conocí no ha dejado de alentarme y apoyarme. A los mejores compañeros de laboratorio la Amiguis Nadia, Claudia, Manuel, Alfonso, Yossef y Patty que siempre han estado ahí para sacarme una sonrisa, sacarme de problemas y por su puesto su valiosa compañía.

A todos mis compañeros de maestría en especial a Tony y Maria por que siempre estuvieron en los momentos mas difíciles apoyándome incondicionalmente.

A Stephen Winans, Anatol Eberhard, Cathy White, David Kim, Jeronimo Bernar-Salas, Rhoan Morgan y Jose Carlos Huguett por su valiosa e infinita amistad y cariño, por ser como mi familia y haciéndome sentir como en casa en otro país.

Y a todas aquellas personas que me han brindando su cariño y comprensión en esta jornada y que han aportado con algo a mi persona y por haber formado parte de mi vida.

AGRADECIMIENTOS

Este trabajo no se hubiera podido lograr sin la ayuda de muchas personas que me asesoraron hasta el último momento

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología por el otorgamiento de la beca-crédito con registro 181882

A las autoridades del Programa de Posgrado del CIBNOR, por gestionar el apoyo necesario para este estudio. Dra. Thelma, Osvelia, Lety, Bety y Claudia por ayudarme en todo lo humanamente posible para que pudiera cumplir este objetivo.

A mis asesores de tesis: Dra. Gina Holguin por su apreciable dirección, al Dr. Yoav Bashan por su comprensión absoluta y sus valiosos comentarios, Dr. Stephen C. Winans por dedicarme su tiempo y abrirme las puertas de su laboratorio por casi un año, al M. en C. Gustavo de la Cruz Agüero por su apreciable asesoría en estadística. Es poco lo que puedo describir con palabras y agradecer su infinito apoyo, enseñanza, dirección, disposición y sobretodo la atención recibida por ellos.

Al Dr. Fernando García Carreño por que nunca perdió la confianza en mí, apoyándome incondicionalmente.

Al Grupo de Microbiología Ambiental por facilitarme las instalaciones y el equipo para desarrollarme en el tan hermoso mundo de la microbiología

A todo el Departamento de Microbiología en la Universidad de Cornell, por abrirme las puertas en especial al laboratorio del Dr. Stephen C. Winans: Dr. Anatol Eberhard por sus consejos asesoría, ayuda infinita, Cathy White por su disponibilidad y sus valiosos consejos y David Kim por facilitarme todo lo necesario para realizar mi trabajo, Yuping Wei, Yunrong Chai, Ching-Sung Tsai y Hongbaek Cho. A la Dra. Esther Anger y Julie Frey por su disponibilidad y su asesoría en la técnica de T-RFLP. Al Dr. James Shapleigh por su asesoría en desnitrificación y facilitación de muestras de DNA. Al Dr. Jonh Helmann por prestarme el equipo necesario para desarrollar mi tesis. A la secretaria Shirley Cramer que me apoyo en lo que me nos me gusta, hacer papeleo y documentación, facilitándome la vida.

A todos mis compañeros de Microbiología Ambiental, en especial a la banda pesada del JB2 y a Blanca Romero por todo el tiempo y asesoría que me brindaste. A Ángel Carrillo por enseñarme como trabajar en el laboratorio y por alentarme, por las innumerable buenas platicas que hemos tenidos y su valiosa amistad.

Al personal de los laboratorios de Edafología, Análisis de aguas, Espectrometría y Cromatografía por su ayuda en el procesamiento de las muestras de suelo y agua.

A las personas que laboran en la biblioteca que fue como un tercer hogar después del laboratorio, en especial a Tony por brindarme una sonrisa y toda su buena vibra todos los días.

En general a las personas que me han atendido durante mi estancia en el CIBNOR pero que de momento escapan de mi memoria.

CONTENIDO

CAPITULO	TEMA	Página
I.	INTRODUCCIÓN.....	1
II.	ANTECEDENTES.....	9
III.	JUSTIFICACIÓN.....	12
IV.	OBJETIVOS.....	13
	4.1 Objetivo General.....	13
	4.2 Objetivos Específicos.....	13
V.	HIPÓTESIS.....	14
VI.	ÁREA DE ESTUDIO.....	15
VII.	MATERIALES Y MÉTODOS.....	17
	7.1 Ordenación de los parámetros biogeoquímicos	17
	7.2 Método de Biología Molecular.....	17
	7.2.1 Aislamiento de DNA de rizósfera.....	17
	7.2.2 Diseño de Primers.....	19
	7.2.3 Amplificación de los genes <i>nirK</i> , <i>nirS</i> y <i>nifH</i>	19
	7.2.4 Clonación y Secuenciación.....	21
	7.2.5 Selección de las endonucleasas de restricción.....	22
	7.2.6 Análisis de T-RFLP.....	23
	7.3 Análisis Numéricos.....	24
	7.3.1 Atributos ecológicos de las comunidades.....	24
	7.3.2 Riqueza de especies.....	24
	7.3.3 Índice de Diversidad de Shannon-Wiener.....	25
	7.3.4 Índice de Dominancia de Simpson.....	25
	7.4 Disimilitud en la estructura de las comunidades bacterianas.....	25
	7.4.1 Coeficiente de Similitud Bray-Curtis.....	25
	7.4.2 Escalamiento No métrico Multi Dimensional (MDS)....	26
	7.4.3 Análisis de Similitud.....	27

7.4.4	Porcentaje de Similitud.....	28
7.4.5	Índice de Dispersión.....	28
7.5	Aislamiento de bacterias desnitrificantes y fijadoras de N ₂	28
7.5.1	Aislamiento de bacterias de fijadoras de N ₂	29
7.5.2	Aislamiento de bacterias desnitrificantes.....	29
7.6	Evaluación, cuantificación y caracterización de AHL.....	31
7.6.1	Evaluar la producción de AHL por las cepas aisladas.....	31
7.6.2	Prueba presuntiva de producción de AHL.....	32
7.6.3	Cuantificación de AHL.....	32
7.6.4	Aislamiento de AHLs.....	34
VIII.	RESULTADOS.....	36
8.1	Características del área de estudio.....	36
8.2	Presencia de las comunidades Fijadoras de N ₂ y desnitrificantes.....	40
8.2.1	Amplificación de un fragmento del gen <i>nifH</i>	40
8.2.2	Amplificación de un fragmento de los genes <i>nir</i>	40
8.3	Diversidad molecular de las comunidades fijadoras y desnitrificantes..	42
8.3.1	Riqueza de los genes <i>nifH</i> , <i>nirK</i> y <i>nirS</i>	42
8.3.2	Índices Ecológicos.....	43
8.4	Estructura de las Comunidades a través de T-RFLP.....	47
8.4.1	Distribución y agrupamiento de las comunidades	47
8.4.2	Análisis de Similitud.....	51
8.4.3	Porcentaje de Similitud de los OTU's (SIMPER).....	52
8.4.4	Índice de Dispersión.....	53
8.5	Análisis de las secuencias.....	55
8.5.1	Árbol filogenético de las secuencias de <i>nifH</i>	55
8.5.2	Árbol filogenético de las secuencias de <i>nirK</i>	59
8.5.3	Árbol filogenético de las secuencias de <i>nirS</i>	62
8.6	Amplificación de los genes <i>nifH</i> , <i>nirK</i> y <i>nirS</i> de las cepas.....	64
8.7	Evaluar la producción de AHL por las cepas aisladas.....	68

8.7.1	Determinación del medio de cultivo.....	71
8.7.2	Cultivos mixtos.....	71
8.7.3	Caracterización de AHLs.....	72
8.8	Caracterización de AHLs.....	79
IX.	DISCUSIÓN.....	83
9.1	Parámetros ambientales.....	84
9.2	Diversidad molecular de las comunidades.....	89
9.2.1	Diversidad de las bacterias fijadoras de nitrógeno.....	91
9.2.2	Diversidad de las bacterias desnitrificantes.....	94
9.3	Árboles Filogenéticos.....	100
9.3.1	Secuencias de las comunidades fijadoras de nitrógeno.....	100
9.3.2	Secuencias de las comunidades desnitrificantes.....	103
9.4	Cepas aisladas del manglar.....	105
9.5	Evaluación de la Producción de AHL.....	107
9.6	Interacciones de las bacterias a través de la molécula AHL.....	109
X.	CONCLUSIONES.....	115
XI.	LITERATURA CITADA.....	116

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla	Título	Página
I	Características biogeoquímicas del sedimento del Manglar de Balandra.....	36
II	Ordenación de los parámetros biogeoquímicos ACP.....	37
III	Importancia de las variables en el ACP.....	38
IV	Amplificaciones de los genes <i>nifH</i> , <i>nirK</i> y <i>nirS</i> de las cepas aisladas.....	66
V	Riqueza de T-RFs de <i>nifH</i> , <i>nirK</i> y <i>nirS</i> con diferentes enzimas de restricción.....	43
VI	Diversidad genética de los genes <i>nifH</i> , <i>nirK</i> y <i>nirS</i>	44
VII	Análisis de similitud de los sitios de estudios.....	52

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura	Título	Páginas
1	Localización de la Bahía de Balandra.....	16
2	Ordenación de los sitios conforme a los parámetros biogeoquímicos.....	39
3	Amplificación del gen <i>nifH</i> de muestras de ADN ambiental.....	40
4	Amplificación del gen <i>nirK</i> de muestras de ADN ambiental	41
5	Amplificación del gen <i>nirS</i> de muestras de ADN ambiental.....	41
6	Amplificación del gen <i>nifH</i> de cepas aisladas.....	64
7	Amplificación del gen <i>nirK</i> de cepas aisladas.....	65
8	Amplificación del gen <i>nirS</i> de cepas aisladas.....	65
9	Electrogramas de los T-RF de los tres genes.....	46
10	MDS basado en presencia/ausencia de los T-RF.....	49
11	MDS basado en abundancias relativas de los T-RF.....	49
12	Análisis de Grupos basados en presencia/ausencia de los T-RF.....	50
13	Análisis de Grupos basados en las abundancias relativas de los T-RF.....	58
14	Árbol filogenético del gen <i>nifH</i>	55
15	Árbol filogenético del gen <i>nirK</i>	61
16	Árbol filogenético del gen <i>nirS</i>	63
17	Cuantificación de producción de AHL por las cepas aisladas.....	70
18 A.	Cuantificación de AHL en cultivos mixtos con extracto de levadura.....	73
18 B.	Cuantificación de AHL en cultivos mixtos con extracto de levadura.....	74
19 A.	Cuantificación de AHL en cultivos mixtos sin extracto de levadura.....	77
19 B.	Cuantificación de AHL en cultivos mixtos sin extracto de levadura.....	78
20	Caracterización de las moléculas C4-HSL.....	80
21	Caracterización de las moléculas C6-HSL.....	81
22	Caracterización de las moléculas C8-HSL.....	82

I. INTRODUCCIÓN

El ecosistema de manglar es la vegetación arbórea que se localiza en la zona de mareas en lo que corresponde al ecotono entre el ambiente marino y el terrestre de las regiones tropicales y subtropicales. Los manglares están formados por 12 familias que comprenden 70 especies. Es la vegetación dominante que circunda muchas lagunas costeras y estuarios; se estima que un 60% a un 75% de las costas de regiones tropicales están bordeadas de manglares. México cuenta con aproximadamente 660,000 m² (Lacerda *et al.*, 1993). En México existen 4 especies de mangles: *Rizophora mangle*, *Laguncularia racemosa*, *Avicennia germinans* y *Conocarpus erectus* (Flores-Verdugo, 1989).

Los mangles se caracterizan por estar adaptados a hábitats salinos, de sedimentos ricos en materia orgánica y por lo tanto en condiciones reductoras, sujetos a inundaciones periódicas por mareas (Flores-Verdugo, 1993). Los manglares desde el punto de vista funcional son sistemas abiertos, es decir, dentro de su estructura como ecosistemas, forman parte importante los intercambios de materia y energía con otros ecosistemas que lo circundan, como son los ambientes terrestres, el mar, la atmósfera y el sedimento (Odum *et al.*, 1982).

Estos ecosistemas juegan un importante papel como zonas de crianza, refugio y alimentación para numerosos organismos y sostienen una cadena alimenticia muy extensa basada en el detritus, rico en contenido calórico, proteico y carga microbiana, y producido por la descomposición de hojas de mangle. Los organismos que se alimentan

del detritus incluyen crustáceos, moluscos, larvas de insectos, nemátodos, poliquetos y algunas especies de peces (Odum y Heald, 1975).

Además de su importancia como sostén de extensas cadenas tróficas, los manglares juegan un papel significativo en la estabilización costera al presentar acumulación del sedimento y fijación del fango, que ayuda a disipar la energía de los vientos, las olas y la marea (Bandaranayenke, 1998; Flores-Verdugo, 1989).

En Baja California Sur, los manglares se caracterizan por ser árboles pequeños a diferencia de otros manglares del mundo (Holguin *et al.*, 1999). La distribución de los manglares es en parches, limitada principalmente al extremo sureste de la península y consisten predominantemente de una franja ancha de *R. Mangle*, de 3 a 5 m de ancho (Flores-Verdugo *et al.*, 1993). Su tamaño pequeño se debe a que crecen en agua netamente marina y tienen un gasto fuerte de energía en la regulación de las sales; por otra parte el estar ubicados en áreas semidesérticas de escasa lluvia impide el aporte de nutrientes vía terrestre.

A pesar de la escasez de nitrógeno y fósforo en las aguas del manglar (Holguin *et al.* 1992; Vazquez *et al.* 1996), los manglares se observan sanos y frondosos, no mostrando alguna deficiencia nutricional (Holguin *et al.*, 1999).

El nitrógeno es un constituyente básico, que se encuentra en varios estados de oxidación. Dos de los principales procesos de la transformación microbiana del nitrógeno son: fijación de nitrógeno y desnitrificación (Madigan, *et al.* 2000).

La fijación de nitrógeno biológico es un proceso importante ya que contribuye al reciclaje del nitrógeno incorporándolo en materia viva, la cual tiene importancia no solo agrícola sino en el funcionamiento total de la biosfera (Madigan *et al*, 2001). La fijación de nitrógeno aparentemente es una habilidad ampliamente distribuida entre los microorganismos. Estos organismos son denominados diazotróficas.

Todas las bacterias diazotróficas utilizan la misma maquinaria básica bioquímica para la fijación de nitrógeno, el cual es llevado a cabo por un sistema de enzimas nitrogenasa (Glick *et al*, 1999). La nitrogenasa es la enzima que cataliza la reducción del dinitrógeno a amonio, esta compuesta por dos proteínas altamente conservadas: la enzima con hierro (Fe) (codificada por el gen *nifH*) y la enzima con molibdeno y hierro (MoFe) (codificada por los genes *nifDK*) (Young *et al*. 1992). El gen *nifH* presenta la secuencia de aminoácidos evolutivamente conservada, por lo que este gen ha sido explotado en el diseño de primers para PCR para detectar el potencial genético de la fijación de nitrógeno en ambientes marinos (Zerh *et al*. 1996).

La desnitrificación constituye uno de los principales pasos del ciclo del nitrógeno global sostenido por bacterias (Zumft, 1997), controla el N y el balance entre las formas de nitrógeno (Ghiglione *et al*, 2000). Es un proceso respiratorio netamente microbiano donde el nitrato es reducido a nitritos, óxido de nitrógeno (NO y N₂O), y por último dinitrógeno (N₂) el cual se libera a la atmósfera.

Existen dos formas de reducción del nitrato 1) la reducción asimilatoria y 2) la reducción asimilatoria. En la ruta de reducción asimilatoria del nitrato, el nitrato se reduce al nivel de oxidación del amoníaco para su uso como fuente de nitrógeno en el

crecimiento (Lenhinger, 1989). Mientras que en la reducción desasimilatoria del nitrato, el nitrato se usa como un aceptor de electrones alternativos en generación de energía. Este último proceso es el modo principal por el que se forma N_2 gaseoso biológicamente, y como este gas, a pesar de que es muy abundante en la atmósfera, no puede ser asimilado por muchos organismos debido a su forma inorgánica. Cuando el nitrógeno está en su forma más oxidada nitrato sirve como fuente de nitrógeno (Madigan *et al.*, 2001).

La desnitrificación es importante porque permite la mineralización de la materia orgánica (Song y Ward, 2003) y el reciclaje de los nutrientes en ambientes anaerobios o microaerófilos tales como sedimentos marinos, ecosistemas de manglar, y marismas (Rivera-Monroy y Twilley, 1996; Priemé *et al.* 2002), donde el oxígeno no está disponible como aceptor final de electrones (Wolsing y Priemé, 2004).

Las vías de reducción del nitrato juegan un rol clave en el ciclo del nitrógeno en el ambiente, así como sus implicaciones de salud pública (Conrado *et al.*, 1999; Zumft, 1997; Lenhinger, 1989). Esto último se demuestra debido a que el nitrato en grandes concentraciones se convierte en un contaminante en mantos y reservorios de agua, causando problemas en el suministro de agua (Zumft, 1997). Cuando la desnitrificación se ve interrumpida se producen los gases N_2O y NO , los cuales son liberados a la atmósfera, donde están involucrados en reacciones químicas las cuales resultan en la degradación del ozono (Knowles, 1982; Conrado *et al.* 1999).

La reducción de nitrito a óxido nítrico a través de la nitrito reductasa es el primer paso que distingue a los microorganismos desnitrificantes netos (Priemé *et al.*

2002). Dado así que esta enzima sea clave en el proceso de desnitrificación. Por lo que, los genes de la nitrito reductasa *nirK* y *nirS* se utilizan como marcadores funcionales, los cuales codifican para la nitrito reductasa con cobre y con citocromo cd_1 sucesivamente (Zumft, 1997; Priemé *et al.* 2002; Castro-González *et al.* 2005).

Se sabe que un exceso de bacterias desnitrificantes en los suelos sería indeseable porque eliminaría el nitrato que es una fuente de alimentación necesaria en plantas. Sin embargo, un suelo sano microbiológicamente hablando, con una riqueza y alta diversidad microbiana, contendrá bacterias fijadoras de nitrógeno las cuales devolverán al sistema el nitrógeno liberado por el proceso de desnitrificación (Zumft, 1997).

Por lo que, se especula que la comunidad microbiana de bacterias desnitrificantes y fijadoras de nitrógeno asociadas a la rizósfera del mangle y a sedimentos interactúan conjuntamente para reciclar el nitrógeno de una manera muy eficiente manteniéndolo dentro del ecosistema, sin resultar en pérdidas significativas de nitrógeno.

La diversidad de las comunidades diazotróficas y desnitrificantes en las raíces del manglar proporcionaría información del funcionamiento de un ecosistema. La técnica de huella digital T-RFLP (Terminal restriction fragment length polymorphism), se ha utilizado para dilucidar la diversidad de las comunidades bacterianas. La cual consiste en la amplificación de los genes de interés a través del uso de un marcador que se encuentra inmovilizado en el extremo 5' del primer. El producto amplificado es cortado con enzimas de restricción. Estos fragmentos son denominados T-RF (Fragmento terminal de restricción) o OTU (Unidad Operacional Taxonómica). Cada

uno de los T-RFs o OTUs son separados por electroforesis y visualizados por excitación en un fluorómetro. La información que incluye cada T-RF demuestra el tamaño en pares de bases y la intensidad de fluorescencia (longitud del pico) (Osborn *et al.* 2000; Blackwood *et al.* 2003).

La técnica de T-RFLP permite la detección tanto de la heterogeneidad espacial y los cambios en el tiempo de la composición de las comunidades bacterianas (Lukow *et al.* 2000). Esta técnica permite que se puedan comparar los patrones de las huellas digitales de una comunidad, debido a que automáticamente se puede cuantificar tanto con los tamaños (pares de bases) como la abundancia relativa (longitud del pico) de cada T-RF. A su vez comparar las similitudes con otras comunidades bacterianas. Esta técnica es fácil de manejar, reproducible y muy sensible (Dunbar *et al.* 2001). Por lo que, comparándose con otras técnicas como DGGE y TGGE, esta representa una herramienta superior para el biomonitoreo de las comunidades microbianas (Lukow *et al.* 2000).

Recientemente, se ha observado que las bacterias no solo actúan como individuos independientes celulares sino que también pueden coordinar actividades y comportamiento en conjunto como un organismo multicelular (Steindl *et al.*, 2001). Para que esta coordinación se lleve a cabo, se ha observado que existe un sistema de comunicación química sofisticado entre las células bacterianas, el cual interviene en varias funciones dentro de la comunidad (Steindl *et al.*, 2001). Esta comunicación es llevada a cabo por difusión de pequeñas moléculas, en un proceso conocido como "Quorum sensing", ya que para que se pueda llevar la respuesta en este proceso, tiene

que existir un quorum mínimo en la comunidad (Dunny y Winams, 1999; Elasri *et al*, 1999; Fray *et al*, 1999; Steindl *et al*, 2001).

Quorum sensing es un ejemplo de comportamiento multicelular en procariotes y regula diversos procesos fisiológicos en respuesta a la densidad poblacional incluyendo bioluminiscencia, salida en enjambre, biosíntesis de antibióticos, transferencia conjugal de plásmidos, y producción de factores de virulencia en animales, peces y plantas (Dunny y Winams, 1999; Fray *et al*, 1999). En bacterias Gram negativas la comunicación celular es mediada por moléculas señal denominadas *N*-acilo-L-homoserina lactonas (AHL's) (Dunny y Winams, 1999; Elasri *et al*, 1999; Fray *et al*, 1999; Steindl *et al*, 2001).

A las raíces de las plantas se asocian bacterias Gram negativas, las cuales establecen con las plantas un tipo de interacción mutualista en la cual tanto las bacterias como las plantas se benefician; esta asociación es inducida debido a la presencia de exudados radiculares tales como azúcares, aminoácidos, hormonas y vitaminas que son utilizados por las bacterias para su metabolismo y crecimiento (Madigan *et al*, 2001; Glick *et al*, 1999). A su vez, las bacterias, denominadas BPCV o bacterias promotoras del crecimiento vegetal, promueven el crecimiento de las plantas. Esto lo pueden hacer de forma indirecta, inhibiendo el desarrollo de patógenos a través de la producción de antibióticos, inducción a sistemas de resistencia, síntesis de metabolitos anti-hongos, competencia por espacio en la raíz.; o de forma directa, a través de la solubilización de fósforo, fijación de nitrógeno, captación de hierro por sideroforos, producción de fitohormonas, y disminución de la concentración de etileno en la planta (Glick *et al*, 1999).

Sin embargo, en la comunidad bacteriana, las poblaciones no viven aisladas sino en sistemas que interactúan entre sí a través del ambiente. Se ha observado a través del sistema de quórum sensing, diversas bacterias pueden comunicarse; y regular o reprimir de forma directa o indirecta algunos procesos fisiológicos. Algunas poblaciones utilizan las AHLs como alimento interfiriendo la comunicación con otras poblaciones (Flagan *et al.* 2003), en otros casos esta comunicación es utilizada para competir por los recursos, así como espacio, nutrientes entre otros (Ladbetter y Greenberg, 2000). La estructura y funcionamiento de las comunidades bacterianas resulta de las interacciones que se efectúan entre las poblaciones pueden ser benéficas, negativas o neutrales (Krebs, 2000).

II. ANTECEDENTES

En ecosistemas de manglar se han detectado bacterias fijadoras de nitrógeno asociadas a la rizosfera del mangle (Holguin *et al.* 2001), a sedimentos (Zuberer y Silver, 1975) y a pneumatóforos (Toledo, 1995) por lo que se considera que la fijación de nitrógeno aporta a los manglares la mayor parte del nitrógeno necesario para el desarrollo y sostenimiento del ecosistema (Holguin *et al.* 2001).

Sin embargo, solo se cuenta con un reporte de las tasas de desnitrificación en manglares, en el cual Rivera-Monroy y Twilley (1996) observaron que en ecosistemas de manglar contaminados, las tasas de desnitrificación era mayor a diferencia de las tasas de desnitrificación en manglares no perturbados.

En ecosistemas de manglar han sido aisladas bacterias diazotróficas de los generos *Azospirillum*, *Azotobacter*, *Rhizobium*, *Clostridium* y *Klebsiella* de sedimentos, rizósfera, y de la superficie de las raíces de varias especies de mangle de la India (Sengupta y Chaudhuri, 1991). Por otra parte, algunas bacterias diazotróficas se han aislado de la rizósfera de las especies de mangle *Rhizophora mangle*, *Avicennia germinans* y *Laguncularia racemosa* en México (Holguin *et al.* 1992). Algunas de esas cepas son *Vibrio campelli*, *Listonella anguillarum*, *V. aestuarianus*, y *Phyllobacterium sp.* (Holguin y Bashan, 1996; Rojas *et al.* 2001; Holguin *et al.* 2005 no publicado). Sin embargo hasta el momento no se ha reportado ninguna bacteria desnitrificantes en manglar.

Conforme a la diversidad de bacterias diazotróficas (*nifH*) y desnitrificantes (*nirK*, *nirS*), no se tiene ningún reporte de haber sido caracterizadas a nivel molecular en ecosistemas de manglar. Para la comunidad diazotrófica se han realizado estudios moleculares en estuarios (Nogales *et al.* 2002), lagos hipersalinos (Short *et al.* 2004), columna de agua (Zehr *et al.* 1998), sedimentos (Windmer *et al.* 1999; Poly *et al.* 2001; Yeager *et al.* 2004), pastos marinos (Welsh, 2000; Hamelin *et al.* 2002), termitas de intestino (Ohkuma *et al.* 1999) y mantos microbianos, crustáceos planctónicos (Zehr *et al.* 2003; Raymond, 2004).

Por otra parte, se han estudiado ambos genes desnitrificantes en plantas de tratamiento de agua (Yoshie *et al.* 2004); en suelos agrícolas (Thróback *et al.* 2004), en suelos agrícolas enriquecidos con fertilizantes artificiales y estiércol de ganado (Wolsing y Priemé, 2004), en suelos y aguas subterráneas contaminadas con nitratos y uranio (Yan *et al.* 2003); reactores con tratamientos de aguas residuales con diferentes concentraciones de oxígeno (Cole *et al.* 2004), en sedimentos de humedales (Priemé *et al.* 2002), en rizósfera de pastos marinos (Wang y Skipper, 2004); y en sedimentos marinos costeros con deficiencia de oxígeno (Liu *et al.* 2003)

La comunidad desnitrificante *nirS* se han reportado estudios en sedimentos marinos en noroeste del pacífico (Braker *et al.* 2001), en la zona con mínimo oxígeno de la columna de agua en el sureste del Océano Pacífico (Castro-González *et al.* 2005). Mientras que Avrahami y colaboradores (2002) describieron la diversidad de bacterias desnitrificantes con *nirK* en suelos con alto contenido de amonio.

Son pocos los estudios en los cuales se involucran las comunidades diazotróficas y las desnitrificantes. Mergel y colaboradores (2001) midieron la abundancia relativa de estos dos grupos bacterianos en diferentes capas del suelo del bosque. Por otra parte, Rösch y colaboradores (2002) estudiaron la biodiversidad de estos grupos en suelos de bosques ácidos.

Se ha reportado que algunas especies de bacterias que se encuentran asociadas a raíces de plantas hacen uso del sistema quórum sensing. El sistema de Quórum sensing basado en AHLs ha sido identificado en algunas BPCV (Steindl *et al*, 2001). La red del sistema de quórum sensing en *Rhizobium leguminosarum* está implicada en el control de varias funciones, como la adaptación a la fase estacionaria, la capacidad de la célula para formar nódulos en plantas de chícharo, y está involucrada en la transferencia conjugal del plásmido pRL1JI (Steindl *et al*, 2001). Otro ejemplo es *Pseudomonas aureofaciens* la cual produce fenazina, que es un antibiótico utilizado como agente de control biológico para proteger plantas de trigo contra toda enfermedad causada por el hongo *Gaeumannomyces graminis* var. *tritici* (Elasri *et al*, 2001; Wood *et al*, 1997).

Ejemplo de la comunicación entre diferentes especies o géneros (Juhás *et al*. 2005), es el comportamiento de *Pseudomonas aeruginosa* y la bacteria gram negativa *Burkholderia cepacia*, las cuales tienen el mismo nicho ambiental e incluso forman biopelículas mixtas en los pulmones de pacientes con fibrosis quística (Riedel *et al*. 2001). Se ha reportado que la bacteria gram positiva *Bacillus sp.* 240B1 produce la enzima AiiA que hidroliza la AHL interfiriendo en la comunicación *Erwinia carotovora* (Dong *et al*. 2002). Se ha encontrado que posiblemente, la fijación de nitrógeno (Daniels *et al*. 2002) y la desnitrificación (Wagner *et al*. 2003).

III. JUSTIFICACIÓN

A pesar de su gran importancia ecológica y económica, los manglares se encuentran bajo intensa presión debido a las actividades humanas. La pérdida directa de hábitat de manglares se debe principalmente a su conversión a zonas urbanas e industriales (Bandaranayenke, 1998); la destrucción para el cultivo de peces y mariscos; y la conversión a salitrales (Flores-Verdugo, 1989). Además, la contaminación con desperdicios humanos es un problema.

Conforme a lo anterior y debido a la importancia que tiene el nitrógeno en los ecosistemas de manglar, es importante conocer la estructura y funcionamiento del tipo de interacción que existe entre las bacterias fijadoras de nitrógeno y desnitrificantes de los ecosistemas de manglar, ya que forman parte de los dos principales procesos del ciclo del nitrógeno.

IV. OBJETIVOS

4.1 OBJETIVO GENERAL

Estudiar la diversidad molecular de las comunidades de bacterias fijadoras de N₂ y desnitrificantes asociadas a la rizósfera de *Avicennia germinans* así como su capacidad para sintetizar moléculas señal tipo acilo homoserina lactonas.

4.2 OBJETIVOS ESPECIFICOS

1.- Determinar la presencia de bacterias fijadoras de N₂ y desnitrificantes en la rizósfera del mangle por medio de técnicas moleculares (amplificación por PCR, polymerase chain reaction, de genes específicos para fijación de N₂ (*nifH*) y desnitrificación (*nirS* y *nirK*), y de técnicas tradicionales de aislamiento.

2.- Caracterizar la comunidad de bacterias fijadoras de N₂ y desnitrificantes asociadas a raíces de mangle, a través de T-RFLPs (terminal restriction fragment length polymorphisms).

3.- Aislamiento de cepas fijadoras de nitrógeno y desnitrificantes a partir de raíces del mangle negro y evaluación de la capacidad de las cepas para producir moléculas señal tipo acilo-homoserina lactonas.

4.- Caracterizar las moléculas acilo homoserina lactonas producidas por las bacterias fijadoras de N₂ y desnitrificantes.

V. HIPÓTESIS

Las comunidades de bacterias diazotróficas y desnitrificantes coexisten en la rizosfera del mangle. Debido a que en los manglares semiáridos hay condiciones limitantes de nitrógeno, se espera que la comunidad de bacterias diazotróficas presente mayor diversidad que la de desnitrificantes.

Dado que se ha reportado que muchos grupos bacterianos asociados a rizosfera producen AHLs suponemos que las bacterias diazotróficas y desnitrificantes en raíces de mangle producen estas moléculas.

VI. ÁREA DE ESTUDIO

El área de Balandra (Fig. 1), está situado al norte de la Ciudad de La Paz, en los 24° 19' 15" latitud norte y 110° 10' 45" longitud oeste. Esta área esta caracterizada por presentar un clima seco con una temperatura media anual de 29 °C (Holguin, 1992). La precipitación pluvial anual es de 177 mm (Anónimo, 1979). La evaporación es sumamente alta con un valor anual de 2113.3 mm (Holguin, 1992).

Ha sido clasificada como un sistema Caleta-Laguna. La caleta tiene un ancho de 720, y una longitud de 1150 m, la profundidad varía de los 25 m en la entrada hasta 0.5m. En la parte sur existe un área rocosa en la parte suroeste de la entrada, la cual queda expuesta durante marea baja. Al suroeste de la caleta se localiza una depresión de 6 m, la cual durante la marea alta está conectada con la Bahía de La Paz por medio de un canal de mareas con orientación oeste-noroeste. En la parte interna de la caleta se encuentra un cuerpo lagunar que tiene un eje mayor de 990m de longitud con un ancho promedio de 324m, una boca de 180 m de ancho y un canal de flujo y reflujos con una profundidad media de 1.10 m. La barrera tiene una dirección norte-sur orientada con la dirección de la corriente de la Bahía de La Paz (Vazquez, 1996).

La vegetación de esta zona esta compuesta por árboles de manglar y vegetación halófila. El ecosistema de manglar esta representado por tres especies *Rhizophora mangle* L., *Avicennia germinans* (L.)L., *Laguncularia racemosa* (L.) Gaertn. *Salicornia sp.* fue el genero que represento a la vegetación halófila (Pedrín-Avilés *et al.* 1992)

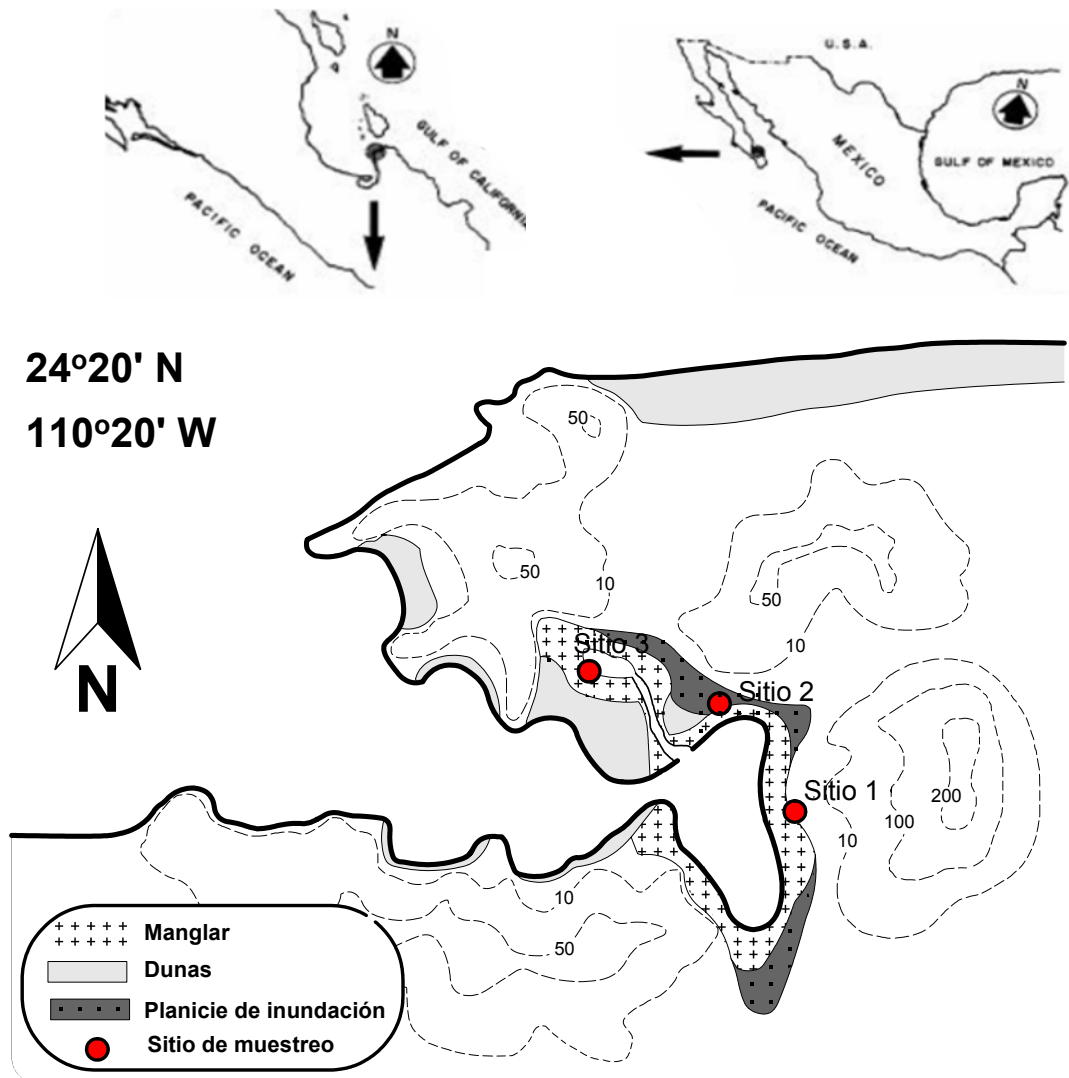


Fig. 1. Localización de la Bahía de Balandra.

VII. MATERIAL Y MÉTODOS

7.1. Ordenación de los parámetros biogeoquímicos

Los parámetros biogeoquímicos del sedimento se analizaron mediante el Análisis de Componentes Principales (ACP). Para este análisis se utilizaron dos paquetes estadísticos multivariados: Primer V5 (Primer-E Ltd, Plymouth, UK) y la graficación de los valores obtenidos se realizó con MVSP (Multi-Variate Statistical Package versión 3.13m)

7.2 Métodos de Biología Molecular

7.2.1 Aislamiento de DNA de rizósfera

Se tomaron muestras de 3 árboles de mangles (1, 2 y 3) de la especie *Avicennia germinans*, situados en diferentes áreas del manglar de Balandra, B.C.S. Se tomó el árbol entero y se limpió cuidadosamente quitando el sedimento y se separaron las raíces de la planta, se lavaron con agua de mar estéril y se cortaron en pedazos pequeños aprox. 2 cm, se molieron en mortero con solución buffer de fosfatos, 0.39M, pH 7.6, y se centrifugaron por 2 minutos a 500 X G. Después se tomó el botón celular y se volvió a moler con la misma solución buffer. Este paso se realizó por triplicado. Se juntaron los tres sobrenadantes y se centrifugó a 10, 000 X G por 30 min y se colectó el botón celular y se almacenó a -70 °C (Smalla *et al.* 1995).

Posteriormente se realizó la extracción de DNA, siguiendo el protocolo de Schwieger y colaboradores (1998). Se resuspendió el botón celular obtenido con el protocolo anterior en 5 ml de buffer para lisis (0.05 M NaCl; 0.01 M Na₂EDTA, 0.05 M Tris-HCl ([pH 8.0], 1% Sodio dodecil sulfato. Se colocaron las suspensiones en tubos de centrifuga Falcón de 50 ml y se realizaron 5 ciclos de congelamiento y calentamiento; cada ciclo consistió de 5 min de congelamiento en ultracongelador a -70°C, 5 min de calentamiento en baño maria a 65°C con agitación leve y se vortexeó fuertemente por 10 segundos. Se adicionó a los tubos proteínasa K a una concentración final de 0.28mg/ml y se incubaron a 65°C por una hora en baño maria con agitación a 150 rpm. Se colocaron las muestras en hielo, se mezclaron con 2 volúmenes de fenol-cloroformo-alcohol isoamílico y se centrifugaron por 10 minutos a 4°C y 9000 rpm. La fase acuosa se transfirió a otro tubo, se mezcló con un volumen de fenol-cloroformo-alcohol isoamílico y se centrifugó de nuevo, recuperándose la fase superior y se transfirió a tubos eppendorf en alícuotas de 1.5 ml. El DNA se precipitó con 0.7 vol de isopropanol a -20°C por todo una noche. El precipitado se colectó por centrifugación a 24, 000 X G por 15 min a 4 °C. Se recuperó el botón con etanol al 70%, se dejó secar y se resuspendió en buffer TE (10 mM Tris, 1 mM Na₂EDTA, pH 8.0).

Sin embargo, el ADN extraído presentaba un color amarillento por la presencia de ácidos húmicos y compuestos fenólicos. Dado esto no se pudieron amplificar por lo que se buscaron diferentes protocolos para limpiar las muestras sin perder el DNA. El primer protocolo que se siguió fue utilizando columnas de Polivinilpolipirrolidona (PVPP) (Berthelet *et al.*1996; Burlage *et al.* 1998), no obstante, este método no fue eficiente para purificar las muestras debido a que no se pudo recobrar el DNA.

Posteriormente, se trataron las muestras con el kit PowerSoils DNA Isolation (MO BIO laboratorios, INC.) recobrándose el DNA limpio y listo para amplificar.

7.2.2 Diseño de Primers

Se diseñaron primers para las comunidades bacterias desnitrificantes, enfocándose en los genes *nirS* y *nirK*. Para el diseño los primers del gen *nirS* se tomaron las secuencias publicadas de bacterias desnitrificantes como *Paracoccus denitrificans* (PDU75413), *Alcaligenes eutrophus* (AENDANRIS), *Pseudomona stutzeri* (PSNIRSTB), *Azoarcus toluolyticus* (AY078272), *P. aeruginosa* (AE004488), *P. fluorescens* (AF114792), *Acidovorax sp.* (AY078273), *Thauera selenatis* (AY078264), *Thauera chlorobenzoica* (AY078263), γ - *Proteobacterium* (GPR248400) esperándose un fragmento de 608 pb. Mientras que para el gen *nirK* de aproximadamente 472 bp, se trabajo sobre secuencias publicadas de *Bradyrhizobium japonicum* (AP005961), *Rhizobium hedysari* (RHU65658), *Rhodobacter sphaeroides* (RSU62291), *Pseudomona aureofaciens* (PANIRKA), *Alcaligenes sp.* (AB046603), *Hypomicrobium denitrificans* (AB076606), *Alcaligenes xylosoxidans* (AF051831).

Sin embargo, para el diseño los primers del gen *nifH* se basó en las secuencias de *Bradyrhizobium sp.* (NC_00463), *Rhizobium sp* (RHPNIFH), *Methansarana mazci* (AY029234), *Azospirillum brasilense* (AZSFETEMO), *Synechococcus sp.* (SSU22146), *Nostoc sp.* (ANANIFBH), esperando un fragmento de 615 pb.

7.2.3 Amplificación de los genes *nirK*, *nirS* y *nifH*

El fragmento del gen *nirS* fue amplificado usando el par de primers forward 5'-ACA ACG TCG ACT TCC ACG CC-3', y reverse 5' GCC GAC CGT GCC GTT GAA GA-3', mientras que para el gen *nirK*, se utilizó el primer forward 5'-TGA ACG TCA AGG AAA CCG GCC A-3' y el reverse 5'- AGC TTC AGG GTC TTG TCG TCG-3'.. El PCR fue realizado en un termociclador Mastercycle gradient (Eppendorf

AG, Hamburgo, Alemania). Las condiciones de PCR para los genes *nirK* y *nirS* fueron: una temperatura inicial de 94°C por 2 min, seguido por 35 ciclos de 45'' a 94 °C, 45'' a 65 °C y 1 min a 72 °C. La reacción se completó con un ciclo a 72 °C por 20 min. Para el gen *nifH* se utilizó el primer forward 5'-TCT ACG GAA AGG GCG GTA TCG G-3', y el reverse 5'- GGC ACG AAG TGG ATCAGC TG-3' .Las condiciones de amplificación fueron: una temperatura inicial de 94 °C por 2 min, seguido por 35 ciclos de 45'' a 94 °C, 45'' a 57.8 °C, 1 min a 72 °C. La amplificación fue completada con un ciclo a 72°C por 20 min.

La amplificación por PCR fue realizada en un volumen total de 20 µl conteniendo 2 µl de 10X PCR Buffer, 10 mM de deoxinucleotidos trifosfato, 25 mM de MgCl₂, 100 µM de cada primer, 0.1 µl Taq polimerasa (Promega) y 100 ng de ADN de rizósfera. Para la amplificación de los genes de las cepas aisladas se utilizó la técnica de PCR colonial (Trower, M.K., 1996), que a diferencia del PCR normal, no se le agregó ADN si no que se le colocó una colonia pequeña de la cepa de interés en el tubo y posteriormente se le añadió la mezcla de reacción trabajándose con el mismo volumen de reacción. Sin embargo, en las condiciones de PCR se modificó el tiempo de la temperatura inicial 94 °C de 2 min a 5 min.

Para los análisis de T-RFLP el primer forward correspondiente a cada gen se modificó marcando el extremo 5' con la etiqueta fluorescente 6-FAM (6-carboxyfluorescein) (IDT, Coralville, IA), y con un grado de pureza HPLC. La amplificación se llevó a cabo con la misma concentración y especificaciones de los primers sin marcar. Se determinó la concentración de los productos de PCR por realizó por espectrofotometría de UV a A₂₆₀ (UV-2800 Espectrofotómetro, UNICO, USA).

7.2.4 Clonación y Secuenciación

Los productos de PCR fueron examinados en geles de agarosa al 1.5 %, las condiciones de electroforesis fueron 100 milivoltios, utilizando el buffer TBE a 0.5% (45 mM Tris-borato; 1mM EDTA). Se utilizó el marcador molecular 1kb ladder (Invitrogen, Carlsbad, Calif). Después de verificar que el producto de PCR tenía el tamaño esperado, se cortaron las bandas que correspondían a cada gen. Los productos fueron purificados usando Qiaquick spin columns (Qiagen, Valencia, Calif) siguiendo el protocolo del fabricante. Los productos eluidos fueron clonados utilizando el Original TA Cloning Kit (Invitrogen, Carlsbad, Calif.). La reacción de clonación se realizó con un volumen final de 6 µl, del cual 1 µl fueron del producto fresco de PCR, 1 µl de solución de sal (1.2 M NaCl; 0.06 M MgCl₂), 3 µl de agua estéril y 1 µl del vector pCR®2.1-TOPO (3.9 kb). La reacción de mezcla se realizó gentilmente y se incubó por 30 min a temperatura ambiente (22-23 °C). Subsiguientemente, se tomó 2 µl de la reacción de clonación y se añadió para la transformación *E. coli* químicamente competente, se mezcló gentilmente sin pipetear y se dejó incubar en hielo por 30 min. Después las células recibieron un shock térmico por 30 seg a 42°C sin agitar e inmediatamente se transfirieron en hielo por 3 min. Posteriormente, cada tubo se le agregó 250 µl de medio S.O.C. a temperatura ambiente, los tubos se dejaron en agitación horizontal (200 rpm) a 37 °C por 45 °C. Se tomó 10, 50 y 100 µl de las células transformadas y 20 µl de medio S.O.C., se esparcieron en placas selectivas precalentadas (50 µg/ml ampicilina y X-gal 40 mg/ml en dimetilformamida (DMF)). Las placas se dejaron

incubar a 37 °C por una noche. Las células que presentaron el plasmido con el fragmento se observaron de color blanco y aquellas que no tenían el fragmento se observaron de color azul. La efectividad de clonación fue aproximadamente del 95%. De las placas se escogieron 20 a 30 células seleccionadas al azar para cada gen de cada muestra.

A los clones seleccionados se les realizó PCR Colonial para corroborar que el plasmido tuviera el fragmento. Posteriormente se aisló el plásmido utilizando el kit QIAprep Miniprep (Qiagen, Valencia, Calif). Se mandaron a secuenciar a BIOtech, Cornell University, NY.

Las secuencias obtenidas fueron comparadas con secuencias reportadas en el banco de datos del Nacional Center for Biotechnology Information (NCBI) usando el programa BLAST. El alineamiento de las secuencias de DNA fue realizado con el programa Clustal W y los filogramas fueron editados con el programa PAUP.

7.2.5 Selección de las endonucleasas de restricción

Para la selección de las endonucleasas de restricción se utilizaron las mismas secuencias de las cepas con las que se realizó el diseño de los primers. De la secuencia se utilizó solo el fragmento que sería amplificado por los primers. A estos fragmentos se les realizó una digestión virtual con el software RestrictionMapper version 3. Para los genes *nirK* y *nirS* se realizaron las digestiones con las enzimas *MspI*, *RsaI*, *MnII*, *MboII* y *HhaI*; mientras que para el gen *nifH* se utilizaron las enzimas *MspI*, *BsaHI*, *BstUI*, *Bari*, *MnII*, *MboII*, *RsaI* y *HhaI*.

7.2.6 Análisis T-RFLP

Los productos de PCR fueron visualizados por electroforesis con gel de agarosa al 1.5% (Sigma-Aldrich, USA) y los fragmentos con el tamaño correcto fueron cortados y se purificaron usando Qiaquick spin columns (Qiagen, Valencia, Calif) de acuerdo a las especificaciones del fabricante. De las alícuotas se tomaron 375 ng de DNA y se realizó una reacción de digestión de 30 μ l. Para la digestión se utilizaron diferentes endonucleasas haciéndose las reacciones de cada enzima por separado. Las enzimas MspI, HhaI (NE BioLabs, Beverly, MA) y RsaI (Invitrogen, Carlsbad, Calif) se usaron para los genes *nirK* y *nirS*, mientras que para el gen *nifH* se utilizaron MspI, MnlI y HhaI (NE BioLabs, Beverly, MA). La reacción se llevo acabo de acuerdo a las especificaciones del fabricante.

Posteriormente, el producto de la digestión se purificó con las columnas Centri-sep (Princeton Separations, NJ). Una vez realizada la purificación, el ADN estaba disuelto en agua y esta se evaporó en una centrifuga de concentración por evaporación. El DNA se resuspendió con una mezcla de la línea interna estándar 0.2 μ l de GeneScan-500 Liz (ABI 4322682) y 9.8 μ l de Formamida. Aliquotas de 10 μ l fueron colocados en placas de 96 pozos (AbGene ThermoFAst 96 Detection Plate) y después la placa fue sellada con cita adhesiva (Applied Biosystem Gene). La placa se centrifugó para que la solución se asentara en el fondo de cada pozo. Las muestras fueron desnaturalizadas a 94 °C por 2 min e inmediatamente fueron colocadas en hielo.

Los fragmentos fueron analizados con el analizador Applied BioSystems 3730 xl basándose en la detección solo en etiqueta fluorescente 5' terminal 6-FAM. La longitud y la intensidad de la señal fluorescente de cada T-RF dada en el patrón fingerprint en la comunidad fueron calculadas automáticamente por el programa GeneMapperTM (Version 3, PE Applied Biosystem).

7.3 Análisis Numéricos

7.3.1 Atributos ecológicos de las comunidades

El numero de T-RF identificados fueron usados para estimar la diversidad de las diferentes comunidades de estudio usando el Paquete estadístico Primer V5 (Primer-E Ltd, Plymouth, UK).

7.3.1.1 Riquezas de especies

Es el número de especies que se encuentran presentes, el cual es obviamente muy independiente sobre el tamaño de la muestra.

7.3.1.2 Índices de Diversidad de Shannon-Wiener

El índice comúnmente utilizado es el índice de diversidad de Shannon (o Shannon-Wiener). Índices de diversidad enfatiza en la riqueza de las especies o en la equitabilidad de los componentes de diversidad varían a diferentes grados.

$$H' = \sum_i p_i \log(p_i)$$

Donde p_i es la proporción de la cuenta total (o biomasa etc.) obtenidos de i th especies. Cuando los valores son altos la diversidad es mayor en una comunidad.

7.3.1.3 Índice de Dominancia de Simpson

Se utilizó para estimar la dominancia en cada una de las comunidades. Este índice esta representado como:

$$1-\lambda^2 = 1 - \frac{\sum_i N_i(N_i-1)}{N(N-1)}$$

Donde, N_i es el número de individuos de la especie i . El índice λ tiene una interpretación natural como la probabilidad de cualquiera de dos individuos de una muestra, elegidos al azar, sean de la misma especie (λ es siempre ≤ 1). En este índice de dominancia, mientras los valores sean mayores indica que la abundancia total esta representada homogéneamente se acerca a la equitabilidad y cuando estos valores sean cercanos a 0 la abundancia total será representada por una especie o por varias.

7.4. Disimilitud en la estructura de las comunidades bacterianas

Los datos fueron generados consistieron de picos que reflejaban el tamaño de los fragmentos terminales de restricción (T-RF) presentes, las medidas se presentaron en pares de bases, y se produjeron los datos del área y altura, medidas en unidades de fluorescencia. Los datos fueron estandarizados al calcular.

7.4.1 Coeficiente de Similitud Bray-Curtis

Los datos fueron importados dentro del paquete estadístico multivariado Primer V5 (Primer-E Ltd, Plymouth, UK). Las matrices de similitud fueron calculadas usando el coeficiente de Bray-Curtis:

Donde i es la pico función el cual es comparado a través de las muestras j y k . Para propósito de comparar los datos fueron convertidos a presencia/ausencia de los picos (datos binarios) y la fluorescencia relativa (área) de los picos transformándolos con raíz $\sqrt{\cdot}$.

7.4.2. Escalamiento No métrico Multi Dimensional (MDS)

Se utilizó el Escalamiento No métrico Multi Dimensional (MDS) para desplegar los datos de los sitios en un espacio de k dimensiones tal, que las distancias entre los sitios en ese espacio se parezcan lo más posible a las distancias observadas entre los sitios. Para ordenar los datos obtenidos la matriz de similitud. MDS usó algoritmos interactivos que toman los datos multidimensional de la matriz de similitud y los presenta en mínimo espacio dimensional, típicamente en dos dimensiones, aunque las graficas en tres dimensiones se puede apreciar las diferencias del grupo.

Los resultados de la ordenación con MDS es un mapa donde la posición de cada muestra es determinada por su distancia de todos los demás puntos en el análisis. La ordenación con MDS es un algoritmo iterativo que involucra la estimación por medio de un ajuste de bondad, un componente importante de una grafica de MDS es la medición del ajuste de bondad de la grafica final, para este tipo de análisis es llamado stress de la grafica. Los valores de stress mayores de 0.2 indica que la grafica es cercana al azar, stress menores a 0.2 indica que puede ser utilizable las graficas en 2 dimensiones y los valores menores a 0.1 corresponden a una ideal ordenación con no hay argumentos reales a mal interpretaciones (Clarke, 1993). El análisis de stress fue calculado con

forme a la descripción dada por Kruskal (1964) con el software Primer. Las ordenaciones en los análisis fueron computadas seguidos de 100 intentos al azar, con la mejor configuración basadas sobre el número de mínimo stress obtenido sobre el curso de intentos al azar.

7.4.3 Análisis de Similitud

Un análisis de similitud (ANOSIM) fue utilizados para examinar la significancia estadística entre las muestras, involucra una prueba basada sobre las permutaciones de todos los sitios y las replicas y esta libre de suposiciones de normalidad, pero no de las suposiciones de igual dispersión dentro de los grupos.

Por otra parte, el análisis de similitud (ANOSIM) el cual ver la significancia entre los grupos de datos. ANOSIM esta basada sobre la similitud de los renglones entre las muestras en la matriz de similitud y produce una prueba estadística R la cual tiene un rango que va de -1 a 1. Los T-RF que tienen mayor disimilitud entre los sitios que dentro de los sitios será indicado con una R estadística grande a 0. Un valor de R de 0 indica que la hipótesis nula es aceptada. El nivel significancia (valor de p) también es producido por este análisis. La hipótesis nula que se esta manejando es que no existen diferencias en la composición de la comunidad entre los tres sitios de estudio. La prueba estadística refleja las diferencias observadas entre los sitios, contrastadas con las diferencias entre las replicas de cada sitio. Cuando R es aproximadamente a 0 si la hipótesis nula es verdad, dando que las similitudes entre y dentro de los sitios presentan el mismo promedio.

7.4.4 Porcentaje de Similitud

El análisis SIMPER (similarity percentages) identifica cuales son los T-RF responsables de los aspectos particulares de cada sitio de estudio. Es decir, calcula el promedio de contribución de cada Terminal fragmento a los promedio de similitud entre las muestras. Se examinó la similitud de 1% de umbral en los datos, comparándose con la presencia/ausencia y la abundancia relativa de los fragmentos transformados $\sqrt{\sqrt{}}$.

7.4.5 Índice de Dispersión

El índice de Dispersión fue calculado para examinar la heterogeneidad de cada sitio. Este índice compara los promedios de las similitudes de los renglones a través un número de muestras dados, con el rango de los promedios derivados de matriz de similitud. Los valores altos del índice de dispersión mayor heterogeneidad (variabilidad) dentro del sitio comparando a los sitios con menor índice de dispersión.

7.5. Aislamiento de bacterias desnitrificantes y fijadoras de nitrógeno a partir de raíces de mangle

Se colectaron plántulas de mangle de aproximadamente 50 cm de altura con todo el sistema de raíces envolviéndose éste en una bolsa de plástico. Una vez en el

laboratorio, se removieron los sedimentos y lodo que cubrían las raíces y se lavaron con agua de mar filtrada y tratada con luz ultravioleta.

7.5.1 Aislamiento de bacterias fijadoras de N₂.

Se trataron las raíces de la misma manera que para el aislamiento de bacterias desnitrificantes, a excepción de que las raíces fueron inoculadas en medio HGB semisólido (0.05%) (Holguin et al. 1992). El medio HGB se preparo libre de nitrógeno, el cual contenía ácido málico (37 mM) como fuente de carbono. Posteriormente se realizó la prueba de fijación de nitrógeno con el ensayo de reducción de acetileno (Holguin *et al.*, 1992).

En el ensayo de reducción de acetileno se utilizaron botellas de suero con tapones de caucho, a dichas botellas se les removió 1 ml de aire con una jeringa en su lugar 1ml de acetileno fue inyectado. Las botellas se incubaron de 3 a 24 hrs. Un ml de muestra fue inyectado en el cromatógrafo de gases. El análisis de acetileno fue complementado usando a Varian 6000 cromatógrafo de gases (Varian Instrument Group, USA), equipado con detector de ionización de hidrogeno por flama (FID). El instrumento operó con columna 150X 0.2 cm empacado con Porapak N, 80/100, la temperatura de la columna de 60 °C, 50 °C la temperatura del inyector, y la temperatura del detector de 200 °C. El nitrógeno y el hidrogeno fueron transportados a un flujo de 25 ml/min, y el rango del flujo de aire fue de 300 ml/min. La cantidad de acetileno fue expresada en nmol de etileno por unidad de tiempo.

7.5.2 Aislamiento de bacterias desnitrificantes

Las raíces del mangle *Avicennia germinans*, se lavaron abundantemente con agua de mar estéril, se cortaron en pequeños fragmentos. Y se inocularon con medio nutritivo con nitrato [(g/L) 1.5 g de KNO₃; 8.6 g de peptona; 20 g NaCl; 3.0 g de MgSO; 0.02 g de CaCl₂, pH 7.0]. En seguida de ser esterilizados se le adicionó 10 ml de solución de acetato de sodio (4.5 g/100ml), y 10 ml de microelementos diseñados para el medio HGB. Se dejaron crecer los cultivos en botellas de suero que se mantuvieron sin agitación y se incubaron 30 °C. Posterior a 7 días, se transfirieron 100 µl de los cultivos enriquecidos a en tubos de ensaye con tapa en rosca y fueron llenados con medio Patureau modificado *et al.* (1996): Solución I preparada para un litro: 409 mg KNO₃; 3.0 g de MgSO₄ ; 20.0 g NaCl; 212 mg de NH₄(SO₄); 161 mg de extracto de levadura; 0.02g de CaCl₂; Solución II: 100 ml de buffer de PO₄ a 0.1M a pH 7.0; Solución III: 10 ml de solución de acetato de sodio (4.5g/100ml); Solución IV: 20 ml de solución de etanol (2.5g/100ml); Solución V: 10 ml de solución de microelementos para medio HGB. Este medio contenía nitratos y amonio a una concentración inicial de 250 mg/l de NO₃ y 170 mg/l de NH₄ y contiene glucosa como fuente de carbono. Después de un período de incubación de una semana, se tomó con un asa la parte densa del cultivo que mostraba crecimiento y se sembró por estría cruzada en medio Patureau modificado sólido. Se aislaron los diferentes morfotipos, y se obtuvieron las cepas puras.

Se procedió a determinar su capacidad para desnitrificar. Las cepas se incubaron por separado en medio Patureau modificado por 10 días bajo condiciones estáticas y con agitación (170 rpm a 30 °C). Después se centrifugaron los cultivos a 5000 rpm

durante 10 minutos y se determinó la concentración de nitratos y nitritos del sobrenadante.

La concentración de nitritos fue determinada el método de Bendschneider y Robinsón (1952). Mientras que el nitrato, se determinó utilizando el método de Morris y Riley (1963). La concentración de nitritos y nitratos fue analizado con el autoanalizador de iones de flujo continuo FIAS (LACHAT modelo QuikChem 8000).

7.6 Evaluación, Cuantificación y Caracterización de la molécula señal Acilo homoserina lactona

7.6.1 Evaluar la capacidad de las cepas para producir acilo-homoserina lactonas.

Para realizar el análisis presuntivo de producción de acilo homoserinas lactonas por parte de las cepas aisladas de la rizósfera de manglar, se utilizó la cepa reportera *Agrobacterium tumefaciens* KYC55 (pJZ372)(pJZ384)(pJZ410), el cual tiene adaptado un bacteriofago T7 este sistema que incrementa la expresión de TraR, haciendo que presente una gran sensibilidad de detección hacia diferentes tipos de AHLs (Zhu *et al.* 2003).

A. tumefaciens fue preinducida creciéndola toda la noche a 28 °C con una agitación de 217 rpm. Se hizo un raspado de un stock congelado de la cepa y fue inoculada en cultivos 2.5 ml de Luria Broth LB (Difco) suplementado con 1.5 µg ml⁻¹ de tetraciclina, 100 µg ml⁻¹ de espectinomicina, y 100 µg ml⁻¹ de gentamicina. Posteriormente se realizó un sub-cultivo 1:100 en 250 ml de medio mínimo AT, el cual fue inoculado con los 2.5 ml de el cultivo anterior y se colocó en matraces de un litro.

Se dejó crecer a 28°C a 217 rpm hasta que alcanzara una DO_{600} de 0.3 a 0.4, la densidad óptica fue medida con el espectrofotómetro (Unico, United Products and Instruments, Inc.). Después los cultivos fueron centrifugados a 10 min a 4 °C a 8000 rpm. Se descartó el sobrenadante y las células bacterianas fueron resuspendidas en glicerol al 15%. Se transfirieron a tubos eppendorf y se centrifugaron a 14 000 rpm por 2 min y se volvió a descartar el sobrenadante y se en glicerol al 10% las células que a 250X.

7.6.2 Prueba presuntiva de producción de AHL

La prueba presuntiva de producción de AHLs a las cepas aisladas del manglar se realizó en medio HGB con agar al 1.5% suplementado con glucosa y $60 \mu\text{g ml}^{-1}$ X-Gal (5-bromo-4-cloro-3-indol- β -D-galactopiranos) (Sigma-Aldrich), se sembró perpendicularmente la cepa de estudio de la cepa reportera KYC55 preinducida. Se dejaron crecer de 24 a 48 h a 28°C. Cuando la cepa de estudio produjo AHL activó el gen de la β -galactosidasa de la cepa reportera, y a su vez la enzima reaccionó con el sustrato x-gal generando que la cepa reportera adquiriera una coloración azul. Se utilizó como control negativa la cepa reportera sola y como control positivo con la molécula sintética AHL a concentraciones altas.

7.6.3 Cuantificación de la producción de AHL en bacterias aislada de raíz de mangle.

Para la cuantificación de las moléculas señal se realizó el ensayo MUG. Este ensayo se utilizó para evaluar los tiempos de óptima producción de AHLs por parte de

las cepas, así como para comparar la producción de AHLs en diferentes medios de cultivo.

Se determinó la actividad de β -galactosidasa por fluorometría usando MUG (4-methylumbelliferyl β -D-galactosida) (Molecular Probes) como sustrato. Se determinó la producción de AHL. Las bacterias fueron crecidas en medio HGB suplementado con glucosa (5 g l^{-1}) o glicerol ($3 \text{ y } 5 \text{ ml l}^{-1}$) a diferentes horas 12, 24, 48, y 72. Las células fueron desechadas por centrifugación y el sobrenadante ($100 \mu\text{l}$) se añadió al medio mínimo suplementado con aproximadamente 10^7 de células de *A. tumefaciens* KYC55 (pJZ372)(pJZ384)(pJZ410). Después de la incubación con agitación a 217 rpm por 12 h se realizó el ensayo MUG en microplacas de 96 pozos (FluoroNunc, Nalge Nunc Internacional) en un buffer de reacción [200 mM de buffer de fosfato de sodio a un pH 7, 2 mM MgCl_2 , 4% Triton X-100, 0.1 mM EDTA, y 0.5 mM MUG]. Posterior a una hora de reacción se adicionó el buffer de paro [250mM EDTA, glicina 1M, pH 11.5]. La fluorescencia fue medida en la misma microplaca con el fluorometro (Genios FL, Tecan, USA) usando un filtro de excitación a 360-nm y un filtro de emisión de 465-nm. La DO_{600} de los cultivos y el tiempo de reacción fueron divididos entre los valores de fluorescencia para normalizarlos.

En el caso de la curva estándar se realizó calculando la concentración de AHL en el sobrenadante del cultivo, se realizó siguiendo el mismo procedimiento descrito arriba excepto que 3-O-C8-HL sintética fue diluida en acetato de etilo a diferentes concentraciones de 10nM a 10^{-3} nM, y fue añadida en tubos de cultivos vacíos y el solvente fue evaporado, posteriormente se le añadió 2 ml de medio AT complementado con cepa reportera. Como controles fueron incluidos solo el medio AT, KYC55 (pJZ372)(pJZ384)(pJZ410) crecida con el medio AT, y la cepa reportera fue

crecida con HGB con glucosa o glicerol sin añadir el sobrenadante de los cultivos aislados.

7.6.4 Aislamiento de AHLs

Se crecieron cada una de las cepas en 1 litro del medio y tiempo óptimo para la mayor producción de AHL. El cultivo se centrifugó por 10 min a 4 °C a 8000 rpm y el sobrenadante se acidificó a pH 4. La extracción de la molécula se llevo acabo con columnas cromatográficas C18 (10g/60ml) (Supelco, Sigma-Aldrich, USA), las cuales se preconditionaron llenando la columna con acetonitrilo (MeCN) y el solvente fue succionado lentamente a través de la columna evitando que se seicara. Poco antes de que pasara todo el acetonitrilo se le agrego 10 ml de agua tres veces (esto es para eliminar el acetonitrilo). Poco antes de que pasara toda el agua se paso el sobrenadante a través de la columna. Se dejo secar la columna por 10 min. Ya una vez seca, se eluyeron las AHLs con 10 ml de acetonitrilo repitiendo este paso 3 veces; ya obtenida la muestra se evaporó con N₂ en baño maría a 40°C. Posteriormente la muestra se resuspendió en 1ml de acetato de etilo consistiendo en 5 enjuagues con 200 µl del solvente. Se tomó 1 µl y se inyectó en el Cromatógrafo de Gases acoplado a un espectrómetro de masas (marca). Posteriormente se inyectaran al HPLC y se terminaran de analizar en GC/MS.

Los extractos de AHL (5 µl) y los estándares sintéticos de AHL (3-O-C6-HL, 3-O-C8-HL, C8-HL, C4-HL, C6-HL) se aplicaron en placas TLC de fase reversa en placas C18 (200-µm layer thickness, Whatman). Las placas se corrieron con metanol:agua 60:40 por volumen, y posteriormente se dejaron secar y se colocó un

cultivo de las células preinducidas de *A. tumefaciens* KYC55(pJZ372)(pJZ384)(pJZ410) (Shaw *et al.*, 1997). Las placas con el cultivo se dejaron incubaron a 28°C de 12 a 24 h.

Para la posterior caracterización, los estratos fueron evaporados y resuspendidos en 150 µl de acetonitrilo y 50 µl de agua, se centrifugo removiendo el material insoluble, y se inyectó en el cromatógrafo de líquidos de alta resolución (HPLC). En la columna Phenomenex Ultracarb 5 C-8 de 1x 25 cm se eluyó a un flujo constante de 3 ml min⁻¹ y a un gradiente de 2 min a 10% de MeCN/90% H₂O (v/v), seguida por incrementos paulatinos a 100% MeCN por 20 min y entonces se mantuvo a 100% por otros 15 min. Fracciones de 6 ml fueron colectadas, evaporadas hasta el secado con una centrifuga de concentración al vacío y se disolvieron en 10 µl de acetonitrilo; se utilizaron 0.2 µl para el análisis GC/MS. El análisis de GC/MS se realizó con un Hewlett-Packard modelo 5890 ajustado con un detector selectivo de masa modelo 5971A y una columna 6 m x 0.2 mm de 0.33 µm de 5% PH ME siloxano (Hewlett-Packard).

Todas las fracciones fueron analizadas por fragmentación e ion libre monitoreando las masas 143, 172 y 185. Comúnmente, los fragmentos con masa 143 fueron los predominantes en AHLs sin sustituciones, mientras que las 3-hidroxi-HL presenta picos predominantes a una masa 173, y las moléculas 3-oxo-AHLs a 185. Posteriormente las mismas fracciones fueron tratadas con 150 µL de MeCN y 50 µl de ácido fórmico al 1 % en agua y expuesto espectrómetro de masas de ionización en serio por electroespray (ESI MS/MS) como es descrito por Marketon *et al.* (2002). Los

tiempos de retención tanto para GC/MS y ESI MS/MS fueron comparados con los de las AHLs las cuales fueron químicamente sintetizadas (Eberhard & Schineller (2000).

VIII RESULTADOS

8.1 Características del Área de Estudio

Las características biogeoquímicas de los sedimentos de los tres sitios revelaron que los tres sitios de estudios presentaron diferencias (Tabla I).

Tabla I. Características biogeoquímicas de muestras de sedimento tomadas en tres sitios del Manglar de Balandra.

	Sitio		
	1	2	3
pH	8.26 ± 0.07	7.52 ± 0.38	8.053 ± 0.068
%MO	0.74 ± 0.219	3.06 ± 0.747	4.88 ± 0.574
Oxígeno (mg/ml)	0.936 ± 0.10	1.93 ± 0.061	0.265 ± 0.009
Salinidad (‰)	76 ± 1	68.6 ± 1.15	60.6 ± 2.08
Fe (mg/kg)	6.70 ± 4.69	0.62 ± 0.06	3.42 ± 0.60
N-NO3 (mg/kg)	0.24 ± 0.069	0.68 ± 0.30	0.216 ± 0.02
N-NH4 (mg/kg)	1.873 ± 0.243	4.65 ± 0.60	26.47 ± 5.73
Arenas	50.16 ± 12.7	9.5 ± 2	77.5 ± 0.0
Limos	26 ± 10	34.6 ± 6.11	10 ± 0.0
Arcillas	23.83 ± 2.3	55.83 ± 5.77	12.5 ± 0.0

Se realizó un Análisis de Componentes Principales (ACP) (utilizados los programas Primer-E y MVSP) para evaluar las relaciones entre los sitios en función de la variación de los parámetros biogeoquímicos. Se observó que los dos primeros componentes son los mas significativos ya que explican el 89.1% de la varianza de los parámetros (Tabla II). Tan solo el primer componente explico el 57.3% de la varianza y

a su vez las diferencias de los sedimentos entre los sitios (Tabla II). La interpretación del plano de ordenación se realizó conforme a estos dos primeros componentes (CP1 vs CP2).

Tabla II.- Ordenación de los parámetros biogeoquímicos por Componentes Principales que acumulan el 99.1% de la varianza total.

	CP1	CP2	CP3	CP4	CP5
Eigenvalores	5.73	3.18	0.48	0.37	0.15
%Varianza explicada	57.3	31.8	4.8	3.7	1.5
% Acumulado	57.3	89.1	93.9	97.5	99.1

Las variables biogeoquímicas del suelo arrojaron diferentes valores de importancia en el ACP. Se observó que para del primer componente tanto la textura del suelo como la concentración de oxígeno en el sedimento fueron las variables preponderantes (coeficiente de 0.409 y -0.409 respectivamente); el segundo componente estuvo determinado por el porcentaje de materia orgánica (coeficiente de 0.496) y la salinidad (ppm) (coeficiente de -0.459); estas variables explicaron las diferencias en el sedimento de los tres sitios de estudio (Tabla III)

Los resultados obtenidos al ordenar los sitios de estudio con respecto a las variables fisicoquímicas del sedimento revelaron claras diferencias en las propiedades del sedimento entre los tres sitios de estudio, observándose una clara separación de los 3

sitios en tres grupos (Fig. 2) EL CP1 fue representado por la textura del sedimento y la concentración de oxígeno (Fig. 2). Se observó que el sitio 3 estuvo compuesto principalmente por arenas finas presentando una combinación de arcilla y limo que clasificó al sedimento como arena mijagosa. El sitio 1 estuvo compuesto por aproximadamente 50% arenas, 26% limos y 24% de arcilla, por lo que fue clasificado como migajón arcillo-arenoso, mientras que el sitio 2 estuvo compuesto por aproximadamente 56% de arcillas, 24% de limo y 12% de arenas clasificándolo como un sedimento arcilloso (Villanueva y Ortiz, 1984).

Por otra parte, el sitio 3 presentó la menor concentración de oxígeno, y en la dirección contraria se encontró el sitio 2 ya que presentó las concentraciones mas altas de oxígeno (Fig. 2).

Tabla III. Importancia de las variables en el Análisis de Componentes Principales.

Variables	CP1	CP 2
pH	0.265	-0.394
Salinidad	-0.212	-0.459
%MO	0.168	0.496
Oxígeno	-0.409	0.038
Fe	0.134	-0.422
N-NO3	-0.321	0.269
N-NH4	0.327	0.312
Arenas	0.409	-0.035
Limos	-0.367	-0.137
Arcillas	-0.398	0.140

EL CP2 estuvo representado por el porcentaje de materia orgánica y la salinidad. El sitio 3 fue el que presentó mayor concentración de materia orgánica, mientras que en sentido opuesto se encontró el sitio 1 presentando la menor concentración de materia orgánica. En cambio, a concentración de salinidad para el sitio 1 fue mayor 76 ± 1 en el sitio 1 y la menor concentración fue el sitio 3 (Tabla I).

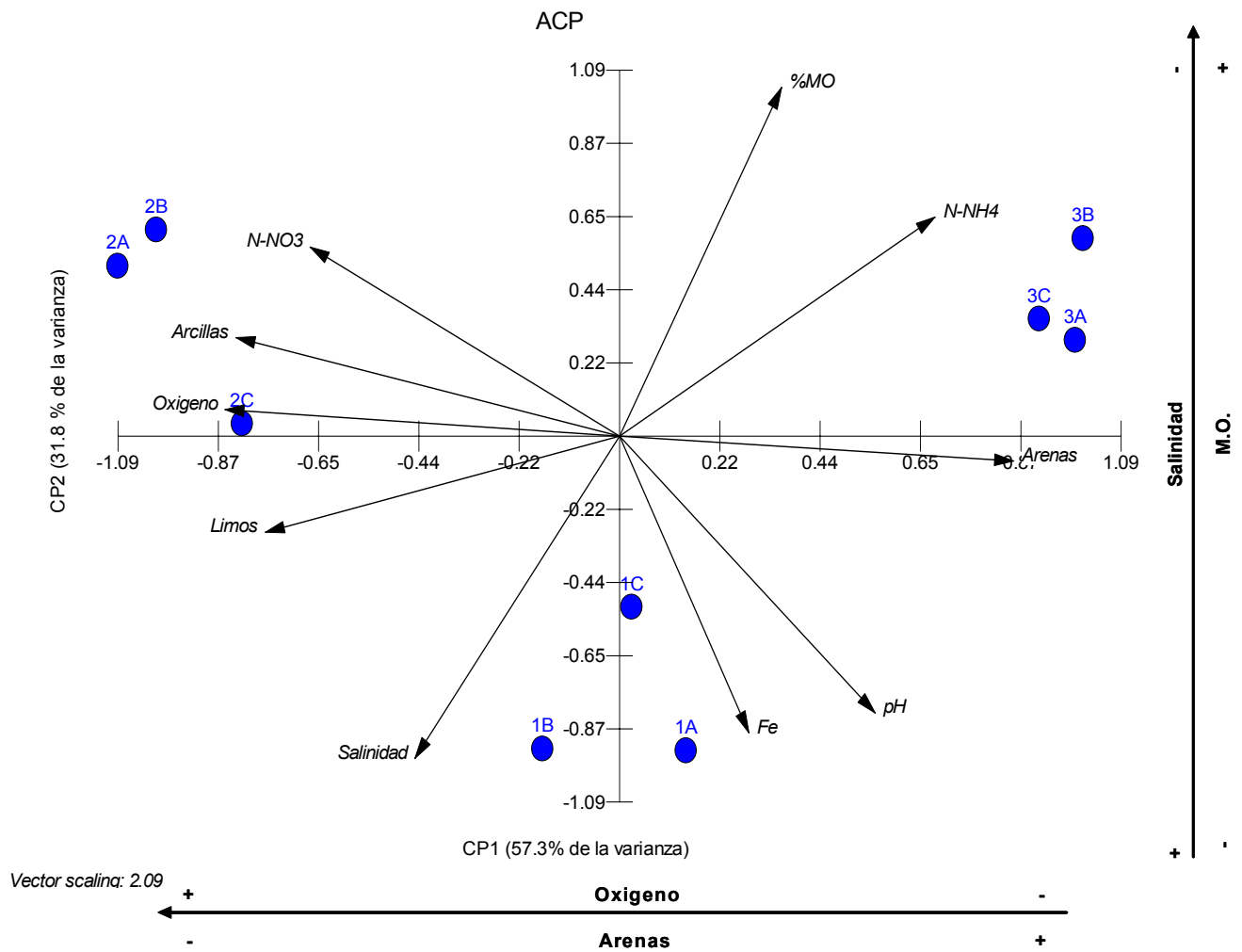


Fig. 2. Ordenación de los sitios de estudio con respecto a los parámetros biogeoquímicos del sedimento. Variables: pH, %MO = porcentaje de materia orgánica, Salinidad, Fe = Fierro, Oxígeno, N-NH₄ = Amonio, N-N₃ = nitratos, Arenas, Arcillas y Limos.

8.2 Presencia de las comunidades fijadoras de nitrógeno (*nifH*) y desnitrificantes (*nirK* y *nirS*) en las raíces del manglar

8.2.1 Amplificación de un fragmento del gen *nifH*.

La amplificación del fragmento de 660bp del gen *nifH* a partir de ADN de rizósfera, fue exitosa. Las muestras del sitio 3 fueron de las que se obtuvo mayor cantidad de DNA (de 58 a 126 ng/ μ l); del sitio 2 se obtuvo de 48 a 60 ng/ μ l, mientras que para el sitio 1 se obtuvo de 56 a 80 ng/ μ l (Fig. 3).

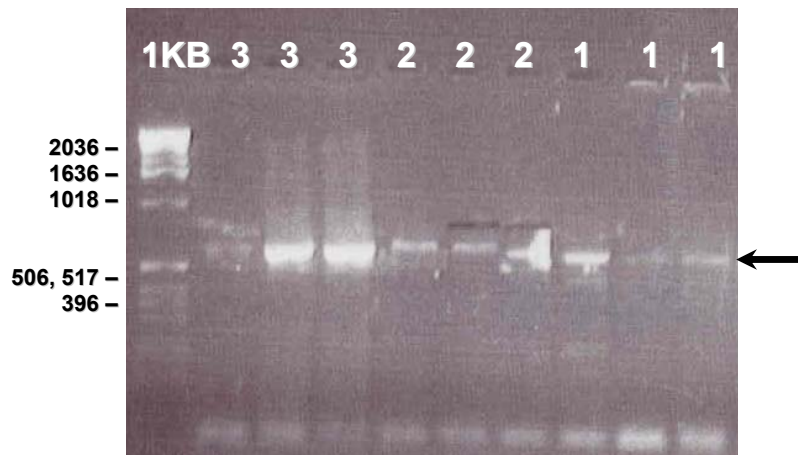


Figura 3 Electroforesis en gel de los productos de amplificación por PCR del gen *nifH* a partir de ADN de rizósfera. La flecha indica el fragmento con un tamaño aproximado de 660.bp. Los números arriba de las columnas indican el sitio de muestreo.

8.2.2 Amplificación de los genes *nir*.

La amplificación del fragmento de 405 pb del gen *nirK* fue exitosa en los tres sitios. No obstante, la concentración del producto de PCR para cada uno de los sitios fue diferente, obteniéndose de 100 a 115 ng de producto para el sitio 3, mientras que para el sitio 1 fue de 57 a 70 ng y para el sitio 2 la concentración fue relativamente débil obteniéndose de 40 a 47 ng por cada reacción de PCR (Fig. 4).

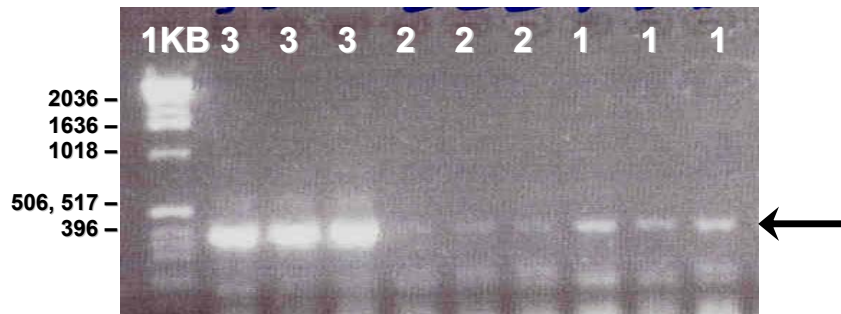


Fig. 4. Electroforesis en gel de los productos amplificados de los genes *nirK*. Muestra del sitio 3 (3); muestra del sitio 2 (2); muestra del sitio 1 (1).

Contrariamente a los resultados obtenidos para la amplificación de los genes *nifH* y *nirK*, la concentración de los productos de amplificación de los genes *nirS* fue baja para los tres sitios de muestreo, y fue mucho más laborioso lograr optimizar la reacción de PCR. Se obtuvo de 39 a 47 ng para el sitio 3, de 57 a 60 ng de producto para el sitio 2, mientras que para el sitio 1 se obtuvo una concentración de 50 a 54 ng de DNA (Fig. 5).

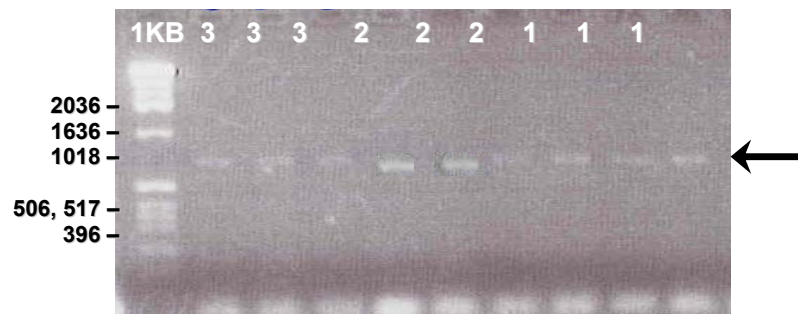


Fig. 5. Electroforesis en gel de los productos amplificados de los genes *nirS* con los primers *nirKF-nirKR*. Muestra del sitio 3 (3); muestra del sitio 2 (2); muestra del sitio 1 (1).

8.3 Diversidad molecular de las comunidades fijadoras de nitrógeno y desnitrificantes

8.3.1 Riqueza de genes *nifH*, *nirS* y *nirK* basada en la técnica de T-RFLP

El análisis por T-RFLP de los productos de amplificación de los genes *nifH*, *nirK* y *nirS* fue utilizado para comparar la estructura de las comunidades microbianas asociadas a la rizósfera del mangle negro entre tres sitios de muestreo en Balandra, B. C. S. México (Fig. 1). Este análisis sugiere que existen diferencias en la estructura de la comunidad de bacterias fijadoras de nitrógeno (*nifH*) y desnitrificantes (*nirK* y *nirS*) entre los tres sitios.

Los fragmentos terminales de restricción también llamados T-RFs o OTUs (Unidad operacional taxonómica) obtenidos con las tres enzimas tetraméricas fueron los siguientes: Para *nifH*: *MnII* = 39; *MspI* = 16; *HhaI* = 28. Para *nirK* *MnII* = 39; *MspI* = 16; *HhaI* = 28. Tanto para *nifH* como para *nirK*, el número más alto de T-RFs fue encontrado en el sitio 3. Sin embargo, este patrón fue diferente al que se presentó con el gen *nirS*, debido a que el mayor número de OTUs generados por las tres enzimas de digestión: *MspI* = 7; *HhaI* = 8; *RsaI* = 8, se presentaron en el sitio 2 (Tabla V). El número más alto de OTUs de todos los sitios de muestreo fue encontrado para el gen *nifH*, seguido por el gen *nirK* y por último, el gen *nirS* (Tabla II).

A pesar de que se encontró un patrón similar en las digestiones con cada una de las enzimas, la resolución por cada corte individual fueron diferentes en términos del número de fragmentos; el mayor número de OTUs para el gen *nifH* fueron dados por la enzima *MnII*; mientras que para el gen *nirK* y el *nirS* fueron las enzimas *RsaI* y *HhaI*, respectivamente. Por lo tanto, los análisis que se realizaron fueron basados en los T-RFs generados por estas enzimas.

Tabla V. Riqueza de T-RFs de *nifH*, *nirK* y *nirS* obtenidos con diferentes enzimas de restricción.

Sitio	Riqueza de OTUs								
	<i>nifH</i>			<i>nirK</i>			<i>nirS</i>		
	<i>MnII</i>	<i>MspI</i>	<i>HhaI</i>	<i>MspI</i>	<i>HhaI</i>	<i>RsaI</i>	<i>MspI</i>	<i>HhaI</i>	<i>RsaI</i>
1	21	12	15	8	6	8	6	4	5
2	18	13	8	7	5	2	7	8	8
3	39	16	28	11	7	20	3	6	5

8.3.2 Índices de Ecológicos

El comparar la abundancia relativa de los T-RFs derivados del gen *nifH* permitió analizar la comunidad de bacterias diazotróficas para los tres sitios de muestreo. Se encontró que el sitio 3 presenta mayor riqueza y diversidad a diferencia de los otros dos sitios (Tabla VI).

Por otra parte, el sitio 2 reveló un índice de dominancia mayor (Tabla VI). Por otra parte, se analizaron los principales cuatro OTUs predominantes de cada sitio;

teniendo que el sitio 1 fueron: 158 pb [37.41%], 168 pb [22.79], 57 pb [6.62%], y 306 pb [3.63]; en el sitio 2 los OTUs predominantes fueron 168 pb [56.11%], 158 pb [18.21%], 303 pb [15.44%] y 57 pb [5.32%]; Los T-RFs dominantes en el sitio 3 fueron de 158 pb [43.29%] y 168 pb [20.63%].

Al comparar los OTUs entre los sitios 1, 2 y 3 se observó que los primeros dos OTUs dominantes en los tres sitios son los mismos, pero, sus abundancias relativas son diferentes. Sin embargo, a diferencia de los sitios 1 y 2, el sitio 3 presenta dos OTUs que no se presentaron en los sitios 1 y 2: 294 pb [13.08%], y 132 pb [2.71%].

Tabla VI. Diversidad genética de la comunidad de bacterias fijadoras de nitrógeno basada en el gen *nifH* y de la comunidad de bacterias desnitrificantes basada en los genes *nirK* y *nirS* asociadas a la rizósfera del mangle en tres sitios en Balandra.

Gen	Sitio	Resultados del Análisis de T-RFLP		
		S ^a	H ^b	1-λ ^c
<i>nifH</i>	1	21	1.92	0.78
	2	18	1.59	0.70
	3	39	2.05	0.77
<i>nirK</i>	1	8	0.70	0.32
	2	2	0.46	0.29
	3	20	1.77	0.78
<i>nirS</i>	1	4	1.03	0.57
	2	8	1.90	0.83
	3	7	1.61	0.75

^a Riqueza de T-RFs, S, fue calculada con el número total de distintos T-RFs para cada sitio de estudio.

^b Índice de Diversidad Shannon-Weiver fue calculada con la formula: $H = -\sum(p_i)(\log_2 p_i)$, donde p es la proporción de distintos T-RFs relativo a la suma total.

^c Índice de Dominancia de Simpson $1-\lambda' = 1 - \{\sum_i N_i(N_i-1)\} / \{N(N-1)\}$, donde N_i es el número individual de T-RFs i , N es el total de la muestra.

En los OTUs generados para el gen *nirK* se encontraron diferencias marcadas en el número de OTUs entre los tres sitios de muestreo, siendo el sitio 3 el que presentó una riqueza de OTUs mayor, mostrándose del mismo modo que la diversidad fue mayor para este sitio. Por el contrario se observó que el sitio 2 presentó mayor dominancia (Tabla VI). Esto se debió a que para el sitio 2 solo se generaron dos OTUs en el análisis, siendo el más dominante el OTU de 392 pb [88.31 %], seguido por el de 390 pb [11.69 %]. De igual forma los 4 fragmentos mas predominantes en el sitio 1 fueron el OTU de 393 pb [81.44%], el de 390 pb [12.32 %], y el de 105 pb [2.37%], 32 [1.63 %]. Estos resultados indican que en el sitio 1 y 2 los dos OTUs dominantes son idénticos con abundancias relativas similares. Caso contrario, para el sitio 3, los OTUs fueron de 65 pb [40 %], de 138 pb [20.57 %], de 200 pb [21.73 %] y de 53 pb [10.68 %]. Estos OTUs no fueron detectados en los sitios 1 y 2.

Para el gen *nirS* se observó que el sitio 2 presentó mayor riqueza (Tabla VI). Estos resultados contrastan con los obtenidos para los genes *nifH* y *nirK* en los cuales la mayor riqueza y diversidad se encontró para el sitio 3. El sitio 2 presentó una mayor diversidad y la menor dominancia, mientras que el sitio 1 exhibió mayor dominancia, siendo los OTUs los siguientes: de 81 pb [60 %], de 53 pb [25 %], de 41 pb [8.07 %] y de 44 pb [6.46 %]. Si bien el sitio 2 presentó los mismos OTUs 81 pb [38.66 %], 41 pb [35.54%], 44 pb [11.94 %] y 53 pb [10.76 %], estos se diferenciaron en la abundancia relativa de cada uno de ellos así como en el porcentaje de contribución fueron más homogéneos. En el caso del sitio 3, fue el que presentó menor dominancia, con tres de los cuatro OTUs iguales a los otros dos sitios 81 pb [41.22 %], 190 pb [25.25 %], 53 pb [12.06 %] y 41 pb [9.0 %].

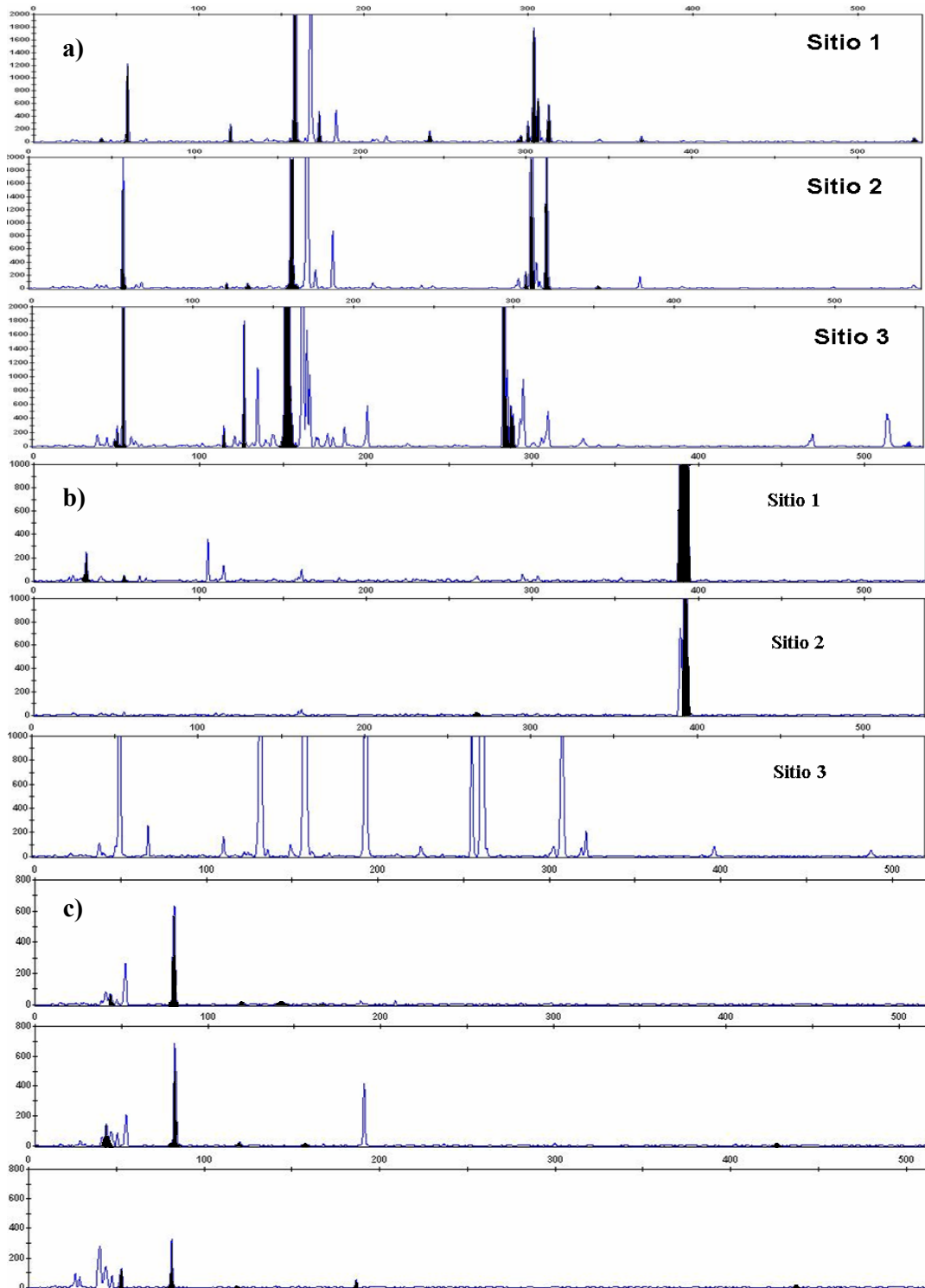


Fig. 9. Comparación de los OTUs obtenidos para los tres sitios de muestreo. a) El gen *nifH* con la enzima tetramérica *MnII*; b) el gen *nirK* con la enzima *RsaI*; y c) el gen *nirS* digerido con la enzima *HhaI*. El eje X corresponde al tamaño de los fragmentos (pares de bases) y el eje Y corresponde a las unidades relativas de fluorescencia.

8.4 Estructura de las Comunidades a través de OTUs de los genes *nifH*, *nirK* y *nirS*

8.4.1 Distribución y agrupamiento de las comunidades en los sitios de estudio

Con el fin de interpretar visualmente las diferencias en el pool genético de *nifH*, *nirK* y *nirS* representativos de la comunidad bacteriana diazotrófica y desnitrificante asociados a la rizósfera del mangle en los tres sitios, se utilizó Escalamiento Multidimensional no-métrico y el análisis de grupo usando la matriz de similitud de Bray-Curtis. Los mapas y el análisis de grupo de los sitios se generaron a partir de T-RFs obtenidos basándose sobre 1% de verosimilitud; los datos se analizaron con la estandarización de presencia/ausencia y con la transformación de las abundancias relativas con doble raíz cuadrada $\sqrt{\sqrt{\cdot}}$. Los valores de estrés fueron pequeños, indicando una buena ordenación (Clarke y Gorley, 2001).

Al realizar los análisis se observó que con ambas estandarizaciones de los datos arrojados por los OTUs se presentó el mismo patrón de distribución (presencia/ausencia Fig. 10 y abundancia relativa Fig. 11) y agrupación (presencia/ausencia Fig. 12 y abundancia relativa Fig. 13) de los sitios. Sin embargo, los resultados derivados de la abundancia relativa se consiguió una mejor representación de las diferencias entre los sitios.

En la comunidad de fijadoras de nitrógeno (*nifH*) se encontró una gran divergencia entre el sitio 3 y los sitios 1 y 2 (stress 0.05) (Fig.11a). Esto se vió

reflejado en el análisis de grupos ya que el sitio 3 presentó una similitud del 34.83% con los otros dos sitios. Por otra parte, los sitios 1 y 2 presentaron OTUs en común (Fig. 13a) con una similitud de 67.71%.

De igual manera, para el gen *nirK* se observó que la diferencia mas notable fue el sitio 3 mostrándose una distribución alejada del sitio 1 y 2, lo que sugiere que estos sitios tienen diferentes comunidades microbianas a comparación con los otros dos sitios (stress 0) (Fig. 11b), se corroboró esta diferencia con el porcentaje de similitud de 2.22% siendo este muy bajo (Fig. 13b). Para los sitios 1 y 2 los OTUs se superpusieron demostrando así mayor similitud (61.05%) entre los T-RFs que conforman los sitios.

De forma contraria, los OTUs obtenidos para el gen *nirS* sugieren que no hay diferencias marcadas entre los sitios. Contrario a lo obtenido con los genes *nifH* y *nirK*, cuyos OTUs de los sitios 1 y 2 fueron similares, para el gen *nirS* los OTUs de los sitios 1 y 3 tuvieron mas parecido entre sí que con el sitio 2 (stress 0.11) (Fig. 11c). El análisis de grupos presentó dos grupos con una similitud de 47.47%. Dentro del grupo dos se formaron otros dos subgrupos observándose que las muestras del sitio 1 quedaron agrupadas por 58.8% en un subgrupo, este subgrupo se unió al otro por un 49.25%; mostrando así que el sitio 2 y 3 presentaron mayor OTU en común (Fig. 13c).

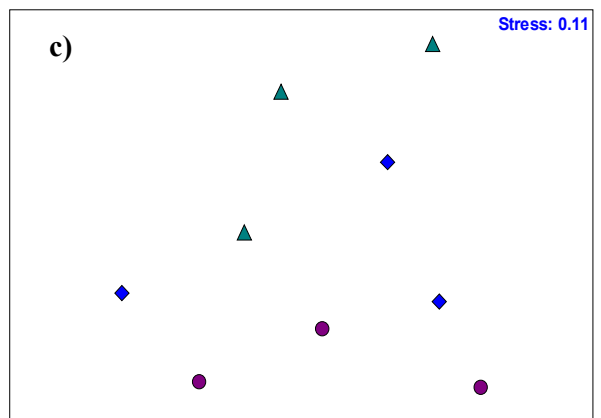
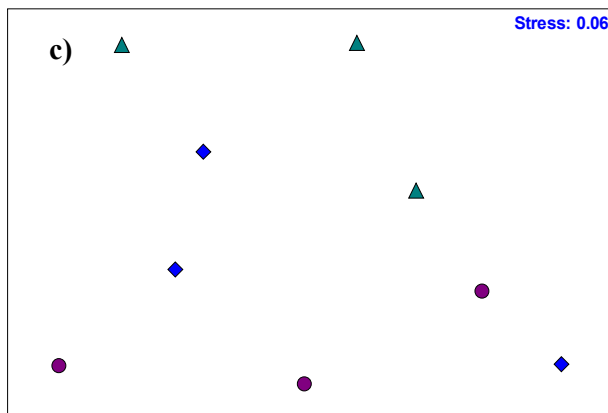
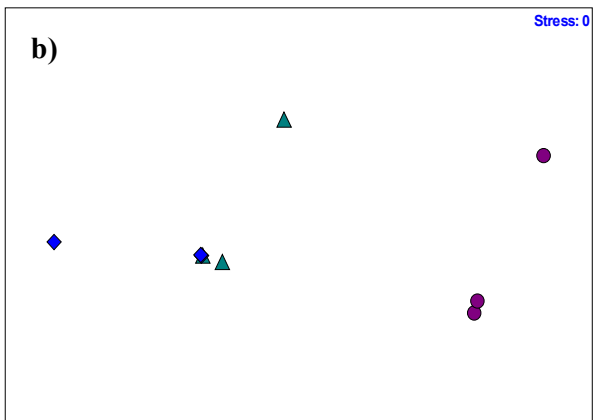
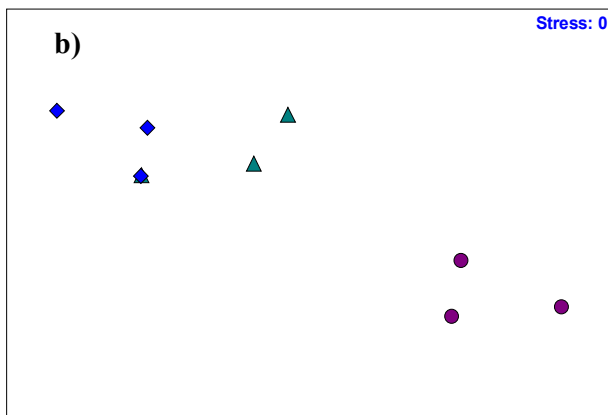
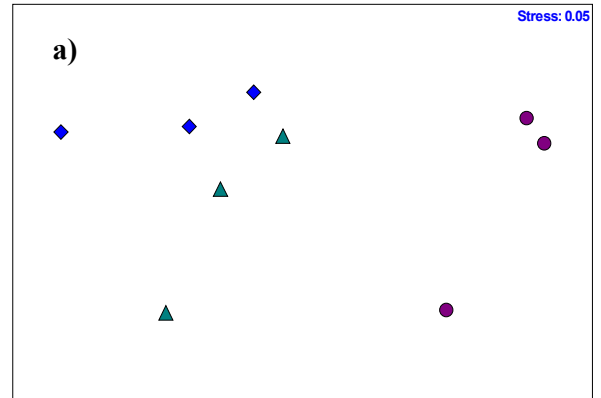
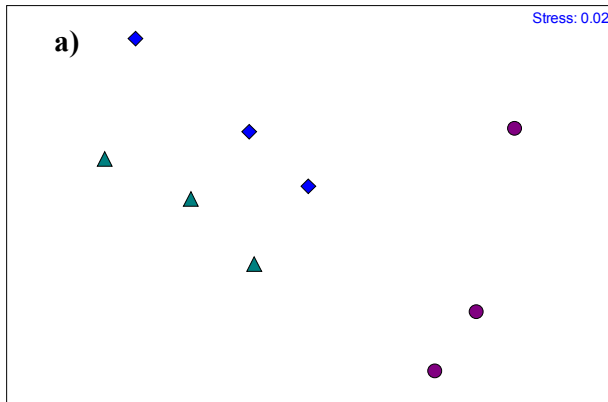


Fig. 10.- Grafica de escala multidimensional no métrica (MDS) basada en el coeficiente de similitud de Bray-Curtis tomando la presencia/ausencia de los OTUs con 1% de verosimilitud. Triángulos (sitio1), rombos (sitio 2) y círculos (sitio 3). a) T-RFs del gen *nifH*; b) T-RFs del gen *nirK*; c) T-RFs del gen *nirS*.

Fig. 11.- Grafica de escala multidimensional (MDS) de los datos de abundancia relativa de los OTUs basados en el coeficiente de similitud de Bray-Curtis con 1% de verosimilitud. Triángulos (sitio1), rombos (sitio 2) y círculos (sitio 3). a) T-RF del gen *nifH*; b) T-RF del gen *nirK*; c) T-RF del gen *nirS*

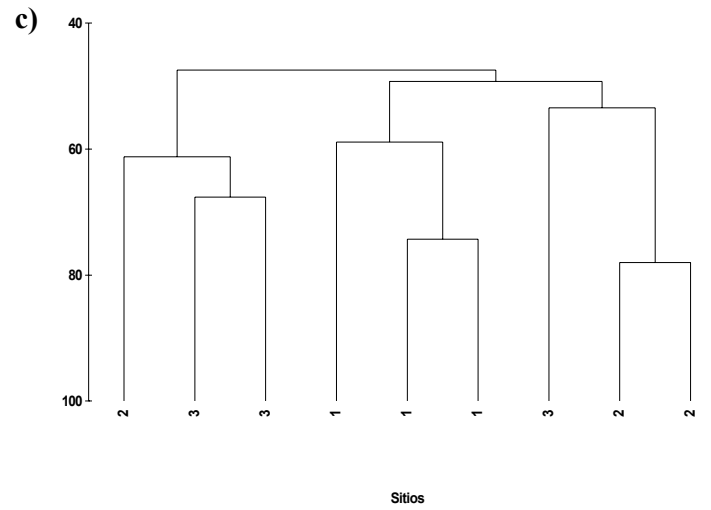
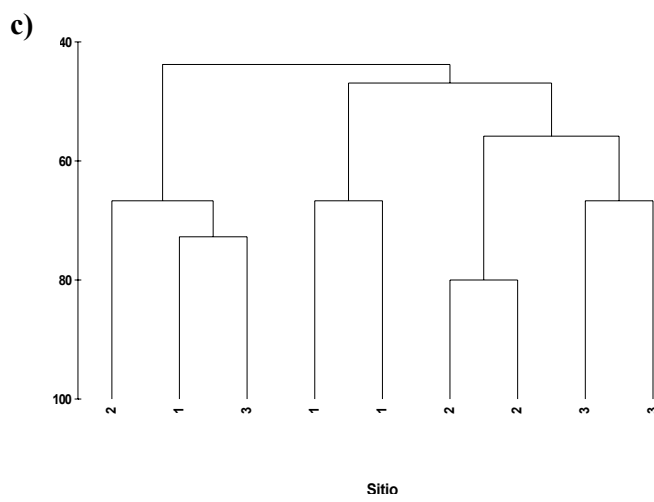
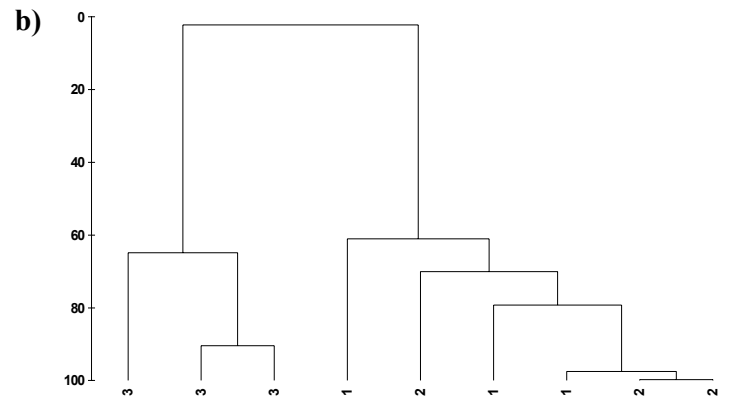
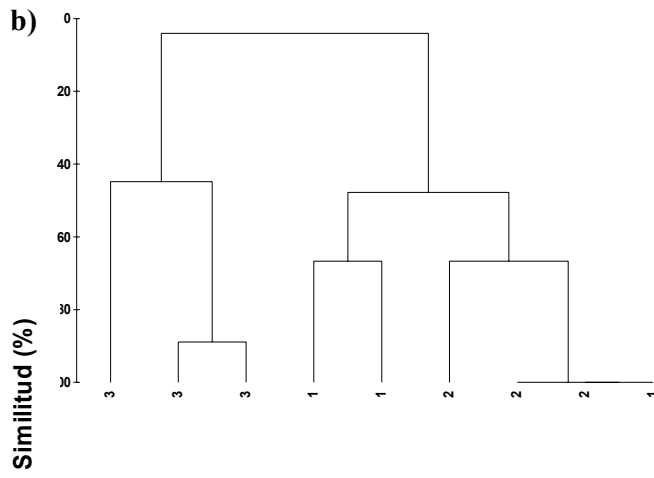
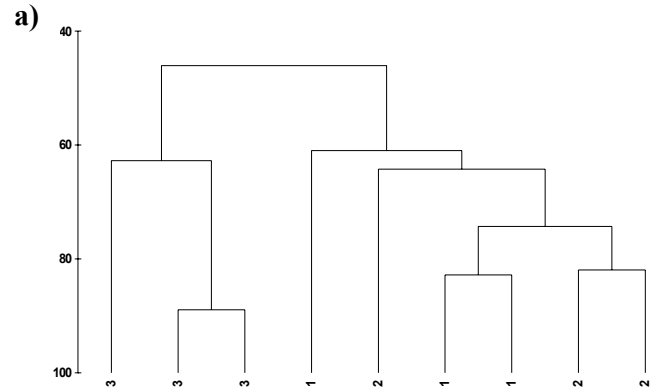
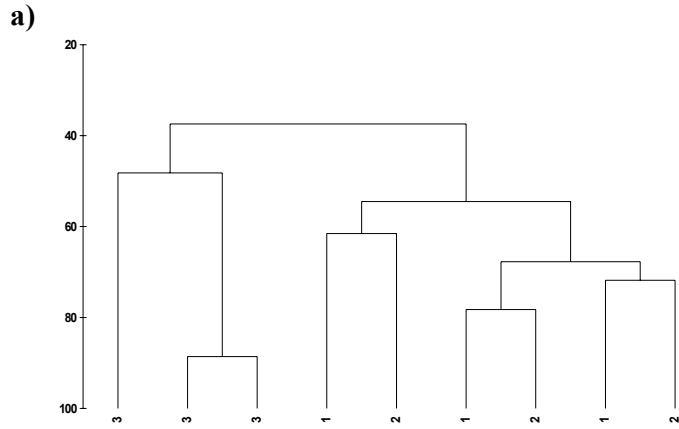


Fig. 12.- Análisis de Grupos de la comunidad de fijadoras de nitrógeno (*nifH*) y desnitrificantes (*nirK* y *nirS*) basado sobre en la presencia/ausencia de los OTUs de cada uno de los sitios de estudio. a) *nifH*; b) *nirK*; c) *nirS*

Fig. 13.- Análisis de Grupos de la comunidad de fijadoras de nitrógeno (*nifH*) y desnitrificantes (*nirK* y *nirS*) basado en la abundancia relativa de los OTUs en los tres sitios de estudio. a) *nifH*; b) *nirK*; c) *nirS*

Las diferencias observadas con los análisis realizados corroboraron los resultados encontrados con el análisis de similitud ANOSIM entre los sitios. Al analizar los OTUs del gen *nifH* de los tres sitios, se obtuvo un R estadística global de 0.802, con un valor de $p < 0.01$, demostrando diferencias notables entre los sitios. Se compararon los sitios en pares, encontrándose una diferencia significativa entre el sitio 1 y 3 y entre el 2 y 3, mientras que entre los sitio 1 y 2 la diferencia fue de 0.407 evidenciando que son más similares entre ellos que con el sitio 3 (Tabla VII).

Para el caso del *nirK* se obtuvo una R global de 0.704 con un valor de $p < 0.01$, presentándose la misma tendencia que para el gen *nifH* ya que se encontraron diferencias significativas entre el sitio 3 y el 1 y entre el sitio 3 y el 2, (el valor de R fue de 1, y $p < 0.01$ en ambos casos). Sin embargo, cuando se realizó la comparación entre el sitio 1 y 2 se obtuvo un valor de R de 0.185 con una $p < 0.002$ indicando que el parecido entre estas zonas es considerable (Tabla VII).

Por el contrario, con el gen *nirS* se encontró un valor de R global de 0.424 con un valor de $p < 0.039$, indicando que la diferencia entre los tres sitios no es tan significativa. Al comparar el sitio 2 con el 1 y el 2 con el 3 no se encontró diferencia significativa con valores de $p < 0.002$ y $p < 0.003$, respectivamente (Tabla VII).

Tabla VII. Análisis de similitud (ANOSIM) de los tres sitios de muestreo siguiendo la aplicación de 1% de verosimilitud. La similitud fue calculada en base a la raíz cuadrática de los datos de cada sitio por 1% verosimilitud, la abundancia relativa fue 1% de verosimilitud. $p < 0.01$ en todos los casos por la comparación de dos en dos.

R estadística de 1% basada en:			
Gen	Sitios a comparar	R estadística de 1% basada en:	
		Presencia/ausencia	Abundancia relativa
<i>nifH</i>	Sitio 1, Sitio 2	0.148	0.407
	Sitio 1, Sitio 3	0.907	1.0
	Sitio 2, Sitio 3	0.852	1.0
<i>nirK</i>	Sitio 1, Sitio 2	0.204	0.185
	Sitio 1, Sitio 3	1.0	1.0
	Sitio 2, Sitio 3	1.0	1.0
<i>nirS</i>	Sitio 1, Sitio 2	0.074	0.333
	Sitio 1, Sitio 3	0.444	0.519
	Sitio 2, Sitio 3	0.019	0.333

8.4.3 Porcentaje de Similitud de los OTU's (SIMPER)

Al realizar el análisis del porcentaje de similitud (SIMPER) para el gen *nifH* basado en la presencia/ausencia de OTUs se encontraron diferencias palpables entre los sitios, observándose que el porcentaje de disimilitud entre el sitio 1 y 2, 1 y 3, y 2 y 3

fue de 39.52%, 62.75 % y 62.38 % respectivamente. Si bien con el análisis basado en la abundancia relativa no se obtuvieron exactamente los mismos valores de porcentaje, sí se observó la misma tendencia entre los sitios 1 y 2, 1 y 3 y 2 y 3 al obtener porcentajes de 34.66 %, 64.78 % y 65.55 %, respectivamente. Esto confirma que el sitio 3 es muy diferente a los otros dos sitios en relación a la comunidad de bacterias fijadoras de nitrógeno; a su vez el sitio 1 y 2 fueron más semejantes entre sí.

Para el gen *nirK* el análisis SIMPER reveló que entre el sitio 1 y 2, 1 y 3, y 2 y 3 los porcentajes de disimilitud fueron 27.30 %, 95.50 %, 100.00 % respectivamente. Al realizar el análisis basado en la abundancia relativa de los OTUs entre los sitio 1 y 2, 1 y 3, y 2 y 3, se obtuvieron porcentajes muy similares a los de presencia/ausencia (23.20 %, 95.56 % y 100 % respectivamente). Estos resultados coinciden con los obtenidos para el gen *nifH*, confirmando que el sitio 3 es el más heterogéneo.

En relación al gen *nirS*, las diferencias no son tan significativas, debido a que los sitios presentan una distribución de OTUs más homogénea. El análisis SIMPER reveló que entre los sitios 1 y 2, 1 y 3, y 2 y 3, el porcentaje de disimilitud fue de 49.90, 52.95, 50.03, respectivamente. De la misma manera, con las abundancias relativas al comparar los sitios 1 y 2, 1 y 3, y 2 y 3, se obtuvieron exactamente los mismos valores que con el análisis anterior (49.90 %, 52.95 % y 50.03 %, respectivamente).

8.4.4 Índice de Dispersión

El índice de dispersión realizado para *nifH* basado en la presencia/ausencia de OTUs para cada sitio, reveló que el sitio 2 presentó mayor variabilidad en los OTUs

dentro del sitio, obteniéndose un valor de 1.1, seguido por el sitio 3 con una heterogeneidad de 1.067; el sitio 1 fue de 0.833. Sin embargo, cuando se tomó en cuenta la abundancia relativa de cada uno de los OTUs de cada sitio, se observó que la mayor variabilidad se presentó en los sitios 1 y 3 con un valor de 1.067, mientras que para el sitio 2 fue de 0.867.

Para *nirK* se observó que el sitio 1 presentó mayor variabilidad entre sus OTUs, con un valor de 1.2, siguiéndole el sitio 3 con un valor de 1.133 y por último el sitio dos con un valor de dispersión de 0.667 cuando se realizó en base a la presencia/ausencia de OTUs. Al mismo tiempo, cuando se analizaron los OTUs conforme a su abundancia relativa, los valores fueron de 0.8, 1 y 1.2 para los sitios 2, 1 y 3, respectivamente.

Paralelamente, en el análisis realizado para *nirS* se observó que para los sitios 1, 2 y 3 los valores de dispersión fueron de 0.867, 1.133 y 1.0 basados en presencia/ausencia de OTUs. De igual manera, conforme a la abundancia relativa se encontró que los valores para los sitios 1, 2 y 3 fueron de 0.733, 1.2 y 1.067, respectivamente. Ambos análisis coinciden que el sitio 2 fue el más heterogéneo.

8.5 Análisis de las secuencias de los clones

8.5.1. Árbol filogenético para las secuencias de *nifH*

Se obtuvieron clones de los genes representativos de fijación de nitrógeno (*nifH*) y desnitrificación (*nirK* y *nirS*), para cada uno de los sitios de estudio. Estos clones, al igual que los fragmentos amplificados para cada uno de los genes de las bacterias aisladas del manglar, fueron secuenciados. Todas las secuencias de los clones como de las cepas aisladas fueron identificados a través de una búsqueda en Blast para los genes *nifH*, *nirK* y *nirS*.

Para el gen *nifH* se obtuvo un total de 65 secuencias para los tres sitios de estudio. Al comparar los nucleótidos de las secuencias de *nifH* con las reportadas se encontró un rango de similitud entre 79% a 96%. Para las secuencias del gen *nirK* se obtuvo un rango de similitud de 81% a 100%; mientras que para el gen *nirS* fue de 79% a 100%. Se realizaron árboles filogenéticos para cada uno de los genes.

Con las secuencias de *nifH* se observó la formación de 8 grupos (I a VIII) (Fig. 14). Estos grupos se congregaron en dos grandes divisiones; en la primera división se situaron los grupos del I al VI, y en la segunda el VII y el VIII.

En la primera división se observó que en el grupo I se agruparon clones del sitio 1 y 2, encontrándose relacionados con la cepa *Aeromonas sp. 7yc* aislada en este trabajo a partir de raíces de mangle, así como a un clon no cultivable de sedimentos del pasto

marino *Spartina alterniflora* (Lovell *et al.* 2001), y a un grupo de proteobacterias gama. El grupo II fue representado por clones de los tres sitios y estos se relacionaron con clones no cultivables de sedimentos de *Spartina alterniflora* (Brown *et al.* 2003; Lovell *et al.* 2001).

En el grupo III se encontraron secuencias de bacterias pertenecientes a los grupos de proteobacterias beta y gama. Dentro del grupo IV se pudieron identificar dos subgrupos: el primer subgrupo representado por secuencias de proteobacterias alfa, mientras que el segundo fue representado por proteobacterias beta y por Frankia (bacterias Gram positivas con alto contenido de GC). Por su parte, en el grupo V se presentaron dos subgrupos: El primer subgrupo presentó dos ramificaciones: en la primera se relacionaron cercanamente secuencias de clones del sitio tres con la secuencia de la cepa aislada en este trabajo *Corynebacterium sp.* 12a, secuencias de clones no cultivables de sedimentos de *Spartina alterniflora* (Brown *et al.* 2003; Lovell *et al.* 2001) y de consorcios de bacterias diazotróficas en sedimentos marino (Decker *et al.* 2002); mientras que la segunda ramificación fue representada por secuencias de clones del sitio 1 secuencias de clones no cultivables de la bahía de Chesapeake (Zhang *et al.*), y de pastos marinos (Bagwell *et al.* 2002).

El segundo subgrupo del grupo V se encontró relacionado con secuencias de clones del sitio 1, con secuencias de clones de sedimentos en pastos marinos (Bagwell *et al.* 2002), secuencias de sedimentos de *Spartina alterniflora* (Lovell *et al.* 2001) y de consorcios de bacterias diazotróficas de sedimentos marinos (Decker *et al.*, 2002). Por otra parte el grupo VI fue representado por secuencias de proteobacterias alfa y delta y por *Clostridium* (bacterias Gram positivas con bajo contenido de GC).

En la segunda división del árbol filogenético se agruparon principalmente los clones obtenidos de los tres sitios (Fig. 14). El grupo VII se representó por secuencias obtenidas de los tres sitios presentándose tres subgrupos: en el primero se agruparon las secuencias de los sitios 1 y 2, mientras que en el segundo subgrupo, a diferencia del anterior, se relacionaron solo secuencias del sitio 3; en el subgrupo 3 se encontró relación entre la secuencia del clon 3H51 y *Desulfovibrio vulgaris*.

En el grupo VIII se obtuvieron dos subgrupos principales: el primero representado por varias de las cepas aisladas del manglar y secuencias de clones de los sitios 1 y 2, mientras que en el subgrupo II se encontraron clones de los tres sitios. Las secuencias de dos cepas de *Pseudomonas*, 6a y 6b, aisladas del manglar, al igual que algunas secuencias de los sitios 1 y 2, no se relacionaron con ninguno de los grupos ramificándose independientemente. Es importante notar que este análisis revela que hubieron diferencias entre las secuencias obtenidas de cada sitio, haciéndose notar que las secuencias del sitio 1 y 2 se relacionaron principalmente entre ellas formando subgrupos en el árbol. Por otra parte, solo algunas secuencias del sitio 3 estuvieron cercanamente relacionadas con las secuencias de los sitios 1 y 2; mientras que la mayoría de las secuencias del sitio 3 se agruparon entre ellas.

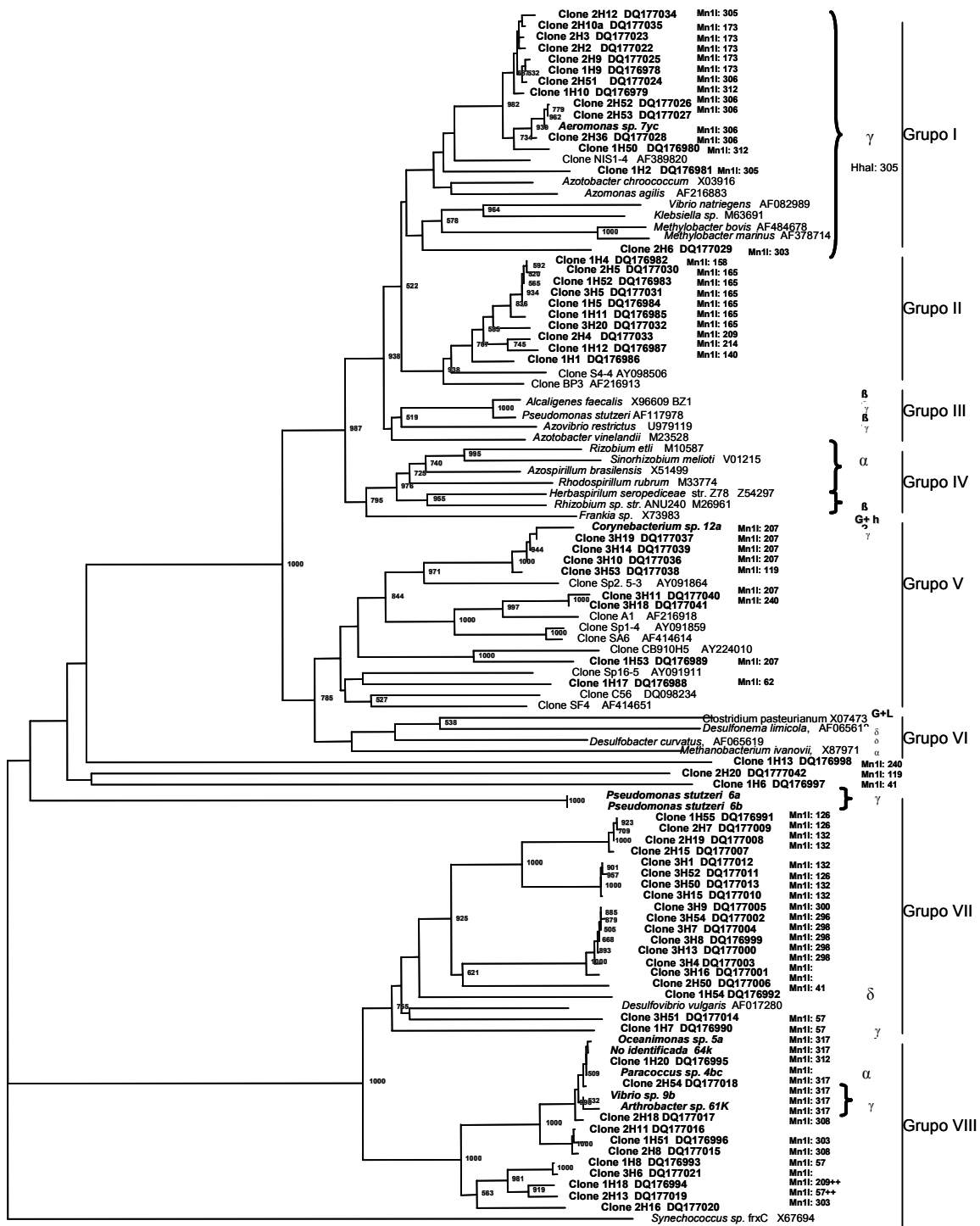


Fig. 14. Árbol filogenético del gen *nifH* basado en la secuencia de nucleótidos usando 63 secuencias parciales clonadas de 680 pb obtenidas de los tres sitios de estudio. Estas secuencias se compararon con 33 secuencias reportadas en el Genbank. Se utilizó como grupo fuera la secuencia de *Synechococcus sp. fxC* (X67694). El árbol fue construido con el método Neighbor-joining. Las secuencias resaltadas en negro son las secuencias obtenidas en este análisis. Los clones fueron denotados conforme al sitio donde se encontraron: Sitio 1 = 1H; Sitio 2 = 2H; Sitio 3 = 3H. Los números de las ramificaciones indican las ocurrencias de cada respectivo nodo en un análisis de bootstrap con 1000 intentos. Los valores que se muestran fueron los que se obtuvieron en más de 500 intentos. La escala representa 10 mutaciones por cada 100 posiciones de nucleótidos. G+H y G+L denominan bacterias gram positivas, la primera indica alto contenido de GC y la segunda bajo contenido.

8.5.2 Árbol filogenético para las secuencias de nirK

El árbol filogenético de las secuencias de *nirK* generó 9 grupos (I a IX) (Fig. 15). Tanto en el grupo I como en el IX se encontraron secuencias de proteobacterias alfa, beta, gama y secuencias de clones no cultivables obtenidos de un sistema de tratamiento de aguas residuales (Yoshie et al. 2004), de blooms de cianobacterias en el mar Báltico y de suelos de marismas (Priemé et al. 2002).

El grupo II esta representado por dos subgrupos: en el primero se agruparon secuencias de clones obtenidos de los tres sitios, mientras que en el subgrupo dos se agruparon secuencias del sitio tres con la secuencia de la cepa *Arthrobacter sp.* 61K aislada en este trabajo. En el grupo III se agrupó una secuencia obtenida del sitio 2 con la secuencia de *Blastobacter desnitrificans*.

En el grupo IV se relacionaron secuencias del sitio 3 y una del sitio 2. Por otra parte, se encontró que el grupo V fue el grupo más grande de todos presentándose dentro de éste varios subgrupos en los cuales se encontraron relacionadas secuencias de clones obtenidas de los tres sitios con secuencias de las cepas aisladas en este trabajo.

En el grupo VII se observó que secuencias de los sitios 2 y 3 se relacionaron con la cepa *Paracoccus sp.* 4bc aislada en este trabajo. Por su parte, el grupo VI fue representado por secuencias del sitio 3. En el grupo VII se relaciono una secuencia del sitio 2 con la secuencia de la cepa 64k aislada en este trabajo y que no ha sido identificada.

El grupo VIII fue representado por secuencias de clones del sitio 2, por secuencias de clones no cultivables obtenidos de aguas contaminadas con uranio y nitratos (Yan *et al.* 2003) y por secuencias de clones obtenidos de suelos de campos agrícolas (Tröback *et al.* 2004). Se encontraron varias secuencias de clones de los sitios 1 y 2 que no se integraron a ningún grupo y se separaron por ramificaciones en el mismo árbol.

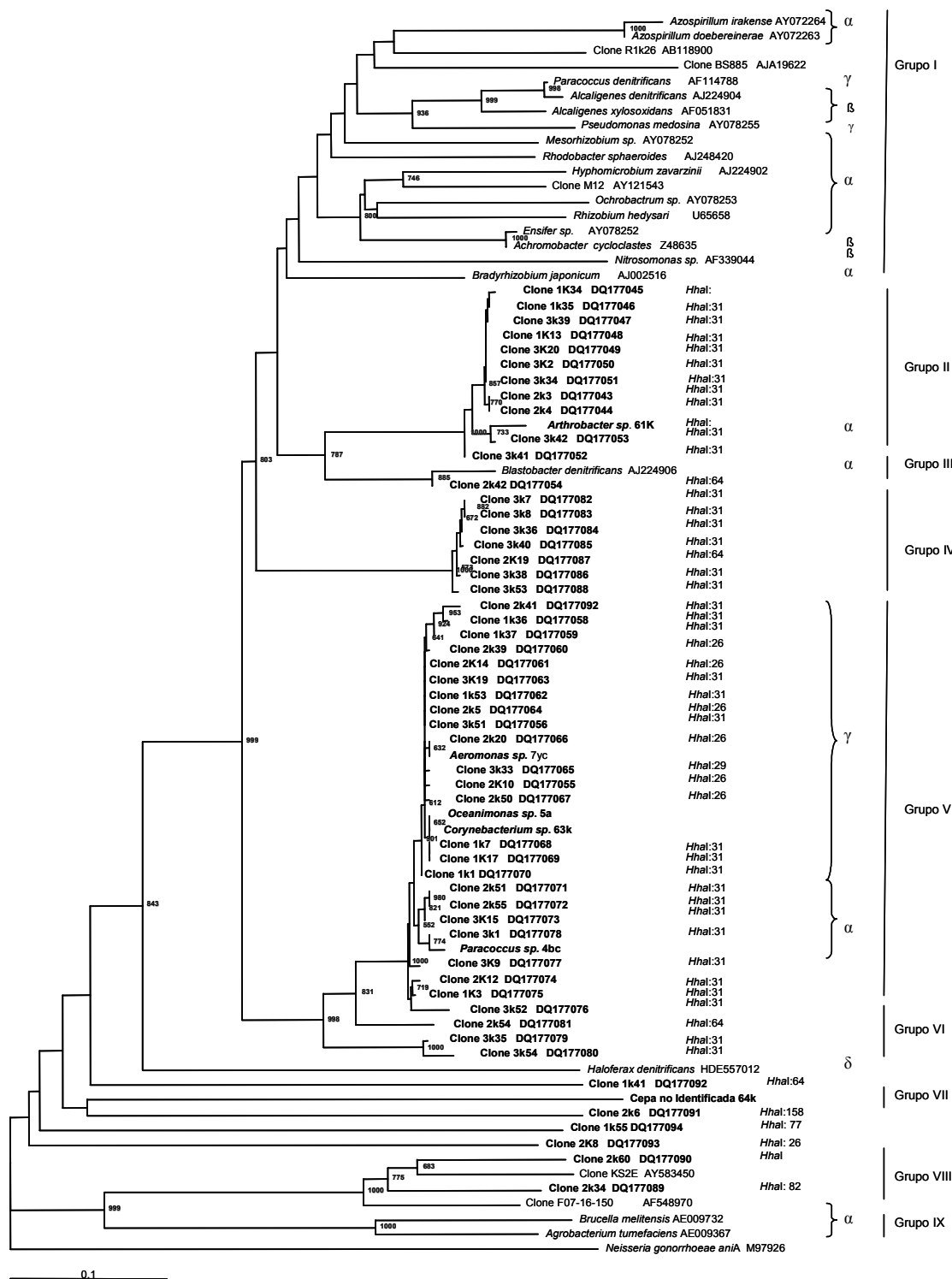


Fig. 15. Árbol filogenético del gen *nirK* basado en la secuencia de nucleótidos usando 51 secuencias parciales y clonadas de 404 pb obtenidas de los sitios de estudio. Se compararon con 24 secuencias reportadas en el Genbank y secuencias de cepas fijadoras de N₂ y desnitrificantes aisladas del manglar. Los clones fueron denotados conforme al sitio donde se encontraron: Sitio 1 = 1k; Sitio 2 = 2k; Sitio 3 = 3k. Se utilizó como grupo fuera la secuencia de *Neisseria gonorrhoeae aniA* (M97926). El árbol fue construido con el método Neighbor-joining. Las secuencias resaltadas con negro fueron las obtenidas en este estudio. Los números de las ramificaciones indican las ocurrencias de cada respectivo nodo en un análisis de bootstrap con 1000 intentos. Los valores mostrados fueron los que se obtuvieron en más de 500 intentos. La escala representa 10 mutaciones por cada 100 posiciones de nucleótidos.

8.5.3 Árbol filogenético para las secuencias nirS

Las secuencias obtenidas del gen *nirS* generaron un árbol filogenético constituido por 12 grupos (I a XII) (Fig. 16). Se observó que los grupos I y II estuvieron representados por secuencias obtenidas de los sitios 1 y 2; las secuencias del grupo I se relacionaron con la cepa *Corynebacterium sp.* 12a aislada en este trabajo. El grupo III estuvo integrado por secuencias de clones obtenidas de sedimento marino deficiente en oxígeno (Liu *et al.* 2003). El grupo IV estuvo representado por secuencias de clones de los sitios 2 y 3. Por otra parte, el grupo V se relacionó con secuencias de clones obtenidas de aguas contaminadas con nitratos y uranio (Yan *et al.* 2003), así como de clones de sedimentos marinos deficientes en oxígeno (Lui *et al.* 2003) y secuencias de proteobacterias alfa. Por su parte, en el grupo VI se agruparon solo secuencias del sitio 3. El grupo VII fue representado por secuencias de clones de humedales (Priemé *et al.* 2002).

El grupo VIII fue integrado por secuencias de proteobacterias beta y gama; mientras que en el grupo IX se relacionaron secuencias de proteobacterias alfa y beta con una secuencia de un clon obtenida de aguas contaminadas con uranio y nitratos (Yan *et al.* 2003). Los grupos X, XI y XII fueron representados por las secuencias de clones obtenidas en este estudio. Cabe mencionar que en el grupo X se relacionaron solo secuencias de los sitios 1 y 2; en el grupo XI fueron de los tres sitios; mientras que el grupo XII estuvo representado por secuencias de los sitios 2 y 3.

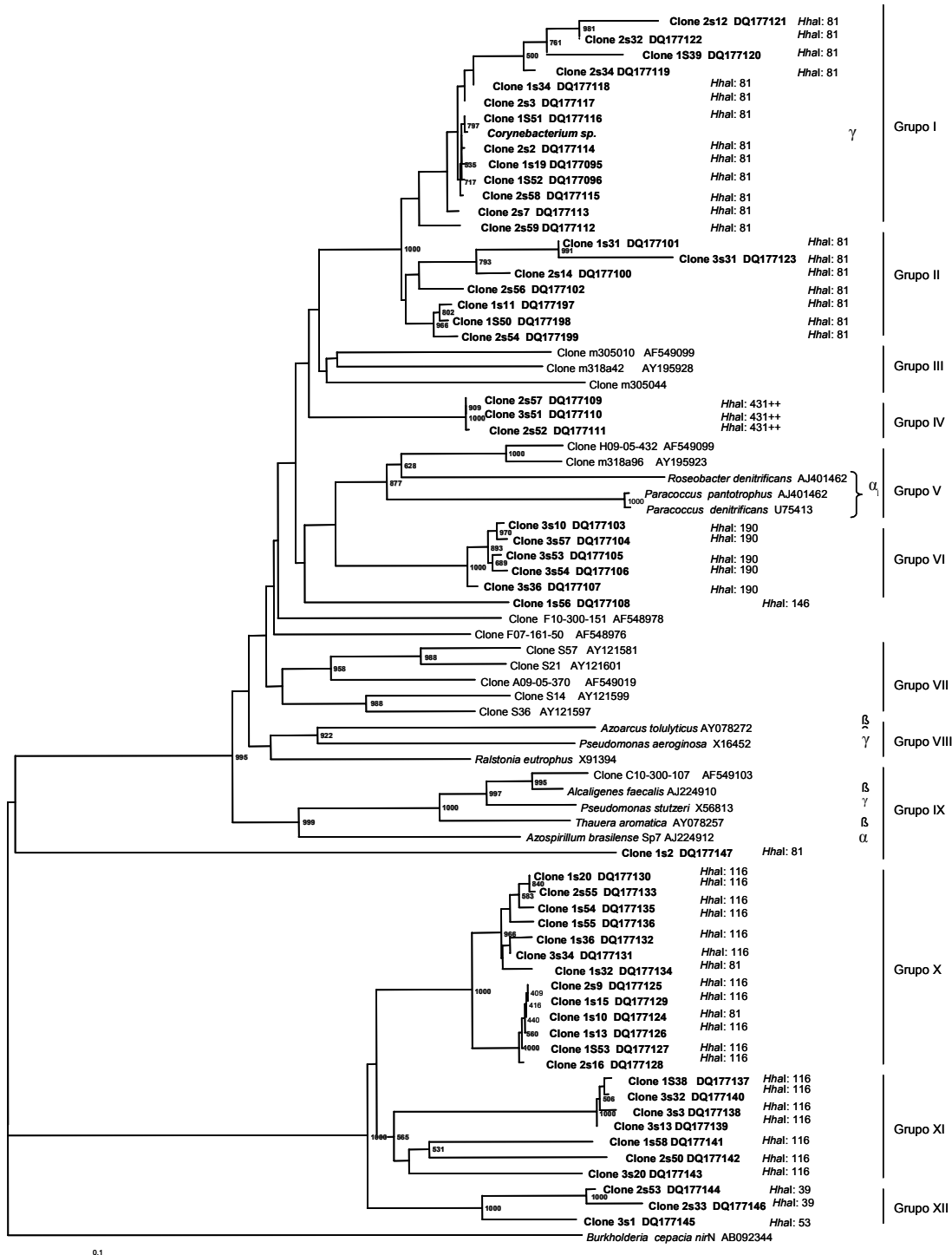


Fig. 16. Árbol filogenético del gen *nirS* basado en la secuencia de nucleótidos usando 53 secuencias parciales y clonadas de 660 pb obtenidas de los sitios de estudio. Los clones fueron denotados conforme al sitio donde se encontraron: Sitio 1 = 1S; Sitio 2 = 2S; Sitio 3 = 3S. Los clones se compararon con 23 secuencias reportadas en el Genbank y con la secuencia obtenida de una cepa aislada en este trabajo. Se utilizo como grupo fuera la secuencia de *Burkholderia cepacia nirA* (AB092344). El árbol fue construido con el método Neighbor-joining. Las secuencias resaltadas con negro fueron las obtenidas en este estudio. Los números de las ramificaciones indican las ocurrencias de cada respectivo nodo en un análisis de bootstrap con 1000 intentos. Los valores que se mostraron fueron los que se obtuvieron en más de 500 intentos. La escala (0.1) representa 10 mutaciones por cada 100 posiciones de nucleótidos.

8.6 Amplificación de los genes *nifH*, *nirK* y *nirS* de las cepas aisladas de raíces del mangle.

Después de llevar a cabo el aislamiento de las cepas diazotróficas y desnitrificantes a partir de raíces de mangle, se realizó PCR colonial a cada uno de las cepas aisladas con el fin de determinar si presentaban los genes de interés.

Se encontró que las cepas 6a, 6b, 7yc, 4bc, 5a, 12a, 9b, 61k, 63k y 64k presentaron el gen de la dinitrogenasa (*nifH*) (Fig. 6). Las cepas que presentaron el gen *nirK* (la nitrito reductasa con Cu) fueron la 61k, la 63k, la 64k, la 5a, la 4bc y la 7yc (Fig. 7). De todas las cepas aisladas solo la cepa 12a presentó el gen *nirS* (la nitrito reductasa con citocromo cd1) (Fig. 8). Es interesante notar que las cepas 7yc, 4bc, 5a, 61k, 63k, 64k y 12a presentaron tanto el gen *nifH* como alguno de los genes *nir* (Tabla IV).

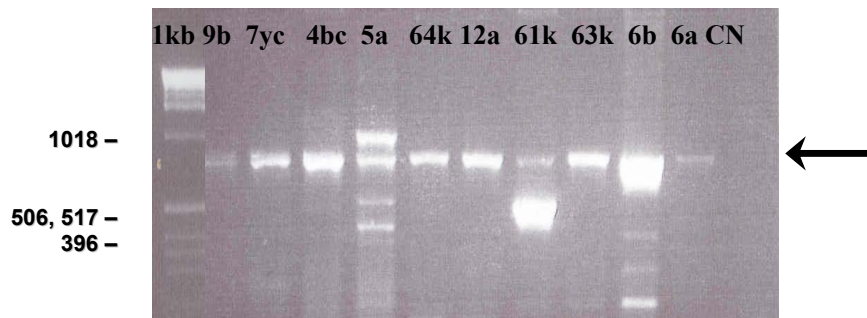


Fig.6.- Electroforesis en gel de los productos de PCR del gen *nifH* de las cepas aisladas de raíces del mangle.

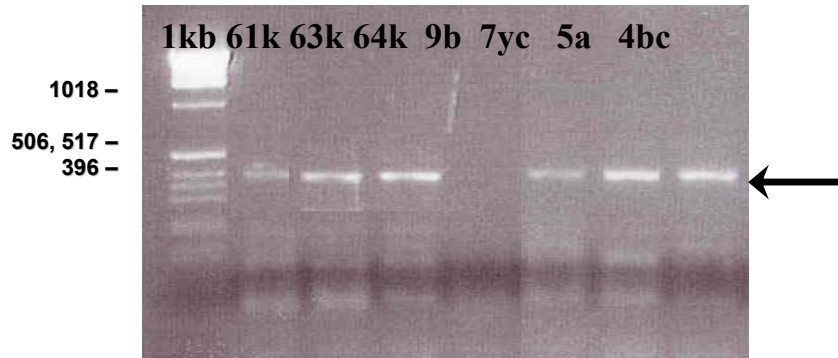


Fig.7. Electroforesis en gel de azarosa de los productos de amplificación del gen *nirK* de las cepas aisladas de la raíces del mangle.

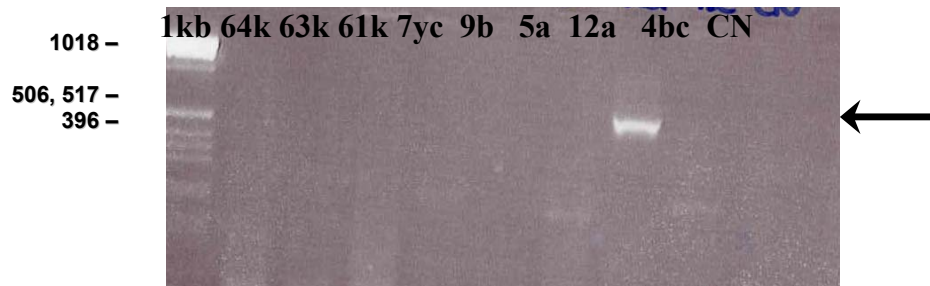


Fig. 8. Amplificación del gen *nirS* de las cepas aisladas del manglar.

Tabla IX.- Amplificación de los genes de *nifH*, *nirK* y *nirS* en las diferentes cepas de estudio.

Cepas	Genes		
	<i>nifH</i>	<i>nirK</i>	<i>nirS</i>
<i>Vibrio sp. 9b</i>	X	X	
<i>Arthrobacter sp. 61k</i>	X	X	
<i>Corynebacterium sp. 63k</i>	X	X	
No identificada 64k	X	X	
<i>Corynebacterium sp. 12a</i>	X		X
<i>Oceanomonas sp. 5a</i>	X	X	
<i>Paracoccus sp. 4bc</i>	X	X	
<i>Aeromonas sp.</i>	X	X	
<i>Pseudomonas sp. 6a</i>	X		
<i>Pseudomonas sp. 6b</i>	X		

8.7 Evaluar la capacidad de las cepas para producir acilo-homoserina lactonas.

8.7.1 Determinar el medio de cultivo a utilizar

Las cepas se crecieron en el medio mínimo HGB (Holguin *et al.* 1992) para evaluar su capacidad de producir las moléculas señal acilo homoserinas lactonas, encontrándose que todas las cepas de estudio produjeron estas moléculas al crecerlas en este medio.

Se decidió evaluar la producción de AHLs por parte de las cepas utilizando diferentes fuentes de carbono. Se utilizaron 3 diferentes tratamientos, el primero fue el medio HGB con glucosa al 0.5%, el segundo fue con glicerol 0.15% y el último con glicerol al 0.25%.

Se encontró que las cepas presentaron diferentes comportamientos tanto en la producción de AHLs así como en su crecimiento. Los resultados sugiere que la densidad óptica (O.D.) y la producción AHLs se vió mejor representada cuando *Vibrio sp.* 9b, y la cepa 64k (no identificada) se crecieron en glicerol al 0.15% (fig. 17).

Por otra parte, las cepas *Arthrobacter sp.* 61k, *Corynebacterium sp.* 63k crecieron de manera similar en el medio con glucosa 0.5% y con glicerol al 0.15% siendo la producción de AHLs semejante en ambos medios. Mientras que las cepas *Paracoccus sp.* 4bc, y *Pseudomonas sp.* 6a y 6b presentaron un crecimiento similar en los tres tratamientos con mayor producción de AHLs cuando se crecieron con glicerol al 0.15% (fig. 17).

Oceanomomas sp. 5a presentó la misma densidad celular al crecerse con glicerol o con glucosa, pero se observó que la producción de AHLs fue ligeramente mayor en se observó con 0.25% de glicerol. A pesar de que *Aeromonas sp.* 7yc presentó un crecimiento menor ($D.O_{600}$ aprox. 0.5) con glucosa y con glicerol al 0.25%, se observó una mayor respuesta en la producción de AHLs en glicerol al 0.15%. Por medio de estos resultados pareciera que las bacterias responden mejor en cuanto a la producción de AHLs cuando se encuentra bajo estrés nutricional. Sin embargo, se necesita hacer más estudios con otras fuentes de carbono (fig. 17).

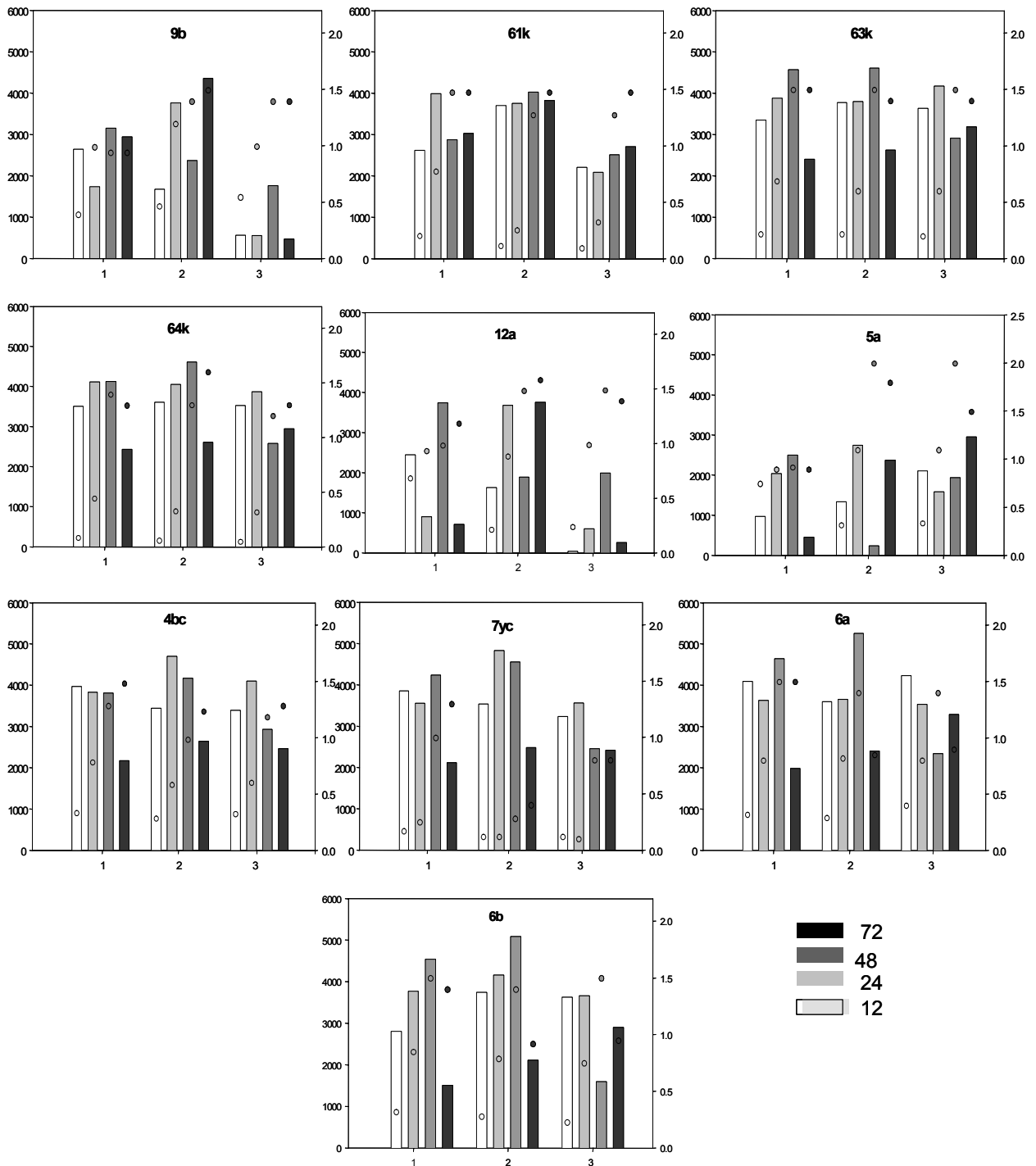


Fig. 17.- Cuantificación de la producción de AHLs por parte de las cepas. Las cepas se crecieron en medio HGB con extracto de levadura conteniendo diferentes fuentes de carbono: 1) glucosa al 0.5%, 2) glicerol al 0.15% y 3) glicerol al 0.25%. En el eje X se ubican las diferentes fuentes de carbono. En el Eje Y de la izquierda se expresa la concentración picomolar de de AHLs presente en los sobrenadantes de los

cultivos. En el eje Y de la derecha se expresa con círculos es la densidad óptica del cultivo (600 nm) tomada a las 12,24, 48 Y 72 horas de incubación. El sombreado en las barras indica las horas de crecimiento del cultivo.

Cultivos mixtos

Una vez demostrada la capacidad de producir AHLs por parte de las cepas, se realizaron experimentos con cultivos mixtos mezclando las cepas en pares y se evaluó su crecimiento y producción de AHLs en conjunto. Para estos experimentos se crecieron las cepas en el medio HGB con glicerol al 0.15% como fuente de carbono suplementado con los elementos traza que se encuentran en el agua de mar [(mg/100ml) $MnCl_2 \cdot 4H_2O$ 80mg, $CoCl_2 \cdot 6H_2O$ 5mg, $NiCl_2 \cdot 6H_2O$ 20mg, $ZnCl_2$ 60mg, $Na_2MoO_4 \cdot 2H_2O$ 75mg, KI 80mg, $BaCl_2 \cdot 2H_2O$ 50mg]. Experimentos anteriores en nuestro grupo han demostrado que al crecerse las cepas en cultivo mixto las propiedades promotoras del crecimiento vegetal de las cepas se magnifican, y en ocasiones se anulan. Tomando en cuenta esos antecedentes es probable que la producción de AHLs, por parte de las cepas se altere al interactuar las cepas entre sí, por lo que se decidió evaluar la producción de AHLs creciendo las cepas en cultivos mixtos, esperando encontrar tanto relaciones sinérgicas como antagónicas.

Cuando se combinó la cepa *Vibrio sp.* 9b con las otras cepas no se observaron diferencias en la de AHLs entre los diferentes tratamientos, debido a que por sí sola la cepa tiene una producción alta de AHLs (4.5 nanoM/ml) (Fig. 18A- a); se observó que el antagonismo mas fuerte fue cuando se combino *Vibrio sp.* 9b con la cepa 64k que presenta una concentración de aprox. 50 picomolar/ml (Fig. 18A- d), presentando juntas una concentración de 2 nanomolar/ml. Sin embargo, cuando se creció *Vibrio sp.* 9b con la cepa 6a (la cepa 6a cultivada sola presenta una concentración de aprox. 50

picomolar/ml) (Fig 18B- i), la concentración de AHL aumentó a casi los 6 nanomolar/ml (Fig. 18A- a).

Los sinergismos más drásticos en cuanto a producción de AHLs se encontraron con las combinaciones de *Paracoccus sp.* 4bc con *Arthrobacter sp.* 61k y con *Pseudomonas sp.* 6b: *Paracoccus sp.* 4bc produjo alrededor de 74 picomolar/ml; mientras que *Arthrobacter sp.* 61k y *Pseudomonas sp.* 6b produjeron por si solas una concentración de aprox. 34 y 36 picomolar/ml respectivamente. Sin embargo, al combinar *Paracoccus sp.* 4bc con *Arthrobacter sp.* 61k se encontró una concentración de 2.5 nanomolar/ml y al combinar *Paracoccus sp.* 4bc con *Pseudomonas sp.* 6a la concentración de AHLs fue de 1.7 nanomolar/ml (Fig. 18A-g). Asimismo, la producción de AHLs de *Oceanomonas sp.* 5a al crecerse sola es de 55 picomolar/ml y al combinarse con *Pseudomonas sp.* 6b la concentración de AHLs se incrementó hasta 838 picomolar/ml. La absorbancia de los cultivos en todos los casos fue similar. En las demás combinaciones no se observaron diferencias en la concentración de AHLs al comparar cultivos puros con cultivos mixtos (Fig. 18A y B).

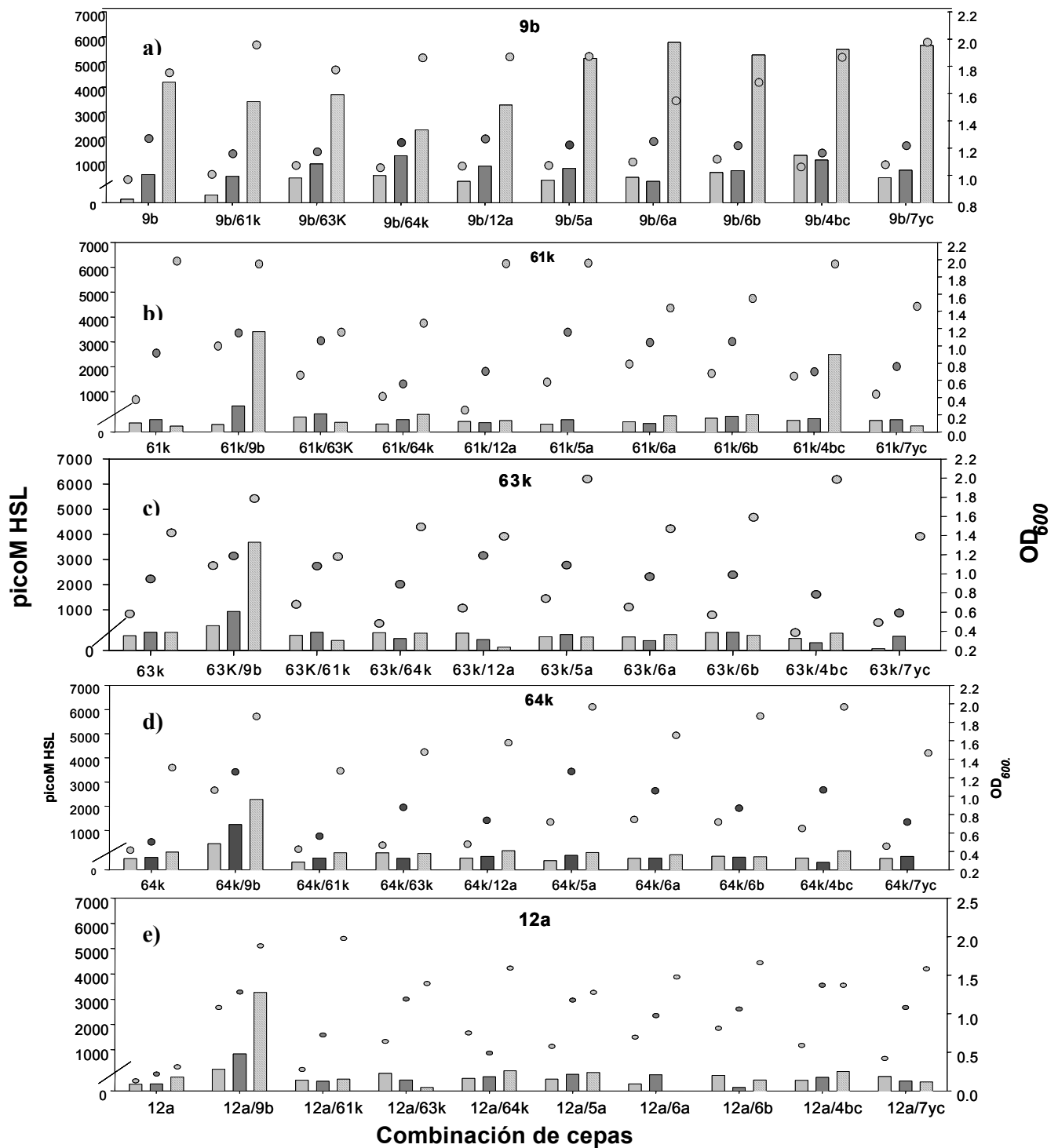


Fig.18A. Concentración de AHLs en los sobrenadantes de los cultivos al crecer en cultivo puro o mezclas las cepas de estudio en medio HGB con extracto de levadura y con glicerol 0.15% como

fuelle de carbono. En el eje x se muestran las combinaciones realizadas y en el Eje Y se muestra la concentración de AHLs en picomoles/ml. En el eje Y derecho se muestra la absorbancia (600 nm). El color gris claro en las barras y círculos representa 12h de crecimiento, el color gris oscuro 24h y el relleno rayado 48 h. Cepas en combinación con a) 9b, b) 61k, c) 63k, d) 64k, e) 12a.

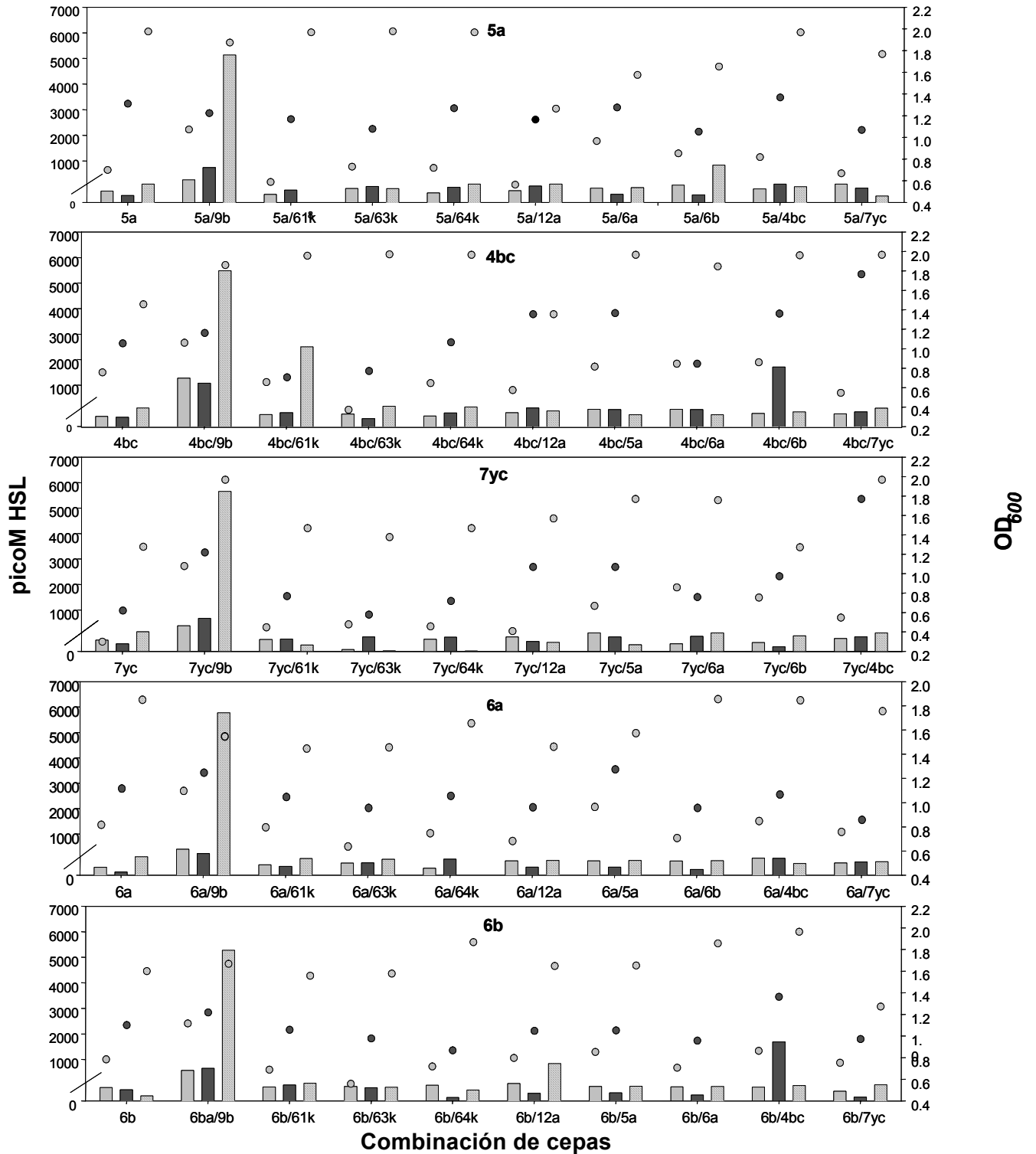


Fig. 18B.- Concentración de AHLs en los sobrenadantes de los cultivos al crecer en cultivo puro o mezcladas las cepas de estudio en medio HGB con extracto de levadura y con glicerol 0.15% como fuente de carbono. En el eje x se muestran las combinaciones realizadas y en el Eje Y se muestra la concentración de AHLs en picomoles/ml. En el eje Y derecho se muestra la absorbancia (600 nm). El color gris claro en las barras y círculos representa 12h de crecimiento, el color gris oscuro 24h y el relleno rayado 48 h. Cepas en combinación con f) 5a, g) 4bc, h) 7yc, i) 6a y j) 6b.

El medio HGB tiene como uno de los componentes extracto de levadura 0.1g/L, que le sirve a las bacterias como vitaminas y fuente de aminoácidos. De acuerdo con la (Eberhard, 2005, platica personal) el extracto de levadura contiene unas moléculas denominadas dicetopiperazinas, las cuales pueden inhibir o activar la producción de AHLs (Whitehead, *et al.* 2001). Por esta razón, se decidió evaluar la producción de AHLs por parte de las cepas cultivándolas en el medio HGB sin extracto de levadura. Aunado a esto, se quiso averiguar si el estrés nutricional inducido por la omisión del extracto de levadura en el medio alteraría la producción de AHLs por parte de las cepas.

Los resultados que se observaron fueron bastante interesantes. En primer lugar la cepa *Vibrio sp.* 9b que siempre se había destacado por producir abundantes cantidades de AHLs (alrededor de 4.5 nanomolar/ml) al crecerla sin extracto de levadura la concentración de AHLs disminuyó hasta 1.3 nanomolar/ml (19A-a). Adicionalmente, se observaron sinergismos al combinar *Vibrio sp.* 9b con las cepas *Arthrobacter sp.* 61k (19A-b) y *Pseudomonas sp.* 6b (19B-j): estas dos últimas cepas presentaron una concentración de AHLs de 23 y 158 picomolar/ml, respectivamente. Sin embargo, al combinar *Vibrio sp.* 9b con *Arthrobacter sp.* 61k la concentración de AHLs se incrementó hasta 5.3 nanomolar/ml y hasta 3.1 nanomolar/ml cuando se combinó con *Pseudomonas sp.* 6b (19A-a). Las combinaciones de *Vibrio sp.* 9b con las demás cepas presentaron antagonismos exhibiendo disminuciones drásticas en la concentración de AHLs que van desde 47 a 1190 picomoles/ml.

Otros resultados interesantes se obtuvieron con las cepas *Pseudomonas sp.* 6a (19B-i), *Aeromonas sp.* 7yc (19B-h) y *Paracoccus sp.* 4bc (19B-g): de presentar concentraciones de AHLs en el medio HGB con extracto de levadura de 78, 142 y 74 picomoles/ml respectivamente, y con el medio HGB sin extracto de levadura se incrementó hasta 4.8, 3.6 y 2.5 nanomoles/ml respectivamente.

Otros sinergismos sobresalientes fueron los observados al combinar la cepa *Corynebacterium sp.* 63k con las cepas *Pseudomonas sp.* 6a y 6b. *Corynebacterium sp.* 63k presentó una producción de AHLs de 354 picomoles/ml, mientras que *Pseudomonas sp.* 6a y 6b de 4.8 y 158 picomoles/ml respectivamente. A pesar de que *Pseudomonas sp.* 6a presentó una concentración elevada de AHLs al crecerse sola, la producción de AHLs se incrementó drásticamente cuando se combinó con *Corynebacterium sp.* 63k alcanzando hasta los 11.6 nanomoles/ml. Cuando se combinó *Corynebacterium sp.* 63k con *Pseudomonas sp.* 6b la concentración de AHLs se incrementó hasta 6.2 nanomoles/ml (Fig. 19A-c)

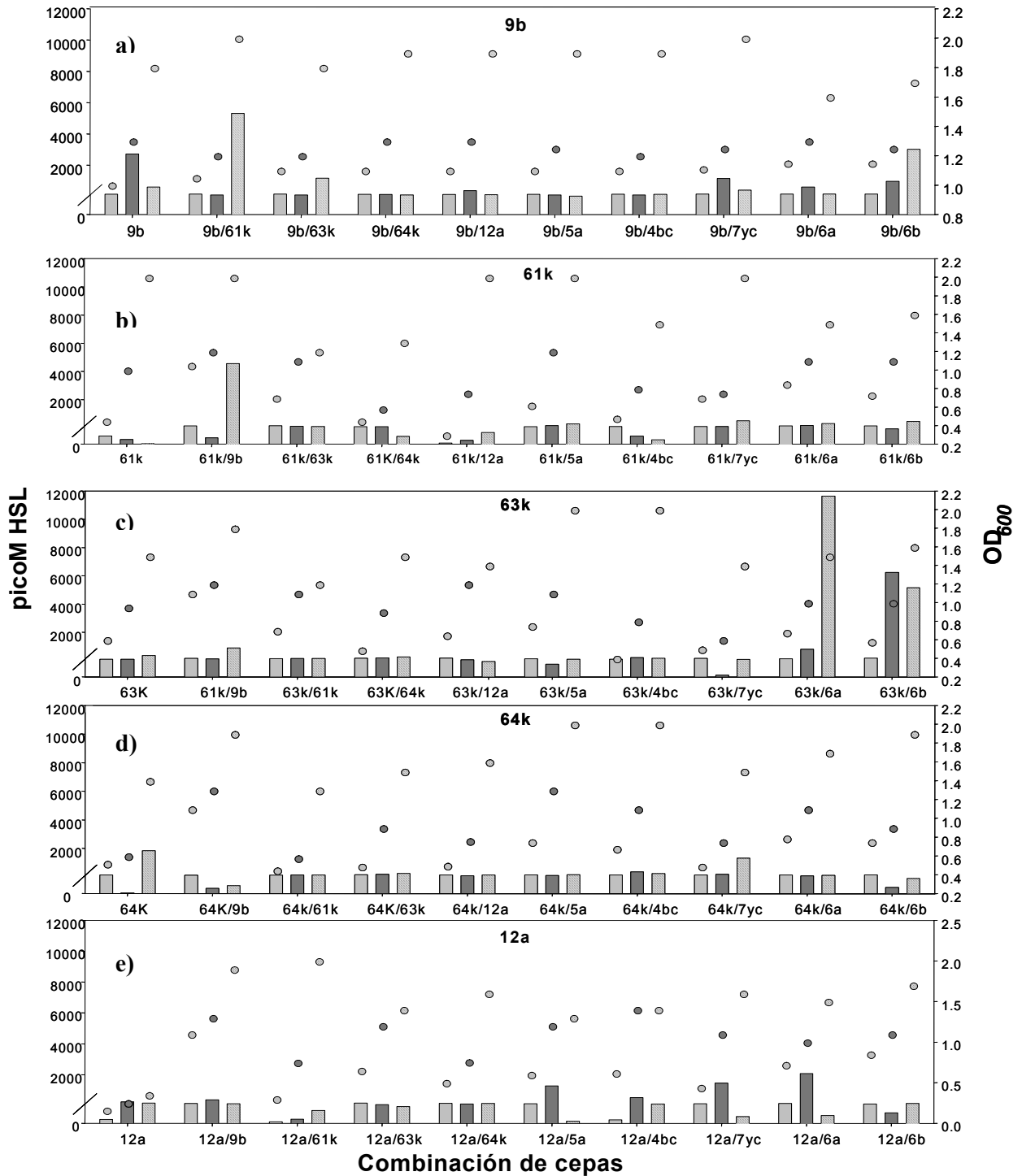


Fig.19A. Concentración de AHLs en los sobrenadantes de los cultivos al crecer en cultivo puro o mezclas las cepas de estudio en medio HGB sin extracto de levadura y con glicerol 0.15% como

fuelle de carbono. En el eje x se muestran las combinaciones realizadas y en el Eje Y se muestra la concentración de AHLs en picomoles/ml. En el eje Y derecho se muestra la absorbancia (600 nm). El color gris claro enas barras y círculos representa 12h de crecimiento, el color gris oscuro 24h y el relleno rayado 48 h. Cepas en combinación con a) 9b, b) 61k, c) 63k, d) 64k, e) 12a.

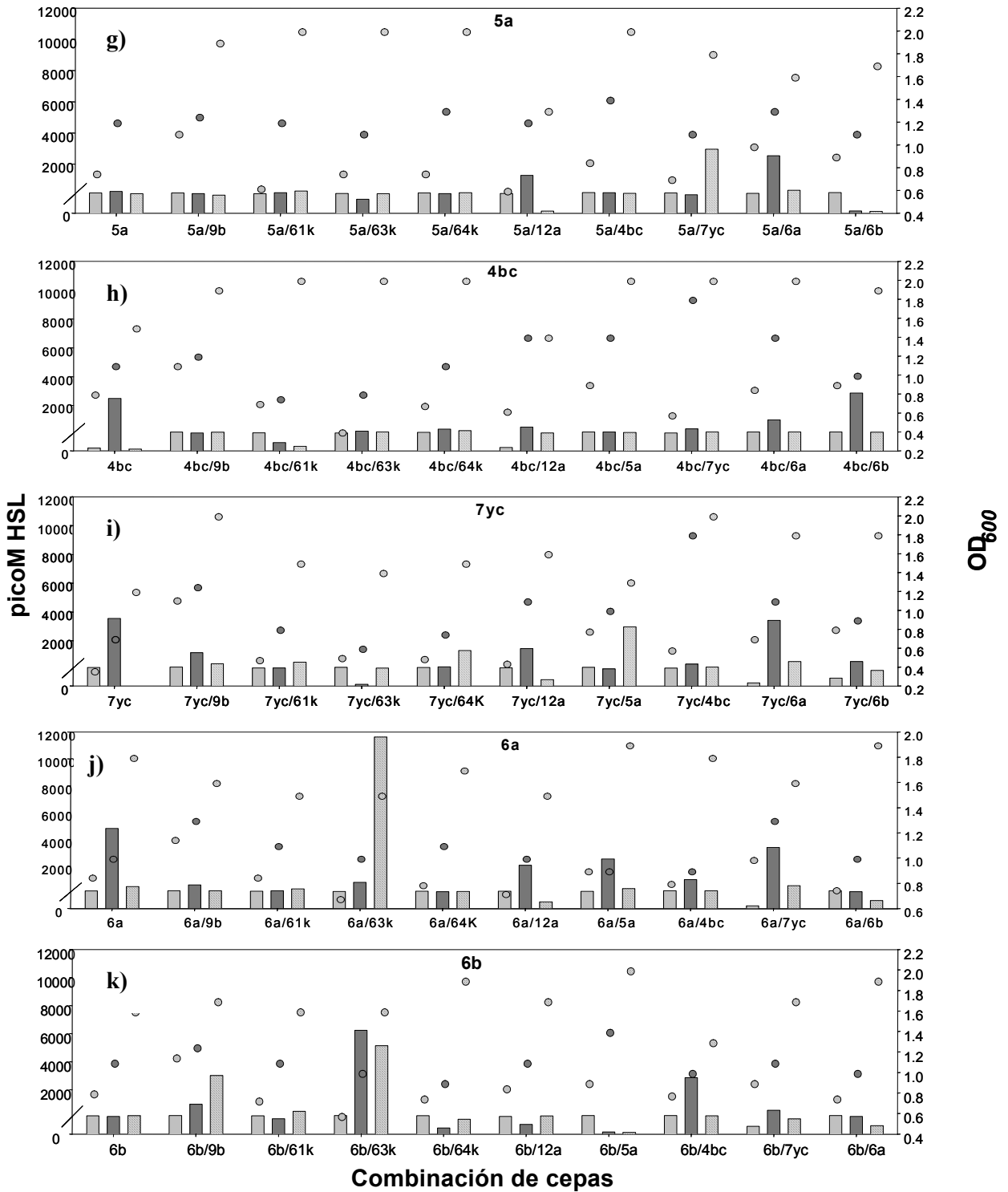


Fig.19B. Concentración de AHLs en los sobrenadantes de los cultivos al crecer en cultivo puro o mezcladas las cepas de estudio en medio HGB sin extracto de levadura y con glicerol 0.15% como fuente de carbono. En el eje x se muestran las combinaciones realizadas y en el Eje Y se muestra la concentración de AHLs en picomoles/ml. En el eje Y derecho se muestra la absorbancia (600 nm). El color gris claro en las barras y círculos representa 12h de crecimiento, el color gris oscuro 24h y el relleno rayado 48 h. Cepas en combinación con. f) 5a, g) 4bc, h) 7yc, i) 6a y j) 6b.

8.8 Caracterizar los tipos de molécula señal que producen las cepas de estudio.

Vibrio sp. 9b fue la única cepa que se le caracterizó los tipos de molécula señal. Se determinó la producción de tres tipos que son la acilo homoserina lactona de C4-HL (Fig. 20), C6-HL (Fig. 21) y C8-HL (Fig. 22). Para la obtención de las moléculas señal esta cepa se creció en con medio HGB con glicerol al 50% como fuente de carbono. Prácticamente no se tuvo ningún problema en caracterizar los tipos de moléculas que producía. Esto fue posible debido a que produce altas concentraciones de AHL nanomolar/ml. Sin embargo, en las demás cepas fue mucho más complicada poder caracterizarlas debido a la baja producción y también a que cuando se realizaron la producción y extracción, la gran concentración que se encontró de dicetopiperazinas bloqueó la visualización de las moléculas señal en el espectrómetro de masas debido a que presentan el mismo peso molecular. Sin embargo, se tienen fracciones que nos dan una idea de que *Arthrobacter sp.* 61k pudiera producir moléculas de C8-HL, C12-HL y C14-HL carbonos; cepa no identificada 64k de 8 carbonos, *Pseudomonas sp.* 6a de C12-HL carbonos y *Aeromonas sp.* 7yc de C6-HL, C12-HL y C14-HL carbonos. No obstante, estas cepas se deberán crecer en medio libres de dicetopiperazinas para poder caracterizarlas.

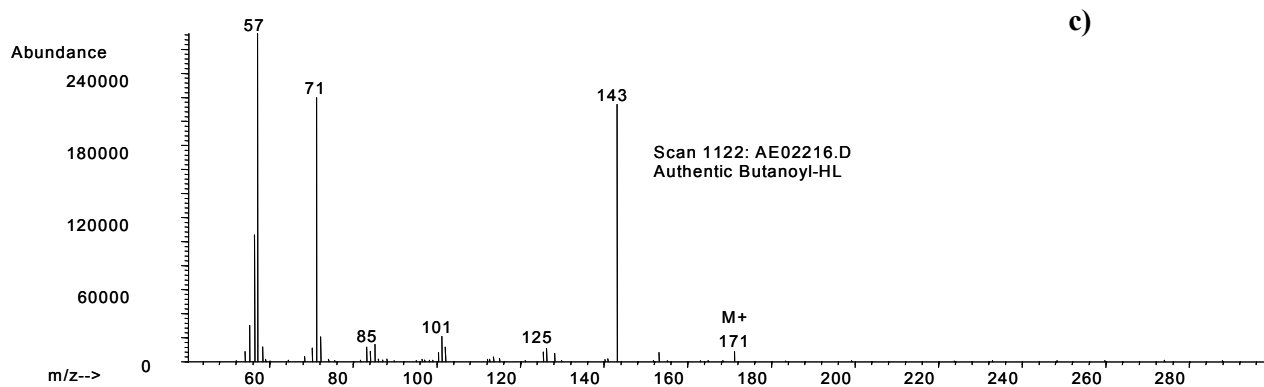
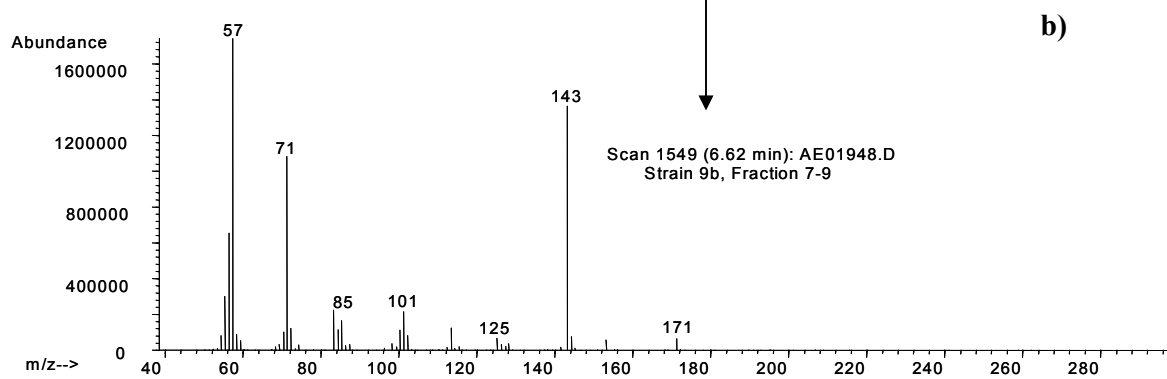
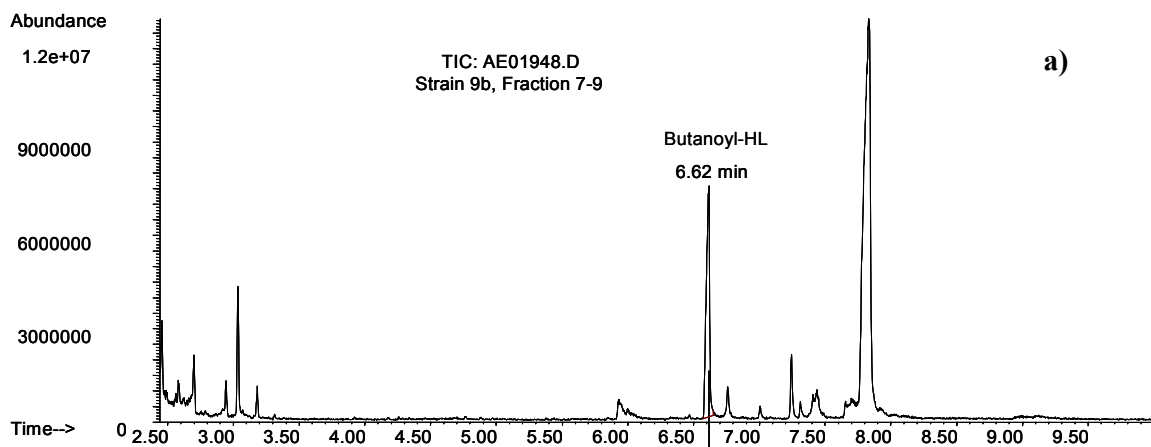
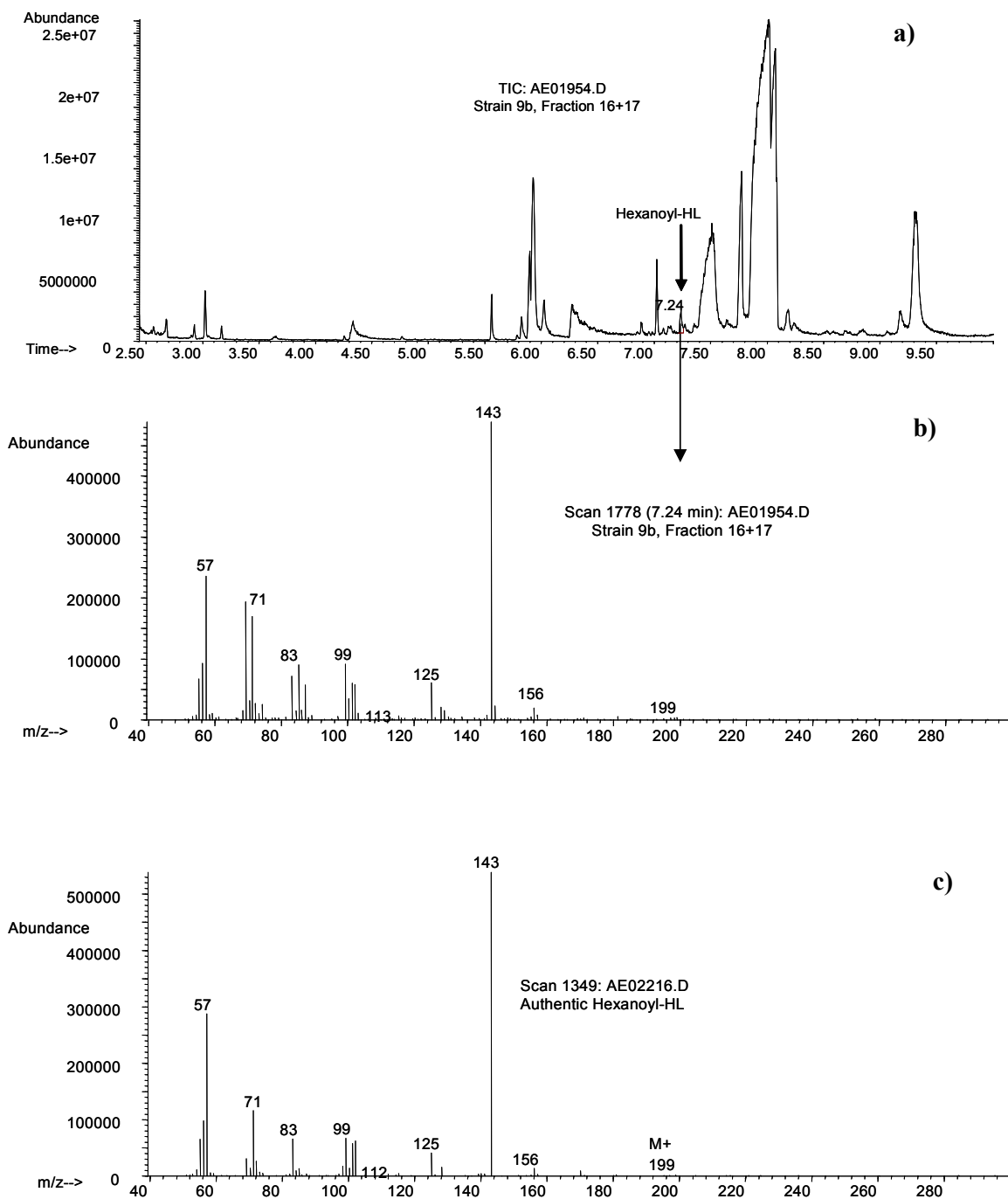
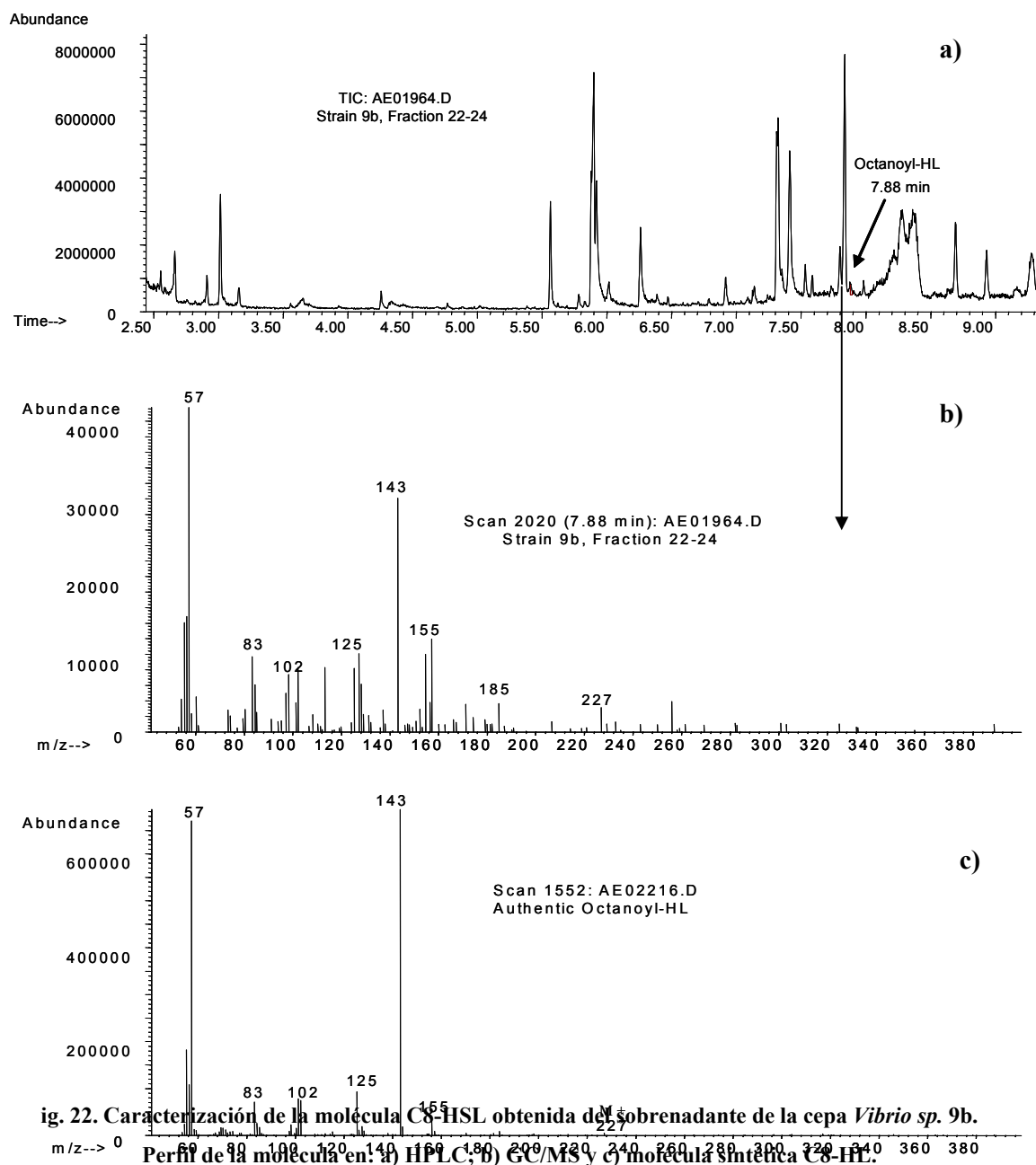


Fig. 20. Caracterización de la molécula C4-HSL obtenida del sobrenadante de la cepa *Vibrio sp.* 9b.
Perfil de la molécula en: a) HPLC; b) GC/MS y c) molécula sintética C4-HL.



**Fig. 21. Caracterización de la molécula C6-HSL obtenida del sobrenadante de la cepa *Vibrio sp. 9b*.
Perfil de la molécula en: a) HPLC; b) GC/MS y c) molécula sintética C6-HL.**



IX. Discusión

Los ecosistemas de manglar están caracterizados por ser ricos en materia orgánica; sin embargo, tienden a estar limitados de nutrientes en los sedimentos principalmente de nitrógeno y fósforo (Sengupta y Chaudhuri, 1991; Bashan y Holguin, 2002). Sumado a esto, en los sistemas de manglares de zonas áridas estos nutrientes son aun más escasos, debido a que no existe aportación de estos nutrientes vía terrígena, por ríos o lluvias (Potts, 1984). Los ciclos biogeoquímicos del nitrógeno y de otros elementos son procesos de suma importancia en estos ecosistemas debido a que desarrollan los mismos bosques de manglar y por ende a la biota que se encuentra en ellos (Sengupta y Chaudhuri, 1991), siendo los microorganismos los que mantienen la funcionalidad de los ciclos biogeoquímicos así como la productividad de los ecosistemas de manglar (Bashan y Holguin, 2002; Nannipieri *et al.* 2003).

Las bacterias fijadoras de nitrógeno juegan un papel muy importante dentro de los ecosistemas de manglar en regiones semiáridas, ya que proporciona el nitrógeno necesario para que se desarrollen saludablemente (Sengupta y Chaudhuri, 1991). A pesar de que la desnitrificación ayuda a mineralizar el nitrógeno y lo recicla en ambiente contaminados, en los ecosistemas de manglar pudieran llegar a ser un problema, debido a que el nitrógeno es escaso y pudiera perderse por este proceso. Sin embargo, Rivera-Monroy y Twilley (1996) mencionan que en manglares que no han estado expuestos a contaminación, como es el caso del manglar de estudio, los rangos de desnitrificación son bajos. Además de los rangos de desnitrificación y fijación de nitrógeno es necesario realizar análisis moleculares como aislar bacterias de los ecosistemas para entender la importancia de estas comunidades. Para esto el gen *nifH* de la nitrogenasa es ampliamente utilizado para saber la composición y estructura de

esta comunidad (Zehr *et al.*, 2003), así como el gen *nirK* y *nirS* para describir las comunidades desnitrificantes (Braker *et al.* 2000).

Por ésta razón es importante conocer la biodiversidad del ecosistema. Así como la relación entre la diversidad microbiana y la funcionalidad del sedimento, por considerar que el 80 al 90% de los procesos en el sedimento son reacciones mediadas por microbios (Coleman y Crossley, 1996; Nannipieri y Badalucco, 2003).

9.1 Parámetros ambientales

Los resultados mostraron que la diversidad molecular de las comunidades de bacterias fijadoras de nitrógeno y desnitrificantes asociadas a las raíces de mangle, presentaban diferencias entre los sitios de estudio. Los resultados derivados de la ordenación de los parámetros ambientales a través de ACP sugieren que los factores que definen las diferencias del sedimento del manglar en los tres sitios de estudio son la textura del sedimento, la materia orgánica, el oxígeno y la salinidad. Existe un gran número de trabajos donde se reporta que la composición de las comunidades microbianas de la rizósfera se ven fuertemente influenciadas por la textura del sedimento (Bachman y Kinzel, 1992; Griffiths, *et al.* 1996; Buyer *et al.*, 1999; Lawlor *et al.*, 2000; Sessitsch *et al.* 2001; Girvan *et al.* 2003; Kennedy *et al.* 2004), así como sus características fisicoquímicas: nutrientes, nutrientes minerales, composición iónica, capacidad de retención, aireación, infiltración del agua, pH, potenciales de oxido-reducción, temperatura, superficie, y la interacción entre los microorganismos (Nannipieri *et al.*, 2003; Suzuki *et al.* 2005). Estos parámetros están profundamente relacionados con la actividad microbiana del sedimento (Kim, *et al.* 2004).

Sessitch y colaboradores (2001) mencionan que la organización estructural de las partículas de suelo (minerales: arcillas, limos y arenas; y materia orgánica) provee de hábitats espacialmente heterogéneos para microorganismos caracterizados por diferentes sustratos, nutrientes y concentraciones de oxígeno; esto mismo nos indica que estos factores pudieran determinar marcadamente la diversidad genética de las comunidades fijadoras de nitrógeno y desnitrificantes asociadas al manglar.

El principal valor en ACP que definió a los 3 sitios de muestreo fue la textura del sedimento. Estos resultados coinciden con los encontrados por otros autores (Monroizer, et al. 1991; Kanawa, 1986; Kandeler, 2000). Sessitch y colaboradores (2001), demostraron claramente que no solo es la biomasa microbiana la que se ve influenciada, sino que también la estructura de la comunidad microbiana se vió afectada considerablemente por el tamaño de partícula, observándose que los tamaños más pequeños de partículas hospedan una alta diversidad microbiana a diferencia de sedimentos compuestos de partículas más grandes. Se ha sugerido que las partículas de tamaño fino proveen un hábitat protector para los microorganismos a través del tamaño de poro excluyendo a predadores como los protozoos (Postman et al. 1990; Elliot et al, 1980).

Los sitios de estudios fueron particularmente diferentes, el sitio 3 mostrando una menor concentración de oxígeno, así como estar compuesto principalmente por arenas y por un alto porcentaje de materia orgánica; el sitio 2 esta compuesto principalmente por arcilla, sin embargo presentó la mayor concentración de oxígeno y nitratos. Sin embargo, el sitio 3 fue en el que se obtuvo mayor cantidad de DNA aislado (Fig.3) y se encontró la mayor diversidad molecular de los genes *nifH* y *nirK* (Tabla VI)). El sedimento de este sitio estuvo compuesto principalmente por arenas (50%), con los valores de concentración de oxígeno y salinidad mas bajos de los tres sitios.

Regularmente las arenas son caracterizadas por tener poca retención de agua, y se da mayor intercambio de gases por el tamaño grande de poro (macroporos) siendo esenciales para el flujo del aire que suplementa a las raíces y el crecimiento microbiano aerobio. Sin embargo, se sabe que la aeración del sedimento esta gobernada principalmente por las fluctuaciones de humedad del mismo. La aeración aumenta cuando disminuye la humedad del sedimento; mientras que un exceso de agua puede bloquear parcial o completamente los poros y tiende a favorecer las condiciones anaerobias (Hausenbuiller, 1972; Millar *et al.* 1975). A pesar de que el sitio de muestreo 3 presenta una baja capacidad de retención de agua por estar compuesto principalmente por arenas, éste no presentaba signos de desecación encontrándose húmedo debido a que se encuentra adyacente a una pequeña laguna. En este caso, los macroporos de las arenas permitieron que este sitio se mantuviera húmedo por capilaridad (infiltración) haciendo que fluya el agua más rápidamente tanto lateral como horizontal, estableciendo un equilibrio y manteniendo esta zona continuamente húmeda evitando la desecación del sedimento en los periodos de mareas bajas; por ende, el aire fue desplazado por el agua, causando que en esta zona se presentara las concentraciones mas bajas de oxígeno (Hausenbuiller, 1972; Tan, 2000). Otra explicación a la baja concentración de oxígeno encontrada para este sitio pudiera deberse a que el sedimento del sitio 3 presentó el mas alto contenido de materia orgánica de los tres sitios. Esto se reflejaría en una alta actividad microbiana sostenida por un mayor contenido de fuentes de carbono y energía, lo que conllevaría a un consumo mayor del oxígeno presente en los sedimentos.

La concentración de salinidad más baja se encontró en el sitio 3. Esto se pudo deber a que el continuo flujo de agua favorecido por el alto contenido de arenas, y la no

desección del sedimento permitió una menor acumulación de sales (Hausenbuiller, 1972; Millar et al. 1975; Nye y Tinker, 1977; Ortiz-Villanueva y Ortiz-Solorio, 1984). Es importante notar que a pesar de que el sitio 3 presento el menor contenido de sales, la salinidad del agua intersticial es relativamente alta en los tres sitios.

Paradójicamente, el sitio 2 estuvo compuesto principalmente por arcilla presentando al mismo tiempo una mayor concentración de oxígeno que los otros dos sitios. Se ha reportado que los sedimentos arcillosos se caracterizan por tener una mayor capacidad de retener el agua contra la fuerza de gravedad, por lo cual presentan poca permeabilidad y aeración, y a su vez su velocidad de infiltración es muy lenta (Millar *et al.* 1975; Ortiz-Villanueva y Ortiz-Solorio, 1984). Esta aparente paradoja entre lo encontrado por nosotros y lo que reporta la literatura se puede explicar de la siguiente manera: Los muestreos se realizaron en la zona supramareal de los manglares. Esta área esta expuesta a los periodos largos de mareas bajas y de desecación; los microporos de las arcillas tienden a retener por mas tiempo el agua, pero a pesar de esa cualidad, los periodos de mareas bajas en verano son largos abarcando las horas más calurosas induciendo la perdida de humedad tanto por la marea baja como la evaporación que se genera; provocando así, el agrietamiento del sedimento en consecuencia de la falta de humedad y a su vez se incrementan los niveles de oxígeno y cuando la marea tiene a subir la saturación de los microporos por el agua se lleva mas tiempo (Hausenbuiller, 1972).

Por otra parte, la estructura del sedimento del sitio 1 es migajon arcillo-arenoso presentando cualidades de las arenas y de las arcillas; al presentar los periodos de desecación, se deshidrata la parte superficial del sedimento; sin embargo, las partes mas profundas siguen siendo humedecidas por capilaridad. En las partes drenadas se lleva el

intercambio gaseoso, oxigenándose estas áreas pero no llegan a los valores que presenta el sitio 2, probablemente el sitio 1 no se encuentre completamente seco el sedimento, debido a que su composición mixta de arenas y arcilla le brinda tener poros grandes y pequeños que permita la capilaridad. Por otra parte, posiblemente el consumo de oxígeno por las raíces y los microorganismos del suelo es rápido y supera el reemplazamiento del oxígeno en el intercambio gaseoso, dando así que las concentraciones de oxígeno disuelto en el agua intersticial, sedimento y en las raíces decline (Russell, 1973). El sitio 1 fue el que presentó mayores concentraciones de salinidad, esto puede ser posible a que en este sitio se presenta la franja de mangle con mayor cobertura de la zona suprameral, pasando la mayor parte del tiempo sin inundación pero cuando se dan las mareas altas estas pueden filtrando las sales en las partes superiores del sedimento haciendo así que la concentración de salinidad se incremente (Gonzales-Acosta, *et al.* 2005).

En el ACP, el parámetro con más peso en el segundo CP fue la materia orgánica (M.O). El sitio 3 fue el que presentó mayor concentración de M.O., debido a que el abastecimiento de M.O. por la caída de las hojas y rizodepositación es mayor, ya que en esta área los manglares son más grandes y frondosos (Twilley *et al.* 1996; Brimecombe *et al.* 2001), ya que en esta área los manglares son más grandes y frondosos. La materia orgánica es la sangre vital del sedimento, y puede impactar fuertemente las propiedades químicas, físicas y biológicas del sedimento. Los sedimentos arenosos tienen poca cohesión y plasticidad, pero a pesar de eso, la M. O. mejora la condición estructural de los sedimentos, incrementando su capacidad de la retención de agua (Hausenbuiller, 1972; Ortiz-Villanueva y Ortiz-Solorio, 1984; Tan, 2000). Posiblemente eso este pasando en el sitio 3.

Los sitios 1 y 2 los árboles pequeños y menos frondosos que el sitio 3, probablemente debido al estrés hídrico, nutricional y salino al que se ven expuestos; evidencia de esto se manifiesta por la dominancia de *A. germinans* en estos dos sitios, siendo esta especie de mangle la que tolera salinidad más alta de las tres especies presentes en el manglar. Esto contrasta con el sitio 3, en el cual abundan las tres especies de mangle. La presencia de árboles más grandes y frondosos en esta área pudo repercutir en la generación de M.O. y existe la posibilidad de que la materia generada pudiera haberse lavado con el ciclo de mareas. De ser así, el sitio 1 sería el más fuertemente impactado por su composición de arcillas y arenas originando una mayor pérdida del porcentaje de M. O. que el sitio 2, ya que el mayor contenido 56% de arcillas del sitio 2 retendría mayor porcentaje de M. O. (Hausenbuiller, 1972).

9.2 Diversidad Molecular de las Comunidades de bacterias fijadoras de nitrógeno y desnitrificantes

El análisis de las comunidades a través de la técnica de huella digital T-RFLP, mostró la heterogeneidad y la composición estructural de los miembros de la comunidad bacteriana de fijadores de nitrógeno y desnitrificantes. Conforme a los patrones de T-RF ó Unidades Taxonómicas Operacionales (OTUs), la comunidad de fijadoras de nitrógeno presento una alta diversidad de T-RF a diferencia de los encontrados para las comunidades de desnitrificantes. Estas diferencias pudieran deberse a la importancia del rol ecológico que juegan las bacterias diazotróficas en los ecosistemas de manglar (Moeseneeder, *et al.* 1999; Lukow, *et al.* 2000). Para una revisión del tema ver Holguin *et al.* (2001).

Como ya se había explicado anteriormente en los ecosistemas de manglar semiáridos el nitrógeno es considerado como el principal nutriente que limita la producción del mismo (Potts, 1979). La fijación de nitrógeno en ecosistemas de manglar esta ampliamente distribuida y se ha encontrado asociada a raíces y hojas muertas del manglar, a corteza, a raíces aéreas, a rizosfera, y a sedimentos (Holguin *et al.* 2005). Se calcula que el proceso de fijación de nitrógeno en manglares pudiera contribuir con el 40-60% del nitrógeno requerido por el ecosistema (Zuberer y Silver, 1978). Se ha reportado que la importancia ecológica de la fijación de nitrógeno debido a las asociaciones de las bacterias fijadoras de la rizósfera con los mangles es potencialmente importante (Sengupta y Chaudhuri, 1991). En estos ecosistemas la fijación de nitrógeno es considerada como la más importante función fisiológica, ya que juega un papel importante en la excelente salud y densidad de los bosques de manglar (Holguin *et al.* 2001; Potes y Whitton, 1977; Toledo *et al.* 1995).

La importancia de este proceso en ecosistemas de manglar que reciben aporte de nitrógeno por vía terrestre, como es el caso de manglares situados en desembocaduras de ríos, o por residuos agrícolas o de aguas residuales, pudiera ser menor ya que estas fuentes de nitrógeno inhiben a la nitrogenasa. Considerando que Balandra es un manglar no impactado por actividad humana importante y que el contenido de nitrógeno en sus aguas es sumamente bajo, es lógico que la comunidad de bacterias fijadoras de nitrógeno esté bien representada en este manglar lo que explica la alta diversidad encontrada.

La diversidad en la comunidad de bacterias desnitrificantes fue baja. Rivera-Monroy y Twilley (1996) reporta que la tasa de desnitrificación en los ecosistemas de

manglares no perturbados (no contaminados) es escasa, debido a que la cantidad de nitratos y nitritos son muy bajas lo cual provoca que no haya aceptor de electrones para este proceso respiratorio, encontrándose una correlación positiva entre la cantidad las tasas de desnitrificación y las concentraciones de nitratos (Payne, 1973; Körner y Zumft, 1989; Rivera-Monroy et al. 1995; Zumft, 1997).

9.2.1 Diversidad molecular de la comunidad de bacterias fijadoras de nitrógeno (*nifH*)

La comunidad de fijadoras de nitrógeno de los tres sitios fue diferente tanto en la presencia/ausencia de OTUs como en la abundancia relativa; estas diferencias fueron demostradas a través de los índices de diversidad (Tabla VI), los electrogramas (Fig. 9), el análisis MDS (Fig. 10 y 11), de grupos (Fig. 12 y 13) y el analisis de similitud (Tabla VII), lo cual sugiere que las disimilitudes del pool genético de las bacterias fijadoras de nitrógeno asociadas a raíces esta determinada por las diferencias biogeoquímicas de los sitios de estudio.

La fijación de N₂ es influenciada por diferentes factores biogeoquímicos (Riffkin, et al.1999; Poly, et al. 2001) principalmente el oxígeno, la materia orgánica, amonio y nitratos, determinando que los genes involucrados en el proceso de fijación de nitrógeno sean expresados o no expresados (Hopwood y Chater, 1989).

El oxígeno es uno de los principales factores reguladores de este proceso fisiológico (Brill, 1980; Potts, 1984; Peterson, 1992; Zehr et al. 1998). Se sabe que altas tensiones de oxígeno pueden tener un efecto deletéreo sobre la actividad de la nitrogenasa (Fray, 1992), inactivándola rápida e irreversiblemente en muchos

microorganismos (Madigan, 2001; Zuberer, 1990). Consecuentemente, la regulación de la nitrogenasa por oxígeno es muy importante (Bergersen, 1991). A pesar de esto, algunas bacterias presentan adaptaciones fisiológicas que les permiten fijar nitrógeno aún bajo condiciones aerobias (White, 1999).

El sitio 3 fue el que presentó menores concentraciones de oxígeno de los tres sitios, y posiblemente influyó a que se obtuviera mayor riqueza y diversidad de T-RFs para el gen *nifH* ya que la mayoría de los procariotes que fijan nitrógeno lo hacen bajo condiciones anaerobias y microaerofílicas, y los parámetros biogeoquímicos de este sitio favorecieron la formación de microambientes anaerobios y microaerofílicos (White, 1999; Madigan *et al.* 2001). Por otra parte, en los sitios 1 y 2 se obtuvieron las mayores concentraciones de oxígeno, principalmente el sitio 2. En este último se presentó el valor más bajo de riqueza y diversidad, mas sin embargo, se obtuvo el valor más alto en dominancia. Es probable que en este sitio se estén seleccionando grupos de microorganismos con capacidad de desarrollar la fijación de nitrógeno aerobia y microaerofílica, que involucran mecanismos para poder lidiar con la inactivación de la nitrogenasa por el oxígeno (Zuberer, 1990, Robson; 1991; White, 1999).

Estos mecanismos se han observado en bacterias del género *Azotobacter*, grupo estrictamente aerobio, que consisten en aumentar las tasas de respiración aerobia en la superficie de la membrana previniendo que el oxígeno entre en la célula manteniendo sus concentraciones bajas en el interior de la misma, protegiendo así a la nitrogenasa; alternativamente, cuando el oxígeno no puede ser mantenido a bajos niveles, la nitrogenasa puede sufrir cambios en su conformación asociándose con proteínas protectoras, evitando el daño que pudiera causar el oxígeno. Otras bacterias fijadoras de

nitrógeno aerobias producen sustancias mucilaginosas que las protegen del oxígeno (Brill, 1980; Zuberer, 1990; Linkerhägner y Oelze, 1995; White, 1999).

Algunas de las secuencias de clones de *nifH* de los sitios 1 y 2 están cercanamente relacionadas con secuencias reportadas de *Azotobacter sp.* (Fig. 14), por lo que es probable que bacterias diazotróficas con capacidad de tolerar oxígeno dominen en estos sitios. Se encontró que la mayoría de las secuencias de los clones del sitio 3 solo se relacionaron entre ellos mismos y solo algunas secuencias estuvieron relacionadas con secuencias de los otros sitios. Esto sugiere que la selección de los miembros de las comunidades fijadoras de nitrógeno en cada sitio fue determinada por su capacidad de sobrellevar las variaciones de las concentraciones de oxígeno.

Otros estudios han revelado que la cantidad de materia orgánica puede afectar la diversidad de OTUs del gen *nifH*; se ha reportado que las poblaciones microbianas diazotróficas en sedimentos de manglares son frecuentemente limitadas por la disponibilidad de carbono (Zuberer and Silver, 1975); en su contraparte, se encontraron altas tasas de fijación de nitrógeno asociadas con hojas en proceso de descomposición, ya que estas sirven como fuentes de carbono y energía.

La diversidad de las comunidades diazotróficas de los sitios 1 y 2 pudo estar limitada por la baja disponibilidad de carbono debido a los menores porcentajes de materia orgánica encontrados para estos dos sitios. Otro elemento que pudo estar en juego y contribuir a la menor diversidad de OTUs en estos sitios, fue que la rizósfera de mangle en estos dos sitios, al encontrarse en la zona supramareal, estuvo expuesta a periodos largos de exposición al aire y a alta salinidad, lo que pudo causar efectos o

cambios en la superficie de la raíz o en el patrón de exudación dándose una limitación de fuente de carbono (Zuberer y Silver, 1978; Kennedy *et al.* 2004).

La concentración de amonio es otro elemento que afecta la actividad de la nitrogenasa, reprimiendo la síntesis de la misma (Glick *et al.* 1999). El amonio fijado por la nitrogenasa no reprime la síntesis de la enzima porque tan pronto como se forma se incorpora a forma orgánica y se usa por la planta en procesos de biosíntesis. Cuando hay un exceso de amonio en el medio (provocado principalmente por contaminación) la síntesis de la nitrogenasa se reprime. La saturación de amonio no sería una opción ya que inmediatamente que se produjera este compuesto en las raíces sería incorporado o utilizado por la planta (Madigan *et al.* 2001).

Por otra parte, la salinidad no jugó un papel crucial, ya que no afecta en la fijación de nitrógeno directamente, si no en la capacidad de osmoregulación de las bacterias (Moisander *et al.* 2002)

9.2.1 Diversidad Molecular de las Comunidades Desnitrificantes (*nirK* y *nirS*)

La comunidad de bacterias desnitrificantes se ve influenciada por los parámetros biogeoquímicos de los sedimentos (Mancino y Torello, 1986). Strong y Fillery (2002) sugieren que el oxígeno, los nutrientes, salinidad y la concentración de nitratos son factores que pueden controlar la desnitrificación en sedimentos.

Los resultados mostraron que los patrones en el análisis de T-RFLP fueron diferentes en los tres sitios, mostrando disimilitudes en la diversidad en las comunidades desnitrificantes representadas por *nirK* y por *nirS*. La diversidad más alta de T-RFs para el gen *nirK* fue encontrada en el sitio 3, debido probablemente a las condiciones ambientales de baja tensión de oxígeno, alto porcentaje de M.O. en ese

sitio. Mientras que la mayor diversidad del gen *nirS* se encontró en el sitio 2 donde las tensiones de oxígeno son altas y bajo porcentaje de M.O. Interesantemente, en estudios anteriores realizados en ecosistemas marinos y suelos terrestres, se ha encontrado mayor diversidad en las secuencias de genes *nirS* que de *nirK* mientras que para este estudio el gen *nirK* presentó mayor riqueza y diversidad que *nirS* (Tabla VI) (Braker *et al.* 2000; Priemé *et al.* 2002). Cabe notar que en ecosistemas de manglar no se han reportado trabajos a cerca de caracterización molecular de la diversidad de la comunidad desnitrificante.

La diferencia en la diversidad de T-RFs encontrada para *nirK* o *nirS* en el sedimento puede estar reflejando las diferencias en las propiedades de las enzimas que participan ó, puede deberse a características fisiológicas de las bacterias no relacionadas con la desnitrificación (Priemé *et al.* 2002). Especulamos que el hemo-citocromo *cd₁* le confiera la capacidad de las bacterias que presentan nitrito reductasa a soportar mayores tensiones de oxígeno. Pero, se desconoce si existe una correlación entre la distribución y diversidad de las bacterias desnitrificantes y el tipo de nitrito reductasa que presenta la bacteria (Coyne *et al.* 1989). De acuerdo, a la diferenciación de los dos grupos de desnitrificantes, se especula la posibilidad que los dos tipos de nitrito reductasas se hayan originado a tiempos muy diferentes, el tipo con Cu sea mucho mas viejo, y con las variaciones resultantes de la divergencia, y el tipo heme *cd₁* sea mucho después, como una variación de la respiración con oxígeno (Priemé *et al.* 2002).

Al parecer ambas nitrito reductasas son funcionalmente iguales, ya que no se han reportado diferencias significativas (Priemé *et al.* 2002). Sin embargo, se encontró que existen señales exógenas dominantes que inducen la síntesis del sistema de desnitrificación tales como la concentración de oxígeno (Körner y Zumft, 1989; Payne,

1973), que al menos uno de los aceptores de electrones alternativos como NO₃ o NO₂ este presente (Miller y Nicolas, 1985), y la fuente de carbono (Magalhaes, *et al.* 2005; Wolsing y Priemé; 2004; Yan *et al.* 2003).

El oxígeno puede ser el factor más importante que determine el proceso de desnitrificación. En estudios previos se ha reportado que la diferencia en las concentraciones de oxígeno disuelto es uno de los factores decisivos para la síntesis de las enzimas involucradas en la desnitrificación (Payne, 1973; Körner y Zumft, 1989; Tiedje, 1998), y controla la estructura de las comunidades desnitrificantes (Liu, 2003). Barton y colaboradores (2000) reportaron que el tamaño de la población de desnitrificantes se ve limitada por la aireación del sedimento, y viceversa: cuando la disponibilidad de oxígeno es limitada la población de desnitrificantes se ve incrementada.

En los resultados se observó distribución de las comunidades de bacterias desnitrificantes con *nirK* y *nirS* marcada. La comunidad de *nirK* fue más abundante en condiciones deficientes de oxígeno mientras que la comunidad de *nirS* se encontró mejor representada en condiciones mayor tensión de oxígeno. A pesar de que supuestamente no existen diferencias funcionales entre las dos nitrito reductasas, Miller y Nicolas (1985) observaron que la nitrito reductasa con cobre fue inducida a bajas tensiones de oxígeno, mientras que Son y War (2003) encontraron que algunos de los grupos bacterianos con *nirS* presentaron diferentes características fisiológicas logrando la desnitrificación aeróbica. Por otra parte, Coyne y colaboradores (1989) vieron que las secuencias de genes *nirS* fueron numéricamente dominantes en las cepas aisladas y en suelos aerobios enriquecidos. Esto fue corroborado por Yan y colaboradores (2003)

encontraron que las poblaciones de *nirS* se encontraron en ambientes con altas concentraciones oxígeno. Nuestros resultados coinciden con estos estudios ya que sugieren que las bacterias desnitrificantes que presentan *nirS* son menos lábiles al oxígeno que las que presentan el gen *nirK*.

En contraste con los resultados anteriores, Cole y colaboradores (2004), reportaron una diferenciación de nicho entre las poblaciones bacterianas desnitrificantes que presentaban *nirK* en comparación con aquellas que presentaban *nirS*, lo cual se reflejó en una estratificación de estas comunidades en reactores MAB (membrana-aereated biofilm): Las poblaciones bacterianas con *nirK* se localizaron cercanas a las zonas de mayor concentración de oxígeno y menos nutrientes, mientras que las poblaciones con *nirS* se encontraron donde los niveles de oxígeno fueron menores y había mayor cantidad de nutrientes.

Sin embargo, el oxígeno no es el único factor crucial, ya que la anaerobiosis no es suficiente para inducir o estimular la síntesis de las enzimas involucradas en la desnitrificación (Corner y Zumft, 1989).

La materia orgánica es otro de los principales factores que controlan la desnitrificación en los sedimentos (Lou *et al.* 1996), debido a que es utilizada como fuente de energía o carbono y cuando es limitante se disminuye la densidad poblacional (Firth y Edwards, 2000; White, 2000). Yoshie y colaboradores (2004), mencionan que pequeñas variaciones en la concentración de ácido acético (fuente de carbono) provoca la diversidad de estas comunidades. Firth y Edwards (2000), reportaron que no se encontró un rango limite del proceso de desnitrificación cuando se agregaba fuente de

carbono en exceso; por el contrario, cuando se incrementaba la fuente de carbono al mismo tiempo se incrementaba la cantidad de N_2 que estaba siendo producido (Firth y Edwards, 2000).

El que se haya presentado la mayor riqueza y diversidad para *nirK* en el sitio 3, pudo deberse a que la baja concentración de oxígeno en ese sitio evitó que se inhibiera la desnitrificación. Si consideramos que la concentración de materia orgánica fue mayor en ese sitio podemos suponer que ésta proporcionó la fuente de carbono necesaria para que se desarrollara esta comunidad; asimismo, es razonable que en este sitio se encontraran los valores más bajos de nitratos ya que éstos están siendo utilizados como aceptor de electrones en el proceso respiratorio (Körner y Zumft, 1989; Firth y Edwards, 2000).

En el caso de *nirS* la diversidad de T-RFs fue mayor en el sitio 2 (). Es posible que se hayan desarrollado comunidades aerobias y microaerofílicas debido a las condiciones altas de oxígeno y posiblemente estas comunidades se hayan visto reguladas positivamente por la concentración de nitratos. Esta conjetura es apoyada por lo encontrado por Yan y colaboradores (2003), que sugieren que la concentración de nitratos juega un papel importante en el desarrollo de comunidades con *nirK* o con *nirS*.

A pesar de que la salinidad jugó un papel importante en la definición de las características de cada sitio de muestreo, este factor posiblemente no actuó como un agente regulador de la desnitrificación, ya que se ha reportado que este factor no regula la desnitrificación en el ambiente (Magalhaes, *et al.* 2005). Yoshie y colaboradores (2004) sugieren que la razón por la cual se observó una disminución en la diversidad de

la comunidad *nirS* y *nirK* en reactores MAB se debió más a pequeñas variaciones en las concentraciones de ácido acético (3 g/L) utilizado como fuente de carbono que a la salinidad.

La salinidad puede afectar la desnitrificación de forma indirecta, ya que afecta fuertemente la fisiología osmótica de las bacterias causando deshidratación, provocando que pasen a condiciones de reposo o simplemente provocándoles la muerte (Madigan *et al.* 2001). Es probable que las bacterias que proliferan en ecosistemas salinos sean halotolerantes presentando mecanismos de protección (Hochtein y Tomlinson, 1985; Dennis, 1997; Magalhaes, *et al.* 2005); se sugiere que estos mecanismos se estén presentando en los ecosistemas de manglar de zonas áridas.

EL pH fue el cuarto factor importante en el CP2 (Tabla III) que determinó las diferencias entre los tres sitios de muestreo (Tabla III). Se le ha denominado variable maestra ya que puede afectar procesos y propiedades químicas, físicas y biológicas, y particularmente afecta el proceso de desnitrificación (Stevens *et al.* 1998; Simek y Cooper, 2002). Priemé y colaboradores (2002) reportaron que el pH fue un fuerte selector negativo de las bacterias desnitrificantes y los pH bajos de 5.5 contribuyeron a una baja riqueza de filotipos de *nirK* así como su diversidad genética, y se encontró que esto fue mucho más bajo en las secuencias de *nirS*. Avrahami y colaboradores (2002), no encontraron clones *nirK* estuvieran cercanamente relacionados de suelos altamente ácidos, lo que esto sugiere que el pH un factor efectivo de selección de este grupo. El sitio 1 y 3 mostraron un pH similar (8.26 y 8.05 respectivamente); mientras que el sitio 2 se encontró un pH (7.52) (Tabla I). Por diversos estudios, se concluyó que el pH óptimo para el proceso de desnitrificación es entre 7 y 8 (Simek y Cooper, 2002).

Concluyendo así, que en el pH, por lo menos para estos grupos desnitrificantes de este ecosistema no jugó un papel de selección en la distribución y diversidad de los mismos.

9.3 Árboles filogenéticos

9.3.1 Secuencias de la comunidad fijadora de nitrógeno (*nifH*)

Se sabe que el sistema nitrogenasa contemporáneo ha evolucionado en varios linajes (Young, 1992). Esto se ha corroborado, debido a que las secuencias son similares en árboles filogenéticos del gen *nifH* se contradicen en la filogenia con el gen 16 ribosomal (Zehr *et al.* 2003). Es probable que los genes de la nitrogenasa no sean también conservados como el ARNr ya que se han mostrado diferencias en su tasa de evolución entre los mismos. Este escenario se encontró en los grupos III, IV, VI ya que se observó que se relacionaron cercanamente diferentes tipos de proteobacterias como alfa, beta, gama, delta y hasta secuencias de Gram positivas. Este mismo patrón se encontró en el grupo VIII, en el cual las secuencias de cepas aisladas del manglar pertenecientes a diferentes generos como *Vibrio sp.* 9b, *Arthrobacter sp.* 61k, *Paracoccus sp.* 4bc., *Oceanomonas sp.* 5a y la cepa no identificada 64k (Fig. 14). Este panorama ha venido siendo soportado en el supuesto de que los genes y operones de la nitrogenasa pueden ser transferidos horizontalmente, pueden duplicarse, o selectivamente perdidos debido a que los genes no son retenidos por los organismos, a menos de que estos sean funcionales. (Zehr *et al.*, 2003; Raymond, *et al.* 2004). Xiong y colaboradores (2000) encontraron que estos genes al ser transferidos se recluyeron dentro del metabolismo del aparato fotosintético. También se ha reportado la ocurrencia de fusiones de los genes de fijación de nitrógeno (*nif*), así como la presencia de los genes *nif* en plásmidos (Prakash *et al.* 1981).

A pesar de que se han hecho grandes esfuerzos para obtener el mayor número de genes *nif* (*nif*HDK) secuenciados tanto de bacterias aisladas como de muestras ambientales, la representación aun sigue siendo pobre en la base de datos (Zehr *et al.* 2003). Esto se ve reflejado más aun en muestras ambientales. Se ha reportado que secuencias ambientales son divergentes en ambientes anaerobios, y en ciertos microambientes microaerofilicos. Estos ambientes incluyen estuarios (Nogales *et al.* 2002), lagos hipersalinos (Zhang *et al.*; Short *et al.* 2004), columna de agua (Zehr *et al.* 1998), sedimentos (Windmer *et al.* 1999; Poly *et al.* 2001; Yeager *et al.* 2004), pastos marinos (Welsh, 2000; Hamelin *et al.* 2002), termitas de intestino (Ohkuma *et al.* 1999) y mantos microbianos, crustáceos planctónicos (Zehr *et al.* 2003; Raymond, 2004).

En el ecosistema de manglar no se tiene ningún reporte de diversidad de los genes *nif*H anteriores a este. En los resultados se observó que existe una diversidad genética entre las zonas de estudio, y además algunas secuencias del sitio 1 y 2 se relacionaron con secuencias de cepas aisladas de la misma zona. Por lo que, para el primer caso tenemos que estos sitios tienen mayor fluctuaciones de la concentración de oxígeno y se encontró que este grupo está más cercanamente relacionado con *Azotobacter chroococcum*; el género *Azotobacter* se ha reconocido por poder mantener el proceso de desnitrificación en un ambiente aerobio (Fallik *et al.*; 1991; Peterson, 1992; Linkerhaäger y Oelze, 1995). Podría ser posible que presenten la misma característica que les permita desarrollarse a esas condiciones.

Algunas secuencias de obtenidas principalmente del sitio 3 se relacionaron con secuencias de diferentes ecosistemas salinos, lo cuales tiene por característica estar

limitados de nitrógeno y algunos de ellos con concentraciones bajas de oxígeno (Novell *et al.* 2001; Bagwell *et al.* 2002; Brown *et al.* 2003; Short *et al.* 2004). A pesar de que estas comunidades se encuentren en diferentes hábitats, estos hábitats pueden presentar características biogeoquímica similares (Zehr *et al.* 2003).

La mayoría de las secuencias obtenidas no se relacionaron con otras secuencias reportadas. Un patrón que se observó fue que las secuencias del sitio 1 y 2 se encontraron mas frecuente asociadas en grupos dentro del árbol filogenético, a diferencias de las secuencias del sitio 3 que la mayoría se agruparon entre ellos mismos. Esto confirmaría lo encontrado en los análisis de similitud de estas comunidades en donde el sitio 1 y 2 que presentan mayor OTUs en común. Posiblemente por las características que se presentan en este ecosistema de manglar, este reflejando la selección de los filotipos presentes que posiblemente han divergido y generando su diversidad a través de la transferencia lateral que les ha permitido explotar estos ambientes debido a la fuerte limitación de nitrógeno en el ambiente (Silvestre y Musgrave, 1991; Zehr *et al.* 2003).

Lo que se encontró en este análisis es una contribución a conocer la diversidad de filotipos que se desarrollan en diferentes ambientes; de hecho se espera que la diversidad de bacterias diazotróficas sea más alta, y esto mismo es lo que se ha venido encontrando, ya que en ambientes se han encontrado que los filotipos no se encuentran cercanamente relacionados con secuencias previamente caracterizadas de cepas y filotipos de otros ecosistemas (Zehr *et al.* 2003).

9.3.2 Secuencias de las comunidades desnitrificantes *nirK* y *nirS*

La topología del árbol filogenético con secuencias de *nirK* presentó un comportamiento diferente al encontrado con las secuencias de *nirS*. Las secuencias de *nirK* se encontraron concentradas en una sección de árbol filogenético, a diferencia de las secuencias del gen *nirS* que se encontraron repartidas por todo el árbol. Una explicación a este comportamiento es que la mayor parte de las secuencias reportadas en la base de datos está dada por secuencias basadas en el gen *nirS* dando así que haya mayor diversidad de secuencias con las que se pueden comparar; además en estudios previos se han reportado mayor diversidad de secuencias de *nirS* que de *nirK* (Braker *et al.* 2000; Priemé *et al.* 2002). En este estudio la resolución de los genes *nirS* fueron bastante bajas. Existen otros trabajos en los cuales han reportado algunos trabajos en los cuales no pudo ser detectable las comunidades de desnitrificantes con *nirS* (Avrahami *et al.* 2002; Wolsing y Priemé, 2003).

Las secuencias de *nirK* y *nirS* revelaron que la mayoría de las secuencias no se relacionaron cercanamente con otras secuencias reportadas para bacterias desnitrificantes conocidas. Por otra parte, las secuencias de las cepas que se aislaron del manglar sí estuvieron relacionadas con las secuencias obtenidas en el mismo ecosistema. Esto pudiera indicar una evolución independiente de los genes involucrados en la desnitrificación y esta divergencia se fue dirigiendo hacia adaptaciones similares seleccionadas por las características particulares de este ecosistema (Song, *et al.* 2003; Reardon *et al.*, 2004).

Algunas secuencias de *nirK* se relacionaron con secuencias reportadas en el Genbank procedentes de clones no cultivables de aguas contaminadas con uranio y

nitratos (Yan *et al.* 2003) y suelos de humedales (Priemé *et al.* 2002), mientras que para el gen *nirS* se relacionaron con secuencias de sedimentos marinos con deficiencia de oxígeno (Liu *et al.* 2003), aguas contaminadas con uranio y nitratos (Yan *et al.* 2003), y de sedimentos de humedales (Priemé *et al.* 2002). Posiblemente esta relación refleja características fisiológicas comunes entre ellas (Song *et al.* 2003).

A pesar de que se conoce poco sobre la evolución de estos genes, se sabe que la relación filogenética no está basada en el gen 16S ribosomal ya que estos genes tienen una amplia rango de distribución. Por ejemplo, un análisis de la relación filogenética entre *P. aureofaciens* (gamma) y *A. xylosoyidans* (beta) basado en el 16S ribosomal es soportado por un valor de bootstraps del 100% (Casciotti y Ward, 2001). Esto sugiere que las bacterias desnitrificantes han adquirido los genes *nirK* y *nirS* por transferencia lateral y esto es soportado por cuentas tempranas de tales transferencia de genes desnitrificantes (Zumft, 1997). Las bacterias desnitrificantes son más frecuentes dentro de los grupos alfa y beta de la clase proteobacteria, aunque no existe un patrón definido de distribución (Zumft, 1992). Hay bacterias desnitrificantes que pueden poseer tanto nitrato reductasa con citocromo cd_1 o con cobre (Yoshie *et al.* 2004). La activación de determinada enzima dependerá de las condiciones en las que se vea rodeada.

Concluyendo que la estructura genética de las comunidades desnitrificantes es un posible resultado de las adaptaciones a las condiciones particulares de cada ambiente. La diversidad es menor a diferencia de la comunidad de bacterias diazotroficas, posiblemente a que no hay un exceso de aceptores de electrones que puedan estimular la desnitrificación, por lo que hayan sido selectivamente perdidos ya

que estos genes no son retenidos a menos de que sean funcionales (Zumft, 1997; Yan *et al.* 2003; Reardon *et al.*, 2004).

9.4 Cepas aisladas del manglar

Se tiene reportado que 3 cuartos de la colección mundial de desnitrificantes presentan la enzima nitrito reductasa citocromo *cd₁*, (Gamble *et al.* 1977; Coyne *et al.* 1989). En tanto, las bacterias que presentan nitrito reductasa Cu no son muy numerosas pero se ha encontrado que esta ampliamente diversificada en diferentes grupos bacterianos y hábitats (Coyne *et al.* 1989). En los resultados obtenidos, se encontró que de la mayoría las cepas desnitrificantes presenta el gen *nirK* a excepción de *Corynebacterium sp.* 12a que presento el gen *nirS* (Tabla IX).

Interesantemente, se encontró que 5 de las bacterias desnitrificantes aisladas del manglar, presentaron además el gen *nifH*, por lo que estas cepas utilizan ambas vías metabólicas.

En estudios anteriores se han reportado bacterias desnitrificantes que a su vez son diazotróficas; algunos de los ejemplos más conocidos son *Azospirillum lipoferum* (Danneberg *et al.* 1986), *A. brasilense* Sp7 (Eskew *et al.* 1977), *Bradyrhizobium japonicus* y un considerable número de rizobios (Zumft, 1997).

¿Qué ventajas le puede conferir a una bacteria presentar ambos vías metabólicas?. Dunstan y colaboradores (1982) realizaron estudios con $^{15}\text{NO}_3^-$ y encontraron que era incorporado por la célula y el $^{15}\text{N}_2$ producido por la desnitrificación

fue reciclado por la nitrogenasa y utilizado para su crecimiento. Esto tiene sentido ya que las bacterias al encontrarse en un ambiente tan limitante en nitrógeno y presentar las dos vías metabólicas tendrían la habilidad y versatilidad de reasimilar el nitrógeno (Dunstan *et al.* 1982). Además, al tener ambas vías se podría compensar la pérdida de los electrones gastados con la fijación de nitrógeno debido a que éste es un proceso muy costoso energéticamente hablando (Brill, 1980; Voet y Voet, 1995; Mathews *et al.* 1999; White, 2000). La reducción es exotérmica, por lo que requiere de energía: 16 ATP, 8 e⁻ más 16 moléculas de agua para convertir dos moléculas de nitrógeno en dos de amonio (Brill, 1980; Voet y Voet, 1995). Por otro lado la desnitrificación, al reducir los nitratos a N₂, dona 5 e⁻ a la cadena de transporte de electrones (White, 2000), por lo que esa energía generada se puede utilizar en la fijación de nitrógeno u otro proceso metabólico.

Otra explicación, es que los cofactores reducen NADH inhibiendo algunas de las enzimas del ciclo del ácido cítrico (CAC) (donde el piruvato es oxidado completamente hasta CO₂). El CAC puede solo funcionar como un generador de energía bajo condiciones aeróbicas. La razón es que el ciclo puede decaer hasta ser bloqueado, a menos que el NADH sea oxidado a NAD. El NADH producido en el CAC es usado en el transporte de electrones para producir ATP (Cevallos *et al.* 1996; Millar, 1999). Pero ¿que pasa cuando el oxígeno no está disponible como aceptor de electrones?

Se ha reportado en una cepa *Rhizobium etli*, que la reducción de succinato y la oxidación de la glucosa pueden ser el resultado del incremento en la cantidad de cofactores reducidos. La fijación de nitrógeno requiere NADH. Para evitar la inhibición del CAC, una bacteria desnitrificante directamente produce NADH puede proporcionar

el NADH para la fijación de nitrógeno. Sin embargo, no se pudo realizar la fosforilación oxidativa en condiciones microaerófilas; por lo que, se ha encontrado que bajo condiciones anaerobias, una manera de compensar la fosforilación oxidativa es mediante la síntesis de lactato y etanol consume NADH y regenera NAD⁺ esencial para continuar con la glucólisis (Cevallos et al. 1996; Millar, 1999).

9.5 Evaluación de la producción de AHL

La extraordinaria capacidad de las diferentes bacterias sobrevivir y adaptarse a un amplio rango de ambientes debido a una aparente inteligencia usando percepción sensorial es un comportamiento fascinante (Armitage *et al.* 2003). La señalización, el comportamiento y el desarrollo son procesos y están ligados que permiten a la bacteria en una amplia variedad de ambientes detectar y traducir señales externas, dando así que las bacterias se puedan coordinar (Armitage *et al.* 2003; Juhas *et al.* 2005). La comunicación entre las bacterias es dada a través de la secreción específica de moléculas señal dependiente de la densidad poblacional (Juhas *et al.* 2005).

La comunicación a través de quórum sensing puede inducir o reprimir la expresión de genes (Fuqua *et al.* 1994). El primer modelo de estudio de comunicación celular a través del sistema de quórum sensing basado en AHL fue *Vibrio fischeri*, controlando la bioluminiscencia. En este sistema se basa en el operon lux el cual presenta 8 genes importantes: como los genes principales que involucran la síntesis y regulación de la AHL y los genes que codifican a la luciferasa y a otras proteínas que sintetizan aldehídos. El gen *luxI* que codifica para la acilo homoserina sintetasa (LuxI) y el gen *luxR* que codifica el regulador transcripcional (LuxR) se encuentran dentro del

operón lux. Las células de *V. fischeri* expresan luxI de forma basal cuando la densidad de la población es baja, por ende la concentración de AHL es baja también. Por lo que, cuando la densidad poblacional aumenta se incrementa la síntesis de AHL y la bioluminiscencia (Whitehead *et al.* 2001). Debido a este estudio, los genes *luxI* y *luxR* sirvieron como modelos para los genes de la acilo homoserina sintetasa y del regulador transcripcional de otros sistemas de quórum sensing, denominando homologos de *luxI* y *luxR*.

Se ha reportado que varias bacterias gram negativas asociadas a plantas como *Agrobacterium*, *Erwinia*, *Pantoea*, *Pseudomonas*, *Ralstonia*, y *Rhizobium* producen compuestos como las AHL (Cha *et al.* 1998). En este estudio se encontró que las 10 cepas aisladas de las raíces del manglar produjeron AHL. Holguin y colaboradores (datos no publicados) detectaron la presencia de AHL en la rizósfera de *L. racemosa* y *A. germinans* comprobándose la síntesis de estas moléculas *in situ*. Posiblemente este fenómeno sea utilizado por una variedad de bacterias en la rizósfera del manglar.

Se observó que cuando las cepas de estudio fueron crecidas en medio mínimo con diferentes fuentes de carbono, la producción de AHL se vió incrementada bajo estrés nutricional, posiblemente el estrés nutricional de una señal en la cual se induzca la síntesis de las AHL (Eberhard, platica personal).

Un ejemplo muy característico de la inducción de la síntesis de AHL por un nutrientes, es *Agrobacterium tumefaciens* que utiliza a la octopina (aminoácido) como fuente de carbono y como una señal química para a inducir la transferencia conjugal del plásmido Ti (induce la tumoración). Este plásmido presenta dos sistemas que son regulados por un activador llamado OccR (Zhu *et al.* 2000; Wang *et al.* 1992). Esta

proteína regula positivamente la expresión de los genes del catabolismo de la octopina y también la expresión TraR, que es la proteína reguladora de la síntesis de AHL en *Agrobacterium sp.* (Fuqua y Winans, 1994).

Sin embargo, aun no se sabe como el estrés nutricional esta induciendo los genes de la síntesis y regulación de la AHL, y si estos están regulando otros procesos fisiológicos en la célula.

9.6 Interacción de las bacterias a través de las moléculas AHL

Muchos ecólogos microbianos creen que la variedad de interacción que ocurre entre las células bacterianas en comunidades microbianas juegan un papel significativo en la diversidad y función de la comunidad (Valle *et al.* 2004).

Se ha observado, que algunas moléculas señal bacterianas no son solo usadas como sensores de densidad en la población de una especie, sino para la comunicación entre bacterias de diferentes especies o géneros que ocupan el mismo nicho ecológico (Juhas *et al.* 2005).

La percepción de la AHL de una especie bacteriana por otras especies de bacterias que emplean el sistema quórum sensing son similares AHLs es probable y quizás inevitable en ciertos ambientes. Una comunidad puede producir AHL que podría inhibir el fenotipo de quórum sensing expresado por otras comunidades. Similarmente, homólogos de LuxI pueden envolver una síntesis directa de múltiples moléculas de AHL con la finalidad de producir un arma antagónica. Las especies bacterianas pueden utilizar AHL foránea para regular ventajas fenotípicas competitivas (Whitehead *et al.* 2001).

El interés de utilizar las relaciones a través de las bacterias diazotróficas y desnitrificantes, es porque se ha encontrado que posiblemente los genes de fijación de nitrógeno este regulados por el sistema de quórum sensing, debido a un estudio realizado mostro que *Rhizobium etli* la síntesis y regulación de la AHL esta dada por CinI y CnR. Se indujeron mutaciones en el gen *cinI* y se disminuyó la actividad de reducción de acetileno de un 60-70% comparada con el fenotipo silvestre. Por lo que, se sugiere que posiblemente este gene este involucrado en la fijación de nitrógeno (Daniela *et al.* 2002).

Por otra parte, Wagner y colaboradores (2003) encontraron que el sistema de quórum sensing reguló varios genes fundamentales en el proceso de desnitrificación, como: *nosR* (proteína reguladora NosR), *nosZ* (oxido nitrito reductasa), *nosD* (proteína NosD: involucrada en la inserción del cobre dentro de NosZ), *nosF* (proteína NosF: proteína unida s ATP/GTP, involucrada en la inserción del cobre dentro de NosZ), *nosY* (NosY proteína intermembranal), *nosL* (NosL conforma una parte de una lipoproteína), genes *narI* (NarI subunidad del citocromo cd_1), *narJ* (NarJ proteína necesaria para ensamblar la nitrato reductasa), *narH* (NarH subunidad β de la nitrato reductasa), *narG* (NarG subunidad α grande de la nitrato reductasa), *narK2* (NarK proteína de extrusión del nitrito 2), *narK1* (NarK1 proteína de extrusión del nitrito 1), gen *nirN* (este gen es homologo al gen *nirS* que codifica para la nitrito reductasa citocromo cd_1).

En este estudio, se encontró que al hacer los cultivos mixtos con las cepas *Paracoccus sp.* 4bc y *Arthrobacter sp.* 61k, *Paracoccus sp.* 4bc y *Pseudomonas sp.* 6b, y *Pseudomonas sp.* 6b y *Oceanomonas sp.* 5a, una respuesta positiva observándose una mayor concentración de AHL a diferencia de cuando se crecen por separado. No

obstante, el medio mínimo de cultivo HGB contiene extracto de levadura, y asu vez este presenta dipéptidos llamados dicetopiperazinas (DKPs) (Eberhard, platica personal). Se han reportado a estas moléculas como posibles inhibidores o activadores del complejo sistema de quórum sensing, ya que supuestamente tiene la habilidad de interaccionar con homólogos de LuxR ejerciendo efectos positivos o negativos (Holden, 1999).

Sin embargo, para que esta interacción suceda se da una competencia enzima sustrato, en la cual la concentración de DKPs tiene que ser excesiva a la de AHL para poder activar o reprimir la comunicación celular (Holden, 1999). Se observó que la cepa *Vibrio sp.* 9b posiblemente no se vio afectada por estas moléculas ya que su síntesis de AHL siempre se había dado en altas concentraciones. Pero, en algunas de las otras cepas su síntesis de AHL es baja y no se sabe si en el caso de estas cepas los DKPs estuviera afectándolas. Hasta el momento no ha sido bien determinado si esos compuestos son fisiológicamente relevantes (Fuqua *et al.* 2001)

Por lo que, se volvió a realizar este experimento con el medio sin extracto de levadura, presentando, comportamientos diferentes: se encontraron mayores casos de antagonismos entre las bacterias, tal fue el caso de la cepa *Vibrio sp.* 9b que se vió fuertemente afectada cuando se cultivo con las cepas *Corynebacterium sp.* 63k y 12a, 64k, *Paracoccus sp.* 4bc, *Aeromonas sp.* 7yc y *Pseudomonas sp.* 6a. Otra cepa que se vió fuertemente afectada fue *Corynebacterium sp.* 12a cuando se creció en combinación con la cepa *Arthrobacter sp.* 61k. Se ha reportado que cepas del genero *Arthrobacter sp.* degrada a las AHL utilizándolas como fuente de nitrógeno (Flagan *et al.* 2003); probablemente esta es la razón, por la cual, siempre se detectan muy bajas concentraciones de AHL en el sobrenandante donde se creció.

Algunas interacciones competitivas entre diferentes AHLs puede incluso funcionar como un mecanismo de comunicación entre diferentes especies de bacterias. Una alta producción de moléculas no conocidas, compiten con AHLs por un tipo de bacteria y hace que se desplome la función de la proteína tipo LuxR en bacterias adyacentes (Chhabra *et al.* 1993; Wood *et al.* 1997).

Se ha reportado que algunos hospederos u otras bacterias que compiten pueden beneficiarse al interrumpir la producción o detección de esas moléculas señal. Ejemplo de estos tenemos a *Bacillus* que produce una enzima llamada AiiA, la cual hidroliza el anillo lactona de las AHLs, destruyendo la actividad biológica. Esta enzima fue probada en *Erwinia carotovora*, que es un patógeno de plantas que utiliza en quórum sensing para sintetizar pectinasas y otras enzimas hidrolíticas, incluso regula la producción de antibióticos. *E. carotovora* cuando se encuentra en presencia de AiiA bloquea la producción de las enzimas y la virulencia es atenuada (Dong *et al.* 2000). Algo similar ocurrió cuando *Pseudomonas aureginosa* (patógeno) ya que se vio afectada por la presencia AiiA, la cual provoco que la formación de la biopelícula fuera deficiente y se mostró que la patogénesis fue bloqueada (Leadbetter y Greenberg, 2000).

Por otra parte *R. leguminosarum* se ve afectado su crecimiento con la presencia de 3OH-C14:1-HSL, pero se observó que este crecimiento también es inhibido por otras AHL como 3O-C8-HSL o C8-HSL. Estas AHL pueden regular algunos genes que estén participando en la bacteria, que afectan en la disminución de la tasa de crecimiento (Wilkinson *et al.* 2002).

En este estudio, los sinergismos fueron caracterizados por otras bacterias: *Vibrio sp.* 9b con *Arthrobacter sp.* 61k, *Corynebacterium sp.* 63k con *Pseudomonas sp.* 6a y *Corynebacterium sp.* 63k con *Pseudomonas sp.* 6b. Algo que llama la atención es el sinergismo entre *Vibrio sp.* 9b y *Arthrobacter sp.* 61k, pues se sabe que esta última utiliza la AHL como fuente de nitrógeno.

Flagan y colaboradores (2003) han reportado un sinergismo de *Arthrobacter sp.* 61k en co-cultivo, pero sinergismo se dio para el consumo de la AHL no para su síntesis. Ellos observaron que cuando se hacían co-cultivos con dos cepas *Variovorax paradoxus* y *Arthrobacter VAI-A*, hidrolizan las AHL con acil homoserinas lactonasas, con el fin de utilizarlas como fuente de energía y de nitrógeno sucesivamente. Se crecieron juntas en un medio con 3OC6HSL. Encontraron, que la cepa VAI-A no fue capaz de utilizar el sustrato. Además de que el crecimiento fue superior a diferencia de cuando se crecieron solas. Ellos suponen que *Variovorax paradoxus* corta la cadena acyl de la homoserina lactona (HSL) y posteriormente HSL ya se encuentra disponible para ser utilizada por *Arthrobacter VAI-A*. Sin embargo, aun no se conoce cual es el mecanismo fisiológico y detalles moleculares de esta simbiosis nutricional.

Aun no se sabe, como es que se dan estos procesos de sinergismo, pudiera ser que la producción de un metabolito este inhibiendo o reprimiendo un regulador de la AHL. No se tiene reportes en los cuales se pudiera explicar estos fenómenos. Por lo que, sería importante seguir trabajando en ellos, y tratar de dilucidar si existe algunas otras moléculas que están interactuando con el sistema de quórum sensing.

X. CONCLUSIONES

- La textura del sedimento, la materia orgánica, el oxígeno y la salinidad fueron los principales factores biogeoquímicos que diferenciaron los tres sitios de estudio. En el cual el sitio 3 está compuesto principalmente por arenas, baja concentración de oxígeno y salinidad, y alto porcentaje de materia orgánica. El sitio 2 está compuesto principalmente por arcillas, una mayor concentración de oxígeno. Mientras que el sitio 1, está compuesto tanto por arcillas como arena, presenta los valores más altos en salinidad y los más bajos en materia orgánica.
- La diversidad molecular de las bacterias fijadoras de nitrógeno (*nifH*) fue mayor que las desnitrificantes (*nirK* y *nirS*) en los tres sitios de estudio.
- Las características del suelo del sitio 3, principalmente la baja tensión de oxígeno y el alto contenido de materia orgánica favorecieron una mejor diversidad en los genes *nifH* y *nirK*, debido a que las enzimas NifH y NirK trabajan en condiciones anaerobias y microaerófilas. Como para el gen *nirS*, su mayor diversidad se encontró en el sitio 2, caracterizado por tener una alta concentración de oxígeno en el sedimento que los otros dos sitios posiblemente el que el cofactor citocromo cd_1 de la enzima NirS le confiera la capacidad de ser funcional en ambientes aerobios.
- La mayoría de las secuencias de los clones de *nifH*, *nirK* y *nirS* no se relacionaron con otras secuencias conocidas de cepas aisladas y de ambientales reportadas en el GenBank. Por lo que, se sugiere que las condiciones de este ecosistema han propiciado una evolución independiente de estos genes, debido a que estos genes son transferidos lateralmente. Lamentablemente no existe más información de secuencias de clones en condiciones similares con las cuales se puedan comparar mejor.

- La mayoría de los aislamientos presentan tanto los genes de fijación de nitrógeno como los de desnitrificación en la misma célula. Los ensayos de reducción de acetileno y desnitrificación revelan que ambos genes son funcionales.
- Todas las cepas aisladas del manglar producen la molécula señal AHL, además que la composición del medio es determinante para la síntesis de AHL, debido a que cuando se someten las cepas a estrés nutricional puede llegar a incrementar la síntesis 20 veces.
- Al crecer juntas algunas bacterias tanto reacciones sinérgicas, antagónicas y neutral en la síntesis de la AHL. Existen pocos reportes a cerca de la interacción interespecifica de las bacterias por lo cual aun no se conocen los mecanismos que se ven envueltos en estos fenómenos.

XI. LITERATURA CITADA

An, S., W. S. Gardner y T. Kana. 2001. Simultaneous measurement of denitrification and nitrogen fixation using isotope pairing with membrane inlet mass spectrometry analysis. **Appl. Environ. Microbiol.** 67 (3): 1171-1178.

Armitage, J. P. Ch. J. Dorman, K. Hellinger, R. Schmitt, D. Summers y B. Holland. 2003. Microreview: Thinking and decision making, bacterial style: Bacterial Neural Networks, Pbernai, France, 7th -12th June 2002. **Molecular Microbiology.** 47(2): 583-593.

- Avrahami, S., R. Conrad y G. Braker. 2002. Effect of Soil Ammonium Concentration on N₂O release and on the community structure of ammonia oxidizers and Denitrifiers. **Appl. Environ. Microbiol.** 68(11):5685-5692.
- Bachmna, G., y H. Kinzel. 1992. Physiological and ecological aspects of the interactions between plant roots and rhizosphere soil. **Soil Biol. Biochem.** 24: 5543-5552.
- Barton, L. L. A. Schipper, C.T. Smith, C.D. A. McLay. 2000. Denitrification enzyme activity is limited by soil aeration in a wastewater-irrigated forest soil. **Biology and Fertility of Soil.** 32(5): 385 – 389.
- Bergersen, F.J. 1991. Physiology control of nitrogenasa and uptake hydrogenase. En: **Biology and Biochemistry of Nitrogen Fixation.** Dilworth, M. J. y A. R. Glenn (eds). pp. 162-186. Elsevier. New York.
- Blackwood, B. Ch. T. Marsh, S-H. Kim y E. A. Paul. 2003. Terminal restriction fragment length polymorphism data analysis for quantitative comparison of microbial communities. **Appl. Environ. Microbiol.** 68(2): 926-932.
- Bordalo AA. 2005. Effect of salinity and inorganic nitrogen concentrations on nitrification and denitrification rates in intertidal sediments and rocky biofilms of the Douro River estuary, Portugal. **Water Res.** 39(9):1783-94.
- Braker, G., J. Z. Zhou, L. Y. Wu, A. H. Devol, and J. M. Tiedje. 2000. Nitrite reductase genes (nirKnirK and nirSnirS) as functional markers to investigate diversity of denitrifying bacteria in Pacific Northwest marine sediment communities. **Appl. Environ. Microbiol.** 66:2096-2104.
- Braker, G., H. Ayala-del-Rio, A. H. Devol, A. Fesefeldt y J. M. Tiedje. 2001. Community structure of Denitrifiers, Bacteria, and Archaea along redox gradient in Pacific Northwest Marine sediments by Terminal Restriction Fragment

- Length Polymorphism Analysis of amplified Nitrite Reductase (*nirS*) and 16S rRNA genes. **Appl. Environ. Microbiol.** 67(4):1893-1901.
- Brill, W. J. 1980. Biochemical Genetics of Nitrogen Fixation. **Microbiological Reviews.** 44(3): 449-467.
- Brimecombe, M.J., F. A. De Leij y J. M. Lynch. 2001. The effect of roots exudates on rhizosphere microbial populations. En: **The Rhizosphere: Biochemistry and Organic Substances at the Soil-Plant Interface**(eds R. Pinton, Z. Varaninin, y P. Nannipieri), pp. 95-140. Marcel Decker, New York.
- Buyer, J. S., D. P. Roberts, and E. Russek-Cohen. 1999. Microbial community structure and function in the spermosphere as affected by soil and seed type. **Canadian Journal of Microbiology.** 45: 138-144.
- Cacciotti, L. K. y B.B. Ward. 2001. Dissimilatory Nitrite Reductase genes from Autrophic Ammonia-Oxidizing Bacteria. **Appl Environ Microbiol.** 67(5): 2213-2221.
- Cevallos et al. 1996. Genetic and physiological characterization of rhizoboun etli mutant strain unable to synthesize poly-B-hydroxybutyrato. **Journal of Bacteriology.** 178: 1646-1654.
- Cha, Ch., P. Gao, Y-Ch. Chen, P. D. Shaw y S. K. Farrand. 1998. Production of Acyl-homoserine lactone quorum-sensing signals by Gram-negative Plant-associated bacteria. **MPMI.** 11(11): 1119-1129.
- Chhabra, S. R., P. Stead, N. J. Bainton, G. P. C. Salmond, G.S.A.B. Stewart y *et al.* 1993. Autoregulation of carbapenem biosynthesis in *Erwinia carotovora* by analogues of N-(3-oxohexanoyl)-L-homoserine lactone. **J. Antibiot.** 46: 441-45.
- Coleman, D. C: y D. A: Crossley. 1996. **Fundamentals of Soil Ecology.** Academic Press, London.

- Conrado, M.V., P. Cabello, M. Martínez-Luque, R. Blanco y F. Castillo. 1999. Prokaryotic Nitrate Reduction: Molecular Properties and Funcional Distinction among Bacterial Nitrate Reductases. **Journal of Bacteriology**. 6573-6584.
- Coyne, M. S., A. Arunakumari, B. A. Averill y J. M. Tiedje. 1989. Immunological identification and distribution of dissimilatory heme cd1 and nonheme copper nitrite reductases in denitrifying bacteria. **Appl Environ Microbiol**. 55(11): 2924-2931.
- Curl, E. A. y B. Truelove. 1986. **The Rhizosphere**. Springer-Verlag. Berlin. 288 pp.
- Dalsgaard, T. y B. Thamdrup. 2002. Factors Controlling Anaerobic Ammonium Oxidation with Nitrite in Marine Sediments. **Appl Environ Microbiol**. 68(8): 3802-3808.
- Daniels, Ruth, D. E. De Vos, J. Desair, G. Raedschelders, E. Luyten, V. Rosemeyer, Ch. Verreth, E. Schoeters, J. Vanderleyden y J. Michiels. 2002. The cin quorum sensing locus of *Rhizobium etli* CNPAF512 affects growth and symbiotic nitrogen fixation. **The Journal of Biological Chemistry**. 277(4):462-468.
- Danneberg, G., A. Kronenberg, G. Neuer y H. Bothe. 1986. Aspects of nitrogen fixation and denitrification by *Azospirillum*. **Plant Soil**. 90: 193-202.
- Denaro, R. G.D. Auria, G. Di Marco, M. Genovese, M. Troussellier, M. M. Yakimov y L. Giuliano. 2005. Assessing Terminal restriction fragment length polymorphism suitability for the description of bacterial community structure and dynamics in hydrocarbon-polluted marine environments. **Environmental Microbiology**. 7(1): 78-87.
- Dennos, P.P. y L. C. Shimmin. 1997. Evolutionary Divergent and Salinity-Mediated selection in Halophilic Archaea. **Microbiology and Molecular Biology Review**. 61(1): 90-104.

- Dong, Y. H., J. L. Xu, X. Z. Li y L. H. Zhang. 2000. AiiA, an enzyme that inactivates the acylhomoserine lactone quórum-sensing signal and attenuates the virulence of *Erwinia carotovora*. **Proc Natl Acad Sci USA**. 97: 3526-3531.
- Dunstan, R. H., B. C. Kelley y D. J. Nicholas. 1982. Fixation of Dinitrogen derived from denitrification of nitrate in a photosynthetic bacterium, *Rhodospseudomonas sphaeroides* forma sp. Denitrificans. **Journal of Bacteriology**. 150(1): 100-104.
- Dunbar, J. L. O. Ticknor y Ch. R. Kuske. 2001. Phylogenetic Specificity and Reproducibility and new method for analysis of terminal restriction fragment profile of 16S rRNA genes from bacterial communities. **Appl. Environ. Microbiol.** 67(1): 190-197.
- Eskew, D. L., D. D. Focht, y I. P. Ting. 1977. Nitrogen fixation, denitrification, and pleomorphic growth in a highly pigmented *Spirillum liporefum*. **Appl Environ Microbiol.** 34(5): 582-585.
- Fallik, E., Y-K. Chan y R. L. Robson. 1991. Detection of alternative nitrogenases in Aerobic Gram-negative nitrogen fixing bacteria. **Journal of Bacteriology**. 173(1): 365-371.
- Flagan, S., W-K. Ching y J. R. Leadbetter. 2003. *Arthrobacter* strain VAIA-A utilizes Acyl-Homoserine Lactone inactivation products and stimulates quorum signal biodegradation by *Variovorax paradoxus*. **Appl Environ Microbiol.** 69(2): 909-916.
- Flores-Verdugo, 1989. Algunos aspectos sobre la ecología, uso e importancia de los ecosistemas de manglar. Cap. 2,: 21-56. En: Rosa-Vélez, J. de la y F. González-Farias (eds.) **Temas de Oceanografía Biológica en México**. Universidad Autónoma de Baja California, Ensenada. 337 pp.
- Flores-Verdugo, 1993. Ecological parameters of the mangroves of semi-arid regions of México: Important for ecosystem management. In H. Lieth and Al Mansoom

- (eds.): **Toward the rational use of high salinity tolerant plants**. Kluwer Academic Publishers. Vol. 1: 123-132.
- Firth, J. R., y C. Edwards. 2000. Analysis of denitrification by *Pseudomonas stutzeri* under nutrient-limited conditions using membrane inlet mass spectrometry. **Journal of Applied Microbiology**. 88: 853-859.
- Fuqua, C. y S. C. Winans. 1994. A LuxR-LuxI type regulatory system activates *Agrobacterium* Ti plasmid conjugal transfer in the presence of a tumour metabolite. **Journal of Bacteriology**. 176. 2796-3806.
- Fuqua, C., M. R. Parsek y E. P. Greenberg. 2001. Regulation of e gene expresión by cell-to-cell communication: Acyl-Homoserine Lactone Quorum Sensing. **Anna. Rev. Genes**. 209: 439-468.
- Gamble, T. N., M. R. Betlach y J. M. Tiedje. 1977. Numerically dominant denitrifying bacteria from world soils. **Appl Environ Microbiol**. 33: 926-939.
- Gelsomino, A., A. C. Keijzer-Wolters, G. Cacco, y J. D. van Elsas. 1999. Assessment of bacterial community structure in soil by polymerase chain reaction and denaturing gradient gel electrophoresis. **J. Microbiol. Methods**. 38: 1-15.
- Girvan, M. S., J. Bullimore, J. N. Pretty, A. M. Osborn, y A. S. Ball. 2003. Soil type is the primary determinant of the composition of total and active bacterial communities in arable soils. **Appl Environ Microbiol**. 69: 1800-1809.
- Ghiglione, J.F., F. Gourbiere, P. Potier, L. Philippot y R. Lensi. 2000. Role of Respiratory Nitrate Reductase in Ability of *Pseudomonas fluorescens* YT101 to Colonize the Rhizosphere of Maize. **Applied and Environmental Microbiology**. 4012-4016.
- Glick, B.R., C-L. Patten, G. Holguin y D. M. Penrose. 1999. **Biochemical and Genetic Mechanisms Used by Plant Growth Promoting Bacteria**. Imperial College Press. 267pp.
- Gonzalez-Acosta, B., Y. Bashan, N. Y. Hernandez-Saavedra, F. Ascencio y G. De la Cruz-Aguero. 2005. Seasonal seawater temperature as the major determinant for

- populations of culturable bacteria in the sediments of an intact mangrove in an arid region. **FEMS Microbiology Ecology**.
- Gray, K. M. y J. R. Garey. 2001. The evolution of bacterial LuxI y LuxR quorum sensing. **Microbiology**. 147: 2379-2387.
- Griffiths, B. S., K. Ritz, y L. A. Glover. 1996. Broad-scale approaches to the determination of soil microbial community structure: application of the community DNA hybridization technique. **Microb. Ecol.** 31: 269-280.
- Hamelin, J., N. Fromin, S. Tarnawski, S. Teyssier-Cuvelle y M. Aragno. 2002. nifH gene diversity in the bacterial community associated with the rhizosphere of *Molina coerulea* an oligonitrophilic perennial grass. **Environmental Microbiology**. 4(8): 477-481.
- Hausenbuiller, R. L. 1972. **Soil Science: Principle and Practices**. Wm. C. Brown Company Publishers. Iowa. USA. 504 pp.
- Herbert, R. A. 1999. Nitrogen cycling in coastal marine ecosystems. **FEMS Microbiol. Rev.** 23:563-590.
- Hochstein, L. I. y G. A. 1985. Denitrification by extremely halophilic bacteria. **FEMS Microbiology Letters**. 27: 329-31.
- Holden, M.T.G., S.R. Chhabra, R. de Nys, P. Stead, N. J. Bainton. 1999. Quorum sensing crosstalk: isolation and chemical characterization of cyclic dipeptides from *Pseudomonas aeruginosa* and other Gram-negative bacteria. **Mol. Microbiol.** 33: 1254-66.
- Holguin, G., M. A. Guzman, Y. Bashan. 1992. Two new nitrogen-fixing bacteria from the rhizosphere of mangrove trees: their isolation, identification and in Vitro with rhizosphere *Staphylococcus sp.* **FEMS Microbiol Ecol.** 101: 207-216.

- Holguin, G., Y. Bashan, R. A. Mendoza, E. Amador, G. Toledo, P. Vázquez y A. Amador. 1999. La microbiología de los manglares. **Ciencia y Desarrollo**. Sep-Conacyt. Vol. XXV. N. 144. 26-35.
- Holguin, G. P. Vazquez y Y. Bashan. 2001. The role of sediments microorganisms in the productivity, conservation y rehabilitation of the mangroves ecosystems: an overview. **Biol. Biol Fertil Soil**. 33: 265-278.
- Hopwood, D. A. y K. F. Chater. 1989. **Genetics of Bacterial diversity**. Academic Press. New York. pp. 449.
- Kennedy, N. E. brodie. J. Connolly y N. Clipson. 2004. Impact of lime, nitrogen and plant species on bacterial community structure in grassland microcosms. **Environmental Microbiology**. 6(10): 1070-1080.
- Kim, O., J. Yoo, D. Lee, T. Ahn y H. Song. 1994. Monitoring of bacterial community in a Coniferous Forest soil after a Wildfire. **The Journal of Microbiology**. 42(4):278-284.
- Knowles, R. 1982. Denitrification. **Microbiological Reviews**. 46(1):43-70.
- Körner, H y W. Zumft. 1989. Expression of Denitrification enzyme in response to the dissolved oxygen level and respiratory substrate in continuous culture of *Pseudomonas stutzeri*. **Appl Environ Microbiol**. 55(7): 1670-1676.
- Linkerhägner, K. y J. Oelze. 1995. Cellulas ATP levels and nitrogenasa switchoff upon oxygen stress in chemostat cultures of *Azotobacter vinelandii*. **Journal of Bacteriology**. 1177(18):5289-5293.
- Liu, W.-T., T. L. Marsh, H. Cheng, y L. J. Forney. 1997. Characterization of microbial diversity by determining terminal restriction fragment length polymorphisms of genes encoding 16S rRNA. **Appl Environ Microbiol**. 64:2691-2696.
- Lynch, J. M. 1990. Rhizosphere. John Wiley & Sons. Chichester, England.

- Latour, X., T. Corberand, G. Languerre, F. Allard, y P. Lemanceau. 1996. The composition of fluorescent pseudomonad populations associated with roots is influenced by plant and soil type. **Appl Environ Microbiol.** 62: 2449-2456.
- Lawlor, K., B. P. Knight, V. L. Barbosa-Jefferson, P. W. Lane, A. K. Lilley, G. L. Paton, S.P. McGrath, S. M. O'Flaherty. *et al.* 2000. Comparison of methods to investigate microbial populations in soils under different agricultural management. **FEMS Microbiology Ecology.** 33: 129-137.
- Leadbetter, J. R. and E. P. Greenberg. 2000. Metabolism of acyl-homoserine lactone quorum-sensing by *Variovorax paradoxus*. **J. Bacteriology.** 182: 6921-6929.
- Lehninger, A.L. 1989. **Bioquímica.** Ediciones Omega. España. 1117 pp.
- Loreau, N., S. Naeem, P. Inchausti, J. Bengtsson, J.P. Grime, A. Hector et al. 2001. Biodiversity and ecosystem functioning: current knowledge and future challenges. *Science.* 294: 804-808.
- Loveless, T. M. y P. E: Bishop. 199. Identification of genes unique to M, o-independent systems in diverse diazotrophs. **Can J Microbiol.** 45: 312-317.
- Lukow, T., P. F. Dunfield, W. Liesack. 2000. Use of the T-RFLP technique to assess spatial and temporal changes in the bacterial community structure within an agricultural soil plated with transgenic and non-transgenic potato plants. **FEMS Microbiology Ecology.** 32: 241-247.
- Madigan, M.T., J.M. Martinko y J. Parker. 2001. **Biología de los Microorganismos.** Prentice may-Iberia. España. 986 pp.
- Mancino, C. F. y W. A. Torello. 1986. Enumeration of denitrifying microbial populations in turf. **Plant and Soil.** 96: 146-151.
- Mathews, Ch. K., K. E: van Holde, K. G. Ahern. 1999. **Biochemistry.** Addison Wesley Logman, Inc. New York. pp 1186.

- McKenny, D. J., C. F. Drury, W.I., Findlay, B. Mutus, T. McDonnell y C. Gajda. 1994. Kinetics of Denitrification by *Pseudomonas fluorescens* – oxygen effects. **Soil Biology and Biochemistry**. 26:901-908.
- Mergel, A., O. Schmitz, T. Mallmann y H. Bothe. 2001. Relative abundante of denitrifying and nitrogen fixing bacteria in layers of a forest soil. **FEMS Microbiol Ecol**. 36: 33-42.
- Millar, C. E., L.M. Turk y H. D. Foth. 1975. **Fundamentos de la ciencia del suelo**. C.E.C.S.A. México. 527 pp.
- Millar, T. 1999. Biochemistry explained. **A practical guide to learning biochemistry**. Routledge Press. New York.
- Moeseneder, M. M., J. M. Arrieta, G. Muyzer, Ch. Winter y G. J. Herndl. 1999. Optimization of Termina-Restriction Fragment Length Polymorphism Analysis for complex marine bacterioplankton communities and comparison with Denaturing gradient Gel Electrophoresis. **Appl Environ Microbiol**. 65(8):3518-3525.
- Moisander, P. H., E. 3rd. McClinton y H. W. Paerl. 2002. Salinity effect on growth, photosynthetic parameters, and nitrogenase activity in estuarine planktonic cyanobacteria. **FEMS Microbiology Ecology**. 43(4): 432-442.
- Nannipieri, P., J. Asche, M.T. Ceccherini, L. Landi. G. Pietramellara y G. Renella. 2003. Microbial diversity and soil functions. **European Journal of Soil Science**. 54: 655-670.
- Nannipieri, P. y L. Badalucco. 2003. Biological processes. In: **Processes in the soil-Plant system: Modelling Concepts and Applications** (eds D. K. Bembí y R. Nieder). The Haworth Press, Binghamton, NY, in Press.

- Nogales, B., K. N. Timmis, D. B. Nedwell, y A. M. Osborn. 2002. Detection and Diversity of Expressed Denitrification Genes in Estuarine Sediments after Reverse Transcription-PCR Amplification from mRNA. **Appl Environ Microbiol.** 68(10): 5017–5025.
- Odum, W. E. y E. J. Helad. 1975. The detritus based food web o fan estuarine mangroves community. En: **Coupling of land and water systems**. Hasler, A. D. (ed.) Ecological Studies 10. Springer Verlag. New York. 129-136.
- Ohkuma, M. S. Noda y T. Kudo. 1999. Phylogenetic diversity of nitrogen fixation genes in the symbiotic microbial community in the gut of diverse termites. **Appl Environ Microbiol.** 65(11): 4926-4934.
- Ortiz-Villanueva, B. y C. A. Ortiz-Solorio. 1984. **Edafología**. Universidad Autonoma de Chapingo. México. 347 pp.
- Osborn, A. M, E. R. B. Moore y K. N. Timmis. 2000. An evaluation of terminal-restriction fragment length polymorphism (T-RFLP) analysis for a study of microbial community structure and dynamics. **Environmental Microbiology.** 2(1): 39-50.
- Parkin, T.B. 1987. Soil microsites as a source of desnitrification variability. **Soil Science of America Journal.** 51: 1194-1199.
- Payne, W. J. 1973. Reduction of nitrogenous oxide by microorganism. **Bacteriol. Rev.** 37:409-452.
- Petersen, J. B. 1992. Dependence of oxygen-tolerant nitrogenasa activity on divalent cations in *Azotobacter vinelandii*. **Journal of Bacteriology.** 174(10): 3399-3402.
- Pinton, R., Z. Varanini, y P. Nannipieri. 2001. **The Rhizosphere: Biochemistry and Organic Substances at the soil- Plant interface**. Marcel Dekker, New York.

- Poly, F., L. Ranjard, S. Nazaret, F. Gourbière y L. J. Monrozier. 2001. Comparison of *nifH* gene pools in soils and soil microenvironments with contrasting properties. **Appl Environ Microbiol.** 67(5): 2255-2262.
- Postma, J. y A. va Veen. 1990. Habitable pore space and survival of *Rhizobium leguminosaru*, biovar *trifollu* introduced into soil. **Microb. Ecol.** 19:146-161.
- Potts, M. 1979. Nitrogen Fixation (Acetylene Reduction) associated with communities of heterocystous and non-heterocystous blue-green algae in Mangrove Forests of Sinai. **Oecologia.** 39: 359-373.
- Potts, M. 1984. Nitrogen fixation in mangrove forests. **En Hydrobiology of the mangal.** Edited by F. D. Por and I. Dor. Dr. W. Junk Publishers, The Hague, The Netherlands. Pp. 155-162.
- Prakash, R. K., R. A. Schilperoort y M. P. Nuti. 1981. Large Plasmids of Fast-Growing Rhizobia: Homology studies and location of structural nitrogen fixation (*nif*) genes. **Journal of Bacteriology.** 1129-1136.
- Priemé, A., G. Braker y J. M. Tiedje. 2002. Diversity of Nitrite Reductase (*nirK* and *nirS*) gene fragments in Forested Upland and Wetland soils. **Appl Environ Microbiol.** 68 (4): 1893-1900.
- Raymond, J., J. L. Siefert, Ch. R. Staples y R. E. Blankeship. 2004. The Natural History Nitrogen Fixation. **Mol. Biol. Evol.** 21(3): 541-554.
- Reardon, C. L., D. E. Cummings, L. M. Petzke, B. L. Kinsall, D. B. Watson, B. M. Peyton, y G. G. Geesey. 2004. Composition and diversity of microbial communities recovered from surrogate minerals incubated in an acidic uranium-contaminated aquifer. **Appl and Environ Microbial.** 70(10): 6037-6047.

- Riffkin, P. A., P. E. Quigley, G. A. Kearney, F. J. Cameron, R. R. Gault, M. B. Peoples y J. E. Thies. 1999. Factors associated with biological nitrogen fixation in dairy pastures in south-western Victoria. *Aust. J. Agric. Res.* 50: 261-272.
- Rivera-Monroy, V. H., W. J. Day, R. R. Twilley, F. Vera-Herrera y C. Coronado-Molina. 1995. Flux of nitrogen and sediment in a fringe mangrove forest in Terminos Lagoon, Mexico. *Estuarine Coastal Shelf Sci.* 40: 139-160.
- Rivera-Monroy, V. H. y R. R. Twilley. 1996. The relative role of denitrification and immobilization in the fate of inorganic nitrogen in mangrove sediments (Terminos Lagoon, Mexico). *Limnol. Oceanogr.* 41(2): 284-296.
- Robson, R. L. 1991. The genetics and regulation of alternative nitrogenasa. En: **Biology and Biochemistry of Nitrogen Fixation**. Dilworth, M. J. y A. R. Glenn (eds). pp. 162-186. Elsevier. New York.
- Rojas, A. G. Holguin, B. R. Glick, Y. Bashan. 2001. Synergism between *Phyllobacterium sp.* (N₂-fixer) and *Bacillus licheniformis* (P-solubilizer), both from semiarid mangroves rhizosphere. *FEMS Microbiol Ecol.* 35: 181-187.
- Rösch, Ch. A. Mergel y H. Bothe. 2002. Biodiversity of Denitrifying and Dinitrogen-Fixing Bacteria in an Acid Forest Soil. *Appl Environ Microbiol.* 68(8):3818-3829.
- Russell, E. W. 1973. **Soil Condition and Plant Growth**. Longman, London.
- Sengupta, A. y S. Chaudhuri. 1991. Ecology of heterotrophic dinitrogen fixation in the rhizosphere of mangrove plant community at Ganges river estuary in India. **Oecologia.** 87: 560-564.
- Sessitsch, A., A. Weilharter, M. H. Gerzabek, H. Kirchmann, y E. Kandeler. 2001. Microbial Population Structures in Soil Particle Size Fractions of a Long-Term Fertilizer Field Experiment. *Appl Environ Microbiol.* 67(9):4215-4224.

- Short, S. M., B. D. Jenkins y J. Zehr. 2004. Spatial and temporal distribution of two diazotrophic bacteria in the Chesapeake Bay. **Appl Environ Microbiol.**70(4): 2186-2192.
- Silvestre, W. B. y D. R. Musgrave. 1991. Free-living diazotrophs. En: **Biology and Biochemistry of Nitrogen Fixation.** Dilworth, M. J. y A. R. Glenn (eds). pp. 162-186. Elsevier. New York.
- Simek, M. y J. E. Cooper. 2002. The influence of soil pH on denitrification: progress towards the understanding of this interaction over the last 50 years. **European Journal of Soil Science.** 53: 345-354.
- Song, B. y B.B. Ward. 2003. Nitrite reductasa genes in halobenzoate degrading denitrifying bacteria. **FEMS Microbiology Ecology.** 43: 349-357.
- Stevens, R. L., R. J. Laughlin y J. P. Malone. 1998. Soil pH affects the process reducing nitrate to nitrous oxide and di-nitrogen. **Soil Biology and Biochemistry.** 30: 1119-1126.
- Strong, D. T. y I. R. P. Fillery. 2002. Denitrification response to nitrate concentration in sandy soils. **Soil Biology and Biochemistry.** 43: 945-954.
- Suzuki, C., T. Kunito, T. Aono, C. -T. Liu y H. Oyaizu. 2005. Microbial indices of soil fertility. **Journal of Applied Microbiology.** 98: 1062-1074.
- Tan, K. H. 2000. **Environmental soil science.** Marcel Dekker, Inc. New York. pp. 452.
- Tiedje, J. M. 1998. Ecology of Denitrification and dissimilatory nitrate reduction to ammonium. P. 176-244. En: **Biology of anaerobic microorganism.** A. J. B. Zehnder (ed.). John Wiley & Sons. New York, N. Y.
- Toledo, G., Y. Bashan y A. Soeldner. 1995. Cyanobacteria and black mangroves in Northwestern Mexico: colonization, and diurnal and seasonal nitrogen fixation on aerial roots. **Can. J. Microbiol.** 41: 999-1011.

- Thróback, I. N., K. Enwall, A. Jarvis y S. Hallin. 2004. Reassessing PCR primers targeting *nirS*, *nirK* and *nosZ* genes for community surveys of bacteria with DGGE. **FEMS Microbiol Ecol.** 49: 401-407.
- Valle, A., M. J. Bailey, A. S. Whiteley y M. Manefield. 2004. N-acyl-L-Homoserine lactones (AHLs) affect microbial community composition and function in activated sludge. **Environmental Microbiology.** 6(4): 424-433.
- Van. Gestel, M., R. Merckx, y K. Vlassek. 1996. Spatial distribution of microbial biomass in microaggregates of a silty-loam soil and the relation with the resistance of microorganisms to soil drying. **Soil Bio. Biochem.** 28: 503-510.
- Vazquez, C. P. 1996. Bacterias solubilizadoras de fosfatos inorgánicos asociadas a la rizosfera de los mangles: *Avicennia germinans* (L.) L y *Laguncularia racemosa* (L.) Gaerth. **Tesis de Licenciatura.** UABCS. México. 44 pp.
- Voet, D. y J. G. Voet. 1995. **Biochemistry.** John Wiley & Sons, Inc. pp 1360.
- Waible, A. E., T. Meter., K.S. Carslaw. Et al. (1999) Arctic ozone loss due to Denitrification. **Science.** 283:2064-2069.
- Wagner, V.E., D. Bushnell, L. Passador, A. I. Brooks y B. Iglewski. 2003. Microarray analysis of *Pseudomonas aeruginosa* quorum sensing regulons: effects of growth phase and environment. **Journal of Bacteriology.** 185(7): 2080-2095.
- Wang, L. J. D: Helmann y S. C. Winans. 1992. The *A. tumefaciens* transcriptional activator OccR causes a bend at a target promoter, which is partially relaxed by a plant tumor metabolite. **Cell.** 69. 659-667.
- Wang G. y H. D. Skipper. 2004. Identification of denitrifying rhizobacteria from bentgrass and bermudagrass golf greens. **Journal of Applied Microbiology.** 97: 827-837.

- Watteau, F., U. Villemin, G. Burtin y L. Jocteur-Monrozier. 2005. Root impact on the stability and types of microaggregates in silty soil under maize. **European Journal of Soil Science**. 10: 1365-2389.
- Widner, F., B. T. Shaffer, L. A. Porteous y R. J. Seidler. 1999. Analysis of nifH gene pool complexity in soil and litter at a Douglas Fir Forest site in the Oregon cascade mountain range. **Appl Environ Microbiol**. 65(2): 374-380.
- Wolsing, M. y A. Priemé. 2004. Observation of high seasonal variation in community structure of denitrifying bacteria in arable soil receiving artificial fertilizer and cattle manure by determining T-RFLP of *nir* gene fragments. **FEMS Microbiology Ecology**. 48(2004) 261-271.
- Wood, D. W., F. Gong, M. M. Daykin, P. Williams, L.S. y Pierson III. 1997. N-acyl-homoserine lacton-mediated regulation of phenazine gene expression by *Pseudomonas aerofaciens* 30-84 in the wheat rhizosphere. **J. Bacteriology**. 179: 7663-70.
- White, D. 2000. **The physiology and biochemistry of prokaryotes**. Oxford University Press. New York. pp 565.
- Whitehead, N. A., A. M. L. Barnard, H. Slater, N. J. L. Simpson, G. P. C. Salmond. 2001. Quorum sensing in Gram-negative bacteria. **FEMS Microbiology Reviews**. 25: 365-404.
- Wilkinson, A., Danino, V. F. Wisniewski-Dyé, J. K. Lithgow y J. A: Downie. 2002. N-Acyl-homoserine lactone inhibition of rhizobial growth is mediated by two quorum-sensing genes that regulate plasmid transfer. **Journal of Bacteriology**. 184(16): 4510-4519.
- Xiong, J., W. M. Fischer, K. Inoue, M. Nakahara y C.E. Bauer. 2000. Molecular evidence for the early evolution of photosynthesis. **Science**. 289: 1724-1730.

- Yan, T., M. W. Fields, L. Wu, Y. Zu, J.M. Tiedje y J. Zhou. 2003. Molecular diversity and characterization of nitrite reductase gene fragments (*nirK* and *nirS*) from nitrate- and uranium-contaminated groundwater. **Environmental Microbiology**. 5(1): 13-24.
- Yeager, Ch. M. 2004. Diazotrophic community structure and function in two successional stages of biological soil crusts from the Colorado plateau and Chihuahuan desert. **Appl Environ Microbiol**. 70(2): 973-983.
- Yoshie, S., N. Noda, S. Tsuneda, A. Hirata y Y. Inamori. 2004. Salinity Decreases Nitrite Reductase Gene Diversity in Denitrifying Bacteria of Wastewater Treatment Systems. **Appl Environ Microbiol**. 70 (5): 3152-3257.
- Young, J. P. W. 1992. Phylogenetic classification of nitrogen-fixing organisms. En G. Stacey, H. J. Evans, y R. H. Burris (ed.). **Biological nitrogen fixation**. Chapman and Hall. New York. pp 43-86.
- Zehr, J.P., M. Mellon, S. Braun, W. Litaker, T. Steppe y H. W. Paerl. 1995. Diversity of heterotrophic nitrogen fixation genes in a marine cyanobacterial mat. **Appl Environ Microbiol**. 61:2527-2532.
- Zehr, J. P. y D. G. Capone. 1996. Problems and promises of assaying the genetic potential for nitrogen fixation in the marine environment.
- Zehr, J.P., B. D. Jenkins, S. M. Short y G. F. Steward. 2003. Nitrogenase gene diversity and microbial community structure: a cross-system comparison. **Environmental Microbiology**. 5 (7): 539-554.
- Zuberer, D. A: y W. S. Silver. 1975. **Mangrove-associated nitrogen fixation**. In: Walsh G. E., S. C. D. Snedaker, H. J. Teas (eds). Proceedings of International Symposium on Biology and Management of Mangroves. Honolulu. Institute of Food and Agricultural Science. University of Florida. Gainesville. pp. 643-653.

- Zuberer, D. A: y W. S. Silver. 1978. Biological Dinitrogen Fixation (Acetylene Reduction) associated with Florida Mangroves. **Appl Environ Microbiol.** 35(3): 567-575.
- Zhu, J., P. M. Oger, B. Scharammeijer, P. J. J. Hooykaas, S. K. Farrand y S. C. Winans. 2000. The bases of crown gall tumorigenesis. **Journal of Bacteriology.** 182: 3885-3895.
- Zuberer, D. A. 1990. Soil and rhizosphere aspects of N₂-fixing plant-microbe associations. En: **The Rhizosphere** (ed J. M. Lynch), pp. 317-353. John Wiley & Sons. New York.
- Zumft, W. T. 1992. The denitrifying prokaryotes. En Balows, A., H.G. Trüper, M. Dworkin, W. Harder y K. -H. Schleifer. **A handbook on the biology bacteria: ecophysiology, aisolation, identification, applications.** Springer-Verlag. New York. pp. 554-582.