



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

---

# POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

Instituto de Ecología

ESTIMACIÓN DE LOS PATRONES DE FIJACIÓN  
DE NITRÓGENO Y DIVERSIDAD ASOCIADA  
(*nifH*) EN TAPICES MICROBIANOS Y  
ESTROMATOLITOS

# TESIS

QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADÉMICO DE

MAESTRA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS  
(BIOLOGÍA AMBIENTAL)

P R E S E N T A

Y. YISLEM BELTRÁN DÍAZ

TUTORA PRINCIPAL DE TESIS: DRA. LUISA ISAURA FALCÓN ÁLVAREZ  
COMITÉ TUTOR: DR. FELIPE GARCÍA OLIVA, DR. JAVIER ALCOCER DURAND

MÉXICO, D.F.

OCTUBRE, 2010



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

**Dr. Isidro Ávila Martínez**  
**Director General de Administración Escolar, UNAM**  
**Presente**

Me permito informar a usted que en la reunión ordinaria del Comité Académico del Posgrado en Ciencias Biológicas, celebrada el día 28 de junio de 2010, se aprobó el siguiente jurado para el examen de grado de **MAESTRA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS (BIOLOGÍA AMBIENTAL)** de la alumna **BELTRAN DIAZ YESSICA YISLEM** con número de cuenta **99038627** con la tesis titulada **"ESTIMACIÓN DE LOS PATRONES DE FIJACIÓN DE NITRÓGENO Y DIVERSIDAD ASOCIADA (*nifh*) EN TAPICES MICROBIANOS Y ESTROMATOLITOS"**, realizada bajo la dirección de la **DRA. LUISA ISAURA FALCON ALVAREZ**:

Presidente: DRA. MARISA MAZARI HIRIART  
Vocal: DR. FELIPE FRANCISCO GARCIA OLIVA  
Secretario: DRA. LUISA ISAURA FALCON ALVAREZ  
Suplente: DR. LUIS ZAMBRANO GONZALEZ  
Suplente: DR. JAVIER ALCOCER DURAND

Sin otro particular, me es grato enviarle un cordial saludo.

**Atentamente**  
**"POR MI RAZA HABLARA EL ESPIRITU"**  
Cd. Universitaria, D.F., a 2 de septiembre de 2010.

  
**Dr. Juan Núñez Farfán**  
Coordinador del Programa

c.c.p. Expediente de la interesada.

## **AGRADECIMIENTOS**

En primera instancia y muy especial a la máxima casa de estudios, la Universidad Nacional Autónoma de México.

Al Posgrado en Ciencias Biológicas, UNAM, por permitirme formar parte de su programa.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por la beca de maestría brindada.

Al proyecto SEP-CONACyT No. 56045 y PAPIIT No. IN225709-3 por el financiamiento otorgado para la realización de esta tesis.

A la unidad de Posgrado, UNAM, por el apoyo económico para asistencia a estancia de investigación internacional (Apoyos financieros PAEP, 2010).

A los miembros del comité tutor: Dr. Felipe García Oliva, Dr. Javier Alcocer Durand y en especial a mi tutora principal Dra. Luisa Isaura Falcón por su dedicación, consejos y paciencia durante la realización de esta tesis.

Al los miembros de Jurado: Dra. Marisa Masari y Dr. Luis Zambrano que con sus valiosos comentarios permitieron el enriquecimiento de esta tesis.

Al laboratorio de Evolución Molecular y Experimental (Instituto de Ecología, UNAM), por las facilidades otorgadas en la realización de trabajo, tanto en la cromatografía como en la parte molecular.

Al laboratorio Biogeoquímica de suelos (CIECO, UNAM), por el apoyo prestado en la obtención de los resultados y análisis de los parámetros biogeoquímicos.

Al apoyo técnico del Biol. Rubén Pérez Ishiwara y las facilidades brindadas por el laboratorio Interacción Planta-Animal (Instituto de Ecología, UNAM) en la culminación de la fase experimental.

Al apoyo brindado por PRONATURA Noreste, AC en el Rancho Pozas Azules en Cuatro Ciénegas y a Community Tours SA de CV en Sian ka'an. Todas las colectas fueron realizadas bajo los permisos SEMARNAT -FAUT.0112 y DGOPA.09392.301109.4119.

A Julia Domínguez, Ana Lidia Sandoval y Carlos Belman por su ayuda en campo.

A mi madre, mamita porque a pesar de todo nunca me dices que no, muchas muchas GRACIAS, te quiero mucho!

A mi padre, porque gracias a ti soy la persona que puede escribir tesis pero no estas cosas.

A mi hermana, Myriana sabemos que solas podemos hacer lo que sea pero entre las dos es más fácil GRACIAS por todo.

A mi tía Beatriz y a la familia Sosa Beltrán, gracias por su apoyo e infinita paciencia y recuerden que esto aún no termina.

A Marcela, gracias por darme el valor de continuar, compartir mis arranques y ponerme los pies en la tierra. La próxima prometo hasta dedicártela.

A Carly, Sandy, Gaby, infinitamente agradecida! Se les quiere bien.

A mis amigos que me ayudaron a hacer más ligera la carga cuando fue muy pesada. Y si, me refiero a ti que estás leyendo esto ahora.

A todas las personas que contribuyeron directa e indirectamente con la realización de este trabajo.

*A mis padres,  
con todo mi cariño y gratitud.  
Sé que siempre estarán ahí*

## ÍNDICE

ÍNDICE DE TABLAS.....	i
ÍNDICE DE FIGURAS.....	ii
RESUMEN.....	iv
ABSTRACT.....	v
INTRODUCCIÓN.....	1
OBJETIVOS.....	8
SITIOS DE ESTUDIO.....	9
Pozas Azules I, Coahuila.....	9
Lago Cráter de Alchichica, Puebla.....	9
Lagunas costeras en Quintana Roo .....	11
Laguna Muyil.....	11
Laguna Bacalar.....	12
MATERIAL Y MÉTODOS.....	13
Parámetros ambientales.....	13
C, N y P en la biomasa microbiana.....	13
Fijación de Nitrógeno.....	14
Análisis de resultados.....	15
Análisis Molecular.....	16
Extracción de ácidos nucleicos.....	16
Amplificación, clonación, secuenciación y análisis del gen nifH.....	17
RESULTADOS.....	18
Parámetros ambientales.....	18
Concentraciones de C, N y P en la biomasa microbiana.....	21
Fijación de nitrógeno.....	23
Composición genética.....	30
Análisis de variables.....	35
DISCUSIÓN.....	38
CONCLUSIONES.....	44
BIBLIOGRAFÍA.....	45

## Índice de Tablas

Tabla 1. Características ambientales registradas en los sistemas durante los muestreos: invierno (enero-febrero), verano (mayo-junio).....	18
Tabla 2. Concentración de los nutrientes disponibles en el agua: NH <sub>4</sub> , NO <sub>2</sub> , NO <sub>3</sub> , PO <sub>4</sub> y SiO <sub>4</sub> , registrada en los sitios de muestreo durante las estaciones invierno (enero) y verano (junio).....	19
Tabla 3. Concentración (µg g <sup>-1</sup> ) de C <sub>mic</sub> , N <sub>min</sub> y P <sub>mic</sub> y proporciones C:N, C:P y N:P, en cada uno de los consocios analizados.....	21
Tabla 4. Resumen de las secuencias representativas recuperadas del tapiz microbiano y estromatolitos en los diferentes sitios.....	31
Tabla 5. Comparación entre las comunidades microbianas según los datos de la composición de los filotipos registrados de los fijadores de nitrógeno potenciales (gen <i>nifH</i> ).....	32
Tabla 6. Resultados del procedimiento de <i>forward selection</i> .....	35

## Índice de Figuras

- Figura 1. Sitios donde se localizan los consorcios microbianos considerados en este estudio. A) Mapa de México indicando las localidades: B) Pozas Azules, en Cuatro Ciénegas; C) Alchichica en Puebla; D) Muyil y E) Bacalar en Quintana Roo.....10
- Figura 2. Formas disponibles: a) DIN ( $\text{NH}_4 + \text{NO}_2 + \text{NO}_3$ ), b)  $\text{PO}_4$  y c)  $\text{SiO}_4$ . En el agua circundante a los consorcios microbianos Muyil (My), Bacalar (Bac), Alchichica columnar (Alc), Alchichica esponjoso (Ale) y Pozas Azules (PA), durante los muestreos de invierno y verano.....20
- Figura 3. Distribución de la concentración ( $\mu\text{g g}^{-1}$ ), de las formas microbianas: a) C, b) N y c) P, entre los consorcios y entre estaciones de muestreo. (My) Muyil, (Bac) Bacalar, (Alc) A. columnar, (Ale) A. esponjoso, (PA) Pozas Azules, (inv) invierno y (ver) verano. NA: estos datos no fueron obtenidos.....22
- Figura 4. Patrones de fijación de  $\text{N}_2$  en un ciclo de 24 hr de cada uno de los consorcios considerados (media  $\pm$  DS).....24
- Figura 5. Tendencia en la fijación de  $\text{N}_2$  en el tapiz microbiano de la Laguna Muyil. a) actividad de la nitrogenasa en un periodo de 24 hrs, durante el invierno (cuadros) y en verano (rombos); diferenciación de la fijación de  $\text{N}_2$  entre el día y la noche en invierno b), en verano c).....25
- Figura 6. Fijación de  $\text{N}_2$  en la Laguna Bacalar. a) actividad en un periodo diario, en invierno (rombos) y en verano (cuadros); b) diferenciación entre el grado de fijación entre el fotoperiodo y el periodo de oscuridad en invierno y c) en verano.....26
- Figura 7. Fijación de  $\text{N}_2$  de los dos tipos de consorcios microbianos en el lago cráter de Alchichica.....26
- Figura 8. Actividad en la fijación de  $\text{N}_2$  en el estromatolito columnar. a) actividad de la nitrogenasa en el monitoreo de 24 hr, invierno (cuadros) y verano (rombos); b y c) fijación de  $\text{N}_2$  realizada durante el día y durante la noche en invierno y verano respectivamente.....27
- Figura 9. Fijación de  $\text{N}_2$  en el estromatolito esponjoso. a) monitoreo de 24 hr, durante invierno (cuadros) y verano (rombos); b y c) fijación de  $\text{N}_2$  durante el día y durante la noche en cada temporada.....28
- Figura 10. Actividad de la fijación de  $\text{N}_2$  en el estromatolito de Pozas Azules. a) actividad de la nitrogenasa en el patrón diario, durante el invierno (rombos) y el verano (cuadros); b) y c) fijación de  $\text{N}_2$  realizada durante el día y durante la noche en ambas estaciones.....28

Figura 11. Tendencia en la fijación de N<sub>2</sub> entre los distintos sitios entre los periodos de luz en cada temporada. Las barras denotan un intervalo de confianza al 0.95.....29

Figura 12. Cobertura de la riqueza registrada en cada una de las librerías de clonas de *nifH* de los consorcios microbianos: Ale, Alchichica esponjoso; My, Muyil; Alc, Alchichica columnar; Bac, Bacalar; PA, Pozas Azules.....33

Figura 13. Topología filogenética generada por Neighbor Joining, con las secuencias representativas de cada uno de los filotipos encontrados al 95% de similitud: AcV, Alchichica columnar; Ale, Alchichica esponjoso; BcV, Bacalar; PA, Pozas Azules; SkV, Muyil; y las secuencias de referencia obtenidas de la base de datos, en los paréntesis se muestran los números de acceso de estas secuencias.....34

Figura 14. Ordenación del RDA en biplot que ilustra el efecto (P=0.05) de la actividad de fijación de N<sub>2</sub> en la composición microbiana (gen *nifH*) de cinco comunidades microbianas. Los puntos negros denotan a las distintas comunidades microbianas. Las líneas sólidas representan los filotipos registrados. En el eje de las abscisas la variable que explica el 11% de la variación de los datos.....36

## Resumen

Las comunidades microbianas en los ambientes acuáticos están frecuentemente organizadas en matrices laminadas denominadas tapices microbianos y estromatolitos, los cuales brindan un sustrato de adhesión y gradientes químicos. Dentro de estas comunidades microbianas se crean distintos microhabitats, donde representantes específicos de la comunidad son capaces de optimizar su crecimiento y el ciclaje biogeoquímico. Estos gradientes también brindan protección contra factores ambientales externos, incluyendo la carencia de nutrientes y la desecación periódica, los cuales inhiben el crecimiento y la reproducción de los organismos. Los tapices microbianos y estromatolitos tiene una gran diversidad taxonómica y son comunidades altamente productivas que habitan bajo condiciones que resultan desfavorables para la mayoría de los organismos. Estos tipos de comunidades microbianas, además de ser sorprendentemente diversas, exhiben un alto grado de redundancia, con representantes de procariontes metabólicamente diversos, incluyendo cianobacterias, bacterias tanto fotosintéticas como heterótrofas y arqueas. Todos estos grupos llevan a cabo la producción primaria y el ciclaje de nutrientes en lagos, lagunas y otros cuerpos de agua superficiales, bajo condiciones ambientales extremas y estacionalmente fluctuantes. Este estudio analiza la función de las comunidades microbianas que forman tapices microbianos y estromatolitos, asociadas a la fijación de nitrógeno y la diversidad del gen *nifH* de diferentes ambientes. Todas las comunidades comparten un patrón diario de fijación de nitrógeno registrando la mayor actividad durante el día y en el verano. La diversidad del gen *nifH* estuvo dominada por representantes de cianobacterias y proteobacterias, sugiriendo la importancia de organismos fotoautótrofos y heterótrofos en estas comunidades microbianas. La estructura de las comunidades basada en la composición de *nifH* estuvo relacionada a la actividad de la nitrogenasa. Ninguna de las variables ambientales fue determinante en la estructura de la comunidad. La condición oligotrófica de los sistemas resulta ser una característica fundamental en el desarrollo de los estromatolitos y de los tapices microbianos que remarcan la importancia de estas estructuras como indicadores de la salud del ambiente.

## Abstract

Microbial communities are often organized in laminated matrices called microbial mats and stromatolites, which provide both a substrate for attachment and chemical gradients. Within the microbial communities are distinct microhabitats in which specific members of the community are able to optimize biogeochemical cycling and growth. These gradients also provide protection against external environmental factors, including nutrient deprivation and periodic desiccation, which inhibit growth and reproduction. These mats and stromatolites are taxonomically diverse and productive communities that inhabit under conditions that would otherwise be hostile for life. These types of microbial communities are surprisingly diverse and exhibit a high degree of redundancy. They include a wide arrangement of metabolically different prokaryotes, including cyanobacteria, photosynthetic and heterotrophic bacteria and Archaea. Together, these organisms carry out primary production, nutrient cycling in lakes, lagoons and other shallow water ecosystems under fluctuating and extreme conditions. This study analyzed stromatolites and mat-forming community function associated to N<sub>2</sub> fixation and diversity (*nifH*) from different environments. All communities shared a diurnal pattern of N<sub>2</sub> fixation with peak activity during the day and in the warmer, rainy summer. *nifH* gene diversity was dominated by cyanobacteria and proteobacteria suggesting the importance of photoautotrophs and heterotrophs in these microbial communities. Community structure based on *nifH* composition was related to nitrogen activity. No environmental variable was determinant in the community structure. Oligotrophy was defined as a fundamental condition for sustaining stromatolites and mat-forming communities, enhancing the importance of these structures as indicators of environmental health.

## INTRODUCCIÓN

Las comunidades bacterianas formadoras de microbialitos son los registros más cercanos que encontramos hoy en día a las primeras o más antiguas formas de vida bacterianas e incluso podrían ser consideradas los primeros ecosistemas organizados en la superficie del planeta (Schopf et al., 2002; Awramik, 2006). Estas comunidades formadas principalmente de organismos procariontes han logrado desarrollarse en una gran variedad de ambientes extremos, en los cuales los organismos eucariontes son poco comunes. Entre las razones, destacan la variedad de reacciones metabólicas que pueden catalizar los procariontes y su gran capacidad de adaptarse a los cambios y fluctuaciones en las condiciones ambientales (Whitman, 1998; Ward et al., 1998). En estas comunidades, existe la presencia de bacterias púrpuras y bacterias verdes del azufre, pero las cianobacterias son los organismos más exitosos en la formación de comunidades microbianas, tales como el tapiz microbiano y los estromatolitos en los cuerpos de agua. Una importante propiedad de las cianobacterias y de algunas proteobacterias, que no comparten con ningún eucarionte, es la capacidad de utilizar el nitrógeno atmosférico ( $N_2$ ) como fuente de nitrógeno. Por lo tanto esta característica le brinda a la comunidad microbiana la ventaja de crecer independientemente de una fuente de nitrógeno combinada (Stal, 2000).

Actualmente la combinación de los métodos ecofisiológicos con los de la biología molecular ha logrado un enorme impacto en el entendimiento no solo de la fijación de nitrógeno, realizada en las comunidades microbianas, sino del ciclo completo del N y su implicación en el ciclaje de los elementos a una escala ecosistémica (Zerh & McReynolds, 1989; Scala & Kerhof, 1998; Moir & Wood, 2001; Des Marais, 2003).

### ***Ecología bacteriana***

Las bacterias catalizan transformaciones únicas e indispensables en una gran variedad de rutas metabólicas dentro de los ciclos biogeoquímicos de la biosfera, producen importantes componentes de la atmósfera y representan una gran porción de la diversidad genética de la vida (Whitman, 1998; Ward *et al.*, 1998; Madigan *et al.*, 1999). La ubicuidad de estos microorganismos ha desafiado a los investigadores, debido a que estimar su abundancia y diversidad implica registrar su presencia en una gran variedad de hábitats, desde aquellos ambientes ricos en nutrientes en suelos, cuerpos de agua e incluso otros

organismos; hasta aquellos que presentan condiciones extremas, tales como las ventilas hidrotermales (Whitman, 1998; Horner-Devine, 2004). De tal forma que la ecología microbiana tiene dos grandes retos, el primero es describir la diversidad de los microorganismos y el segundo es medir la actividad de estos organismos (Madigan *et al.*, 1999).

La tarea de describir la diversidad bacteriana ha tenido una serie de limitaciones, la más relevante ha sido, las restricciones de los métodos tradicionales en la microbiología, ya que a través de los cultivos se estima que sólo se ha podido describir el 1% del total de las especies bacterianas (Amann *et al.*, 1995; Pace, 1997; Curtis *et al.*, 2002). Las técnicas dependientes de cultivo indudablemente son esenciales en la caracterización de los microorganismos, principalmente para los estudios de ecofisiología microbiana, la cual no permite establecer las relaciones evolutivas y subestiman la diversidad microbiana (Ward, 1998).

Actualmente con las técnicas moleculares basadas en la manipulación del ADN se ha logrado mejorar la identificación de grupos bacterianos (von Wintzingerode *et al.*, 1997, Head *et al.*, 1998). Con estas técnicas independientes de cultivo, Torsvik *et al.* (2002) estimaron que el número de especies de bacterias en un gramo de suelo alcanzaba las nueve mil especies, de igual forma otros autores han estimado que existen aproximadamente 10,000 millones de especies bacterianas en la Tierra (Horner-Devine *et al.*, 2004). Así es como en las últimas décadas, gracias al aumento acelerado en la utilización de las nuevas técnicas que ofrece la biología molecular, se han obtenido importantes aproximaciones sobre el conocimiento de la diversidad y distribución general de los procariontes (Pace, 1997; Sebat *et al.*, 2003). Con lo cual se ha logrado estudiar la estructura de las comunidades microbianas de la misma forma en que los ecólogos lo hacen con organismos grandes.

Como se enuncia en diversos textos, en los estudios de ecología de comunidades el primer paso usualmente es describir la estructura de la comunidad y entonces formular hipótesis acerca de las causas de dicha estructuración (Begon *et al.*, 1996). En un principio resultaba difícil creer que las bacterias presentaban biogeografía, debido a que se había propuesto que los microorganismos se dispersaban de forma ubicua sin formar poblaciones aisladas geográficamente, sugiriendo una distribución cosmopolita sin la posibilidad de

encontrar en ellos patrones biogeográficos (Finlay *et al.*, 2002; Horner-Devine *et al.*, 2004). Sin embargo, estudios recientes han mostrado patrones biogeográficos en algunos grupos bacterianos (Papke *et al.*, 2003; Whitaker *et al.*, 2003; Dolan, 2005; Falcón *et al.*, 2008), los cuales desafían los modelos sobre diversidad microbiana, que sugieren que la dispersión sin restricción limita el desarrollo de la riqueza de especies. Sin embargo, los factores que determinan estos patrones biogeográficos han sido poco estudiados.

Es probable que la diversidad bacteriana tenga una estructuración redundante en los ecosistemas. Sin embargo estas suposiciones son sutiles, ya que los diferentes estudios sobre el tema son inconsistentes en los resultados. Por ejemplo, algunos estudios indican que la composición de comunidades bacterianas en suelo es heterogénea mientras que otros indican que es homogénea, ambos resultados obtenidos en escalas espaciales grandes (Felske & Akkermans, 1998; Piceno *et al.*, 1999; Webster *et al.*, 2002). Esta inconsistencia puede ser atribuida a la dificultad para estimar la diversidad bacteriana, o bien, a que las bases teóricas establecidas en macroorganismos no aplican en la complejidad del mundo microbiano (Curtis, 2002; Horner-Devine *et al.*, 2004).

Otro de los grandes problemas a los que se enfrenta la ecología microbiana es la escala en la cual se realizan los estudios, ya que aun con las nuevas herramientas moleculares, los resultados pueden variar según la escala temporal, espacial o evolutiva. Por eso, para poder describir las comunidades es necesario contar con la ayuda de marcadores específicos que nos brinden una buena resolución acerca de la composición en la diversidad de las comunidades. Tal es el caso de marcadores metabólicos, que pueden describir a una escala más fina la estructura de cierto grupo de organismos en la comunidad.

### ***Ciclo del nitrógeno***

Las principales fases en el ciclo del nitrógeno son la fijación de nitrógeno, la nitrificación, la asimilación de nitrógeno ( $\text{NO}_2$  y  $\text{NO}_3$ ), la desnitrificación y la amonificación. Todos estos procesos están regulados por la actividad microbiana (Postgate, 1998; Zehr & Ward, 2002).

La fijación de nitrógeno involucra la reducción del dinitrógeno ( $\text{N}_2$ ) en amonio ( $\text{NH}_4$ ), la cual es una de las transformaciones más importantes ya que a pesar de su abundancia ( $3.9 \times 10^{21}$  gN), el  $\text{N}_2$  es prácticamente inerte gracias a su triple enlace. En esta

reacción, las bacterias logran reducir el dinitrógeno a amonio al interior de las células, luego es convertido a formas orgánicas. Una vez que el nitrógeno es incorporado a la biomasa, el nitrógeno orgánico puede ser mineralizado a  $\text{NH}_4$ , este proceso también se conoce como amonificación. El  $\text{NH}_4$  y las formas inorgánicas de nitrógeno como nitritos ( $\text{NO}_2$ ) y nitratos ( $\text{NO}_3$ ) representan las formas disponibles del nitrógeno y pueden limitar la productividad de los ecosistemas (Postgate, 1998; Madigan *et al.*, 1999; Schlesinger, 2000).

La nitrificación se refiere a la formación de  $\text{NO}_2$  y  $\text{NO}_3$  a partir de la oxidación de  $\text{NH}_4$ , cuyas reacciones, son realizadas por las bacterias nitrificantes. Entre las bacterias nitrificantes existen las que oxidan el amonio a nitrito y aquellas que oxidan nitrito a nitrato, de tal forma que ningún organismo hace ambas reacciones (Ward *et al.*, 2007). Las formas inorgánicas de nitrógeno ( $\text{NO}_2$  y  $\text{NO}_3$ ) son incorporadas en polímeros nitrogenados, en un proceso que se conoce como asimilación del nitrógeno. La asimilación corresponde a la reducción del nitrato a nitrito y posteriormente a  $\text{NH}_4$ . Este proceso tiene un costo energético mayor al de la producción de compuestos orgánicos a partir de la asimilación directa de  $\text{NH}_4$ . (Postgate, 1998; Zehr & Ward, 2002).

La reducción del nitrato a formas de nitrógeno gaseosos ( $\text{NO}$ ,  $\text{N}_2\text{O}$  y  $\text{N}_2$ ), representa la pérdida del nitrógeno en el ecosistema. Las transformaciones de esta parte del ciclo son la desnitrificación y la anammox. La desnitrificación es la ruta por la cual las bacterias heterótrofas reducen el nitrato a  $\text{N}_2$ , pasando por el nitrito, el óxido nítrico y por el óxido nitroso, en condiciones anoxigénicas; mientras que en la anammox el amonio es oxidado anaeróbicamente a  $\text{N}_2$ , con  $\text{NO}_2$  como intermediario. Los productos finales de estas últimas transformaciones son gases de efecto invernadero, involucrados en el control del clima en la Tierra (Postgate, 1998; Ward *et al.*, 2007).

### ***Consortios microbianos***

Los consorcios microbianos están formados por comunidades bentónicas de microorganismos. Estas comunidades se desarrollan en estructuras sedimentarias verticalmente laminadas. Frecuentemente esta laminación es fácilmente identificada, debido a las notables diferencias en la coloración que causan los pigmentos correspondientes a cada grupo de organismos (Van Gemerden, 1993; Des Marais, 1995; Reid *et al.*, 1995; Ward *et al.*, 1998; Fenchel, 2000; Stolz, 2000). De tal forma que en cada

una de las láminas del consorcio reside un grupo funcionalmente distinto: fotótrofos oxigénicos, heterótrofos aerobios, fotótrofos anoxigénicos, heterótrofos anaerobios (Fenchel, 2000; Dupraz & Visscher, 2005). La combinación de esta actividad metabólica favorece el establecimiento de gradientes químicos (concentración de  $O_2$  y  $SO_4^{-2}$ ), en el potencial redox, en el pH y en la cantidad de luz disponible (Van Gemerden, 1993; Des Marais, 1995; Stolz, 2000; Des Marais, 2003).

Entre los consorcios microbianos se encuentran los estromatolitos, cuyos depósitos laminados de carbonato, formados a partir de la litificación de la estructura microbiana, han logrado dejar su huella geológica. De hecho, actualmente han sido registrados estromatolitos fósiles que datan de hace 3,500 millones de años en el Precámbrico y son la evidencia macroscópica más antigua de vida en la Tierra (Grotzinger & Knoll, 1999; Fenchel, 2000; Riding, 2000; Schopf, 2002). En este sentido, se considera que los consorcios microbianos actuales son análogos a estas primeras comunidades vivas y por lo tanto el estudio de estos modernos consorcios podrían ofrecer una ventana al pasado (Reid *et al.*, 2000; Awramik, 2006). A la fecha, muchos de los consorcios microbianos han sido encontrados en suelos, lagunas, zonas submareales e intermareales, pozas hipersalinas, manantiales termales, ríos y lagos (Van Gemerden, 1993; Des Marais, 1995; Ward *et al.*, 1998; Fenchel, 2000; Dupraz & Visscher, 2005), sitios con características ambientales extremas, físicamente dinámicos, geoquímicamente inusuales y pobres en nutrientes (Canfield & Des Marais, 1993; Joye *et al.*, 1993; Paerl *et al.*, 1993; Pinckney, 1995; Elser *et al.*, 2005).

En general, los consorcios microbianos se componen de cianobacterias que participan en la producción de materia orgánica, en el aumento de oxígeno y en la fijación de  $N_2$ ; de bacterias fotótrofas anoxigénicas que utilizan formas reducidas del azufre para fijar  $CO_2$  y algunas también fijan  $N_2$ ; bacterias heterótrofas que obtienen energía de la respiración del  $O_2$  y carbono orgánico; bacterias fotótrofas que oxidan azufre para obtener energía y de bacterias sulfato reductoras (Van Gemerden, 1993; Fenchel, 2000; Dupraz & Visscher, 2005). Es así que los consorcios microbianos simbolizan un ecosistema en pequeña escala, compuesto de comunidades microbianas que ofrecen un modelo útil para el estudio de las interacciones en un ecosistema, sobre todo por su alto grado de interacción e

interdependencia entre los distintos grupos funcionales (Fenchel, 2000; Paerl *et al.*, 2000; Des Marais, 2003; Sigee, 2005).

En la superficie de los consorcios generalmente domina la presencia de cianobacterias que se encargan de dar estabilidad a los consorcios, ya que atrapan y adhieren el sedimento en una matriz de sustancias exopoliméricas donde acumulan lentamente materia orgánica y CaCO<sub>3</sub> (Des Marais, 1995; Decho *et al.*, 2005; Dupraz & Visscher, 2005). Las cianobacterias son la fuerza conductora del ciclaje biogeoquímico en los consorcios donde dominan, dada su capacidad de fijar CO<sub>2</sub> y N<sub>2</sub> (Reid *et al.*, 2000; Dupraz & Visscher, 2005). Asimismo, los consorcios más estudiados son aquellos dominados por cianobacterias filamentosas presentes en superficies arenosas intermareales, en los cuales las vainas de polisacáridos que rodean a las cianobacterias tienen la capacidad de retener agua y protegen a los microorganismos de la desecación, además de brindarles protección contra otras condiciones de estrés ambiental. La capacidad que tienen las cianobacterias de fijar N<sub>2</sub> permite el establecimiento de consorcios microbianos en ambientes en los cuales no hay formas disponibles de nitrógeno (Des Marais, 1995; Stal, 1995; Omoregie *et al.*, 2004).

A pesar de que la limitación de nitrógeno es una característica común de los sistemas acuáticos, tanto marinos como continentales (Elser, 2007; Gruber & Galloway, 2008); los consorcios microbianos con frecuencia logran establecerse en estos ambientes, sugiriendo que estas comunidades microbianas no dependen de fuentes exógenas de nitrógeno para desarrollarse. Este éxito ha sido atribuido a la capacidad de grupos específicos en los consorcios que logran efectuar la fijación de N<sub>2</sub> (Paerl *et al.*, 1993).

La fijación de N<sub>2</sub> en los organismos es catalizada por el complejo enzimático nitrogenasa, el cual está conformado por dos subunidades: la dinitrogenasa reductasa y la dinitrogenasa, ambas contienen hierro y la dinitrogenasa además tiene molibdeno (Stal, 1994; Postgate, 1998; Madigan *et al.*, 1999). La secuencia de transferencia de electrones en esta enzima requiere de dos moléculas de ATP por cada electrón transferido, de tal forma que la reacción final es:



Esta reacción ocurre gracias a una de las enzimas más conservadas, que ha logrado permanecer en el tiempo, incluso resistiendo la transición de una atmósfera anoxigénica a

una oxigénica, por lo que se sugiere evolucionó en la Tierra temprana (Raymond *et al.*, 2004; Klotz & Stein, 2008). A pesar de que se asume que las cianobacterias en los ambientes acuáticos son los microorganismos más importantes en la fijación de N<sub>2</sub>, existen además otros organismos procariontes diazotrófos tanto en el dominio Bacteria como en el Archaea (Stal, 1994).

Una de las principales características de la nitrogenasa es el hecho de ser irreversiblemente inactivada en presencia de oxígeno. Sin embargo, el grupo de las cianobacterias ha resuelto el problema que conlleva el realizar procesos metabólicamente incompatibles, tales como la fotosíntesis oxigénica y la fijación de nitrógeno (Paerl *et al.*, 1993; Paerl *et al.*, 2000). Entre los mecanismos que evitan la inactivación de la nitrogenasa por la liberación del O<sub>2</sub> en la fotosíntesis se encuentran la separación temporal, es decir, que la fotosíntesis ocurre durante el día y la fijación de N<sub>2</sub> en la noche, tal y como ocurre en las cianobacterias unicelulares y en algunas filamentosas. La separación espacial se caracteriza por la presencia de células especializadas llamadas heterocistos, en los cuales se logra proteger a la nitrogenasa del O<sub>2</sub> producido en las células vegetativas (Stal *et al.*, 1994). Esta diferenciación celular ocurre en las cianobacterias filamentosas.

Los estudios sobre el operon que regula la nitrogenasa, se basan principalmente en el gen *nifH* que codifica para la subunidad β de este complejo. Este gen es altamente conservado y ha permitido el estudio de la diversidad de diazótrofos. Los estudios basados en el uso de los genes de la nitrogenasa han resultado útiles en el conocimiento de los grupos implicados con la fijación de nitrógeno (Zehr & Capone, 1996; Zehr *et al.*, 1997). Debido a que se han logrado conservar a través de la evolución y que se encuentran ampliamente distribuidos en géneros de los dominios Bacteria y Archaea, se discute si estos genes comparten un ancestro común, o bien, si han sido transferidos horizontalmente (Young, 1992; Zehr *et al.*, 1997; Bolhuis *et al.*, 2010). Con la ayuda de este marcador se ha logrado caracterizar una serie de comunidades presentes en tapices y estromatolitos y se ha encontrado gran diversidad en los fijadores de nitrógeno.

## **OBJETIVO**

Identificar los patrones de la fijación de nitrógeno y diversidad del gen *nifH* en diferentes consorcios microbianos en ecosistemas acuáticos oligotróficos de México.

### ***Objetivos particulares:***

- Describir las características fisicoquímicas en las que se desarrollan los consorcios estudiados.
- Describir el patrón espacial y temporal de la fijación de nitrógeno en estos consorcios.
- Describir la composición de las comunidades microbianas de fijadores de nitrógeno potenciales.
- Analizar la relación entre la composición con las variables ambientales medidas en las diferentes comunidades microbianas.

## **SITIOS DE ESTUDIO**

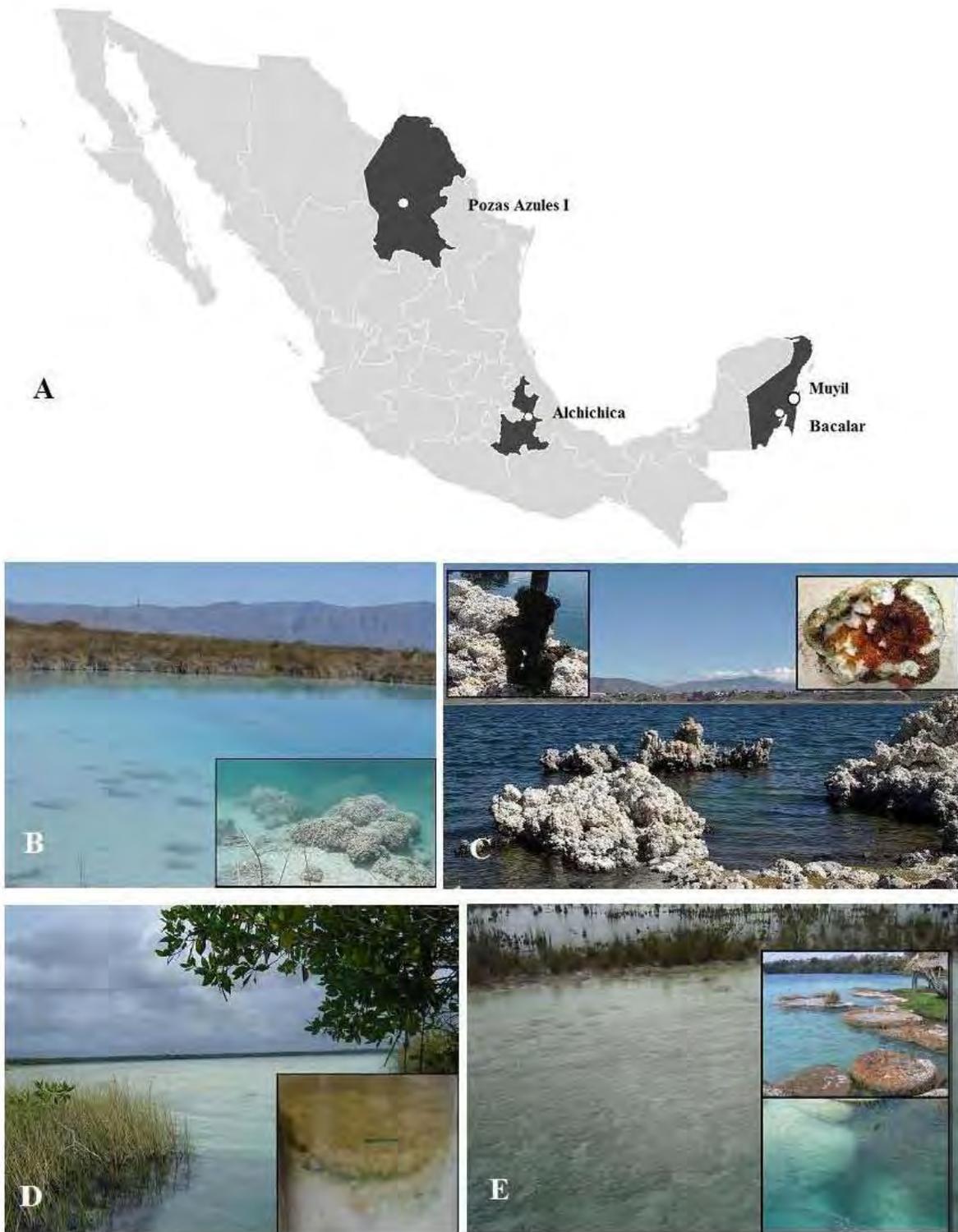
Este estudio se realizó en cinco consorcios microbianos distintos registrados en cuatro localidades en México (Figura 1A). Estas localidades comprenden cuerpos de agua continental con distintas características físico-químicas, ambientales, origen geológico y posición geográfica. Son similares en cuanto a su carácter oligotrófico y que en su composición química presentan formas carbonatadas disueltas en el agua (Badino *et al.*, 2004, Alcocer & Filonov, 2007; Gischler *et al.*, 2008).

### ***Pozas Azules I, Coahuila***

El sistema Pozas Azules (PA) forma parte de una importante serie de cuerpos de agua dentro del valle de Cuatro Ciénegas en el estado de Coahuila, al noreste de México, en el área más seca del desierto Chihuahuense. Se ubica en las coordenadas 26° 49.66' N y 102° 01.46' W, a 740 msnm, rodeado por montañas que alcanzan una elevación de hasta 3,000 msnm (Johannesson *et al.*, 2004; Souza *et al.*, 2006). Pozas Azules se localiza en una zona del valle rica en carbonatos, en donde existe una gran formación de estromatolitos (Badino *et al.*, 2004). Se ha reportado que estos cuerpos de agua presentan limitaciones en fósforo y nitrógeno (Souza *et al.*, 2006). La composición química está dominada por CaCO<sub>3</sub> (Badino *et al.*, 2004). Durante los muestreos correspondientes a este estudio (febrero y julio del 2008), la temperatura en el sistema fue entre 24-30°C, una conductividad constante en 2.8 mS cm<sup>-1</sup>, y el pH entre 6.4 y 6.8 (Tabla 1). En este sistema ha sido registrada la presencia de formaciones extensas de estromatolitos alrededor de toda la poza (Figura 1B).

### ***Lago Cráter de Alchichica, Puebla***

El lago cráter de Alchichica se localiza en la parte central de México en el estado de Puebla, ubicado a 19° 24' N y 97° 24' W, a una elevación de 2,300 msnm. Tiene una superficie de 2.3 km<sup>2</sup> con una profundidad máxima de 62 m. El agua del lago tiene una composición química con sodio, magnesio, cloruro y bicarbonato, con un intervalo de sólidos disueltos de 8.3 - 9.0 g L<sup>-1</sup> y pH entre 8.7 - 9.2. La temperatura promedio del agua es de 15.9°C (Alcocer *et al.*, 2008; Alcocer & Filonov, 2007). Durante este estudio, la temperatura osciló entre 16.5°C en el mes de enero y 19.5°C en junio del 2008, un pH entre



**Figura 1.** Sitios donde se localizan los consorcios microbianos considerados en este estudio. A) Mapa de México indicando las localidades: B) Pozas Azules, en Cuatro Ciénegas; C) Alchichica en Puebla; D) Muyil y E) Bacalar en Quintana Roo.

9.3 y 9.76 y con una conductividad promedio de  $13.2 \text{ mS cm}^{-1}$  (Tabla 1). Al parecer, el nitrógeno es el nutriente que limita la producción primaria en el sistema y la concentración de nutrientes indica que es un sistema oligotrófico (Alcocer & Filonov, 2007; Adame *et al.*, 2008). El lago presenta eventos de mezcla durante el invierno y se estratifica en la temporada cálida de lluvias en el periodo primavera-verano. Durante la estratificación, la concentración de  $\text{O}_2$  disminuye con la profundidad y ocurre un incremento de productores primarios (Adame *et al.*, 2008).

Entre las comunidades microbianas en el sistema, los estromatolitos presentes a orillas del lago manifiestan al menos dos formas: columnar y esponjoso; dominados por cianobacterias (Figura 1C). El estromatolito esponjoso es el más abundante mientras que el columnar se encuentra aleatoriamente distribuido y en menor proporción en el lago (Tavera & Komárek, 1996; Falcón *et al.*, 2002).

### **Lagunas costeras en Quintana Roo**

En la actualidad se ha logrado identificar que varios cuerpos de agua continentales en las regiones tropicales del Caribe presentan comunidades microbianas. Estas comunidades se desarrollan en el sedimento de los cuerpos de agua, como tapices microbianos o estromatolitos (Rejmánková & Komárková, 2000; Gischler *et al.*, 2008). En este estudio fueron consideradas comunidades formadoras de tapiz microbiano en la laguna Muyil y aquellas de formación tipo estromatolito en la laguna Bacalar.

#### ***Laguna Muyil***

La laguna Muyil se localiza en el extremo norte ( $20^{\circ}04.075' \text{ N}$  y  $87^{\circ}35.817' \text{ W}$ ) de un sistema de lagunas costeras dominado por manglares que pertenece a la Reserva de la Biosfera de Sian Ka'an, cuya extensión es de 528,147 ha. La reserva se encuentra en la parte central de la costa del estado de Quintana Roo, dentro de la unidad orogénica Plataforma Yucateca, característicamente plana, con una suave e imperceptible inclinación de sur a norte y sin elevaciones importantes. El clima de la reserva es del tipo cálido-subhúmedo con lluvias en verano. La precipitación anual fluctúa entre 1,100 y 1,200 mm y el 70% ocurre de mayo a octubre (Gómez-Pompa & Dirzo, 1995). Al no existir ríos; el agua de lluvia se infiltra rápidamente y de la misma manera sale hacia el mar, o bien en las partes bajas llegan a aflorar lagunas someras o zonas propensas a inundaciones (Gómez-

Pompa & Dirzo, 1995). El subsuelo es calcáreo y los suelos poco profundos en las partes elevadas y con el nivel freático muy cerca de la superficie. No existen estudios publicados en los sistemas lagunares de la reserva de Sian Ka'an, por lo que el presente estudio inicia los reportes en la zona. Durante los muestreos de este estudio, la temperatura de la laguna Muyil se registró entre 21-29°C y un pH entre 8.0 y 8.3 (Tabla 1). Hasta ahora han sido identificados consorcios microbianos formando tapiz microbiano (Figura 1D).

### ***Laguna Bacalar***

La laguna de Bacalar, se ubica al sur del estado de Quintana Roo (18°38.190' N y 88°23.074' W) con una longitud aproximada de 40 km por 1-2 km de ancho. Presenta una gran área de poca profundidad, que logra dividir la laguna en dos secciones. Además cuenta con la presencia de cuatro cenotes con una profundidad de hasta 90 m. La laguna tiene conexión con la Bahía de Chetumal, tanto en la parte norte como en la sur. Durante el presente estudio se registró el pH entre 7.6-8.3 y la conductividad de 0-2.3 mS cm<sup>-1</sup> con temperatura poco variable, en invierno 28°C y en verano 29°C (Tabla 1). En un estudio previo realizado por Gischler *et al.*, (2008) se registraron temperaturas en el intervalo de 25-28°C, con una precipitación anual aproximada de 1250-1500 mm. La composición química del agua incluye sodio, magnesio, calcio, bicarbonato y sulfatos, de hecho la concentración de calcio y del bicarbonato son cercanos o exceden aquellas propias del océano. La mayor abundancia de estromatolitos se encuentra en el lado oeste de la laguna, principalmente en zonas sometidas a fuertes corrientes (Figura 1E). La forma de los estromatolitos son domos o almohadillas de hasta 2 m de altura y diámetro (Gischler *et al.*, 2008).

## MATERIAL Y MÉTODOS

### *Parámetros ambientales*

Los parámetros ambientales fueron tomados *in situ* durante las colectas de muestras. Con un hidrolab multisensor YSI, se midieron la temperatura, la conductividad y el pH. Las muestras de agua fueron tomadas circundantes a los consorcios microbianos en botellas estériles, que se mantuvieron a 4°C hasta su posterior análisis. El análisis químico de agua constó de las siguientes determinaciones de formas disueltas: fosfatos ( $\text{PO}_4$ ), amonio ( $\text{NH}_4$ ), nitritos ( $\text{NO}_2$ ), nitratos ( $\text{NO}_3$ ), y silicatos ( $\text{SiO}_4$ ). Las muestras de agua fueron filtradas primero por papel Wathman No. 1 y posteriormente por el filtro Millipore de 0.45  $\mu\text{m}$ . Estos nutrientes fueron leídos por colorimetría en un autoanalizador Braun Luebbe 3 (Norderstedt, Alemania). Los análisis se realizaron en el laboratorio de Biogeoquímica de Suelos del Centro de Investigaciones en Ecosistemas, UNAM.

### *C, N y P en la biomasa microbiana*

El carbono, nitrógeno y fósforo en la biomasa microbiana ( $C$ ,  $N$  y  $P_{\text{mic}}$ ) de los consorcios, se determinó con el método de Fumigación-Extracción con cloroformo (Vance *et al.*, 1987). Veinte gramos de muestra del tapiz o estromatolito fueron fumigados en una atmósfera saturada de cloroformo; una fracción de las mismas características se mantiene libre de fumigación. El  $C_{\text{mic}}$  se extrae tanto de la muestra fumigada como de la no fumigada con 0.5 M  $\text{K}_2\text{SO}_4$  y se filtra en papel Whatman No. 42 (Brookes *et al.* 1985). La concentración de  $C$  del extracto se midió en un analizador de carbono (UIC Mod. CM5012). El  $C_{\text{mic}}$  se calcula mediante la siguiente ecuación

$$C_{\text{mic}} = EC / K_{EC}$$

donde:  $EC$  =  $C$  orgánico extraído de la muestra fumigada menos el extraído de la muestra no fumigada;  $K_{EC}$  es la eficiencia de extracción, la cual tiene un valor de 0.45 (Joergenser, 1996).

El  $N_{\text{mic}}$  se extrae de igual forma con 0.5 M  $\text{K}_2\text{SO}_4$ , pero a diferencia del  $C_{\text{mic}}$ , el extracto es filtrado con papel Wathman No. 1. El filtrado es digerido en ácido sulfúrico y el  $N$  total fue leído por Colorimetría en un autoanalizador Braun Luebbe 3 (Norderstedt, Alemania). El  $N_{\text{mic}}$  se calcula con la ecuación  $N_{\text{mic}} = EN / K_{EN}$ , donde  $EN$  =  $N$  extraído del la

muestra fumigada menos el extraído de la muestra no fumigada y  $K_{EN}$  es la eficiencia de extracción con un valor de 0.54 (Joergenser & Mueller, 1996).

El  $P_{mic}$  de las muestras fumigadas y no fumigadas es extraído con 0.5 N  $\text{NaHCO}_3$ , pH 8.5. El extracto fue filtrado por papel Whatman No. 42, posteriormente se digirió con  $\text{H}_2\text{SO}_4$  y persulfato de amonio. El P se determina como ortofosfatos por colorimetría y el  $P_{mic}$  es estimado mediante la diferencia en la concentración de P entre las muestras fumigadas y las no fumigadas. Los valores de concentración de muestras fumigadas y no fumigadas fueron divididos entre un  $KEp$  de 0.40 (Brookes *et al.*, 1982). Los valores de C, N y P microbianos están expresados con base en el peso seco de las muestras.

### ***Fijación de Nitrógeno***

Para estimar las tasas de fijación de nitrógeno producidas por los consorcios microbianos, se analizaron al menos tres réplicas de cada uno de los consorcios, en las cuatro localidades y en cada colecta. Cada una de las réplicas, permaneció sumergida en una fase líquida dentro de una cámara de incubación con agua circundante al sitio donde se colectó el consorcio, además de una fase gaseosa en la superficie de la cámara. Una vez cerradas las cámaras, la actividad de la nitrogenasa se estimó con ensayos de reducción de acetileno (Capone, 1993). Cada réplica fue sometida a la saturación atmosférica con acetileno, el cual es reducido a etileno por la nitrogenasa ( $\text{C}_2\text{H}_2 \rightarrow \text{C}_2\text{H}_4$ ). La actividad de la nitrogenasa fue monitoreada durante 24 hrs en intervalos de seis horas, durante estos intervalos fueron colectadas tres muestras de 1 mL de la fase gaseosa en tubos para su posterior análisis con cromatografía de gases (Falcón *et al.*, 2007).

Las muestras de gas obtenidas de la reducción de acetileno fueron analizadas en un cromatógrafo de gases SRI Scientific, provisto con un detector de ionización de flama, con el que se determina la cantidad de etileno ( $\text{C}_2\text{H}_4$ ). En la detección de ionización de flama, el gas portador (nitrógeno) se mezcla con hidrógeno y con el aporte de aire se forma una flama que enciende e ioniza los compuestos separados en la columna. Esta ionización es registrada por un par de electrodos como diferencia de potencial (Braithwaite & Smith, 1996).

La tasa de fijación de nitrógeno se calculó a partir del etileno formado como función de la proporción de los valores de etileno entre la muestra y el estándar, de la concentración

del estándar ( $\text{nmol ml}^{-1}$ ), del volumen de la fase gaseosa (VFG) y del factor de corrección de solubilidad (CS) del etileno en la fase acuosa (Capone & Montoya, 2001):

$(\text{C}_2\text{H}_4 \text{ formado}_{\text{muestra}} / \text{C}_2\text{H}_4 \text{ formado}_{\text{estandar}}) \times \text{Conc. Estandar} (\text{nmol ml}^{-1}) \times \text{VFG} (\text{mL}) \times \text{CS}^*$ .

Las tasas son expresadas en moles de  $\text{N}_2$  por hora, normalizadas por los gramos de  $\text{C}_{\text{mic}}$  de la muestra incubada. La conversión del acetileno reducido convertido a  $\text{N}_2$  fijado se calcula a partir de la proporción de reducción de acetileno por reducción de  $\text{N}_2$ , 3:1 (Capone & Montoya, 2001).

Los experimentos de fijación de nitrógeno, junto con la medición de los parámetros ambientales y las colectas de material se hicieron durante la temporada de secas en invierno (enero y febrero) y durante la temporada de lluvias en verano (junio y julio) cubriendo el ciclo anual 2008.

### ***Análisis de resultados***

El análisis descriptivo permitió evaluar el patrón de fijación de  $\text{N}_2$  a lo largo del monitoreo de 24 h realizado en ambas temporadas (invierno y verano), en cada una de las cuatro localidades: Pozas Azules, Alchichica, Muyil y Bacalar. Este análisis se realizó con pruebas básicas de estadística descriptiva y pruebas no paramétricas, ya que los datos no presentaron una distribución normal. La prueba no paramétrica con la que se compararon los patrones de fijación entre día y noche, y entre invierno y verano fue la prueba de Mann-Whitney. Estos análisis estadísticos se realizaron con el programa STATISTICA (v. 7.0, 2004). La comparación de fijación de nitrógeno entre los sitios y entre periodos de actividad en cada temporada se evaluó con un análisis de varianza de dos vías, modelo I, con una prueba por permutación, utilizando la función 'anova.2way.R' (Legendre, 2007).en el lenguaje R (R Development Core Team, 2009).

La relación entre la composición y las variables ambientales se estimó en un análisis de redundancia (RDA, por sus siglas en inglés). Para este análisis se construyó una matriz de la composición de la comunidad, sitios  $\times$  filotipos con datos de presencia-ausencia, con una transformación  $X^2$ . Esta transformación permitió que los datos de composición fueran

---

\*  $\text{CS} = \text{M}/\text{X} = 1 + (\alpha) (\text{A}/\text{B})$ . Donde M = volumen de etileno total producido, X = volumen de la fase gaseosa,  $\alpha$  = coef. de Busnsen del etileno a la temperatura y salinidad apropiadas, A = Volumen de la fase acuosa, B = volumen de la fase gaseosa

apropiados para los métodos de ordenación lineal. La matriz de variables explicativas se construyó con los valores de fijación de nitrógeno;  $C_{mic}$  y  $N_{mic}$ ; concentraciones de  $NH_4$ ,  $NO_2$ ,  $NO_3$ ,  $PO_4$  y  $SiO_4$ ; temperatura, pH y conductividad. Una vez construidas ambas matrices, se aplicó un análisis de selección de variables (*forward selection*) para considerar las variables significativas que afectan la estructura de la composición genética de las comunidades. Esto con la finalidad de reducir la cantidad de variables explicativas y trabajar con aquellas que resultaran ser significativas en la estructuración. Además para cumplir la condición  $m \leq n$ ; donde  $m$  es el número de variables explicativas y  $n$  el número de objetos del análisis de redundancia, en este caso, el número de comunidades microbianas muestreadas. El RDA también se analizó en el lenguaje R, con la función del paquete 'rdaTest' (Legendre & Durand, 2010) y el de *forward selection* con la función 'forward.sel' de la librería PACKFOR (Dray et al., 2009).

## **Análisis Molecular**

### ***Extracción de ácidos nucleicos***

La identificación de la composición bacteriana se realizó mediante la extracción de ADN total de las comunidades microbianas presentes en los consorcios siguiendo el protocolo modificado de Zhou *et al.*, (1996). Aproximadamente 5g del material colectado fueron triturados en nitrógeno líquido y posteriormente incubados en buffer de extracción (100 mM Tris-HCl, 20 mM NaCl, 100 mM EDTA) y lisozima (30 mg/mL, Sigma Aldrich) durante 30 min a 37°C y se dejaron durante toda la noche con proteinasa K (10 mg/mL, Sigma Aldrich) y SDS 20% a 55°C. Se obtuvo un sobrenadante por centrifugación y el ADN presente en esta fase se extrajo dos veces con fenol/cloroformo/isoamil alcohol (24:25:1) y una vez con cloroformo/isoamil alcohol (24:1), finalmente el ADN se dejó precipitar con isopropanol 100% y acetato de sodio 3M durante 20 min a -20°C. Posteriormente las muestras fueron centrifugadas y el pellet lavado con etanol 70%, se dejó secar a TA y se resuspendió en agua. Para obtener un ADN de mayor calidad, se utilizó el kit DNeasy Blood & Tissue (QIAGEN, Valencia, CA), que brinda una purificación rápida y fácil de ADN a base de columnas de sílice.

### ***Amplificación, clonación, secuenciación y análisis del gen nifH***

Una fracción del gen *nifH* (~359 pb), que codifica la unidad funcional de la nitrogenasa, fue amplificada con reacción en cadena de la polimerasa (PCR) anidada para incluir todos los grupos filogenéticos de fijadores de nitrógeno (Zani *et al.*, 2000). La reacción de PCR fue de un volumen final de 25  $\mu$ L siguiendo el protocolo de Zani *et al.*, (2000). El PCR se realizó con 30 ciclos de 95°C (1min), 55°C (1 min) y 72°C (1 min), con un paso inicial de desnaturalización de 95°C (2 min) y una extensión final de 72°C (30 min). El fragmento de tamaño correcto fue purificado de un gel de azarosa, utilizando columnas de sílice del kit de extracción de gel QIAquick, siguiendo el protocolo del fabricante (QIAGEN). Los productos amplificados fueron separados por clonación con células competentes de *Escherichia coli* con el vector pCR®2.1-TOPO (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA). Los plásmidos se recuperaron utilizando el sistema Montage Plasmid Miniprep<sub>96</sub> (Millipore, Billerica, MA, USA) y posteriormente fueron secuenciados por el método enzimático de Sanger.

Las secuencias obtenidas fueron editadas en el programa *BioEdit Sequence Alignment Editor*, Versión 7.0.5.3 (Hall, 1999), con el cual se eliminó la secuencia de plásmido de los fragmentos de interés y fueron alineadas en *Sequencher* (v. 4.1.4). Las secuencias fueron agrupadas en filotipos al 95% de similitud nucleotídica (Ben-Porath & Zehr, 1994) utilizando un análisis de Neighbor Joining, respaldado con análisis bootstrap, efectuados en PAUP\* (v. 4.0b10, Sworfford, 2002). Posteriormente se estimó la riqueza obtenida en cada una de las librerías utilizando un programa diseñado a partir del estimador de riqueza  $S_{chao1}$  y el índice de cobertura de Good (Kemp & Aller, 2004). También se realizaron análisis de rarefacción y estimación de los índices de diversidad de Shannon y Simpson en el lenguaje estadístico R.

Con las secuencias obtenidas de cada una de las librerías de clonas junto con secuencias de referencia obtenidas de la base pública NCBI se obtuvo un análisis filogenético con la archaea *Methanosarcina mazei* como grupo externo. El análisis filogenético se realizó con *Paup*, la reconstrucción filogenético construyó utilizando 72 taxa con 381 caracteres fijando el criterio de optimización a distancia con el método de Neighbor Joining.

## RESULTADOS

### *Parámetros ambientales*

Los parámetros ambientales que se registraron durante los muestreos se presentan en la Tabla 1, además de las coordenadas geográficas de cada sitio. Los parámetros fueron tomados en el agua circundante a los consorcios microbianos. Estos datos mostraron variación a lo largo de las localidades muestreadas y variación entre las estaciones consideradas (invierno y verano).

El lago cráter de Alchichica fue el sitio en el cual se registraron las temperaturas más bajas, en ambas estaciones (16.5-19.5°C en el estromatolito columnar y 17.6-18.8°C en el estromatolito esponjoso). En los demás sitios, el intervalo de temperatura en el muestreo de invierno fue entre 21.6°C en la laguna Muyil y 28 °C en la laguna Bacalar. Mientras que en el muestreo de verano, los sitios Muyil, Bacalar y Pozas Azules registraron una temperatura de 29°C. La conductividad en el sitio Alchichica presentó una marcada diferencia (12.4 y 13.3 mS cm<sup>-1</sup>) respecto a los otros sitios con un intervalo entre 0-2.8 mS cm<sup>-1</sup> en ambas estaciones. El intervalo del pH entre los sitios fue entre neutro (Pozas Azules, pH=6.8) y alcalino (Alchichica, pH = 9.7).

**Tabla 1.** Características ambientales registradas en los sistemas durante los muestreos: invierno (enero-febrero), verano (mayo-junio)

Localidad	Muyil		Bacalar		Alchichica columnar		Alchichica esponjoso		Pozas Azules	
	<i>Inv</i>	<i>Ver</i>	<i>Inv</i>	<i>Ver</i>	<i>Inv</i>	<i>Ver</i>	<i>Inv</i>	<i>Ver</i>	<i>Inv</i>	<i>Ver</i>
Ubicación	20°04.075' N 87°35.817' O		18°38.190' N 88°23.074' O		19°25.081' N 97°24.142' O		19°24.364' N 97°24.142' O		26°49.66' N 102°01.46' O	
Temperatura (°C)	21.6	29.3	28.0	29.0	16.5	19.5	17.6	18.8	24.5	29.3
Conductividad (mS cm <sup>-1</sup> )	1.4	1.5	0	2.3	13.2	13.3	12.4	13.2	2.8	2.7
pH	8.1	8.3	8.3	7.6	9.3	9.7	9.4	9.6	6.4	6.8

Los resultados sobre la concentración de nutrientes en el agua circundante a los consorcios en cada sitio se muestran en la Tabla 2. Estos datos indican que durante los muestreos la concentración de nitrógeno inorgánico disuelto (DIN, por sus siglas en inglés: NH<sub>4</sub> + NO<sub>2</sub> + NO<sub>3</sub>) fue imperceptible por lo menos en las lagunas Muyil y Bacalar. En Alchichica, la concentración de DIN fue mayor que en los demás sitios, siendo el NH<sub>4</sub> la forma de nitrógeno más abundante en ambos muestreos (1.6-12.2 μM). La segunda forma

más abundante en invierno fue el NO<sub>2</sub> (2.3 y 2.6 μM) y en verano lo fue el NO<sub>3</sub> (1.4 y 3.5 μM). En Pozas Azules, el DIN también fue considerable, con la presencia de NH<sub>4</sub> en ambas estaciones (Figura 2a). En este sitio, además predominó el NO<sub>3</sub>, el cual inclusive fue más abundante que el NH<sub>4</sub> en el muestreo de verano (1.5 vs 0.5 μM).

**Tabla 2.** Concentración de los nutrientes disponibles en el agua: NH<sub>4</sub>, NO<sub>2</sub>, NO<sub>3</sub>, PO<sub>4</sub> y SiO<sub>4</sub>, registrada en los sitios de muestreo durante las estaciones invierno (enero) y verano (junio).

Parámetro	DIN μM		NH <sub>4</sub> μM		NO <sub>3</sub> μM		NO <sub>2</sub> μM		PO <sub>4</sub> μM		SiO <sub>4</sub> μM	
	<i>Inv</i>	<i>Ver</i>	<i>Inv</i>	<i>Ver</i>	<i>Inv</i>	<i>Ver</i>	<i>Inv</i>	<i>Ver</i>	<i>Inv</i>	<i>Ver</i>	<i>Inv</i>	<i>Ver</i>
Muyil	*	0.0	*	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.004	0.1	41	32
Bacalar	*	0.2	*	0.2	0.0	0.0	0.0	0.0	0.010	0.2	152	200
Alch_C	14	10	12.1	6.7	0.0	3.5	2.3	0.09	0.0	1.2	8	15
Alch_E	15	3	12.2	1.6	0.0	1.4	2.6	0.13	0.0	0.7	0.0	13
Pozas Azules	4	2	3.8	0.5	0.6	1.5	0.04	0.07	0.0	1.3	120	153

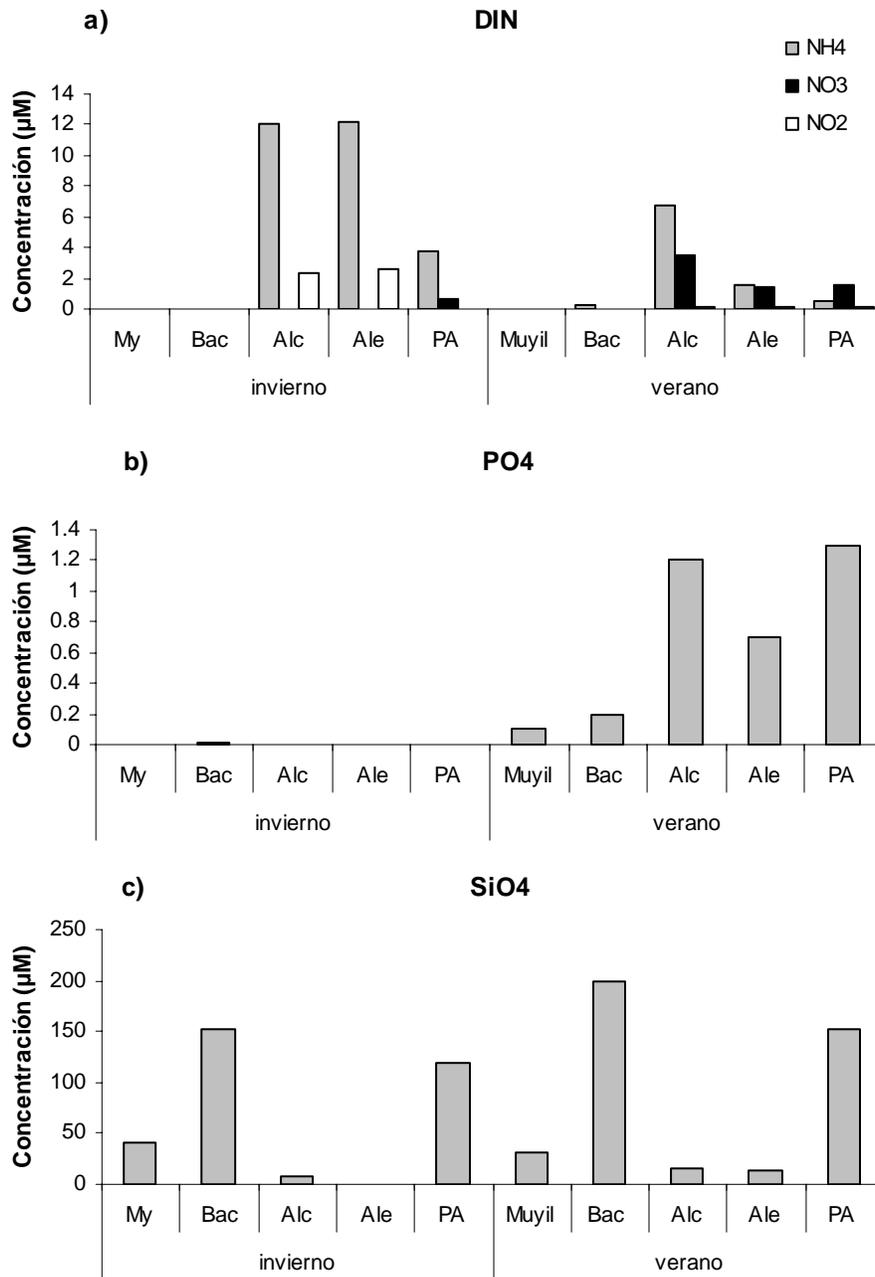
\* Dato no obtenido

Alch\_C = Estromatolito columnar en Alchichica

Alch\_E = Estromatolito esponjoso en Alchichica

La concentración de fósforo (PO<sub>4</sub>) fue imperceptible en todos los sitios durante el muestreo de invierno, pero durante el de verano en todos los sitios hubo un aumento considerable. Este aumento fue mayor en los sitios de Alchichica y Pozas Azules (Figura 2b).

Las concentraciones más altas de silicatos (SiO<sub>4</sub>), en ambos muestreos se obtuvieron en los sitios Bacalar (152, 200 μM), Pozas Azules (120, 153 μM) y Muyil (41, 32 μM), en tanto que Alchichica presentó cantidades muy por debajo de los otros sitios (<15 μM). Los detalles de la variación en los sitios y entre las estaciones se muestran en la Figura 2c.



**Figura 2.** Formas disponibles: a) DIN (NH<sub>4</sub> + NO<sub>2</sub> + NO<sub>3</sub>), b) PO<sub>4</sub> y c) SiO<sub>4</sub>. En el agua circundante a los consorcios microbianos Muyil (My), Bacalar (Bac), Alchichica columnar (Alc), Alchichica esponjoso (Ale) y Pozas Azules (PA), durante los muestreos de invierno y verano.

### **Concentraciones de C, N y P en la biomasa microbiana**

Los resultados acerca del Cmic, Nmic y Pmic en los consorcios microbianos se presentan en la Tabla 3. Los datos de Cmic de cada uno los consorcios microbianos, en el muestreo correspondiente a la estación de invierno, reflejan que aquellos en el lago de Alchichica (estromatolitos esponjoso y columnar) junto con aquellos en Pozas Azules exhibieron las mayores cantidades de Cmic (335-778 y 495  $\mu\text{g g}^{-1}$  respectivamente) a diferencia de los consorcios en Muyil y Bacalar (125 y 234 y  $\mu\text{g g}^{-1}$  respectivamente). Esta tendencia en la concentración de Cmin es similar en el muestreo de verano. Sin embargo, durante esta estación se presentó una disminución en los consorcios de Alchichica, en el estromatolito columnar (778 a 263  $\mu\text{g g}^{-1}$ ) y en el esponjoso (335 a 183  $\mu\text{g g}^{-1}$ ). En Pozas Azules la concentración aumentó de 495 a 581  $\mu\text{g g}^{-1}$ .

**Tabla 3.** Concentración ( $\mu\text{g g}^{-1}$ ) de Cmic, Nmin y Pmic y proporciones C:N, C:P y N:P, en cada uno de los consorcios analizados.

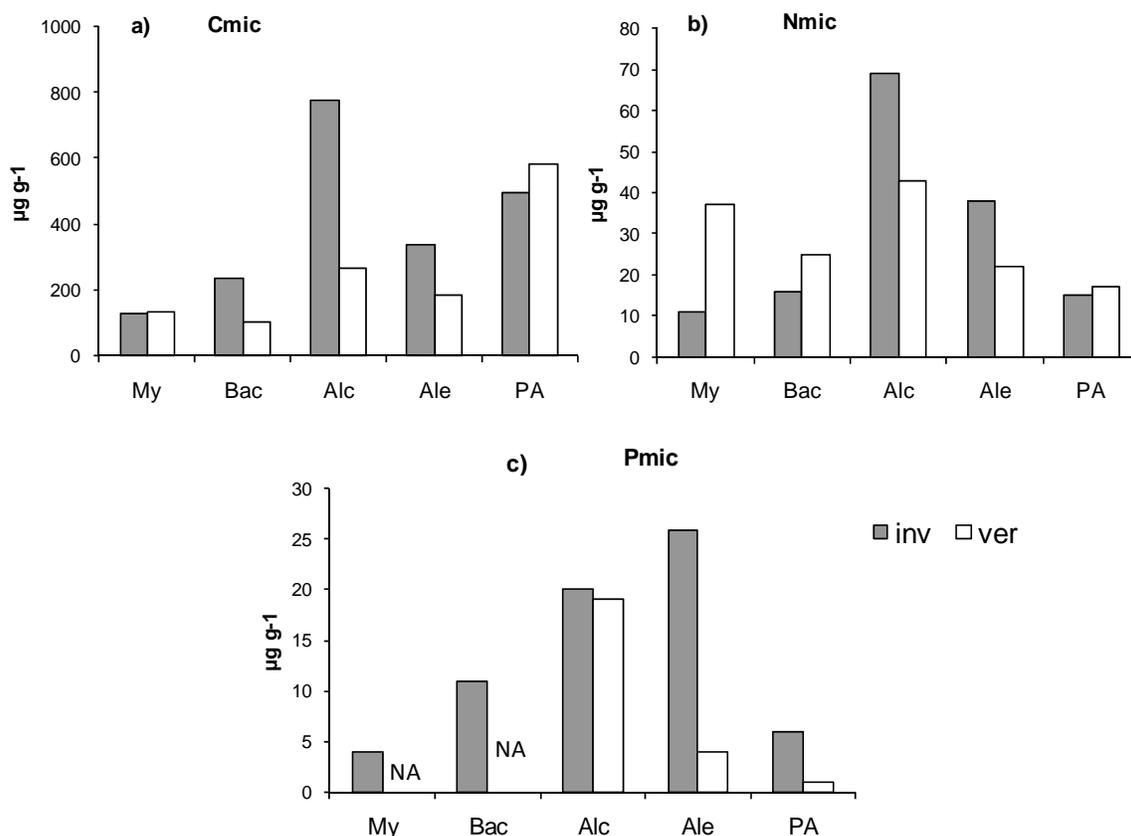
Parámetro ( $\mu\text{g g}^{-1}$ )	Cmin		Nmic		Pmic		C:N		C:P		N:P	
	Inv	Ver	Inv	Ver	Inv	Ver	Inv	Ver	Inv	Ver	Inv	Ver
Muyil	125	134	11	37	4	*	11	4	31	*	3	*
Bacalar	234	102	16	25	11	*	15	4	21	*	2	*
Alch_C	778	263	69	43	20	19	11	6	39	14	4	2
Alch_E	335	183	38	22	26	4	9	8	13	46	2	6
Pozas Azules	495	581	15	17	6	1	33	34	83	581	3	17

\* sin dato

De igual forma, el Nmic es mayor en los consorcios de Alchichica durante el invierno, pero en verano los estromatolitos muestra una disminución (de 69 a 43  $\mu\text{g g}^{-1}$  en el estromatolito columnar y de 38 a 22  $\mu\text{g g}^{-1}$ ). Por el contrario, en el resto de los consorcios, la concentración de Nmic incrementa en el verano, por ejemplo en el tapiz microbiano de Muyil de 11 a 37  $\mu\text{g g}^{-1}$ .

La concentración de Pmic en los diferentes consorcios tuvo un patrón similar al observado en nitrógeno, siendo los consorcios en Alchichica aquellos que tienen mayor concentración (20 y 26  $\mu\text{g g}^{-1}$ ) y en seguida Bacalar con una concentración de 11  $\mu\text{g g}^{-1}$ . Mientras que Muyil y Pozas Azules mostraron valores entre 4-6  $\mu\text{g g}^{-1}$ . Algunos datos sobre la concentración del Pmic en verano presentaron problemas para su obtención, pero los datos obtenidos en Alchichica y Pozas Azules indican disminución en verano.

De esta forma, los datos de C, N y Pmic muestran que los consorcios que logran incorporar en mayor cantidad estos elementos, son aquellos que habitan en el lago cráter de Alchichica en ambas temporadas; mientras que en los demás sitios, los consorcios incorporan menor cantidad de estos elementos con variación entre una temporada y la otra, como se muestra en la Figura 3.



**Figura 3.** Distribución de la concentración ( $\mu\text{g g}^{-1}$ ), de las formas microbianas: a) C, b) N y c) P, entre los consorcios y entre estaciones de muestreo. (My) Muyil, (Bac) Bacalar, (Alc) A. columnar, (Ale) A. esponjoso, (PA) Pozas Azules, (inv) invierno y (ver) verano. NA: estos datos no fueron obtenidos.

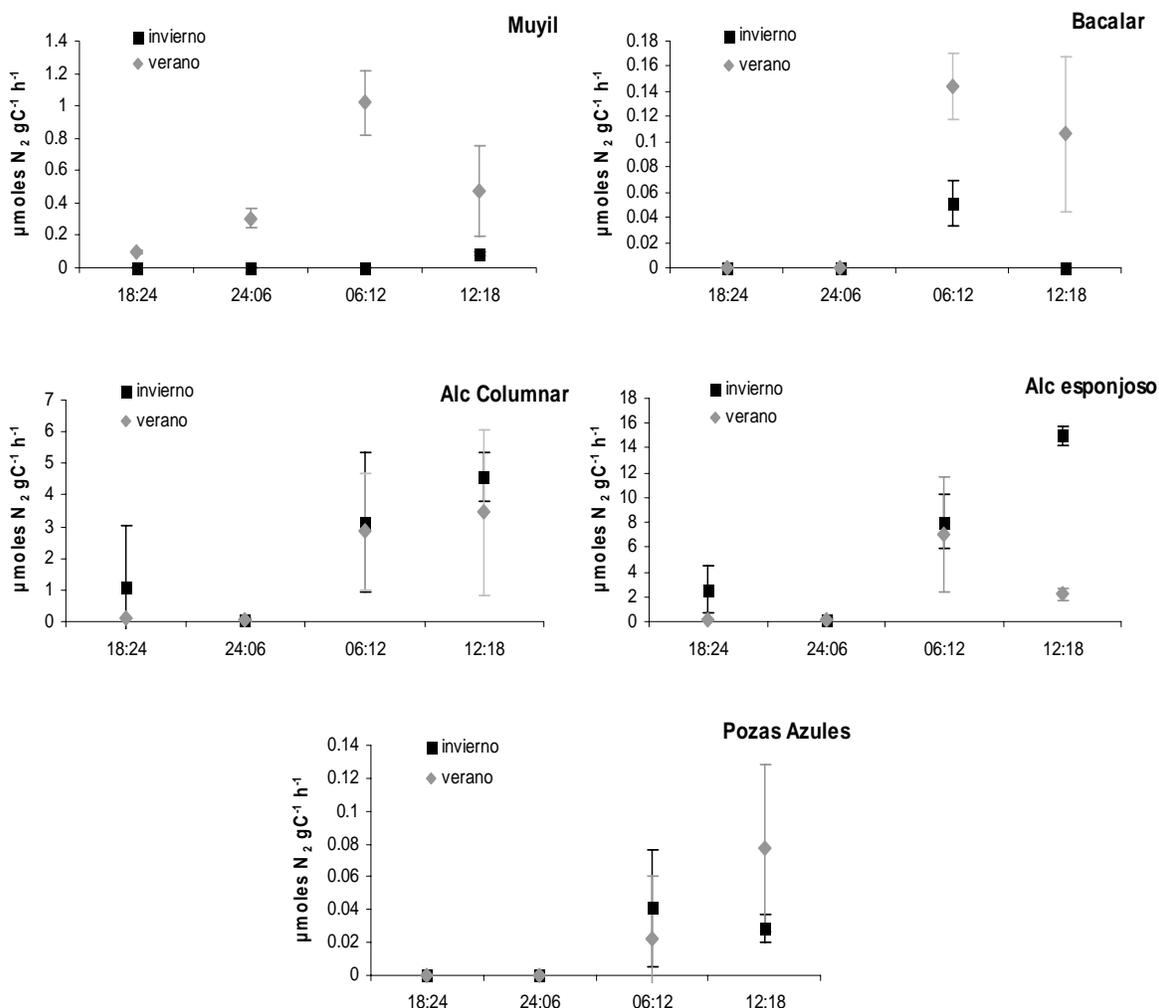
En la mayoría de los consorcios las muestras de invierno tuvieron un cociente C:N mayor que en verano, sugiriendo que están limitados por N en esta estación. En Pozas Azules la proporción C:N es mucho mayor y se mantiene constante entre una estación y otra (33:1 en invierno y 34:1 en verano). La proporción N:P es baja en ambas temporadas con cocientes entre 2:1 y 6:1. La proporción C:P muestra una mayor variación entre los

consorcios, siendo el consorcio de Pozas Azules el que presentó los cocientes más elevados en relación a los demás consorcios (83:1 en invierno y 581:1 en verano).

Es así que se observa una tendencia general en estas comunidades microbianas a presentar en mayor grado una limitación por N más que una limitación por P. Además el grado de limitación en N varía entre las dos temporadas, ya que disminuye en el verano, excepto en Pozas Azules, donde esta limitación se mantiene.

### ***Fijación de nitrógeno***

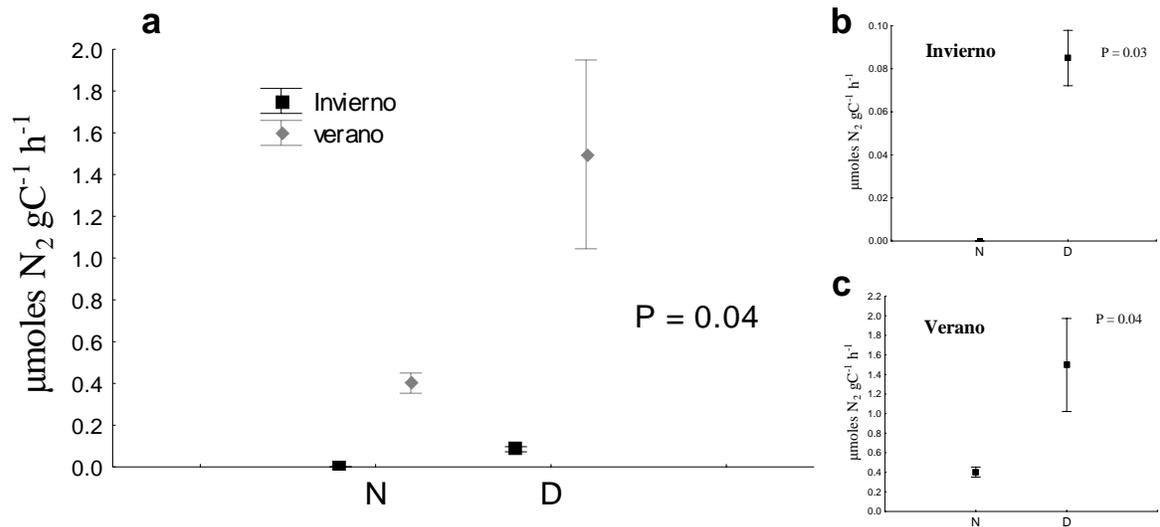
Los resultados de fijación de nitrógeno muestran que a lo largo del periodo de incubación de 24 horas en todas las localidades, el máximo valor de fijación se alcanzó en alguno de los dos fotoperiodos, del amanecer al medio día, o bien, del medio día al atardecer. Dentro de este patrón diario de fijación de nitrógeno, los niveles máximos de actividad de la nitrogenasa se encontraron en el primer fotoperiodo en Muyil y Bacalar. En Alchichica y Pozas Azules, el máximo valor se alcanzó en el periodo que comprende desde el medio día hasta el atardecer. Mientras que la fijación de nitrógeno en oscuridad, sólo se registró en el tapiz microbiano en Muyil y en el lago de Alchichica (Figura 4). En general, en el patrón diario se observa una diferencia en los valores de fijación obtenidos entre las estaciones en algunos consorcios, tales como Muyil y Bacalar, mientras que en el resto de los consorcios no se observan estas diferencias o no resultaron estadísticamente significativas.



**Figura 4.** Patrones de fijación en un ciclo de 24 hr de cada uno de los consorcios considerados (media  $\pm$  DS)

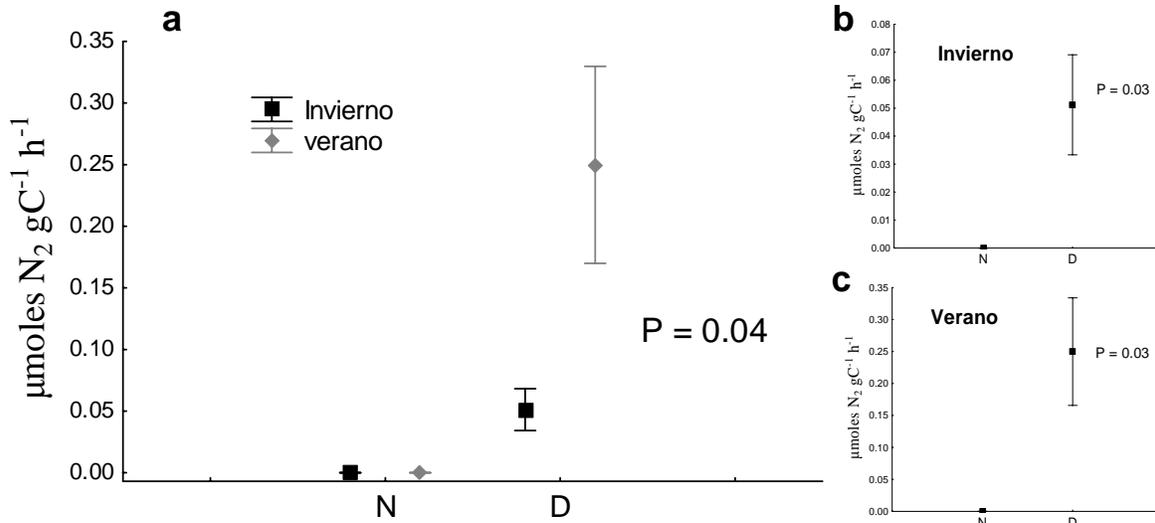
A continuación se describen los resultados correspondientes a cada sitio, en donde se consideran la actividad total registrada en cada temporada (invierno, verano) y sólo dos periodos: el fotoperiodo (D) y el periodo de oscuridad (N).

En Muyil, el patrón de fijación de nitrógeno muestra que los valores de fijación total más altos se registraron durante el verano a diferencia de aquellos registrados en invierno ( $P=0.04$ ), estos valores alcanzaron  $1.90 \pm 0.5 \mu\text{moles N}_2 \text{ gC}^{-1} \text{ h}^{-1}$  (Figura 5a). En verano, los valores de fijación de nitrógeno entre el fotoperiodo ( $1.5 \pm 0.48 \mu\text{moles N}_2 \text{ gC}^{-1} \text{ h}^{-1}$ ) y la periodo de oscuridad ( $0.4 \pm 0.05 \mu\text{moles N}_2 \text{ gC}^{-1} \text{ h}^{-1}$ ) exhiben diferencias significativas ( $P=0.04$ ). Asimismo en invierno, se registra mayor actividad en la fijación durante el fotoperiodo ( $0.08 \pm 0.001 \mu\text{moles N}_2 \text{ gC}^{-1} \text{ h}^{-1}$ , Figuras 5b y 5c).



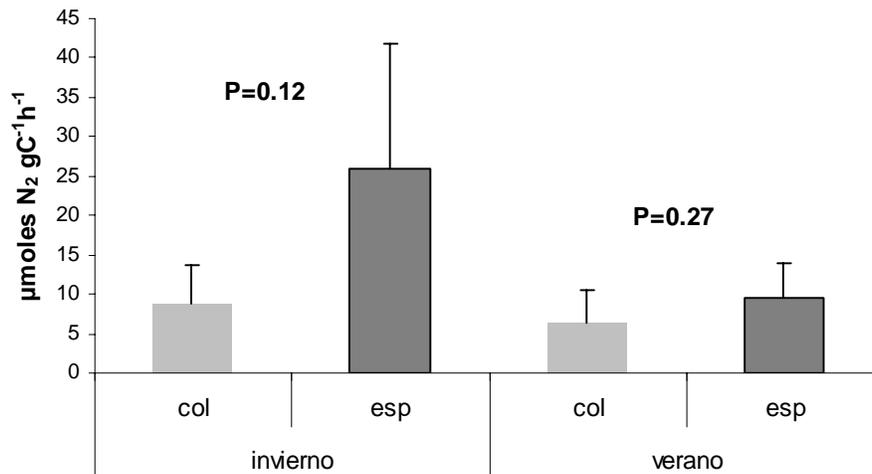
**Figura 5.** Tendencia en la fijación de  $N_2$  en el tapiz microbiano de la Laguna Muyil. a) actividad de la nitrogenasa en un periodo de 24 hrs, durante el invierno (cuadros) y en verano (rombos); diferenciación de la fijación de  $N_2$  entre el día y la noche en invierno b), en verano c).

En la laguna de Bacalar, los valores en la actividad de la nitrogenasa son del orden de  $0.25 \pm 0.08 \mu\text{moles } N_2 \text{ gC}^{-1} \text{ h}^{-1}$  en verano y  $0.05 \pm 0.02 \mu\text{moles } N_2 \text{ gC}^{-1} \text{ h}^{-1}$  en invierno. Estos valores presentan diferencias significativas entre una temporada y otra ( $P=0.04$ ). La actividad de la nitrogenada sólo fue registrada durante el día y presenta el mismo patrón tanto en verano como en invierno (Figura 6a). Además hay una diferencia significativa en la cantidad de fijación entre la diurna y la nocturna en ambas temporadas (Figuras 6b y 6c;  $P=0.03$ ).



**Figura 6.** Fijación de  $\text{N}_2$  en la Laguna Bacalar. a) actividad en un periodo diario, en invierno (rombos) y en verano (cuadros); b) diferenciación entre el grado de fijación entre el fotoperiodo y el periodo de oscuridad en invierno y c) en verano.

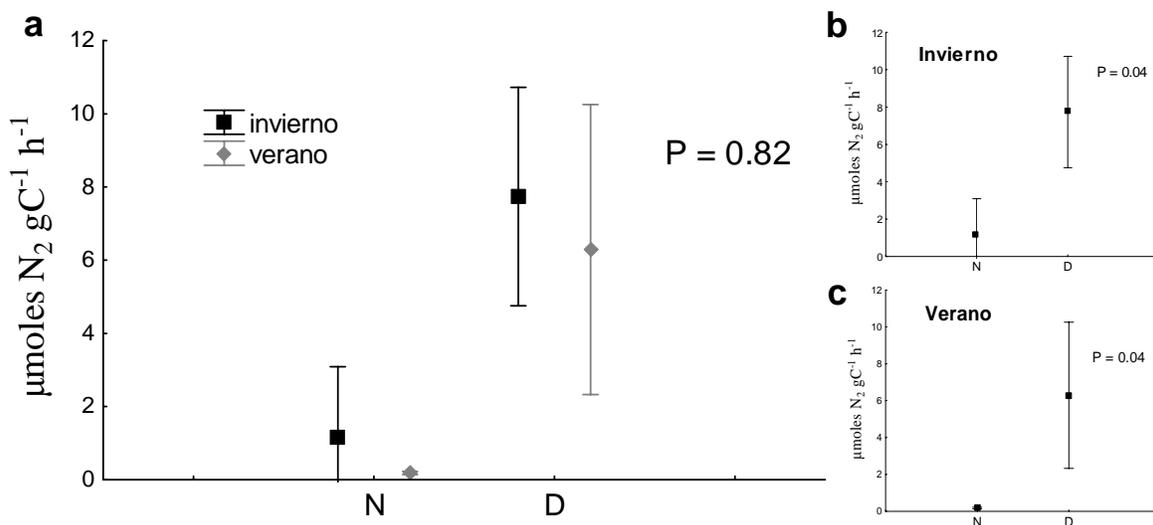
En el lago cráter de Alchichica se lograron distinguir dos formas diferentes de estromatolito: columnar y esponjoso. La actividad total registrada entre los dos tipos de estromatolito no exhibe diferencias significativas ni durante el monitoreo de invierno ( $8.9 \pm 4.9$  vs  $25.8 \pm 16.04 \mu\text{moles N}_2 \text{ gC}^{-1} \text{ h}^{-1}$  respectivamente,  $P = 0.12$ ), ni tampoco durante el monitoreo de verano ( $6.5 \pm 4.0$  vs  $9.4 \pm 4.6 \mu\text{moles N}_2 \text{ gC}^{-1} \text{ h}^{-1}$ ,  $P = 0.27$ ), como se muestra en la Figura 7. Hay que señalar que la forma esponjosa es la más abundante en este lago cráter, y la contribución relativa de cada forma queda por ser analizada.



**Figura 7.** Fijación de  $\text{N}_2$  de los dos tipos de consorcios microbianos en el lago cráter de Alchichica.

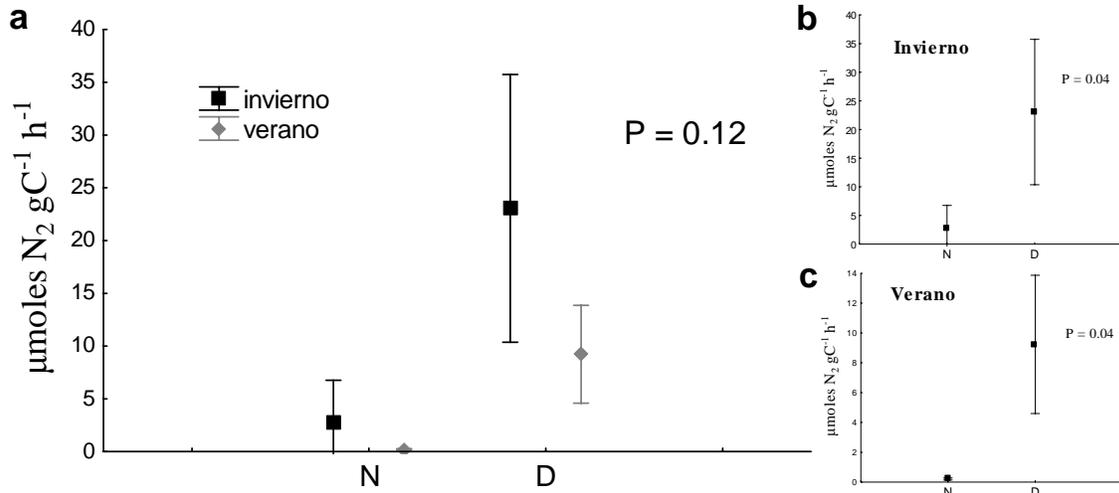
A diferencia de los demás sitios, en los estromatolitos de Alchichica se observa una mayor actividad de fijación de N en invierno, con valores mayores a los registrados en cualquier otro sitio de este estudio. Sin embargo, en ninguno de los dos tipos de estromatolito se presentaron diferencias significativas entre la actividad total registrada entre el invierno y el verano ( $P = 0.82$  columnar y  $P=0.12$  esponjoso; Figuras 8a y 9a)

El estromatolito columnar refleja que tanto en invierno como en verano, la fijación se realiza en mayor medida en el día (Figuras 8b y 8c). En el invierno, durante el día se registraron valores de  $7.7 \pm 2.9 \mu\text{moles N}_2 \text{ gC}^{-1} \text{ h}^{-1}$ , mientras que en la noche se registraron  $1.2 \pm 1.9 \mu\text{moles N}_2 \text{ gC}^{-1} \text{ h}^{-1}$ . En verano, los valores alcanzaron  $6.3 \pm 3.9 \mu\text{moles N}_2 \text{ gC}^{-1} \text{ h}^{-1}$  en el día y  $0.18 \pm 0.04 \mu\text{moles N}_2 \text{ gC}^{-1} \text{ h}^{-1}$  en la noche.



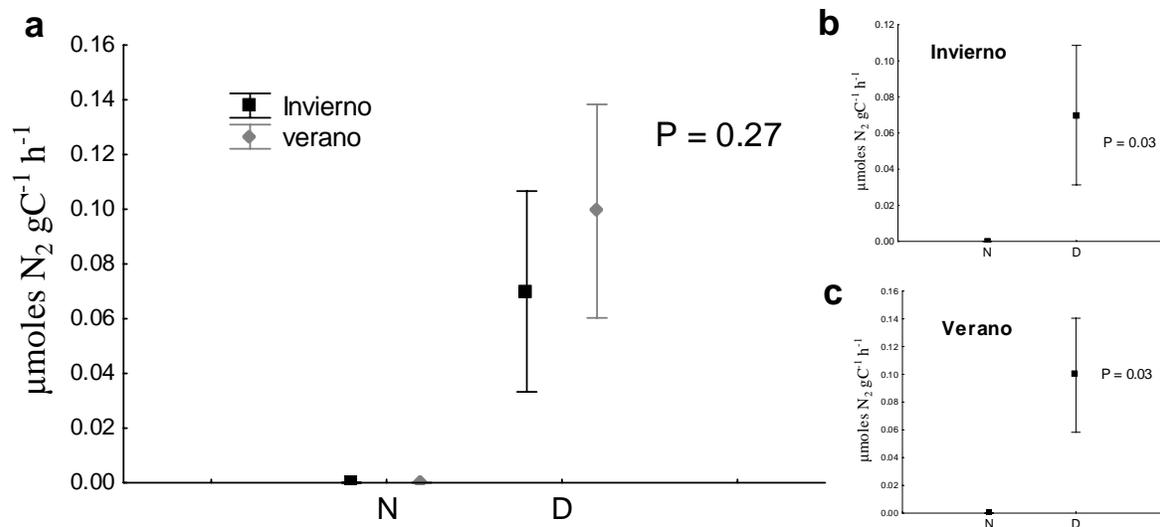
**Figura 8.** Actividad en la fijación de  $\text{N}_2$  en el estromatolito columnar. a) actividad de la nitrogenasa en el monitoreo de 24 hr, invierno (cuadros) y verano (rombos); b y c) fijación de  $\text{N}_2$  realizada durante el día y durante la noche en invierno y verano respectivamente.

El estromatolito esponjoso tampoco presenta diferencias en la actividad total entre invierno y verano ( $P = 0.12$ , Fig. 9). Además exhibe un patrón semejante al tipo columnar, en la actividad entre el día y la noche, cuyos valores de día en invierno alcanzan los  $23.06 \pm 12.7 \mu\text{moles N}_2 \text{ gC}^{-1} \text{ h}^{-1}$  y en verano  $9.24 \pm 4.6 \mu\text{moles N}_2 \text{ gC}^{-1} \text{ h}^{-1}$ , significativamente distintos a los registrados en la noche (Figuras 9b y 9c).



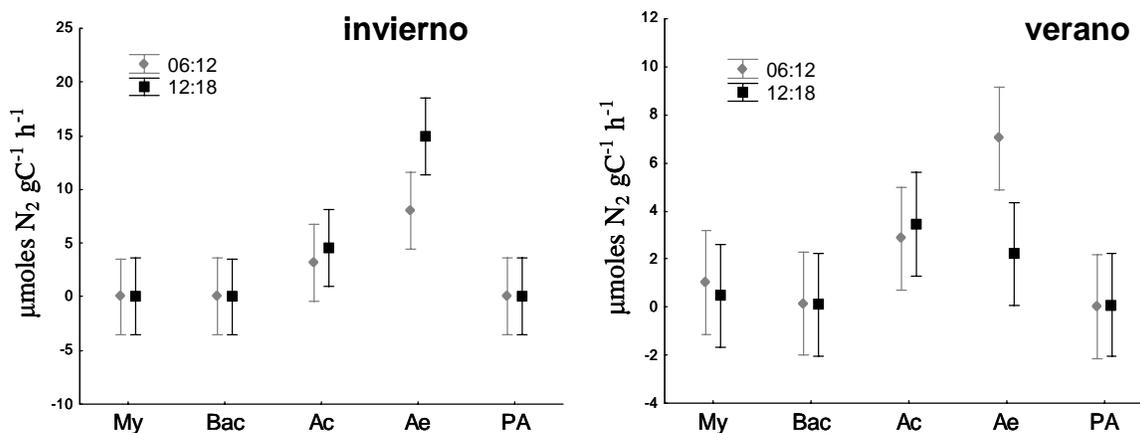
**Figura 9.** Fijación de  $\text{N}_2$  en el estromatolito esponjoso. a) monitoreo de 24 hr, durante invierno (cuadros) y verano (rombos); b y c) fijación de  $\text{N}_2$  durante el día y durante la noche en cada temporada.

Los consorcios en el sistema Pozas Azules, tampoco exhiben diferencias entre la fijación que se efectúa en el invierno y aquella en verano, como se muestra en la Figura 10a ( $P = 0.27$ ). Al igual que en los consorcios anteriores, los de Pozas Azules también tienen más actividad de fijación de  $\text{N}_2$  en el día, ya que durante la noche no se logró registrar actividad. En invierno se registraron  $0.07 \pm 0.04 \mu\text{moles N}_2 \text{ gC}^{-1} \text{ h}^{-1}$  y en verano  $0.10 \pm 0.04 \mu\text{moles N}_2 \text{ gC}^{-1} \text{ h}^{-1}$ , que resultan significativamente distintos de aquellos en la noche (Figuras 10b y 10c).



**Figura 10.** Actividad de la fijación de  $\text{N}_2$  en el estromatolito de Pozas Azules. a) actividad de la nitrogenasa en el patrón diario, durante el invierno (rombos) y el verano (cuadros); b) y c) fijación de  $\text{N}_2$  realizada durante el día y durante la noche en ambas estaciones.

El análisis comparativo entre los sitios y entre los periodos de luz, en los que se registraron los niveles máximos de fijación de N en cada una de las temporadas, indica que no existen diferencias en el nivel de fijación que alcanzan las comunidades entre los dos periodos del día evaluados (06:12 h y 12:18 h) tanto en invierno ( $F=2.39$ ,  $gl=1$ ,  $P=0.11$ ) como en verano ( $F=2.12$ ,  $gl=1$ ,  $P=0.15$ ). Sin embargo, la magnitud con la que los distintos consorcios fijan nitrógeno resulta ser la característica que marca la diferencia tanto en invierno ( $F=16.98$ ,  $gl=4$ ,  $P=0.001$ ) como en verano ( $F=7.9$ ,  $gl=4$ ,  $P=0.003$ . Figura 11).



**Figura 11.** Tendencia en la fijación de N<sub>2</sub> entre los distintos sitios entre los periodos de luz en cada temporada. Las barras denotan un intervalo de confianza al 0.95.

En la figura 11 se observa que el estromatolito esponjoso del lago de Alchichica es el que muestra mayor discrepancia respecto a la demás comunidades. Sin embargo, esta diferencia no parece mantener el mismo patrón entre las temporadas, ya que en invierno la máxima actividad de fijación de nitrógeno se registró en el periodo del medio día hasta el atardecer, mientras que en verano fue registrada en el periodo que comprende desde el amanecer hasta el medio día.

### ***Composición genética***

Un total de 409 secuencias parciales del gen de la dinitrogenasa reductasa (*nifH*) fueron obtenidas en este estudio, 90 de Muyil, 70 de Bacalar, en Alchichica 86 del estromatolito columnar y 85 del estromatolito esponjoso y 78 de Pozas Azules. Las 90 secuencias de Muyil, se agruparon en 22 filotipos (bajo el criterio de 95% de similitud de las secuencias), de los cuales 16 exhiben cierto porcentaje de similitud con representantes del phylum *Cyanobacteria*: entre el 82-84% de similitud con representantes unicelulares y filamentosas con heterocistos, 81-84% con filamentosas sin heterocistos y 78-98% con representantes del phylum *Proteobacteria*. En Bacalar se obtuvieron seis filotipos, todos similares a cianobacterias, ya sea unicelulares con 83 y 84% de similitud, filamentosas con heterocistos entre 80-85% similares, o bien, filamentosas sin heterocistos. En el estromatolito columnar se diferenciaron 13 filotipos, similares a los phyla *Cyanobacteria* (82-92%) y *Proteobacteria* (95-100); mientras que en el estromatolito esponjoso solo se identificaron tres filotipos distintos todos similares en 83-88% a cianobacterias unicelulares. En Pozas Azules de los seis filotipos, sólo tres pudieron ser asignados a grupos taxonómicos definidos, principalmente de cianobacterias (Tabla 4).

**Tabla 4.** Resumen de las secuencias representativas recuperadas del tapiz microbiano y estromatolitos en los diferentes sitios.

Sitio	Representante de filotipo al 95%	# de clonas	Afiliación filogenética cercana	No. Acceso	% identidad
<b>Muyil</b>	SkV69	9	Oscillatoria sp. PCC 6506	AY768417	83
	SkV06a	4	Bacteria no cultivada	DQ485361	97
	SkV71	1	Frankia sp. AiPa1	EU862911	87
	SkV04a	1	Bradyrhizobium japonicum	GQ289576	78
	SkV20a	1	Bradyrhizobium japonicum	GQ289567	82
	SkV66	2	Bradyrhizobium japonicum	GQ289582	82
	SkV72	12	Burkholderia vietnamiensis	AM110707	98
	SKV30	1	Nostoc muscorum UTAD_N213	GQ443450	83
	SkV24	1	Cyanothece ATCC51142	AF003336	82
	SkV07	5	Mastigocladus laminosus CCMEE 5207	EF570540	84
	SkV38	3	Cyanothece sp. ATCC 51142	CP000806	84
	SkV61	3	Cylindrospermopsis raciborskii LD-I	EU381358	83
	SKV64	3	Cyanothece sp. PCC 7425	CP001344	83
	SkV12	2	Lyngbya majuscula CCAP 1446/4	AY768413	81
	SkV19	2	Anabaena variabilis ATCC 29413	CP000117	83
	SkV27	1	Gloeotheca sp. KO68DGA	AB293988	84
	SkV17	3	Anabaena azotica FACHB-118	DQ294218	84
	SKV14	1	Richelia sp. SC01	DQ225762	82
	SKV03	4	Gloeotheca sp. PCC 6909	AY768411	82
	SkV93	7	Halotheca sp. MPI 96P605	AY485152	84
	SkV25	4	Nostoc muscorum UTAD_N213	GQ443450	83
	SkV78	20	Lyngbya wollei	EF397863	84
	<b>Bacalar</b>	BcV46	44	Lyngbya wollei	EF397860
BcV03		1	Nostoc punctiforme PCC 73102	CP001037	80
BcV25		1	Cyanothece sp. PCC 7425	CP001344	84
BcV66		1	Cyanothece sp. PCC 7425	CP001344	83
BcV73		2	Anabaenopsis sp. NRE1	AY461415	85
BcV29		21	Nodularia spumigena AV1	GQ456132	81
<b>Alchichica columnar</b>	AlcV88	7	Phormidium sp.	U73132	91
	AlcV35	2	Phormidium sp.	U73132	92
	AlcV45	11	Bacteria no cultivada	GU192813	93
	AlcV1	15	Bacteria no cultivada	DQ224491	91
	AlcV13	2	Bacteria no cultivada	EU594212	85
	AlcV57	2	Myxosarcina sp.	U73133	89
	AlcV20	6	Mastigocladus laminosus CCMEE 5318	EF570570	82
	AcV11	1	Klebsiella pneumoniae	AF303353	96
	AlcV77	2	Rhodopseudomonas palustris BisB5	CP000283	100
	AlcV26	1	Bradyrhizobium sp. ORS391	FJ347449	95
	AlcV93	2	Bradyrhizobium sp. BTAi 1	AB079618	98
	AlcV65	2	Burkholderia vietnamiensis	AM110707	96
	AlcV53	33	Burkholderia vietnamiensis	AM110707	98

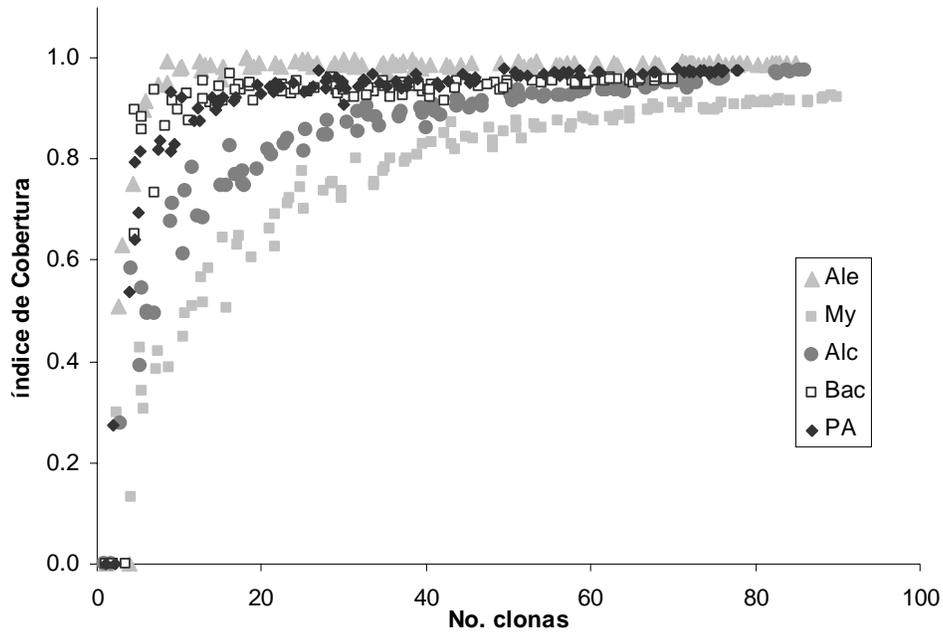
Continuación de Tabla 4...

<b>Alchichica esponjoso</b>	Ale60	28	Gloeotheca sp. KO68DGA	AB264110	83
	Ale33	1	Cyanothece sp. PCC8802	CP001701	86
	Ale20	56	Crocospaera watsonii WH 8501	AY221821	88
<b>Pozas Azules</b>	PA93	2	Bacteria no cultivada	GU192813	95
	PA33	1	Nostoc punctiforme strain PCC 73102	AY768412	73
	PA92	1	Cyanothece ATCC51142	AF003336	84
	PA09	7	Bacteria no cultivada	GQ441590	95
	PA71	14	Bacteria no cultivada	AY461419	85
	PA46	53	Leptolyngbya boryana IAM M-101	D00666	83

El número de filotipos obtenidos en cada uno de los sitios del estudio, cubre entre el 75 y 93% de la riqueza esperada para estas comunidades microbianas, según las estimaciones realizadas con  $S_{\text{chao1}}$  (Tabla 5). A pesar de que cada una de las comunidades muestran coberturas similares en las librerías obtenidas (Figura 12), se realizó un análisis de rarefacción, en el que se corrobora que el número de filotipos se mantiene incluso al tamaño de la librería más pequeña ( $N=70$ ). Los valores de los índices de diversidad, coinciden en que la comunidad de fijadores de nitrógeno potenciales en la laguna Muyil es que presenta mayor diversidad con 22 filotipos, seguida de la comunidad del estromatolito columnar con 13 filotipos, mientras que la comunidad menos diversa para ambos índices es aquella en el estromatolito esponjoso con solo tres filotipos (Tabla 5).

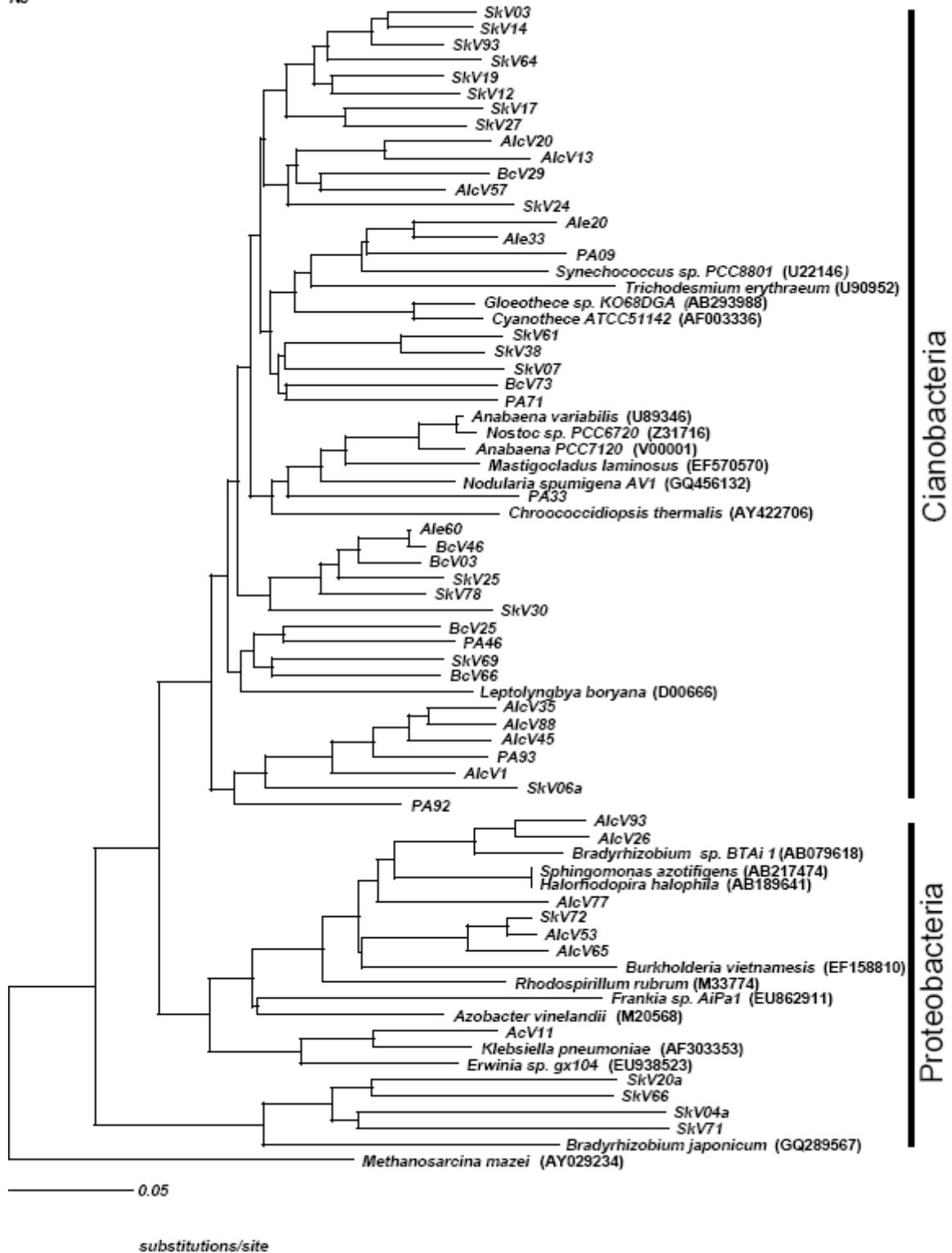
**Tabla 5.** Comparación entre las comunidades microbianas según los datos de la composición de los filotipos registrados de los fijadores de nitrógeno potenciales (gen *nifH*).

Sitio	# clonas	# filotipos observados	Predicción Schao1	% riqueza (C de Good)	Rarefacción N=70	Shannon H	Simpson D
Muyil	90	22	28	81	20	2.66	10.09
Bacalar	70	6	8	75	6	0.94	2.05
A. columnar	86	13	13	93	12	1.95	4.78
A. esponjoso	85	3	3	85	3	0.70	1.84
Pozas Azules	78	6	7	86	6	1.00	1.98



**Figura 12.** Cobertura de la riqueza registrada en cada una de las librerías de clonas de *nifH* de los consorcios microbianos: Ale, Alchichica esponjoso; My, Muyil; Alc, Alchichica columnar; Bac, Bacalar; PA, Pozas Azules.

En el análisis filogenético muestra que los filotipos obtenidos de cada uno de los sitios se agrupan en dos grandes clados, uno con representantes del phylum Cyanobacteria y el segundo con Proteobacteria con representantes de las divisiones  $\alpha$ -,  $\beta$ - y  $\gamma$ -proteobacteria. También se observa que la comunidad de diazótrofos en estos sitios es diversa, con filotipos de distintos sitios compartiendo los mismos clados y especificidad de filotipos de un solo sitio en otros clados (Figura 13).



**Figura 13.** Topología filogenética generada por Neighbor Joining, con las secuencias representativas de cada uno de los filotipos encontrados al 95% de similitud: AcV, Alchichica columnar; Ale, Alchichica esponjoso; BcV, Bacalar; PA, Pozas Azules; SkV, Muylil; y las secuencias de referencia obtenidas de la base de datos, en los paréntesis se muestran los números de acceso de estas secuencias.

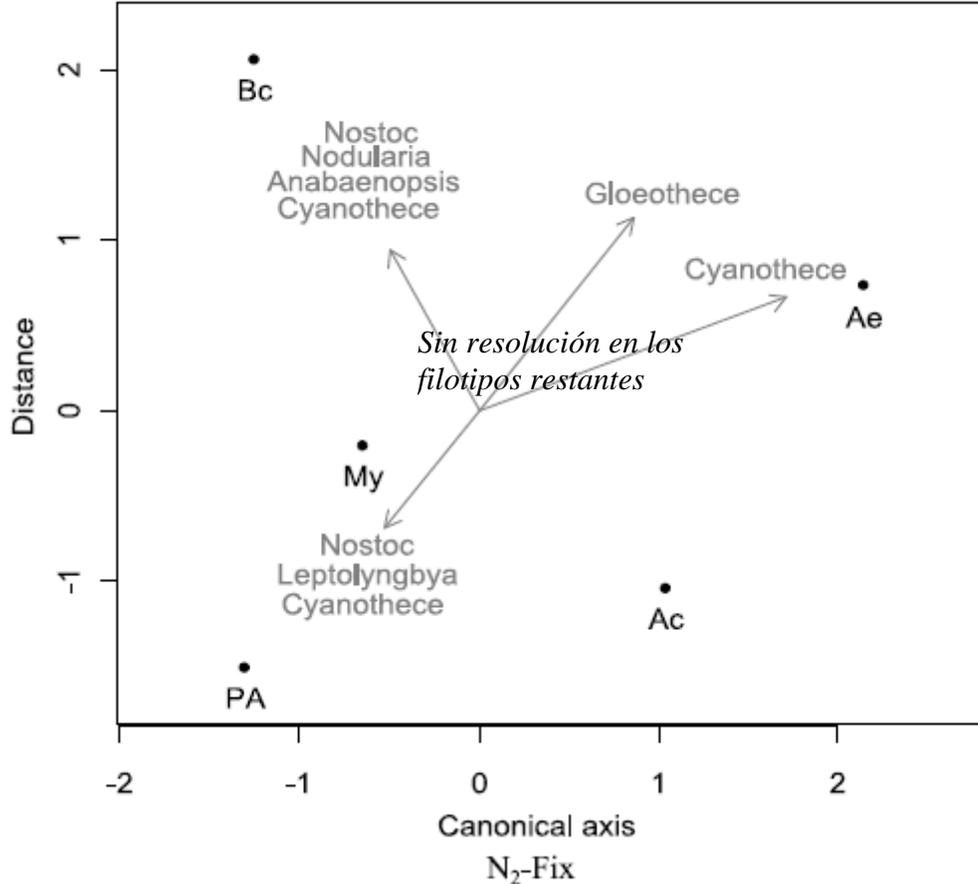
### **Análisis de variables**

El análisis de redundancia canónico (RDA), se realizó a partir de una matriz de composición de  $5 \times 48$  (sitios  $\times$  filotipos). En un principio con el procedimiento de selección de variables se identificó que sólo una variable contribuyó a la estructuración de la composición de las comunidades. Esta variable fue la fijación de nitrógeno, cuyo coeficiente de determinación ( $\text{AdjR}^2=0.11$ ) tuvo un nivel de significancia, obtenido por permutación, de 0.049 (Tabla 6). Este resultado estuvo asociado además a la ordenación de las variables correspondientes a las formas microbianas de carbono y nitrógeno ( $C_m$  y  $N_m$ )

**Tabla 6.** Resultados del procedimiento de *forward selection*

<b>Variab</b>	<b>R<sup>2</sup></b>	<b>R<sup>2</sup><sub>Cum</sub></b>	<b>AdjR<sup>2</sup><sub>Cum</sub></b>	<b>F</b>	<b>p</b>
Fijación N <sub>2</sub>	0.33	0.33	0.11	1.50	0.049*
C <sub>m</sub>	0.26	0.59	0.18	1.26	0.31
N <sub>m</sub>	0.27	0.86	0.43	1.87	0.38

El análisis de redundancia muestra que la actividad en la fijación de nitrógeno explica el 11% de la variación en los datos de presencia-ausencia de la composición microbiana encontrada en un fragmento de gen *nifH*, ( $R^2_a= 0.11$ ,  $P=0.05$ ). Esta relación resulta significativa, con una probabilidad de 0.05, con solo cinco objetos la prueba tiene poco poder de resolución como se observa en la Figura 14.



**Figura 14.** Ordenación del RDA en biplot que ilustra el efecto ( $P=0.05$ ) de la actividad de fijación de  $N_2$  en la composición microbiana (gen *nifH*) de cinco comunidades microbianas. Los puntos negros denotan a las distintas comunidades microbianas. Las líneas sólidas representan los filotipos registrados. En el eje de las abscisas la variable que explica el 11% de la variación de los datos.

La figura 14 muestra la ordenación de los filotipos que resulta del análisis de redundancia. Es esta ordenación se muestran los filotipos orientados espacialmente de acuerdo a la *influencia* de la fijación de nitrógeno (único eje canónico) y la comunidades orientadas según la distancia en el espacio euclidiano. Los filotipos que se observan en la ordenación son aquellos que la fijación de nitrógeno logra explicar con el 11 %

En la figura se observa que filotipos que tiene corresponden con porcentajes de similitud entre 70 y 83% con los generos Nostoc, y Cyanothece son más abundantes o resultan ser únicos en Pozas Azules. Otros filotipos, tales como aquellos que corresponden a Nostoc, Nodularia, Anabaenopsis y Cyanothece se orientan hacia Bacalar y en la dirección opuesta a la comunidad de Alchichica columnar, lo cual indica que estos filotipos

son más abundantes en los estromatolito de Bacalar y raros o ausentes en el estromatolito columnar de Alchichica. Filotipos correspondientes al género *Gloeothece*, *Cyanothece* y *Crocospaera* se orientan hacia el estromatolito esponjoso, sin embargo *Gloeothece* se desvía ligeramente hacia el estromatolito de Bacalar, indicando que este filotipo se localiza en ambas comunidades. El resto de los filotipos agrupados en el centro de la gráfica no alcanzan a ser resueltos dentro del 11% de la variación que explica la fijación de nitrógeno.

## DISCUSIÓN

Los consorcios microbianos, resultan ser ecosistemas completos y autosustentables formados por comunidades bacterianas fotosintéticas, que en una escala milimétrica han logrado transformar la atmósfera a escala planetaria. Recluidos en ambientes extremos son modelos modernos para entender el funcionamiento y desarrollo de las comunidades microbianas, gracias a la extraordinaria diversidad biológica que estamos apenas comenzando a descubrir y entender.

Los consorcios microbianos reportados en este trabajo se encuentran ampliamente distribuidos en una gran variedad de condiciones ambientales. Sin embargo comparten el hecho de habitar cuerpos de agua en condiciones de bajas concentraciones de nutrientes, que marcan el carácter oligotrófico de los sitios en los que habitan (Elser *et al.*, 2005; Souza *et al.*, 2006; Adame *et al.*, 2008).

Bajo estas condiciones de oligotrofia observamos en la fijación de nitrógeno una variación en el patrón diario (periodo que comprende ciclos de 24 h), como se ha reportado en otras comunidades microbianas. Se ha visto que este patrón depende de la composición microbiana, de los gradientes verticales creados a partir de la actividad metabólica correspondiente a cada uno de los grupos funcionales presentes en los agregados y a la intensidad luminosa que incide sobre estas comunidades microbianas (Bebout *et al.*, 1993; Paerl *et al.*, 1996; Steppe *et al.*, 2001; Omoregie *et al.*, 2004b). A pesar de las diferencias en la actividad de la nitrogenasa entre los distintos consorcios, el patrón funcional fue similar entre ellos, con la mayor actividad durante el día. En algunas de las comunidades, la actividad de la nitrogenasa fue detectada tanto en periodos de oscuridad como en el de luz, indicando que microorganismos fotótrofos y heterótrofos pueden ser responsables de este proceso. En todos los casos, los consorcios exhibieron un patrón diario en el cual los mayores niveles de fijación de nitrógeno se alcanzaron durante el día, entre el amanecer y el atardecer, consistente con los estudios previos en el lago cráter de Alchichica (Falcón *et al.*, 2002) y en otros sitios del valle de Cuatro Ciénegas (Falcón *et al.*, 2007). Este patrón es similar al que ha sido registrado en otras comunidades microbianas en ambientes completamente distintos y alejados como los lagos congelados de Antártica (Olson *et al.*, 1998), algunos lagos en Belice (Rejmánková & Komárková, 2000), en la bahía Tomales en

California (Stal *et al.*, 1994) y en el Mar del Norte (Stal *et al.*, 1984). Como la actividad metabólica en los consorcios microbianos está ampliamente relacionada a la composición de las comunidades que las forman, el hecho de que se registre actividad de la nitrogenasa durante el día sugiere que en la composición de los consorcios debe ser registrada la presencia de cianobacterias formadoras de heterocistos, capaces de realizar la fotosíntesis y la fijación de nitrógeno simultáneamente (Stal, 1994).

El desarrollo de heterocistos es una adaptación morfológica que han desarrollado los organismos diazótrofos, específicamente las cianobacterias, para vencer la incompatibilidad metabólica entre la fotosíntesis y la fijación de nitrógeno. Los organismos que carecen de defensas estructurales contra el oxígeno, pero que pueden estar implicados en la fijación de nitrógeno durante el día usan otras estrategias de separación espacial. Por ejemplo, cianobacterias carentes de heterocistos o bacterias heterótrofas fijadoras de nitrógeno pueden alojarse en zonas libres de oxígeno, no fotosintéticas, como las envolturas de exopolisacárido que desarrollan las cianobacterias filamentosas. Incluso se ha sugerido la agregación de cianobacterias filamentosas o unicelulares en donde una fracción de estas agregaciones realiza la fijación de nitrógeno y otra fracción forma barreras contra el oxígeno. También debe considerarse como otra estrategia de separación espacial la estratificación de los grupos funcionales en un gradiente de concentración de oxígeno, que junto con la capacidad de las cianobacterias para desplazarse en la matriz de los consorcios, dejan en la superficie de éstos a los fotótrofos oxigénicos y restringe a los diazótrofos a las zonas más profundas del consorcio, donde el metabolismo es anaerobio y la concentración de O<sub>2</sub> mínima (Paerl, 1990; Bebout, 1993; Van Gemerden, 1993; Stal, 1995; Berman-Frank *et al.*, 2003). Se considera como la estrategia de protección más ancestral, entre los diazótrofos fotosintéticos con actividad durante el fotoperiodo, la compleja interacción entre una segregación espacial y temporal en cianobacterias filamentosas que no forman heterocistos (Berman-Frank *et al.*, 2001)

La composición obtenida del *nifH* confirma los resultados sobre el patrón diario obtenido en la actividad de la nitrogenasa, sugiriendo que cianobacterias y bacterias heterótrofas están involucradas en este proceso. Este estudio confirma la presencia de cianobacterias con heterocistos, cianobacterias filamentosas sin heterocistos y unicelulares, así como bacterias heterótrofas de las divisiones alfa, gama, beta y delta-proteobacterias,

como componentes fundamentales de estos consorcios microbianos. Previamente han sido identificados, ya sea a nivel morfológico o molecular los grupos antes mencionados. En los consorcios de Alchichica han sido identificados miembros de los órdenes Nostocales, Chroococcales, Oscillatoriales, Pleurocapsales (Tavera & Komarek, 1996; Kazmierczak *et al.*, 2008). En Pozas Azules, bacterias heterótrofas: alfa y gama-proteobacterias y cianobacterias: Nostocales y Chroococcales (Breibart *et al.*, 2009, Domínguez, 2008). En Bacalar han sido identificados representantes del orden Oscillatoriales (Gischler *et al.*, 2008).

Aunque no todos los consorcios presentaron cambio estacional en la fijación de nitrógeno, se ha observado en otros consorcios, que este cambio estacional está relacionado tanto con la disponibilidad de nutrientes como con el cambio en la composición y abundancia de los grupos dominantes (Bebout *et al.*, 1993; Pickney, 1995; Paerl *et al.*, 1996). Los consorcios incluidos en este estudio presentaron cambios estacionales poco marcados, principalmente aquellos en Alchichica y Pozas Azules, ya que las tasas de fijación obtenida en verano y en invierno no mostraron diferencias estadísticamente significativas, lo cual sugiere que a pesar de la dinámica de nutrientes en el sistema (Adame *et al.*, 2008; Ramírez-Olvera *et al.*, 2009), la actividad de los organismos diazótrofos responden de igual forma a pesar de los cambios estacionales que ocurren en el medio circundante. Por otra parte, los consorcios microbianos ubicados en los sistemas Muyil y Bacalar, sí muestran diferencias estacionales, siendo en el verano cuando fue registrada la mayor actividad de la nitrogenasa. Este aumento en la fijación de nitrógeno durante el verano ha sido atribuido previamente, en tapices dominados por cianobacterias, al desarrollo del tapiz durante esta temporada (Stal *et al.*, 1994; Pinckney, 1995; Rejmánková & Komárková, 2000), lo cual implica un incremento en la demanda de nitrógeno para la síntesis de proteínas (Sturner & Elser, 2002).

Los efectos en la concentración de nutrientes también se ve reflejada en la actividad de la nitrogenasa, sobre todo en la baja concentración de nitrógeno inorgánico, ya que altas concentraciones de  $\text{NH}_4$  y  $\text{NO}_3$  disminuyen la actividad de la nitrogenasa (Paerl *et al.*, 1993). En ese sentido, en este estudio se sugiere observa la relación entre la concentración de nutrientes y la fijación de nitrógeno, ya que los niveles más altos en la fijación de nitrógeno coinciden con bajas concentraciones de nitrógeno disponible ( $\text{NH}_4$ ,  $\text{NO}_2$  y  $\text{NO}_3$ ).

Lo cual también se ve reflejado en la cantidad del nitrógeno incorporado en biomasa, ya que la concentración de  $N_m$  fue mayor en la temporada en la que la fijación de N lo fue también. El control de la disponibilidad de nutrientes sobre la actividad de la nitrogenasa también ha sido registrado de modo inverso, en el cual bajos niveles de fijación de nitrógeno fueron considerados como respuesta a concentraciones altas de formas disponibles de nitrógeno (Rejmánková & Komárková, 2000).

La limitación por N cobra relevancia en estos sistemas si consideramos que aunque el N y P son esenciales en el desarrollo de las comunidades microbianas, los resultados muestran que a pesar de las bajas concentraciones de fósforo disponible, el nitrógeno limita más que el fósforo a estas comunidades, en cuanto a su capacidad de fijar  $N_2$ . Esta limitación es evidente en los bajos valores que tiene la relación N:P (<4:1). Resultados similares han sido registrados previamente en otras comunidades microbianas, las cuales están primero limitadas por nitrógeno y después por fósforo (Olson *et al.*, 1998).

Aunque la fijación de nitrógeno tiene el potencial de disminuir la limitación por N, también se ha llegado a estimar que ni el aporte externo, ni la actividad metabólica logran suministrar los niveles de nitrógeno estimados en biomasa, lo cual implica que en estos sistemas además de la gran diversidad metabólica, el ciclaje de elementos esenciales también es muy importante (Dupraz & Visscher, 2005; Steppe *et al.*, 1996; Olson *et al.*, 1998; Des Marais, 2003). De tal forma que los organismos en estas comunidades han tenido que desarrollar estrategias para conservar y acceder a los escasos recursos que existen en los sitios en los que habitan. Sobre todo porque estas comunidades microbianas forman parte de pequeños ecosistemas altamente productivos (Canfield & Des Marais, 1993). Recientemente se ha estimado que la producción primaria de comunidades microbianas formadoras de microbialitos son igual de productivas como los bosques tropicales lluviosos (Stal, 2000). Derivar aquí la relevancia de este trabajo

Los estudios moleculares recientes indican que los organismos de las comunidades microbianas podrían enfrentar las limitaciones por la poca disponibilidad de P reemplazando fosfolípidos de la membrana por otro tipo de lípidos. Algunas cianobacterias y plantas que habitan sitios empobrecidos de P, han logrado reemplazar los fosfolípidos por sulfolípidos, alrededor de 30% del P total en la célula (Dörmann & Benning, 2002). De tal forma que la baja demanda de P les brinda una ventaja a estos organismos en ambientes

reducidos en P. De hecho en organismos aislados de los sistemas acuáticos del valle de Cuatro Ciénegas han sido detectados genes relacionados a la síntesis de sulfolípidos (Alcaraz *et al.*, 2008). Además de una gran abundancia de genes involucrados en la síntesis de fosfatasas que remueven los grupos fosfato de nucleótidos y proteínas y les permite a los organismos acceder a estas fuentes orgánicas de P (Breitbart *et al.*, 2009).

Otras evidencias relacionadas a la utilización del nitrógeno también han sido registradas a nivel molecular, como la identificación de un gran número de genes involucrados en la adquisición de fuentes orgánicas de nitrógeno, como la incorporación de aminoácidos (Alcaraz *et al.*, 2008; Breitbart *et al.*, 2009).

Es claro que la participación de organismos con estrategias adaptativas en las comunidades microbianas, permite establecer relaciones benéficas que ofrecen ventajas en sitios pobres en nutrientes. Por consiguiente, en una comunidad metabólicamente diversa estas relaciones permiten la optimización de los recursos frente a factores ambientales extremos y escalas de tiempo cortas para su utilización y crecimiento. Hay que añadir que estas estrategias han sido registradas en varios sitios que comparten condiciones ambientales similares, lo cual sugiere que existen estrategias de adaptación comunes en organismos de comunidades microbianas distintas (Alcaraz *et al.*, 2008).

Con una representación entre 75-93 % sobre la riqueza total de diazótrofos en estas comunidades, logramos identificar una diversa comunidad de diazótrofos afiliados a dos grandes phyla de fijadores de nitrógeno: cianobacterias y proteobacterias. Las secuencias obtenidas se relacionan entre sí de tal manera que parecen estar más relacionadas entre sí que con cualquier otra secuencia en la base de datos, lo cual en principio sugiere que existe una gran diversidad de los potenciales fijadores de nitrógeno en los sitios de estudio de esta tesis. También obtuvimos agrupaciones de clados formados por secuencias provenientes del mismo sitio y clados en los cuales se agruparon secuencias de diferentes sitios, lo cual sugiere que estos organismos diazótrofos que forman comunidades microbianas en México, en sitios oligotróficos tienen patrones biogeográficos. Esta diversidad de diazótrofos en estos sitios o comunidades microbianas similares, ha sido registrada anteriormente (Olson *et al.*, 1998; Olson *et al.*, 1999; Omoregie *et al.*, 2004; Falcón *et al.*, 2007). Sin embargo, recientemente es que comienzan a emerger evidencias sobre los patrones en la distribución de los filotipos de *nifH* entre distintos hábitats. Nuestro estudio muestra que existen

patrones característicos de los microorganismos fijadores de nitrógeno en diferentes hábitats, y aunque se puede decir que estos patrones no están del todo impuestos por la disponibilidad de N en el ambiente tampoco son completamente aleatorios, pero pueden ser previstos en base a las características del hábitat (Zehr *et al.*, 2003). Al respecto observamos que los datos obtenidos sobre la composición de las comunidades en los sitios de este estudio indican que hay una estructuración de las comunidades en respuesta a las características metabólicas, que al final son un reflejo de las condiciones ambientales en las cuales se desarrollan estas comunidades. El análisis de redundancia canónico reveló que la fijación de nitrógeno es la variable, que para estos datos, resuelve apenas un 11% de la estructuración de las comunidades microbianas en este estudio. Con este estudio y con otros trabajos sobre la estructuración de las comunidades se avanza en el entendimiento de los patrones de la distribución del mundo bacteriano (Papke *et al.*, 2003; Whitaker *et al.*, 2003; Dolan, 2005; Falcón *et al.*, 2008). Sin embargo, ahora las nuevas herramientas conceptuales y metodológicas en el área de la ecología microbiana se acercan más a responder grandes interrogantes no solo sobre las poblaciones de diazótofos presentes en los consorcios microbianos, sino también acerca de la dinámica entera de los organismos que forman estos consorcios.

Este estudio constituye un primer ejemplo en el cual se comparan diferentes consorcios microbianos en un gradiente geográfico, utilizando la función metabólica de la fijación de N<sub>2</sub> y su diversidad asociada para explorar los patrones de composición y distribución de las comunidades bacterianas.

## CONCLUSIONES

La actividad de los fijadores de nitrógeno en los consorcios microbianos aquí descritos, exhibe un patrón diurno, en el cual las cianobacterias desempeñan un papel importante dentro de estos pequeños ecosistemas; con un patrón estacional ligeramente marcado.

La composición de diazótrofos muestra una gran diversidad en representantes de los phyla Cyanobacteria y Proteobacteria. Dicha composición indica que existen patrones en la distribución de los filotipos de *nifH* entre los distintos sitios. Se observa que existen grupos funcionales que se comparten entre consorcios y otros que son únicos en estos sitios.

La actividad de la nitrogenasa fue la variable responsable de la estructuración de la composición de los organismos diazótrofos en las comunidades microbianas estudiadas.

La estructuración de las comunidades fue respecto a la variable asociada a la actividad metabólica que realizan los consorcios en sitios con características diferentes.

## BIBLIOGRAFÍA

Adame, M. F., J. Alcocer, and E. Escobar. 2008. Size-fractionated phytoplankton biomass and its implications for the dynamics of an oligotrophic tropical lake. *Freshwater Biology* 53:22-31.

Alcaraz, L. D., G. Olmedo, G. Bonilla, R. Cerritos, G. Hernandez, A. Cruz, E. Ramirez, C. Putonti, B. Jimenez, E. Martinez, V. Lopez, J. L. Arvizu, F. Ayala, F. Razo, J. Caballero, J. Siefert, L. Eguiarte, J. P. Vielle, O. Martinez, V. Souza, A. Herrera-Estrella, and L. Herrera-Estrella. 2008. The genome of *Bacillus coahuilensis* reveals adaptations essential for survival in the relic of an ancient marine environment. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 105:5803-5808.

Alcocer, J., and A. E. Filonov. 2007. A note on the effects of an individual large rainfall event on saline Lake Alchichica, Mexico. *Environmental Geology* 53:777-783.

Amann, R. I., W. Ludwig, and K. H. Schleifer. 1995. Phylogenetic identification and in-situ detection of individual microbial-cells without cultivation. *Microbiological Reviews* 59:143-169.

Awramik, S. M. 2006. Palaeontology - Respect for stromatolites. *Nature* 441:700-701.

Badino, G. et al. (2004). *Bajo el Desierto: el misterio de las aguas de Cuatro Ciénegas*. Tintoretto editzioni, Italia. 272 pp.

Bebout, B. M., M. W. Fitzpatrick, and H. W. Paerl. 1993. Identification of the sources of energy for nitrogen-fixation and physiological characterization of nitrogen-fixing members of a marine microbial mat community. *Applied and Environmental Microbiology* 59:1495-1503.

Bebout, B. M., and F. Garciapichel. 1995. UV B-induced vertical migrations of cyanobacteria in a microbial mat. *Applied and Environmental Microbiology* 61:4215-4222.

Bebout, B. M., H. W. Paerl, K. M. Crocker, and L. E. Prufert. 1987. Diel interactions of oxygenic photosynthesis and N<sub>2</sub> fixation (acetylene-reduction) in a marine microbial mat community. *Applied and Environmental Microbiology* 53:2353-2362.

Begon, M. et al. 1996. *Ecology - Individuals, Populations and Communities*. Blackwell Scientific Publications. 3rd ed. 1068 pp.

Ben-Porath, J., and J. P. Zehr. 1994. Detection and characterization of cyanobacterial nifH genes. *Applied and Environmental Microbiology* 60:880-887.

Berman-Frank, I., P. Lundgren, Y. B. Chen, H. Kupper, Z. Kolber, B. Bergman, and P. Falkowski. 2001. Segregation of nitrogen fixation and oxygenic photosynthesis in the marine cyanobacterium *Trichodesmium*. *Science* 294:1534-1537.

Berman-Frank, I., P. Lundgren, and P. Falkowski. 2003. Nitrogen fixation and photosynthetic oxygen evolution in cyanobacteria. *Research in Microbiology* 154:157-164.

Berman-Frank, I., A. Quigg, Z. V. Finkel, A. J. Irwin, and L. Haramaty. 2007. Nitrogen-fixation strategies and Fe requirements in cyanobacteria. *Limnology and Oceanography* 52:2260-2269.

Bolhuis, H., I. Severin, V. Confurius-Guns, U. I. A. Wollenzien, and L. J. Stal. 2010. Horizontal transfer of the nitrogen fixation gene cluster in the cyanobacterium *Microcoleus chthonoplastes*. *Isme Journal* 4:121-130.

Braithwaite, A. and F.J. Smith. 1996. *Chromatographic methods*. Blackie Academic & Professional, London. 559 p.

- Breitbart, M., A. Hoare, A. Nitti, J. Siefert, M. Haynes, E. Dinsdale, R. Edwards, V. Souza, F. Rohwer, and D. Hollander. 2009. Metagenomic and stable isotopic analyses of modern freshwater microbialites in Cuatro CiEnegas, Mexico. *Environmental Microbiology* 11:16-34.
- Brookes, P. C., A. Landman, G. Pruden, and D. S. Jenkinson. 1985. Chloroform fumigation and the release of soil-nitrogen – a rapid direct extraction method to measure microbial biomass nitrogen in soil. *Soil Biology & Biochemistry* 17:837-842.
- Brookes, P. C., D. S. Powlson, and D. S. Jenkinson. 1982. Measurement of microbial biomass phosphorus in soil. *Soil Biology & Biochemistry* 14:319-329.
- Burns, B. P., F. Goh, M. Allen, and B. A. Neilan. 2004. Microbial diversity of extant stromatolites in the hypersaline marine environment of Shark Bay, Australia. *Environmental Microbiology* 6:1096-1101.
- Canfield, D. E., and D. J. D. Marais. 1993. Biogeochemical cycles of carbon, sulfur, and free oxygen in a microbial mat. *Geochimica Et Cosmochimica Acta* 57:3971-3984.
- Capone, D.G. 1993 Determination of nitrogenase activity in aquatic samples using the acetylene reduction procedure. In: Kemp PF, Sherr, BF, Sherr, EB, Cole, JJ (Eds.) *Handbook of Methods in Aquatic Microbial Ecology*, Lewis Press, Boca Raton, FL, pp 621–631.
- Capone DG y JP Montoya (2001) Nitrogen fixation and Denitrification. En: Paul JH (ed) *Marine Microbiology*. Academic Press, Boca Raton, FL, p 501-515..
- Curtis, T. P., W. T. Sloan, and J. W. Scannell. 2002. Estimating prokaryotic diversity and its limits. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 99:10494-10499.
- Decho, A. W., P. T. Visscher, and R. P. Reid. 2005. Production and cycling of natural microbial exopolymers (EPS) within a marine stromatolite. *Palaeogeography Palaeoclimatology Palaeoecology* 219:71-86.
- Des Marais, D. J. 2003. Biogeochemistry of hypersaline microbial mats illustrates the dynamics of modern microbial ecosystems and the early evolution of the biosphere. *Biological Bulletin* 204:160-167.
- DesMarais, D. J. 1995. The biogeochemistry of hypersaline microbial mats. *Advances in Microbial Ecology*, Vol 14 14:251-274.
- Dolan, J. R. 2005. An introduction to the biogeography of aquatic microbes. *Aquatic Microbial Ecology* 41:39-48.
- Dörmann, P., and C. Benning. 2002. Galactolipids rule in seed plants. *Trends in Plant Science* 7:112-118.
- Dray, S., P. Legendre and G. Blanchet. 2009. Packfor: Forward selection with permutation (Canoco p. 46) R package version 1.0. <http://cran.r-project.org>
- Dupraz, C., and P. T. Visscher. 2005. Microbial lithification in marine stromatolites and hypersaline mats. *Trends in Microbiology* 13:429-438.
- Elser, J. J., M. E. S. Bracken, E. E. Cleland, D. S. Gruner, W. S. Harpole, H. Hillebrand, J. T. Ngai, E. W. Seabloom, J. B. Shurin, and J. E. Smith. 2007. Global analysis of nitrogen and phosphorus limitation of primary producers in freshwater, marine and terrestrial ecosystems. *Ecology Letters* 10:1135-1142.
- Elser, J. J., J. H. Schampel, F. Garcia-Pichel, B. D. Wade, V. Souza, L. Eguiarte, A. Escalante, and J. D. Farmer. 2005. Effects of phosphorus enrichment and grazing snails on modern stromatolitic microbial communities. *Freshwater Biology* 50:1808-1825.
- Falcon, L. I., R. Cerritos, L. E. Eguiarte, and V. Souza. 2007. Nitrogen fixation in microbial mat and

- stromatolite communities from Cuatro Ciénegas, Mexico. *Microbial Ecology* 54:363-373.
- Falcon, L. I., E. Escobar-Briones, and D. Romero. 2002. Nitrogen fixation patterns displayed by cyanobacterial consortia in Alchichica crater-lake, Mexico. *Hydrobiologia* 467:71-78.
- Falcon, L. I., A. M. Noguez, L. Espinosa-Asuar, L. E. Eguiarte, and V. Souza. 2008. Evidence of biogeography in surface ocean bacterioplankton assemblages. *Marine Genomics* 1:55-61.
- Felske, A., and A. D. L. Akkermans. 1998. Spatial homogeneity of abundant bacterial 16S rRNA molecules in grassland soils. *Microbial Ecology* 36:31-36.
- Fenchel, T., and M. Kuhl. 2000. Artificial cyanobacterial mats: Growth, structure, and vertical zonation patterns. *Microbial Ecology* 40:85-93.
- Gischler, E., M. A. Gibson, and W. Oschmann. 2008. Giant Holocene freshwater microbialites, Laguna Bacalar, Quintana Roo, Mexico. *Sedimentology* 55:1293-1309.
- Gómez-Pompa, A. y R. Dirzo. Coords. 1995. Reservas de la biosfera y otras áreas naturales protegidas de México. Instituto Nacional de Ecología, SEMARNAP y Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad. (Edición digital: Conabio 2006).
- Grotzinger, J. P., and A. H. Knoll. 1999. Stromatolites in Precambrian carbonates: Evolutionary mileposts or environmental dipsticks? *Annual Review of Earth and Planetary Sciences* 27:313-358.
- Gruber, N., and J. N. Galloway. 2008. An Earth-system perspective of the global nitrogen cycle. *Nature* 451:293-296.
- Hall, T.A. 1999. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucl. Acids. Symp. Ser.* 41:95-98.
- Head, I. M., J. R. Saunders, and R. W. Pickup. 1998. Microbial evolution, diversity, and ecology: A decade of ribosomal RNA analysis of uncultivated microorganisms. *Microbial Ecology* 35:1-21.
- Horner-Devine, M. C., K. M. Carney, and B. J. M. Bohannon. 2004. An ecological perspective on bacterial biodiversity. *Proceedings of the Royal Society of London Series B-Biological Sciences* 271:113-122.
- Joergensen, R. G. 1996. The fumigation-extraction method to estimate soil microbial biomass: Calibration of the k(EC) value. *Soil Biology & Biochemistry* 28:25-31.
- Joergensen, R. G., and T. Mueller. 1996. The fumigation-extraction method to estimate soil microbial biomass: Calibration of the k(EN) value. *Soil Biology & Biochemistry* 28:33-37.
- Johannesson, K. H., A. Cortes, and K. C. Kilroy. 2004. Reconnaissance isotopic and hydrochemical study of Cuatro Ciénegas groundwater, Coahuila, Mexico. *Journal of South American Earth Sciences* 17:171-180.
- Joye, S. B., and H. W. Paerl. 1993. Contemporaneous nitrogen-fixation and denitrification in intertidal microbial mats – rapid response to runoff events. *Marine Ecology-Progress Series* 94:267-274.
- Joye, S. B., and H. W. Paerl. 1994. Nitrogen cycling in microbial mats – rates and patterns of denitrification and nitrogen-fixation. *Marine Biology* 119:285-295.
- Kazmierczak, J., P. López-García, R. Tavera, S. Kempe, B. Kremer, D. Moreira, 2008. Modern and sub-recent carbonate microbialites from the alkaline lake Alchichica, Mexico - In: J. Reitner, N-V. Quéric & M. Reich (eds), *Geobiology of Stromatolites, International Kalkowsky-Symposium, Abstract Volume and Field Guide*, p. 85-88. Kalkowsky Conference, 5-8 October 2008, Gottingen, Germany.

- Kemp, P. F., and J. Y. Aller. 2004. Estimating prokaryotic diversity: When are 16S rDNA libraries large enough? *Limnology and Oceanography-Methods* 2:114-125.
- Klotz, M. G., and L. Y. Stein. 2008. Nitrifier genomics and evolution of the nitrogen cycle. *Fems Microbiology Letters* 278:146-156.
- Legendre, P. 2007. Anova.2way.R: Two-way crossed-factor anova with permutation tests (balanced design): models I, II, and III. <http://www.bio.umontreal.ca/legendre/indexEn>
- Legendre, P. and S. Durand. 2010. R library to compute simple and partial canonical redundancy analysis (RDA) with permutation test and draw triplots of the results. <http://www.bio.umontreal.ca/legendre/indexEn.html>.
- Madigan M. T. et al. (1999). *Biology of Microorganisms*. Price Hall. 6th ed. USA. 874 pp.
- Moir, J. W. B., and N. J. Wood. 2001. Nitrate and nitrite transport in bacteria. *Cellular and Molecular Life Sciences* 58:215-224.
- Olson, J. B., R. W. Litaker, and H. W. Paerl. 1999. Ubiquity of heterotrophic diazotrophs in marine microbial mats. *Aquatic Microbial Ecology* 19:29-36.
- Olson, J. B., T. F. Steppe, R. W. Litaker, and H. W. Paerl. 1998. N<sub>2</sub>-fixing microbial consortia associated with the ice cover of Lake Bonney, Antarctica. *Microbial Ecology* 36:231-238.
- Omorigie, E. O., L. L. Crumbliss, B. M. Bebout, and J. P. Zehr. 2004. Comparison of diazotroph community structure in *Lyngbya* sp and *Microcoleus chthonoplastes* dominated microbial mats from Guerrero Negro, Baja, Mexico. *Fems Microbiology Ecology* 47:305-318.
- Omorigie, E. O., L. L. Crumbliss, B. M. Bebout, and J. P. Zehr. 2004. Determination of nitrogen-fixing phylotypes in *Lyngbya* sp and *Microcoleus chthonoplastes* cyanobacterial mats from Guerrero Negro, Baja California, Mexico. *Applied and Environmental Microbiology* 70:2119-2128.
- Pace, N. R. 1997. A molecular view of microbial diversity and the biosphere. *Science* 276:734-740.
- Paerl, H. W. 1990. Physiological ecology and regulation of N<sub>2</sub> fixation in natural-waters. *Advances in Microbial Ecology* 11:305-344.
- Paerl, H. W., M. Fitzpatrick, and B. M. Bebout. 1996. Seasonal nitrogen fixation dynamics in a marine microbial mat: Potential roles of cyanobacteria and microheterotrophs. *Limnology and Oceanography* 41:419-427.
- Paerl, H. W., S. B. Joye, and M. Fitzpatrick. 1993. Evaluation of nutrient limitation of CO<sub>2</sub> and N<sub>2</sub> fixation in marine microbial mats. *Marine Ecology-Progress Series* 101:297-306.
- Paerl, H. W., J. L. Pinckney, and T. F. Steppe. 2000. Cyanobacterial-bacterial mat consortia: examining the functional unit of microbial survival and growth in extreme environments. *Environmental Microbiology* 2:11-26.
- Papke, R. T., N. B. Ramsing, M. M. Bateson, and D. M. Ward. 2003. Geographical isolation in hot spring cyanobacteria. *Environmental Microbiology* 5:650-659.
- Piceno, Y. M., Noble, P. A. & Lovell, C. R. 1999 Spatial and temporal assessment of diazotroph assemblage composition in vegetated salt marsh sediments using denaturing gradient gel electrophoresis analysis. *Microb. Ecol.* 38, 157-167.
- Pinckney, J., H. W. Paerl, and M. Fitzpatrick. 1995. Impacts of seasonality and nutrients on microbial mat

- community structure and function. *Marine Ecology-Progress Series* 123:207-216.
- Postgate, J. R. 1998. *Nitrogen Fixation*. Cambridge University Publications. Cambridge, United Kingdom. 112 p.
- R Development Core Team. 2009. *R: A language and environment for statistical computing*. R Foundation for Statistical computing, Vienna, Austria. <http://www.R-project.org>
- Ramette, A., and J. M. Tiedje. 2007. Biogeography: An emerging cornerstone for understanding prokaryotic diversity, ecology, and evolution. *Microbial Ecology* 53:197-207.
- Ramirez-Olvera, M. A., J. Alcocer, M. Merino-Ibarra, and A. Lugo. 2009. Nutrient limitation in a tropical saline lake: a microcosm experiment. *Hydrobiologia* 626:5-13.
- Ramos-Higuera, E., J. Alcocer, E. Ortega-Mayagoitia, and A. Camacho. 2008. Nitrogen: The limiting nutrient for phytoplankton growth in an oligotrophic, tropical lake. *Hidrobiologica* 18:105-113.
- Raymond, J., J. L. Siefert, C. R. Staples, and R. E. Blankenship. 2004. The natural history of nitrogen fixation. *Molecular Biology and Evolution* 21:541-554.
- Reid, R. P., I. G. Macintyre, K. M. Browne, R. S. Steneck, and T. Miller. 1995. Modern marine stromatolites in the Exuma-cays, Bahamas – uncommonly common. *Facies* 33:1-17.
- Reid, R. P., P. T. Visscher, A. W. Decho, J. F. Stolz, B. M. Bebout, C. Dupraz, L. G. Macintyre, H. W. Paerl, J. L. Pinckney, L. Prufert-Bebout, T. F. Steppe, and D. J. DesMarais. 2000. The role of microbes in accretion, lamination and early lithification of modern marine stromatolites. *Nature* 406:989-992.
- Rejmankova, E., and J. Komarkova. 2000. A function of cyanobacterial mats in phosphorus-limited tropical wetlands. *Hydrobiologia* 431:135-153.
- Riding, R. 2000. Microbial carbonates: the geological record of calcified bacterial-algal mats and biofilms. *Sedimentology* 47:179-214.
- Schlesinger, W.H. 2000. *Biogeochemistry: an analysis of global change*. Ariel, Barcelona. 574 p.
- Schopf, J. W., A. B. Kudryavtsev, D. G. Agresti, T. J. Wdowiak, and A. D. Czaja. 2002. Laser-Raman imagery of Earth's earliest fossils. *Nature* 416:73-76.
- Sebat, J. L., F. S. Colwell, and R. L. Crawford. 2003. Metagenomic profiling: Microarray analysis of an environmental genomic library. *Applied and Environmental Microbiology* 69:4927-4934.
- Sigee, D. C. 2005. *Freshwater microbiology: biodiversity and dynamic interactions of microorganisms in the aquatic environment*. John Wiley & Sons Ltd.
- Souza, V., L. Espinosa-Asuar, A. E. Escalante, L. E. Eguiarte, J. Farmer, L. Forney, L. Lloret, J. M. Rodriguez-Martinez, X. Soberon, R. Dirzo, and J. J. Elser. 2006. An endangered oasis of aquatic microbial biodiversity in the Chihuahuan desert. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 103:6565-6570.
- Stal, L. J. 1995. Physiological ecology of cyanobacteria in microbial mats and other communities. *New Phytologist* 131:1-32.
- Stal, L. J., S. Grossberger, and W. E. Krumbein. 1984. Nitrogen-fixation associated with the cyanobacterial mat of a marine laminated microbial ecosystem. *Marine Biology* 82:217-224.
- Stal, L. J., 2000. Cyanobacterial Mats and Stromatolites. En: B. A. Whitton and M. Potts (eds). *The ecology*

of cyanobacteria. 61-120. Kluwer Academic Publishers. Netherlands.

Steppe, T. F., J. B. Olson, H. W. Paerl, R. W. Litaker, and J. Belnap. 1996. Consortial N<sub>2</sub> fixation: A strategy for meeting nitrogen requirements of marine and terrestrial cyanobacterial mats. *Fems Microbiology Ecology* 21:149-156.

Steppe, T. F., J. L. Pinckney, J. Dyble, and H. W. Paerl. 2001. Diazotrophy in modern marine Bahamian stromatolites. *Microbial Ecology* 41:36-44.

Sterner, R.W. and J. J. Elser. 2002. *Ecological stoichiometry : the biology of elements from molecules to the biosphere*. Princeton University, New Jersey. 439 p.

Stolz, J. F. 2000. Structure of microbial mats and biofilms. *Microbial Sediments*:1-8.

Tavera, R. and J. Komárek. 1996. Cyanoprokaryotes in the volcanic lake of Alchichica, Puebla State, Mexico. *Algological Studies* 83:511-538.

Vance, E. D., P. C. Brookes, and D. S. Jenkinson. 1987. An extraction method for measuring soil microbial biomass-C. *Soil Biology & Biochemistry* 19:703-707.

Van Gernerden, H. 1993. Microbial Mats – A joint venture. *Marine Geology* 113:3-25.

Villbrandt, M., L. J. Stal, and W. E. Krumbein. 1990. Interactions between nitrogen-fixation and oxygenic photosynthesis in a marine cyanobacterial mat. *Fems Microbiology Ecology* 74:59-72.

Von Wintzingerode, F., U. B. Gobel, and E. Stackebrandt. 1997. Determination of microbial diversity in environmental samples: pitfalls of PCR-based rRNA analysis. *Fems Microbiology Reviews* 21:213-229.

Ward, B. B., D. G. Capone, and J. P. Zehr. 2007. What's New in the Nitrogen Cycle? *Oceanography* 20:101-109.

Ward, D. M., M. J. Ferris, S. C. Nold, and M. M. Bateson. 1998. A natural view of microbial biodiversity within hot spring cyanobacterial mat communities. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 62:1353-+.

Webster, G., T. M. Embley, and J. I. Prosser. 2002. Grassland management regimens reduce small-scale heterogeneity and species diversity of beta-proteobacterial ammonia oxidizer populations. *Applied and Environmental Microbiology* 68:20-30.

Whitaker, R. J., D. W. Grogan, and J. W. Taylor. 2003. Geographic barriers isolate endemic populations of hyperthermophilic archaea. *Science* 301:976-978.

Whitman, W. B., D. C. Coleman, and W. J. Wiebe. 1998. Prokaryotes: The unseen majority. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 95:6578-6583.

Young, J. P. W. 1992. Phylogenetic classification of nitrogen-fixing organisms. En *Biological Nitrogen Fixation*, pp. 43-86. Edited by G. Stacey, H. J. Evans & R. H. Burris. New York: Chapman & Hall.

Zani, S., M. T. Mellon, J. L. Collier, and J. P. Zehr. 2000. Expression of nifH genes in natural microbial assemblages in Lake George, New York, detected by reverse transcriptase PCR. *Applied and Environmental Microbiology* 66:3119-3124.

Zehr, J. P., and D. G. Capone. 1996. Problems and promises of assaying the genetic potential for nitrogen fixation in the marine environment. *Microbial Ecology* 32:263-281.

Zehr, J. P., B. D. Jenkins, S. M. Short, and G. F. Steward. 2003. Nitrogenase gene diversity and microbial community structure: a cross-system comparison. *Environmental Microbiology* 5:539-554.

Zehr, J. P., and L. A. McReynolds. 1989. Use of degenerate oligonucleotides for amplification of the *nifH* gene from the marine cyanobacterium *trichodesmium-thiebautii*. *Applied and Environmental Microbiology* 55:2522-2526.

Zehr, J. P., M. T. Mellon, and W. D. Hiorns. 1997. Phylogeny of cyanobacterial *nifH* genes: Evolutionary implications and potential applications to natural assemblages. *Microbiology-Uk* 143:1443-1450.

Zehr, J. P., and B. B. Ward. 2002. Nitrogen cycling in the ocean: New perspectives on processes and paradigms. *Applied and Environmental Microbiology* 68:1015-1024.

Zhou, J. Z., M. A. Bruns, and J. M. Tiedje. 1996. DNA recovery from soils of diverse composition. *Applied and Environmental Microbiology* 62:316-322.