

OPTIMIZACIÓN DE UN PROTOCOLO DE EXTRACCIÓN DE DNA TOTAL PARA LA AMPLIFICACIÓN DE MARCADORES MOLECULARES FUNCIONALES ESPECÍFICOS DE ORGANISMOS DESNITRIFICANTES

Blanco-Jarvio, A., A. Martínez López & A. Bautista García

Centro Interdisciplinario de Ciencias Marinas. Av. Instituto Politécnico Nacional S/N, Col. Playa Palo de Santa Rita, A.P. 592. La Paz, B.C.S., México. C.P. 23096. email: amartin@ipn.mx

RESUMEN. En esta contribución se planteó el objetivo de resolver la problemática que se enfrenta al trabajar con técnicas de biología molecular para la extracción de DNA obtenido de material particulado marino en suspensión, y se presenta una propuesta de cómo pueden ser resueltos estos problemas. Los protocolos comúnmente empleados fueron modificados para optimizar la cantidad de DNA total extraído, incrementado así la probabilidad de la amplificación de genes funcionales. Se presentan, además, resultados de la selección de sitios hipervariables para el 16S rRNA, así como para los genes *nirS*, *nirK* y *nosZ* para determinación de amplicones útiles en la identificación de microorganismos participantes en la ruta de desnitrificación en columna de agua.

Palabras clave: microorganismos desnitrificantes, marcadores moleculares, extracción de DNA ambiental.

Protocol optimization for DNA extraction and amplification by PCR of denitrifying organisms

ABSTRACT. In this contribution we had the objective to solve the problems encountered working with molecular biology techniques for the extraction of DNA obtained from marine suspended particulate matter, and we provide an alternative on how to resolve such problems. Commonly employed protocols were modified to optimize the total DNA extracted increasing in terms of quality and quantity the probability of amplifying the functional genes. In addition, the results of the selection of hypervariable sites of 16S rRNA and *nirS*, *nirK* and *nosZ* genes are presented for the determination of amplicons useful in the identification of microorganisms participating in the denitrification pathway in the water column

Keywords: denitrifying microorganisms, molecular markers, environmental DNA extraction.

Blanco-Jarvio, A., A. Martínez López & A. Bautista García. 2014. Optimización de un protocolo de extracción de DNA total para la amplificación de marcadores moleculares funcionales específicos de organismos desnitrificantes. *CICIMAR Oceánides*, 29(2): 37-44.

INTRODUCCIÓN

Los ecosistemas marinos son esenciales en el equilibrio ecológico del planeta ya que tienen flujos de reciclaje conjuntos con los ecosistemas terrestres entre los diferentes ciclos de los elementos químicos. En los océanos la dinámica biogeoquímica está regulada por las actividades microbianas (Karl *et al.*, 2002; Zehr & Kudela, 2011), de tal forma que éstas influyen desde la trama trófica marina hasta el clima global (Baisden & Amundson, 2003; Madigan *et al.*, 2004).

Las transformaciones de los elementos químicos mediadas por la actividad biológica son fundamentales para entender el ecosistema marino, por lo que la identificación de los diferentes tipos de microorganismos involucrados en procesos específicos es necesaria. Bajo esta perspectiva se debe considerar que la historia evolutiva de la vida en el planeta y su equilibrio ecológico han sido en gran medida el resultado de las transformaciones microbianas por organismos procariontes metabólicamente

diversos como las bacterias (Francis *et al.*, 2007; Canfiel *et al.*, 2010). Los genomas bacterianos codifican para una gran cantidad de enzimas necesarias para las transformaciones químicas de los nutrientes y de los procesos biogeoquímicos del planeta (Madigan *et al.*, 2004). La determinación de su diversidad e identificación comenzó con el empleo de técnicas tradicionales dependientes de cultivo y microscopía, sin embargo, muchas de estas bacterias no pueden ser aisladas y cultivadas en un laboratorio, además de que muchas pueden ser morfológicamente similares pero filogenéticamente distantes (Defarge, 1997; Decho & Kawaguchi, 1999). Esta problemática definió la proliferación en los últimos años de diferentes técnicas de biología molecular y la selección de diferentes marcadores, como el 16S rRNA, el cual se ha convertido en la herramienta fundamental de análisis de la diversidad microbiana debido a que esta región ha permitido discernir entre diferentes grupos taxonómicos provenientes de hábitats de agua dulce, marinos o inclusive de suelos (Muyzer

et al., 1993; Abed *et al.*, 2003; Jasper & Overmann, 2004; DeLong, 2005).

Para realizar estudios a nivel molecular el primer paso consiste en realizar la extracción de los ácidos nucleicos (DNA y/o RNA) con los que posteriormente se amplifican diferentes genes o regiones específicas mediante la técnica de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR). En general los protocolos de extracción siguen una serie de pasos, que se basan en el hecho de que los iones salinos positivos son atraídos hacia las cargas negativas del DNA, permitiendo su disolución y posterior extracción de la célula. Los pasos secuenciales consisten principalmente en: lisado de las paredes y membranas celulares mediante la acción de un detergente, seguida de la degradación de la fracción proteica y de restos celulares, y finalmente precipitación del material nucleico (Sambrook & Russell, 2001; Dale & von Schantz, 2002).

Existen diversos protocolos de extracción que han sido ajustados para optimizar el producto dependiendo del tipo de muestra. Sin embargo, el observar DNA (mediante gel o cuantificación en un espectrofotómetro) no necesariamente garantiza una correcta amplificación de una región específica del DNA mediante la técnica de PCR (Noordhoek *et al.*, 1994; Espinosa-Asuar, 2007). Esto entre otras razones se puede deber a: i) bajo rendimiento de la extracción, muchas veces causada por el nivel bajo de biomasa procarionota y la naturaleza del tejido y/o membranas de los eucariotas, ii) poco número de copias del marcador molecular a amplificar y iii) Inhibición de la DNA polimerasa al momento de hacer el PCR, causada por varios factores que dependen de la naturaleza de la muestra tales como, la precipitación de fluidos animales durante la extracción y la presencia de polisacáridos, urea, hemoglobina, entre otras. Si las muestras son ambientales, se puede precipitar además del DNA, ácido húmico, moléculas polares y, en el caso de muestras marinas, los iones orgánicos e inorgánicos, además de polisacáridos y residuos de los químicos usados durante la extracción (Espinosa-Asuar, 2007; Serrato-Díaz *et al.*, 2014).

La técnica de PCR es la base para análisis posteriores, ya que al utilizar oligos específicos permite la obtención de marcadores moleculares que pueden usarse en diferentes estudios como: bibliotecas genéticas a base de clones, huellas genéticas, metagenómica, etc., las cuales permiten una aproximación importante para los estudios de diversidad y/o densidad de las comunidades microbianas (Braker *et al.*, 1998; Hallin & Lindgren, 1999; Philippot & Ha-

llin, 2005).

Actualmente los análisis moleculares se basan en secuencias homólogas aisladas de diferentes organismos que permiten determinar su distancia evolutiva; de esta manera las diferencias en la secuencia pueden ser “proporcionales” al número de cambios fijados en el DNA que codifica esa molécula, lo que permite hacer análisis a partir de las mutaciones que quedan fijadas en las diferentes poblaciones, siendo la biodiversidad el resultado final (Lemely *et al.*, 2009). Es importante mencionar que el objetivo de cada estudio definirá las moléculas adecuadas para utilizar como marcadores. Algunas de las más usadas son las secuencias ribosomales (rDNA) que codifican para los RNA ribosomales (rRNA). Estas moléculas sintetizadoras de proteínas son funcionalmente constantes y por lo tanto se asume que esta “maquinaria” tiene una historia evolutiva antigua, lo que se suma a que las moléculas que codifican para los rRNA están universalmente distribuidas y su secuencia está moderadamente bien conservada a través de amplias distancias filogenéticas (Madigan *et al.*, 2004; Bruce *et al.*, 2008). En bacterias la secuencia que codifica para la subunidad pequeña del ribosoma 16S rRNA ha sido ampliamente utilizada en estudios evolutivos (Fenchel & Ramsing, 1992; Nübel *et al.*, 1997; Schmalenberger *et al.*, 2001; Rocap *et al.*, 2002; Vetrovsky & Baldrian, 2013). Esta secuencia tiene un tamaño aproximado de 1.5 kb y contiene nueve regiones hipervariables (V1 – V9) que muestran una considerable diversidad entre las secuencias de los microorganismos, lo cual la hace sumamente útil para la identificación de especies (Brosius *et al.*, 1978; Van de Peer *et al.*, 1996 Chakravorty *et al.*, 2007). Las regiones hipervariables se encuentran flanqueadas por regiones conservadas (Fig. 1) y, dependiendo del objetivo del trabajo, pueden ser utilizadas como blanco para el diseño y síntesis de oligonucleótidos universales específicos que permitan la obtención de amplicones de regiones hipervariables particulares. (McCabe *et al.*, 1999; Lu *et al.*, 2000; Baker *et al.*, 2003; Chakravorty *et al.*, 2007).

El desarrollo de técnicas moleculares basadas en la secuencia del 16S rDNA se ha dado desde finales de los 80's hasta la fecha y han sido una herramienta útil en el campo de la ecología microbiana (Braker *et al.*, 2000). Actualmente se ha avanzado en el conocimiento de la funcionalidad de genes que codifican para enzimas involucradas en procesos esenciales de la diversidad bacteriana (Braker *et al.*, 2000), lo cual ha permitido la utilización de genes funcionales que codifican para procesos metabólicos. Ejemplo de lo anterior son los

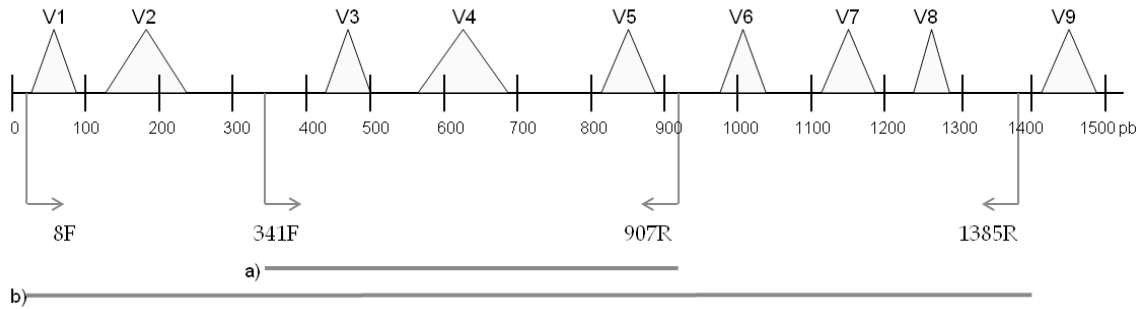


Figura 1. Esquema del 16S rDNA. Los triángulos indican la posición de las regiones hipervariables (V1-V9) en la secuencia del 16S rDNA. a) amplicón corto y b) amplicón largo.

Figure 1. 16S rDNA diagram. Triangle shows the position of hypervariable region (V1-V9) in 16S rDNA. a) short amplicon and b) large amplicon

genes que codifican para enzimas reductasas de la vía de desnitrificación en el ciclo del Nitrógeno, estos genes funcionales han sido utilizados como marcadores moleculares de los microorganismos debido a sus regiones blanco conservadas (Zumft, 1997; Braker, 1998; Scala & Kerkhof, 1998; Ulloa *et al.*, 2013).

Dada la relevancia de la participación de los microorganismos en los ciclos biogeoquímicos del océano, esta contribución abordó la estandarización de los protocolos de extracción de DNA, la elección de sitios hipervariables del 16S rRNA y de regiones de genes funcionales para la vía de desnitrificación, que puedan determinar amplicones útiles para analizar diversidad microbiana en la columna de agua mediante técnicas de biología molecular.

MATERIAL Y MÉTODOS

El sitio de muestreo está ubicado en Cuenca Alfonso (24°35'N y 110°36'W), dentro de la Bahía de La Paz (Fig. 2). Esta bahía está ubicada en la costa sureste de la Península de Baja California y se encuentra semiprotectada por la presencia de las islas Espíritu Santo y La Partida. Dentro de esta bahía se da el intercambio de aguas con el Golfo de California a través del canal San Lorenzo y la Boca Grande (Cruz-Orozco *et al.*, 1989; Jiménez *et al.*, 1997). En este trabajo se utilizó material recolectado en junio de 2013 a cuatro profundidades discretas de la columna de agua. En cada una de estas profundidades se tomó 1 L y se filtró en membranas Durapore de 0.22 µm que fueron almacenadas a -20°C; posteriormente se utilizó un cuarto de cada membrana para realizar las pruebas de estandarización para la extracción del DNA.

Para las pruebas de estandarización se eligieron muestras con diferentes porcentajes de irradiancia superficial (E₀); se seleccionaron las muestras de 100% y 33% para realizar tres diferentes metodologías de extracción basadas en Zhou *et al.* (1996) y Sambrook y Rusell

(2001). El primer protocolo se basó en incubaciones prolongadas con Proteinasa K (P2308 Sigma-Aldrich) y extracción a base de los detergentes dodecil sulfato sódico (SDS) y bromuro de cetiltrimetilamonio (CTAB). El segundo protocolo fue a base de CTAB e incubaciones con baños calientes. Finalmente se especifica la metodología elegida para el tercer protocolo de extracción de DNA total. A cada muestra se le añadió buffer TE 1X y posteriormente se realizó una lisis mecánica con incubaciones en frío; para ello se hicieron ocho ciclos consecutivos con agitación con perlas de vidrio (425-600 µm) por 1 minuto y 1 minuto en hielo. Posteriormente se hicieron tres incubaciones consecutivas; en la primera se adicionaron 0.03 mL de SDS al 10% y para eliminar el RNA de la muestra se incubó con RNasa A (concentración final 0.1 mg/mL) por 1h a 37°C. En la segunda se añadió Proteinasa K para una concentración final 0.1 mg/ml y se incubó por 2 h a 37°C. Finalmente se añadieron 0.08 ml de NaCl 5M y 0.064 ml de CTAB al 10% y se incubó por 2 h a 65°C mezclando cada 15 minutos en vortex a máxima velocidad. El DNA obtenido se precipitó con un volumen de fenol:cloroformo:alcohol isoamílico (25:24:1). Después se centrifugó a 14,000 rpm por 10 min en frío, se recuperó el sobrenadante y se añadió un volumen de cloroformo: alcohol isoamílico (24:1), se homogeneizó y se centrifugó a 14,000 rpm por 5 min en frío, para finalmente recuperar el sobrenadante. Con la finalidad de reducir la presencia de inhibidores de la polimerasa a las muestras, se les añadió un volumen de isopropanol y se incubaron a -20°C toda la noche; al día siguiente se centrifugaron en frío a 14,000 rpm por 20 minutos. Finalmente se hizo un lavado con alcohol al 70% para después resuspender el DNA en agua grado molecular. Las extracciones de DNA fueron corridas en una electroforesis en geles de agarosa al 1% y fueron reveladas con gel red (M00124 Biotium).

Para revisar la calidad de los productos de

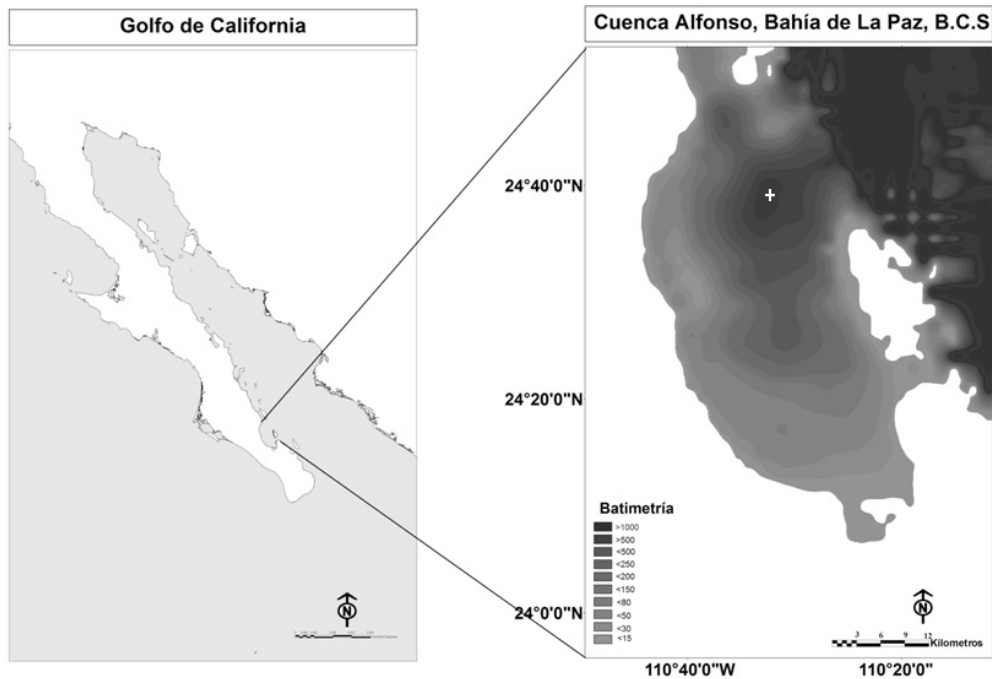


Figura 2. Ubicación del área de muestreo en Cuenca Alfonso dentro de la Bahía de La Paz. En el mapa de la batimetría de la bahía se indica con un signo en blanco (+) la localización del sitio donde se hicieron las recolectas del material biológico.
Figure 2. Location of sample area in Cuenca Alfonso inside Bahía de La Paz. White cross (+) in bathymetry map shows the site where the biological material was collected.

la extracción con estos protocolos de extracción de DNA y corroborar la ausencia de inhibidores de la reacción de PCR, se realizaron pruebas de amplificación para los diversos marcadores moleculares (Tabla 1) utilizando un termociclador marca ESCO (®Swift Max Pro). En el caso del 16S rRNA que incluye de la región V1 a la V8 se utilizó el siguiente programa: Desnaturalización inicial a 95°C por 4 min, 30 ciclos de desnaturalización 95 °C por 1 min, alineación 55°C por 1 min, extensión 74°C por 1 min y una extensión final de 74°C por 5 minutos. Para el amplicón del 16S rRNA que incluye de la región V3 a la V5, se modificó a 40 segundos la temperatura de extensión.

Todas las reacciones de PCR para los amplicones del 16S rDNA y *nosZ* se realizaron a un volumen final de 50 µl con los siguientes reactivos a una concentración final de amortiguador de 1 X, 2 mM MgCl₂, 2 mM de dNTP's, 1.6 µM de cada oligonucleótido, 0.02 U de polimerasa y 10 ng de DNA. Para los amplicones de los genes que codifican para las reductasas *nirS* y *nirK* se añadió una concentración final de 0.4 mg de Albúmina Sérica Bovina. Los programas para la amplificación de los marcadores moleculares de las reductasas difirieron en la temperatura de alineación; para *nirK* a 56.8°C, para *nirS* a 58.6 °C y para *nosZ* a 60°C. Las muestras fueron corridas en un gel de agarosa al 1% y reveladas con gel red.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Se obtuvo DNA en el material recolectado en junio de 2013 con los tres protocolos de extracción, sin embargo, existieron diferencias en la concentración de material genético obtenido. En la muestras del 33% y 100% de Eo, se obtuvieron para los protocolos 1, 2 y 3, las concentraciones de 9.5 y 9.9 ng/µl, 17.1 y 8.6 ng/µl y 19.2 y 27.3 ng/µl, respectivamente, indicando una mayor concentración de la extracción en el protocolo 3. Las amplificaciones mediante PCR (Fig. 3) del marcador molecular 16S rDNA de 1385pb no mostraron diferencias en ningún caso, sin embargo, se observaron para el amplicón de 566 pb. En el gel se denotaron bandas más tenues en la extracción del protocolo 1, dado que se ajustaron las concentraciones de DNA. La diferencia podría deberse a la persistencia de algún inhibidor de la extracción durante la reacción de PCR. Las amplificaciones mediante PCR con los oligonucleótidos específicos de *nirK* son apenas perceptibles, sin embargo, en el protocolo 3 se observan más intensas. Este resultado apunta a diversas hipótesis, dentro de las que destacan: 1) que la diferencia en las concentraciones de DNA afecta a este gen funcional ya que existe un bajo número de copias en el medio; 2) que se acarreó durante la extracción algún inhibidor de la reacción de PCR. En el caso del amplicón del gen *nirS* se

Tabla 1. Posición y secuencia de los oligonucleótidos utilizados.

Table 1. Position and sequence of the oligonucleotides used in this paper.

Blanco	Oligo	Posición	Secuencia (5'-3') d	Fuente
16S rDNA	8F	8	AGAGTTTGATCMTGGCTCAC	Martin & Collen, 1998 Ma <i>et al.</i> , 2008
	1385R	1385	TACGGYTACCTTGTTACGACTT	
16S rDNA	341F	341	CCTACGGGAGGCAGCAG	Muyzer <i>et al.</i> , 1995; Casamayor <i>et al.</i> , 2000 y Xiao 2008
	907R	907	CCGTCAATTCMTTGTGATTT	
	<i>nirK</i> ^a	FlaCu	568	
R3Cu		1021	GCCTCGATCAGRTTGTGGTT	Hallin & Lindgren, 1999
<i>nirS</i> ^b	cd3aF	916	GTS AACG TSAAGGARACSGG	Michotey <i>et al.</i> , 1993 Throback <i>et al.</i> , 2004
	R3cd	1322	GASTTCGGRTGSGTCTTGA	
<i>nosZ</i> ^c	nosZ-F	1169	CGYTGTTTCMTGACAGCCAG	Kloos <i>et al.</i> , 2001
	nosZ-R	1849	CATGTGCAGNGCRTGGCAGAA	

a Posición en la secuencia de *Alcaligenes faecalis* S-6 (Accession No. D13155)

b Posición en la secuencia de *Pseudomonas stutzeri* ZoBell (Accession No. X56813)

c Posición en la secuencia de *Pseudomonas aeruginosa* DSM 50071 (número de acceso X65277)

d Secuencias de acuerdo con la nomenclatura de la IUPAC, V=A+C+G, N=A+C+G+T, D=A+T+G, B=T+C+G, H=A+T+C, W=A+T, S=C+G, K=T+G, M=A+C, Y=C+T, R=A+G

observaron múltiples bandeos para los protocolos 1 y 2; esta interferencia e inespecificidad puede ser el resultado de la precipitación de algunas sales que compiten con el cofactor de la polimerasa utilizada, en este caso el cloruro de magnesio. Esta problemática se abordó y resolvió en el protocolo 3 ajustando la parte final de los pasos de precipitación y lavado del DNA.

Finalmente la amplificación del fragmento de *nosZ* solo fue visible en el protocolo 3 (Fig. 3). Los resultados de este último protocolo indican dos posibles razones para la baja definición de las bandas: 1) una baja proporción de copias en el medio para este marcador molecular, las cuales no pudieron ser obtenidas por los otros protocolos; 2) que los residuos de la extracción inhibieron la reacción de PCR. Las pruebas realizadas al eliminar algunas sales residuales del procedimiento o del medio resolvieron la incertidumbre, definiendo que el protocolo 3 fue el más eficiente para obtener DNA de calidad. Se debe considerar que la abundancia de organismos desnitrificantes no será la misma en todos los estratos marinos, e inclusive pudieran estar ausentes; por tal motivo es fundamental estandarizar la técnica de extracción, la cual es el primer paso de análisis a nivel molecular.

No obstante que este protocolo funcionó para nuestros propósitos específicos, para otros casos se deben determinar claramente los objetivos de trabajo, ya que esto es la guía para el cuidado que se requiere en la etapa inicial de la extracción de DNA de material particulado suspendido en cuerpos de agua. Como se observó en el presente trabajo la amplificación de marcadores moleculares depende en gran medida de la calidad de extracción de

los ácidos nucleicos. Los resultados obtenidos indican que la amplificación del 16S rRNA en muestras ambientales con protocolos no optimizados, no necesariamente refleja la diversidad total del sitio, ya que el DNA amplificado de los organismos predominantes del medio limitará la detección de los posibles taxones funcionales que son menos abundantes, independientemente de que se ajusten condiciones o número de ciclos al mínimo para no sobresaturar filotipos.

La técnica estandarizada de extracción de DNA propuesta es un método simple, reproducible y económico, ya que no requiere de kits o estuches de casa comerciales, y está optimizado para muestras ambientales marinas. Las soluciones requeridas pueden ser elaboradas en el laboratorio y modificadas según los requerimientos particulares del sitio y/o estudio de interés.

AGRADECIMIENTOS

Al Instituto Politécnico Nacional por el apoyo recibido a través del proyecto SIP (SIP 20101059) "Desnitrificación en la columna de agua de una cuenca hipóxica de la región sur del Golfo de California", por los estímulos recibidos por AML de la Comisión de Operación y Fomento de Actividades Académicas (COFAA-IPN) y Estímulos al Desempeño en Investigación (EDI). Al CONACYT por la beca posdoctoral recibida por ABJ. Agradecemos a Gerardo Verdugo Díaz, a Cristian Hakspiel Segura y a Juan David Acevedo Acosta y Francisco J. Gómez Ochoa por la recolecta del material, así como también a Bárbara Gonzáles Acosta, Jefe de Laboratorio de Microbiología y Biología Molecular por las facilidades otorgadas para el uso de las instalaciones.

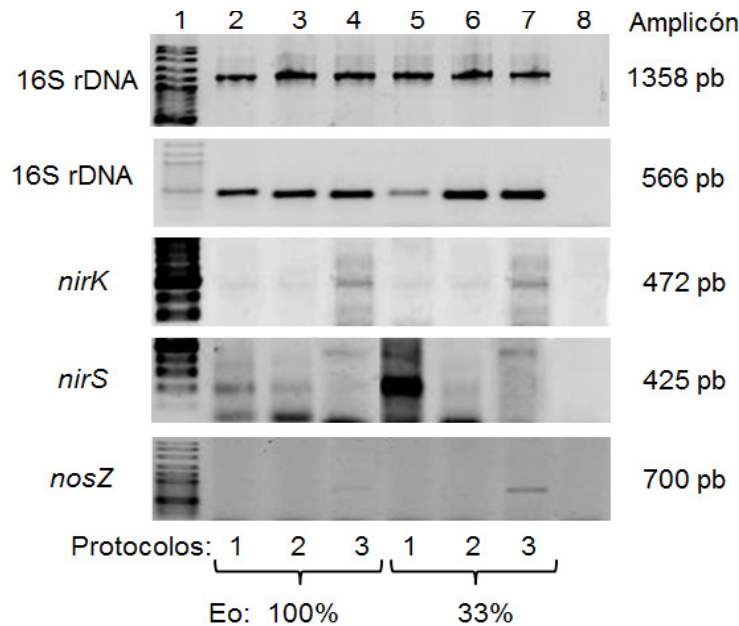


Figura 3. Geles de agarosa al 1%. En las columnas se indica el marcador al que pertenece cada amplicón. En las filas los números corresponden, 1) marcador de peso molecular de 100 pares de bases (pb). Muestréos de junio a 100% Eo: 2) Protocolo 1, 3) Protocolo 2, 4) Protocolo 3, Muestréos a 33% de Eo: 5) Protocolo 1, 6) Protocolo 2, 7) Protocolo 3 y 8) Control negativo

Figure 3. Agarose gels at 1%. Columns shows the marker for each amplicon. The number for each rows correspond to 1) 100 base pairs (bp) molecular weight marker. June sampling at 100% Eo: 2) Protocol 1, 3) Protocol 2, 4) Protocol 3, sampling at 33% Eo: 5) Protocol 1, 6) Protocol 2, 7) Protocol 3 and 8) Negative control.

REFERENCIAS

- Abed, R. M. M., S. Golubic, F. García-Pichel & G. Camoin. 2003. Characterization of microbialite forming cyanobacteria in tropical lagoon; Tikehau Atoll, French Polynesia. *J. Phycol.*, 39: 862-873.
- Baisden, W. T. & R. Amundson. 2003. An analytical approach to ecosystem biogeochemistry modeling. *Ecol. Appl.*, 13: 649-663.
- Baker, G.C., J. J. Smith & D.A. Cowan. 2003. Review and re-analysis of domain-specific 16S primers. *J. Microbiol. Methods.*, 55: 541-555.
- Braker, G., A. Fesefeldt & K. P. Witzel. 1998. Development of PCR primer systems for amplification of nitrite reductase genes (*nirK* and *nirS*) to detect denitrifying bacteria in environmental samples. *Appl. Environ. Microbiol.*, 64: 3769-3775.
- Braker, G., J. Zhou, L. Wu, A. H. Devol & J. M. Tiedje. 2000. Nitrite reductase genes (*nirK* and *nirS*) as functional markers to investigate diversity of denitrifying bacteria in Pacific Northwest marine sediment communities. *Appl. Environ. Microbiol.*, 66 (5): 2096-2104.
- Brosius, J., L. M. Palmer, J. P. Kennedy & F.H. Noller. 1978. Complete nucleotide sequence of a 16S ribosomal RNA gene from *Escherichia coli*. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 75(10): 4801-4805.
- Bruce, A., A. Johnson, J. Lewis, M. Raff, K. Roberts & P. Walter. 2008. *Molecular biology of the cell*. Garland Science, New York. 1392p.
- Canfiel, D. E., A. N. Glazer & P.G. Falkowski. 2010. The evolution and future of earth's nitrogen cycle. *Science*, 330: 192-196.
- Casamayor, E. O., H. Schäfer, L. Bañeras, C. Pedrós-Alió & G. Muyzer. 2000. Identification of and spatiotemporal differences between microbial assemblages from two neighboring sulfurous lakes: comparison by microscopy and denaturing gradient gel electrophoresis. *Appl. Environ. Microbiol.*, 66: 499-508.
- Chakravorty, S., D. Helb, M. Burday, N. Conell & D. Alland, 2007. A detail analysis of 16S ribosomal RNA gene segments for the diagnosis of pathogenic bacteria. *J. Microbiol. Methods.*, 69: 330-339.

- Cruz-Orozco, R., P. Rojo-García, L. Godínez-Orta & E. Nava-Sánchez. 1989. Topografía, hidrología y sedimentos de los márgenes de la laguna de La Paz, B.C.S. *Rev. Inv. Cient.*, 1 (3): 3-15.
- Dale, J. W. & M. von Schantz. 2002. *From genes to genomes. Concepts and applications of DNA technology*. University of Surrey, UK. 329p.
- Decho, A.W. & T. Kawaguchi. 1999. Confocal imaging of in situ natural microbial communities and their extracellular polymeric secretions (EPS) using nanoplast resin. *BioTechniques.*, 27: 1246-1251.
- DeLong, E. F. 2005. Microbial community genomics in the ocean. *Nat. Rev. Microbiol.*, 3: 459-469.
- Défarge, C. 1997. Apports du cryo-microscope électronique à balayage et du microscope électronique à balayage haute résolution à l'étude des matières organiques et des relations organo-minérales naturelles. Exemple des sédiments microbiens actuels. *C.R. Acad. Sci. Paris.*, 324: 553-561.
- Espinosa-Asuar, L. 2007. Guía práctica sobre la técnica de PCR. In: Eguiarte, L., V. Souza & X. Aguirre (Eds.), *Ecología molecular*. SEMRNAAT-INE-UNAM-CONABIO, México. 608p.
- Fenchel, T. & N. B. Ramsing. 1992. Identification of sulphate-reducing ectosymbiotic bacteria from anaerobic ciliates using 16S rRNA binding oligonucleotide probes. *Arch. Microbiol.*, 158: 394-397.
- Francis, C. A., J. M. Beman & M. M. Kuypers. 2007. New processes and players in the nitrogen cycle: the microbial ecology of anaerobic and archaeal ammonia oxidation. *ISME J.*, 1: 19-20
- Hallin, S. & P. E. Lindgren. 1999. PCR detection of genes encoding nitrite reductases in denitrifying bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.*, 65: 1652-1657.
- Jaspers E. & J. Overmann. 2004. Ecological Significance of Microdiversity: Identical 16S rRNA gene sequences can be found in bacteria with highly divergent genomes and ecophysiologicals. *Appl. Environ. Microbiol.*, 70: 4831-4839.
- Jiménez-Illescas, A. R., M. Obeso-Nieblas & D. A. Salas de León. 1997. Oceanografía física de la Bahía de La Paz, B.C.S. In: Urbán, R. J. & Ramírez, M. (Eds.), *La Bahía de La Paz, investigación y conservación*. UABC-CICIMAR-SCRIPPS, La Paz, B.C.S., México. 345p.
- Karl, D. M., A. Michaels, B. Bergman, D. Capone, E. Carpenter, R. Letelier, F. Lipschultz, H. Paerl, D. Sigman & L. Stal. 2002. Dinitrogen fixation in the world's oceans. *Biogeochem.*, 57/58: 47-98.
- Kloos, K., A. Mergel, C. Rosch, & H. Bothe. 2001. Denitrification within the genus *Azospirillum* and other associative bacteria. *Aust. J. Plant. Physiol.*, 28: 991-998.
- Lemely, P., M. Salemi, & A.M. Vandamme. 2009. *The phylogenetic handbook. A practical approach phylogenetic analysis and hypothesis testing*. Cambridge University Press, UK. 723p.
- Lu, J. J., C. L. Perng, S. Y. Lee, & C.C. Wan. 2000. Use of PCR with universal primers and restriction endonuclease digestions for detection and identification of common bacterial pathogens in cerebrospinal fluid. *J. Clin. Microbiol.*, 38: 2076-2080.
- Ma, R., X. Wu, R. Wang, C. Wang & J. Zhu. 2008. Identification and phylogenetic analysis of a bacterium isolated from the cloaca of Chinese alligator. *Afr. J. Biotechnol.*, 7(13): 2128-2133.
- Madigan, M. T., J. M. Martinko & J. Parker. 2004. *Brock. Biología de los microorganismos*, Pearson, Madrid. 1096 p.
- Martin, F. P. & M. C. Collen. 1998. Bias in template to product ratio in multitemplate PCR. *Appl. Environ. Microbiol.*, 64: 3724-3730.
- McCabe, K. M., Y. H. Zhang, B. L. Huang, E. A. Wagar & E. R. McCabe. 1999. Bacterial species identification after DNA amplification with a universal primer pair. *Mol. Genet. Metab.*, 66: 205-211.
- Michotey, V., V. Mejean & P. Bonin. 2000. Comparison of methods for quantification of cytochrome cd1-denitrifying bacteria in marine samples. *Appl. Environ. Microbiol.*, 66: 1564-1571.
- Muyzer, G., E. C. De Waal & A. G. Uitterlinden. 1993. Profiling of complex microbial populations by denaturing gradient gel electrophoresis analysis of polymerase chain reaction-amplified genes coding for 16S rRNA. *Appl. Environ. Microbiol.*, 59: 695-700.

- Muyzer, G., A. Teske & C. O. Wirsen. 1995. Phylogenetic relationships of *Thiomicrospira* species and their identification in deep-sea hydrothermal vent samples by denaturing gradient gel electrophoresis of 16S rDNA fragments. *Arch. Microbiol.*, 164: 165-172.
- Noordhoek, G. T., A. H. Kolk, G. Bjune, D. Catty, J. W. Dale, P. L. Fine, P. Godfrey-Faussett, S. Cho, T. Shinnick, S. B. Svenson, S. Wilson & J. D. van Embden. 1994. Sensitivity and specificity of PCR for detection of *Mycobacterium tuberculosis*: a blind comparison study among seven laboratories. *J. Clin. Microbiol.*, 32 (2): 277-284.
- Nübel, U., F. Garcia-Pichel & G. Muyzer. 1997. PCR primers to amplify 16S rRNA genes from cyanobacteria. *Appl. Environ. Microbiol.*, 63(8): 3327-3332.
- Philippot, L. & S. Hallin. 2005. Finding the missing link between diversity and activity using denitrifying bacteria as a model functional community. *Curr. Opin. Microbiol.*, 8: 234-239.
- Rocap, G., D. L. Distel, J. B. Waterbury & S. W. Chisholm. 2002. Resolution of *Prochlorococcus* and *Synechococcus* ecotypes by using 16S-23S ribosomal DNA interNAL transcribed spacer sequences. *Appl. Environ. Microbiol.*, 68(3):1180-1191.
- Sambrook, J. & W. D. Russell. 2001. *Molecular cloning: a laboratory manual*. CSHL Press, Nueva York. 2344p.
- Scala, D. J. & L. J. Kerkhof. 1998. Nitrous oxide reductase (*nosZ*) gene-specific PCR primers for detection of denitrifiers and three *nosZ* genes from marine sediments. *FEMS Microbiol. Lett.*, 162: 61-68.
- Schmalenberger, A., F. Schwieger & C. C. Tebbe. 2001. Effect of primers hybridizing to different evolutionarily conserved regions of the small subunit rRNA gene in PCR-based microbial community analyses and genetic profiling. *Appl. Environ. Microbiol.*, 67: 3557-3563.
- Serrato-Díaz, A., L. Flores-Rentería, J. Aportela-Cortez & E. Sierra-Palacios. 2014. In: Cornejo-Romero, A., A. Serrato-Díaz, B. Rendón-Aguilar & M. G. Rocha-Munive (Eds.), *Herramientas moleculares aplicadas en ecología: Aspectos teóricos y prácticos*. INECC, México. 274p.
- Throbäck I. N., K. Enwall, A. Jarvis & S. Hallin. 2004. Reassessing PCR primers targeting *nirS*, *nirK* and *nosZ* genes for community surveys of denitrifying bacteria with DGGE. *Microbiol. Ecol.*, 49: 401-417.
- Ulloa, O., J. J. Wright, L. Belmar & S. J. Hallam. 2013. Pelagic Oxygen Minimum Zone Microbial Communities. In: Rosenberg, E., E. F. DeLong, S. Lory, E. Stackebrandt & F. Thompson (Eds.), *The Prokaryotes*. Springer-Verlag, Berlin Heidelberg, 528p.
- Van de Peer, Y., S. Chapelle, & R. De Wachter. 1996. A quantitative map of nucleotide substitution rates in bacterial rRNA. *Nucleic Acids Res.*, 24: 3381-3391.
- Vetrovsky, T. & P. Baldrian. 2013. The variability of the 16S rRNA gene in bacterial genomes and its consequences for bacterial community analyses. *PLoS ONE.*, 8(2): e57923.
- Zehr, J.P. & R. M. Kudela. 2011. Nitrogen cycle of the open ocean: from genes to ecosystems. *Annu. Rev. Mar. Sci.*, 3: 197-225.
- Zhou, J. Z., M. A. Bruns & J. M. Tiedje. 1996. DNA recovery from soils of diverse composition. *Appl. Environ. Microbiol.*, 62: 316-322.
- Zumft, W. 1997. Cell biology and molecular basis of denitrification. *Microbiol. Biol. Rev.*, 61: 533-616.