



**Universitat de les
Illes Balears**

Facultat de Ciències

Memòria del Treball de Fi de Grau

Control de la disponibilidad de hierro a los fijadores de nitrógeno asociados a Posidonea oceanica

Cristina Sosa Mancera

Grau de Biologia

Any acadèmic 2016-17

Treball tutelat per Nona Sheila Agawin Romualdo
Departament de Biologia

S'autoritza la Universitat a incloure aquest treball en el Repositori Institucional per a la seva consulta en accés obert i difusió en línia, amb finalitats exclusivament acadèmiques i d'investigació	Autor		Tutor	
	Sí	No	Sí	No
	X		X	

Paraules clau del treball: Posidonia oceanica, fijación de nitrógeno, hierro, fósforo, Alkaline Phosphatase Activity, APA, Acetylene Reduction Assay, ARA.

Índice

Resumen	4
Abstract	4
Introducción	5
Objetivos	8
Materiales y métodos	9
<i>Cultivo Celular</i>	9
<i>Alkaline Phosphatase Activity (APA)</i>	10
<i>Técnica de reducción de acetileno</i>	10
<i>Microscopía y abundancia bacteriana</i>	11
<i>Análisis estadístico</i>	11
Resultados	12
<i>Microscopía y tasa de crecimiento de V. diazotrophicus.</i>	12
<i>Tasa de fijación de nitrógeno</i>	13
<i>Actividad alcalina fosfatasa</i>	15
Discusión	17
Bibliografía	19

Resumen

Recientemente, se ha encontrado una alta diversidad de microbios fijadores de nitrógeno atmosférico (N₂) asociado a Posidonia oceánica que muestran elevadas tasas de fijación de N₂ que puede contribuir significativamente a la necesidad de este elemento de la planta (Agawin *et al.* 2016), así como indicaciones de que el hierro y el fósforo son elementos limitadores en el proceso de fijación de nitrógeno. Sin embargo, esto no ha sido estudiado en los epifitos asociados a *P. oceanica*. El objetivo del estudio es investigar los efectos de diferentes niveles de hierro y fosforo sobre el crecimiento y las tasas de fijación de nitrógeno de *Vibrio diazotrophicus*, una bacteria fijadora de nitrógeno heterotrófica asociada a *P. oceánica*.

Para ello se realizaron varias pruebas, entre ellas la técnica de reducción de acetileno (ARA; siglas del inglés *Acetylene Reduction Assay*) que fue utilizada para determinar la tasa de fijación de nitrógeno de *V. diazotrophicus*. A su vez, también se determinó la actividad de la enzima de la fosfatasa alcalina (APA o *Alkalyne Phosphatase Activity* en inglés). Se obtuvo una correlación positiva en la interacción entre la efectividad del tratamiento y el tiempo de reacción de las bacterias en la fijación de nitrógeno, así como en su crecimiento. Además, se observó que la actividad de la fosfatasa alcalina difería entre tratamientos posiblemente debido a la concentración de hierro.

Abstract

Recently, a high diversity of atmospheric nitrogen fixers microbes associated to *P. oceanica* has been found, that shows high rates of N₂ fixation may contribute significantly to the requirement of this element to the plant (Agawin *et al.* 2016), as well as indications that iron and phosphorus are limiting elements in the nitrogen fixation process. However, this has not been studied in the epiphytes associated with *P. oceanica*. The objective of this study is probe the effects of different levels of iron and phosphorus on the growth and nitrogen fixation rates of *Vibrio diazotrophicus*, a heterotrophic nitrogen fixing bacteria associated with *P. oceanica*.

Several tests were carried out, including the Acetylene Reduction Assay (ARA), which was used to determine the nitrogen fixation rate of *V. diazotrophicus*; and alkaline phosphatase activity (APA). A positive correlation was obtained in the interaction between the effectiveness of the treatment and the time of reaction of the bacteria in the fixation of nitrogen, as well as in

their growth. In addition, it was observed that alkaline phosphatase activity differed between treatments possibly due to iron concentration.

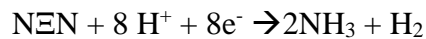
Introducción

Las praderas de *Posidonea oceanica* forman uno de los ecosistemas más importantes del mundo debido a su producción primaria en el Mediterráneo (Hemminga y Duarte 2000). Es la fanerógama marina más extendida (Den Hartog, 1970), formando amplias y densas praderas que llegan a ocupar hasta 50.000 km² del área marina (Béthoux y Copin-Montégut 1986), desempeñando un papel estructural y funcional clave en los ecosistemas costeros (Montefalcone 2009).

A pesar de su importancia, las praderas de *P. oceanica* se han visto expuestas a una eutrofización de las aguas en las que viven, situación a la que son especialmente sensibles y que ha provocado la disminución de su área. Los principales motivos son la introducción de especies invasoras, el calentamiento global, enfermedades, entradas de nutrientes, *blooms* de algas, pesca de arrastre y la acuicultura (Orth *et al.*, 2006, Díaz-Almela & Duarte, 2008). Actualmente, las praderas de *P. oceanica* están protegidas como especie (Convención de Berna, Anexo 1) y a nivel nacional (RD 7/12/1995, BOE nº310).

Debido a la longevidad y a la gran superficie que ocupa la *P. oceanica*, esta se encuentra colonizada por un gran número de especies epífitas, entre las que destacan los fijadores de nitrógeno de origen microbiano. Estos epífitos reflejan mucho más rápido que la *P. oceanica* los cambios en las condiciones de disponibilidad de nutrientes por lo que los convierte en indicadores altamente sensibles a las perturbaciones en su medio natural (Ruiz *et al.*, 2001, Richardson, 2006) debido a que se encuentran más limitados nutricionalmente. Las fanerógamas marinas presentan estrategias de conservación de nutrientes muy pobres, por lo que la fijación de nitrógeno llevada a cabo por las bacterias epífitas es de gran importancia, pudiendo contribuir hasta al 50% de los requerimientos de nitrógeno de las fanerógamas marinas (Herbert, 1999). En la actualidad se han descrito varias especies bacterianas asociadas a las hojas de las praderas marinas fijadoras de nitrógeno tanto como *Anabaena* spp., *Nodularia* spp., *Oscillatoria* spp., *Gloeocapsa* spp., entre otras (Hamisi *et al.*, 2004; Uku *et al.*, 2007). Recientemente, un análisis molecular de los genes *nifH* (que codifican una subunidad del operón que codifica para la nitrógeno reductasa) de muestras epífitas en la filosfera de *P. oceanica* reveló varias secuencias bacterianas *nifH* nuevas (Agawin *et al.*, 2016).

La fijación de nitrógeno biológica es un proceso en el que el nitrógeno ambiental (N₂) se convierte en amonio gracias a la enzima nitrogenasa en microorganismos y diazotrófos. La nitrogenasa es un complejo de dos enzimas, la dinitrogenasa y la dinitrogenasa reductasa, las cuales ambas contienen hierro. El triple enlace entre las moléculas de nitrógeno que es extremadamente estable se rompe en la siguiente reacción:



La nitrogenasa es poco específica por lo que también reduce compuestos análogos con triples enlaces (Capone, 1988). Esta no-especificidad también provoca que se rompa el triple enlace en el acetileno para producir etileno. Esta reacción paralela es utilizada como medida indirecta para medir la tasa de fijación de nitrógeno la actividad de la nitrogenasa en multitud de ecosistemas mediante la técnica de reducción de acetileno (ARA; siglas en inglés de *Acetylene Reduction Assay*).

Actualmente se sugiere que el hierro y el fósforo son los dos nutrientes limitantes más importantes para la fijación biológica marina de nitrógeno, sin embargo, hasta la fecha no se ha realizado ningún estudio sobre cómo estos factores limitan o controlan la fijación de nitrógeno en el Mar Mediterráneo y más aún en los fijadores de nitrógeno asociados a *P. oceanica*.

El fósforo como elemento limitante para la fijación de nitrógeno puede ser relevante en las fanerógamas marinas ya que ya hay evidencias en el Mar Mediterráneo Oriental y Occidental (Alcoverro *et al.* 1995, Pinhassi *et al.* 2006). Uno de los métodos para evaluar indirectamente la limitación de fósforo es el uso de mediciones de actividad de la fosfatasa alcalina (APA). Estas enzimas hidrolizan monoésteres de fosfato orgánico y liberan fosfato inorgánico, aumentando consecuentemente la disponibilidad de fosfato inorgánico para el crecimiento de plantas acuáticas o microorganismos. Por el contrario, la APA en *P. oceanica* disminuye con una mayor disponibilidad de fósforo inorgánico, tanto experimental como a lo largo de gradientes naturales (Invers *et al.* 1995, Martínez-Crego *et al.* 2006). En las mediciones de APA se ve reflejada la actividad combinada de la fanerógama y la microbiota asociada a las partes de la planta. De hecho, las mediciones de la actividad de la fosfatasa alcalina a granel se han utilizado también para estimar la deficiencia de fosfato en las comunidades microbianas (Van Wambeke *et al.* 2002). Actualmente, para diferenciar la actividad de las fosfatasas alcalinas de las bacterias de las de la propia planta, se están desarrollando nuevas técnicas que usan marcadores moleculares (es decir, los genes que codifican para las fosfatasas) como una herramienta potencial.

El hierro es un cofactor requerido en la mayoría de las enzimas redox fotosintéticas y respiratorias, pero su demanda es todavía más evidente en el proceso de fijación de nitrógeno. En el proceso de fijación de nitrógeno, el hierro se requiere en la estructura de ambas proteínas del complejo de enzima nitrogenasa que está compuesto por: dinitrogenasa reductasa y dinitrogenasa. El hierro también es necesario para la respiración y asimilación de carbono como combustible para la fijación de nitrógeno. Se ha observado que la concentración de hierro disuelto (dFe) es baja en entornos donde se produce la fijación de nitrógeno (Blain *et al.* 2008), por lo que se ha estimado que el coste mínimo de hierro para la actividad de la enzima nitrogenasa en cianobacterias es 3 veces más que el requerimiento de hierro no relacionado directamente con la fijación de nitrógeno, mientras que para la fijación heterotrófica de nitrógeno es de hasta 20 veces más (Kustka *et al.* 2002).

El mar Mediterráneo se suministra abundantemente con hierro gracias a la tierra circundante y el polvo saharauis transportado por el viento. A pesar de esto, la falta estacional de hierro se ha observado en primavera cuando la concentración de éste es baja y el fitoplancton está floreciendo en aguas oceánicas. Se estima que las áreas costeras dominadas por *P. oceanica* reciben sedimentos regularmente con altas concentraciones de hierro que estimularía su crecimiento (Marbà 2008). En estas áreas se han observado concentraciones de hierro en el agua de mar del rango de 2,4 - 3,6 nM (Tovar-Sanchez *et al.*, 2014), los cuales son bajos por estar en áreas costeras en mar abierto, ya que normalmente las concentraciones son del orden de 1 nM.

Los fijadores de nitrógeno asociados de *P. oceanica* también pueden ser limitados por el hierro, pero esto nunca ha sido investigado antes. Además, la propia planta y los fijadores de nitrógeno asociados pueden competir por el hierro ya que estos fijadores tienen un alto requerimiento de hierro para sus actividades diazotróficas.

El hierro y el fósforo pueden no ser los únicos nutrientes limitantes para la fijación de nitrógeno asociados a *P. oceanica* en el Mar Mediterráneo y puede haber una relación más compleja entre estos dos nutrientes.

Objetivos

El objetivo de este estudio es comprobar cómo interactúan y afectan diferentes concentraciones de hierro y fósforo en la fijación de nitrógeno de una de las bacterias epífitas de *Posidonea oceánica*, así como su reproducción y crecimiento. La bacteria seleccionada fue *Vibrio diazotrophicus*, elegida entre las bacterias secuenciadas en el análisis molecular de los genes *nifH* de muestras epífitas en la filosfera de *P. oceanica* (Agawin *et al.*, 2016). Para ello se procedió a analizar las diferencias la tasa de crecimiento por día de la bacteria, la tasa de fijación de nitrógeno y la actividad de la enzima alcalina fosfatasa en 9 tratamientos diferentes donde se combinaran 3 concentraciones diferentes de hierro y 3 concentraciones diferentes de fósforo.

Materiales y métodos

Cultivo Celular

La cepa de *V. diazotrophicus* se cultivó previamente en placas con medio Marine-Broth con agar. Una vez crecida se recolectaron aproximadamente 20 colonias y se resuspendieron en 5 ml de agua de mar filtrada (FSW o en inglés *Filtered Sea Water*) en un tubo Falcon.

Para este experimento, se realizaron 9 tratamientos diferentes formados cada uno por 200 ml de FSW (autoclavada 2 veces) con 360 mg de glucosa y se les inoculó 250 μ l de la cepa contenida en el Falcon. En los tratamientos se combinaban diferentes concentraciones de hierro y fósforo (Figura 1). Las concentraciones para el hierro fueron de 6 nM en el caso de pertenecer al tratamiento con hierro bajo (Low Fe) y 20 nM en hierro alto (High Fe), mientras que, para el fósforo, 0,3 μ M si se trataba de fósforo bajo (Low P) y 1 μ M en fósforo alto (High P); en el caso de no querer alterar la concentración inicial de estos elementos en el medio, no se añadió nada (se les marcó como No Fe y No P). Los cultivos se dejaron en agitación continua a 100 rpm en un orbital y a temperatura ambiente (\sim 28°C). Durante la experimentación se revisaron los cultivos diariamente por densidad óptica a 600 y 750 nm (Varian Cary 50 UV-Spectrophotometer) y siembras en placas con medio Marine-Broth con agar, para evitar o detectar posibles contaminaciones o complicaciones.

NFeNP	NFeLP	NFeHP
LFenP	LFelP	LFehP
HFeNP	HFeLP	HFeHP

Figura 1. Tratamientos a realizar dependiendo de las concentraciones de hierro y fosforo a los que estarán sometidos. Concentraciones para hierro: 6 nM para el tratamiento con hierro bajo (LFe) y 20 nM en hierro alto (HFe); concentraciones para fósforo: 0,3 μ M para fósforo bajo (LP) y 1 μ M para fósforo alto (HP); si no se añadió nada se marcó como No Fe (NFe) y No P (NP). De cada uno de los tratamientos se realizaron dos réplicas.

Alkaline Phosphatase Activity (APA)

La fosfatasa alcalina (AP) es una enzima altamente estudiada debido a que es la más importante para la nutrición ya que tiene el potencial de hidrolizar un amplio espectro de compuestos de fósforo orgánico disuelto (DOP o *Dissolved Organic Phosphore*). La AP es producida por una mayoría de microorganismos marinos (Cembella *et al.*, 1984, Hoppe 2003) y dado que la actividad AP (APA) se mejora con la inanición de fósforo inorgánico disuelto (DIP o *Dissolved Inorganic Phosphore*), su detección en el campo se utiliza a menudo como un indicador de limitación o estrés de DIP (Perry 1972, Van Wambeke *et al.* 2002, Dyhrman y Ruttenberg 2005). Este experimento se realizó conforme la metodología del trabajo de Duchamel *et al.* (2011).

La APA total se midió usando como sustrato de la fosfatasa el 4-metilumbeliferilfosfato fluorogénico (MUF-P, Sigma-Aldrich). Para determinar las tasas de hidrólisis del sustrato en FSW y mQ, se trazó una recta patrón con una serie de seis concentraciones diferentes de MUF, que variaban de 0 a 1 nM junto a 1 ml de buffer de borato. Por otro lado, para las mediciones de los tratamientos se incorporaron 3 ml de muestra junto a 500 µl de MUF-P (100 µM) y 1 ml de buffer de borato; y junto a la recta patrón medida anteriormente se determinó la hidrólisis de este componente. Todas las muestras se mantuvieron en la oscuridad a temperatura ambiente hasta su medición. La hidrólisis de MUF-P a 4-metilumbeliferona (MUF) se midió en un espectrofotómetro de fluorescencia (Varian Cary Eclipse Fluorescence Spectrophotometer) a una excitación y emisión: 359 y 449 nm, respectivamente. Se realizaron 5 mediciones en 6 horas para verificar la linealidad del ensayo.

Técnica de reducción de acetileno

El método *Acetylene Reduction Assay* (ARA) se basa en que la nitrogenasa, la enzima que reduce N₂, es una enzima no específica capaz de reducir otros compuestos que contienen un triple enlace, como el acetileno (C₂H₂) a etileno (C₂H₄). Esta reducción es un método ampliamente utilizado para medir las tasas de fijación de N₂ debido a la facilidad con que estos compuestos se miden mediante un cromatógrafo de gases (GC) utilizando un detector de ionización de llama (FID).

Para este trabajo se recogieron 50 ml de cada cultivo que filtraron con filtros GF/F de microfibras de vidrio de 25 mm (tamaño de poro 0,7 µm). Cada uno de los filtros se transfirieron a viales de crimpado de 10 ml humidificados con 1 ml del propio cultivo y se cerraron con sellos de tapón de caucho y tapas de aluminio. Después de sellar, se inyectaron 2 ml de acetileno usando

una jeringa Hamilton hermética. A continuación, los viales se incubaron durante 3 horas. Tras el periodo de incubación, 10 ml de cada muestra fueron transferidos a tubos Hungate al vacío, fueron sellados con pegamento adhesivo termofusible y se conservaron en la oscuridad hasta su medición.

Para la medición de etileno y acetileno, se tomaron 2,5 ml de gas de las muestras usando una jeringa Hamilton hermética y se inyectan manualmente en el cromatógrafo de gases (Agilent Technologies, modelo HP-5890) equipado con un detector de ionización de llama (FID). La columna utilizada era de 25 m de longitud (Varian) y se utilizó el helio como gas portador a un flujo de 4 ml min⁻¹ a una presión de 5 psi. Las temperaturas del horno, de la inyección y del detector se fijaron en 52°C.

Microscopía y abundancia bacteriana

De cada uno de los tratamientos y sus duplicados se obtuvieron 50 ml a los que se les añadió 30 µl de glutaraldehído (concentración 1% final) para su fijación. Posteriormente, las muestras se filtraron a través de filtros de policarbonato negro de 0,2 µm.

Para bacterias heterotróficas, carentes de pigmentos naturales, la tinción con un fluorocromo para poder visualizarlas en un microscopio de epifluorescencia es esencial. DAPI (4', 6-diamidino-2-fenilidol) es un fluorocromo ampliamente utilizado ya que es específico para el ADN. De cada uno de los filtros se cortaron unos fragmentos y se tiñeron con 5µl de DAPI durante 1 minuto.

Los filtros se montaron con 15µl de citifluor y se conservaron en condiciones de poca luz hasta el examen bajo el microscopio. La abundancia de estos microorganismos se determinó por microscopía de epifluorescencia a 1000× (Leica DM 2500M). El reactivo DAPI se excita con luz UV en que la absorción máxima es de 358 nm y su emisión máxima es de 461 nm, por lo que se utilizó un filtro el cual se adaptaba a estas condiciones.

Análisis estadístico

Todos los datos presentados en este trabajo están sujetos a análisis con tests paramétricos (ANOVA de dos vías o ANOVA de una vía). Si hubo diferencias significativas ($p < 0.05$), los tratamientos fueron separados por pares y analizados usando el test de Tukey ($p < 0.05$). El programa utilizado para el análisis estadístico y representación gráfica fue Excel y XLSTAT.

Resultados

Microscopía y tasa de crecimiento de V. diazotrophicus.

La abundancia de *V. diazotrophicus* en los tratamientos varió con el tiempo, pero no de manera significativa ($p=0,3$). La abundancia era similar en el inicio del experimento en todos los tratamientos, y aumentó más de 10 veces al llegar al sexto día del experimento (Gráfico 1). En este momento, todas las muestras estaban cerca del fin de su crecimiento exponencial.

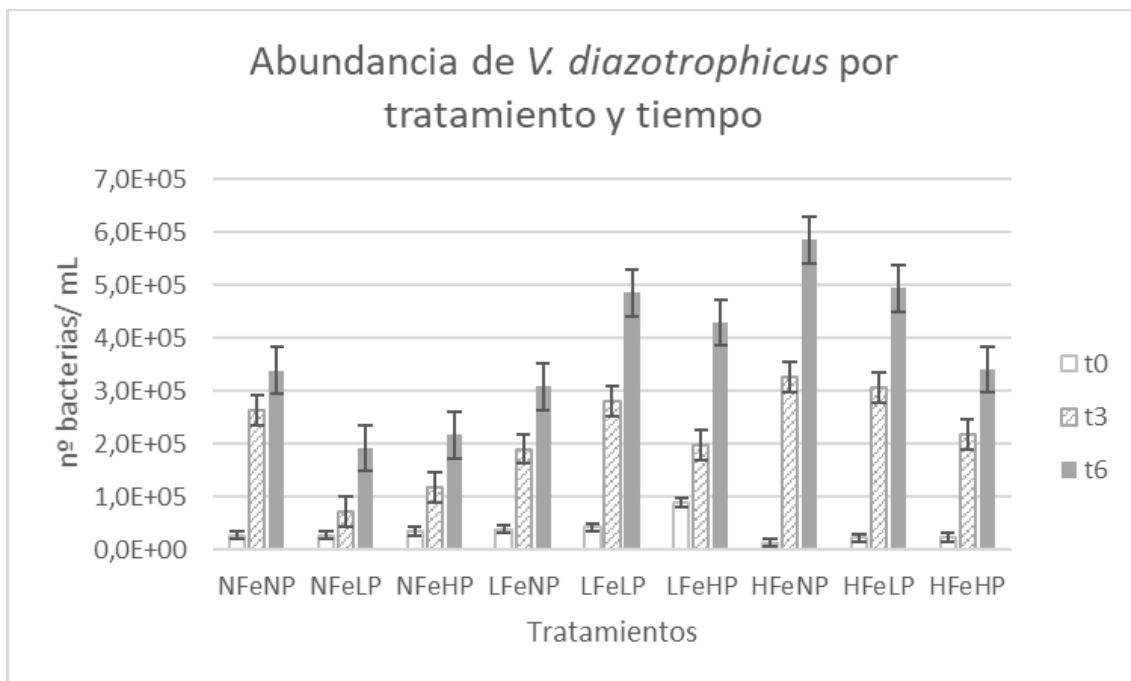


Gráfico 1. Promedio (2 réplicas por grupo) de la abundancia por mL de *V. diazotrophicus* en el tiempo inicial (t_0), el tercer día (t_3) y el sexto día (t_6) en los tratamientos durante el experimento. La prueba de ANOVA no fue significativa ($p>0.05$).

Tras el conteo de células se pasó a estimar la tasa de crecimiento de éstas por día por cada tratamiento (Gráfico 2). Para ello se transformaron los datos a su respectivo logaritmo natural y se trazaron las rectas patrón de los tratamientos a lo largo de los días. Se realizó un ANOVA para determinar si los tratamientos tenían algún efecto, pero no fue significativo (Tabla 1).

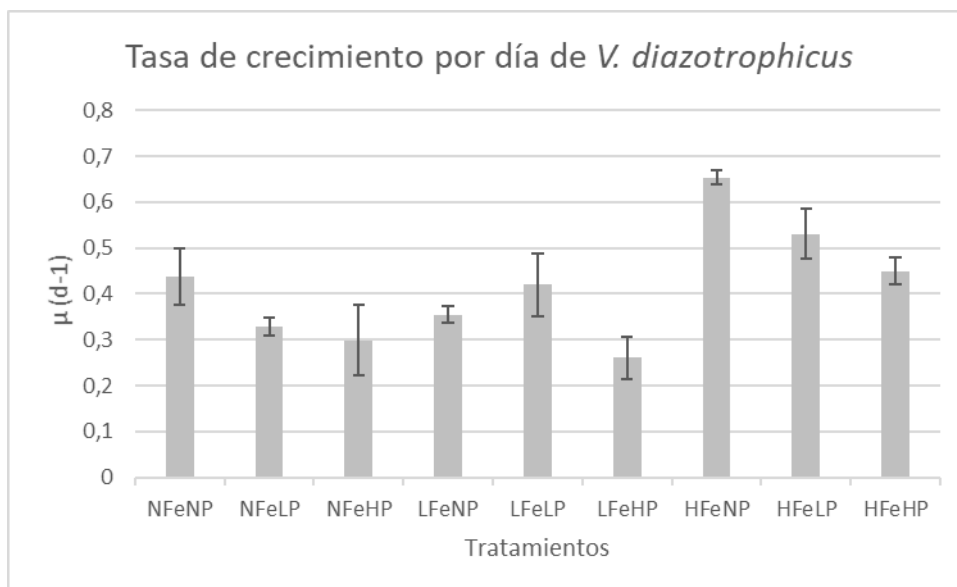


Gráfico 2. Promedio (2 réplicas por grupo) de la tasa de crecimiento por día de *V. diazotrophicus* entre el tiempo inicial (t_0) y el tercer día (t_3) en los tratamientos durante el experimento.

Los tratamientos con una tasa mayor de crecimiento por día son HFeNP ($0,653 \pm 0,015$), HFeLP ($0,530 \pm 0,053$), HFeHP ($0,449 \pm 0,032$) y NFeNP ($0,438 \pm 0,061$); y los de menor tasa son LFeHP ($0,266 \pm 0,07$) y NFeHP ($0,336 \pm 0,21$)

Fuente	df	MS	F	p
Tratamientos	8	0,140	1,861	0,187*
Error	9	0,075	-	-

Tabla 1. ANOVA de un factor. Efectos de los tratamientos (según las concentraciones de Fe y P) en las tasas de crecimiento de *V. diazotrophicus*. La prueba no fue significativa ($p > 0.05^*$).

Tasa de fijación de nitrógeno

Los datos obtenidos mediante la prueba del ARA muestran que durante la etapa inicial del cultivo (t_3) la fijación de nitrógeno en *V. diazotrophicus* no era estable, por lo que hay una gran variación entre las diferentes muestras en un mismo tratamiento que se traducen en un error estándar alto (Gráfico 3).

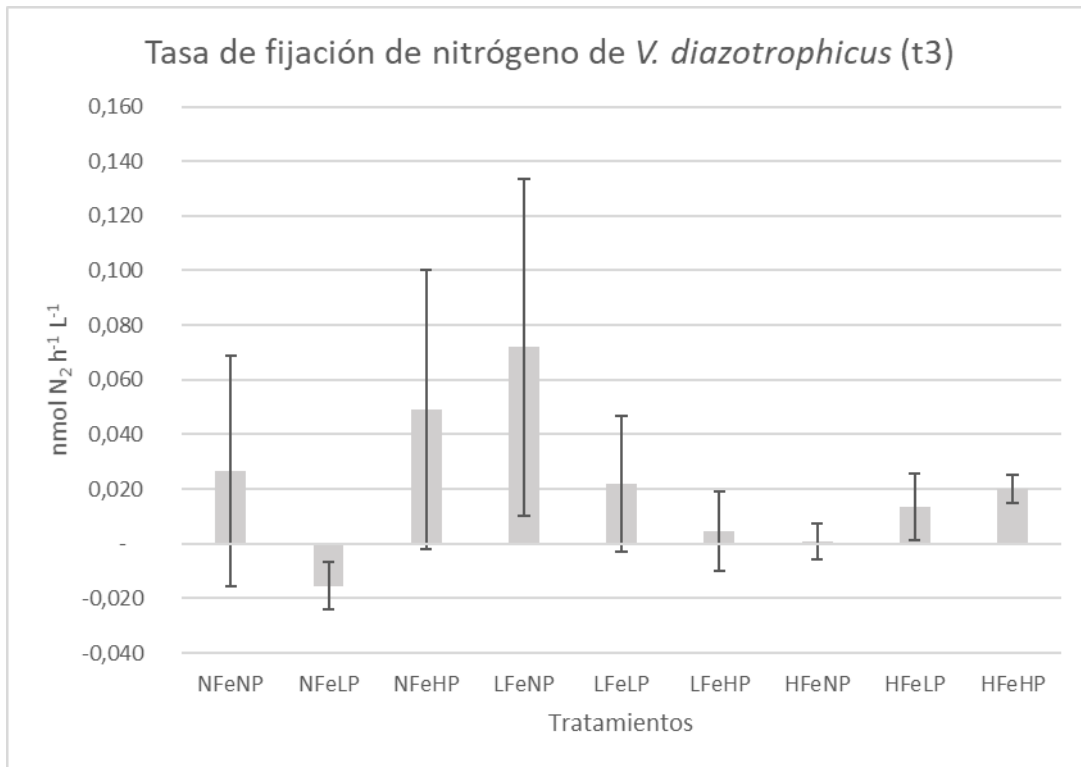


Gráfico 3. Promedio (de 2 réplicas por grupo) de la tasa de fijación de nitrógeno de *V. diazotrophicus* en los diferentes tratamientos el tercer día de cultivo (t3).

En cambio, una vez llegado el sexto día observamos un aumento en la fijación de nitrógeno y unas medias con un error estándar menor en la fijación de nitrógeno en los tratamientos. (Gráfico 4).

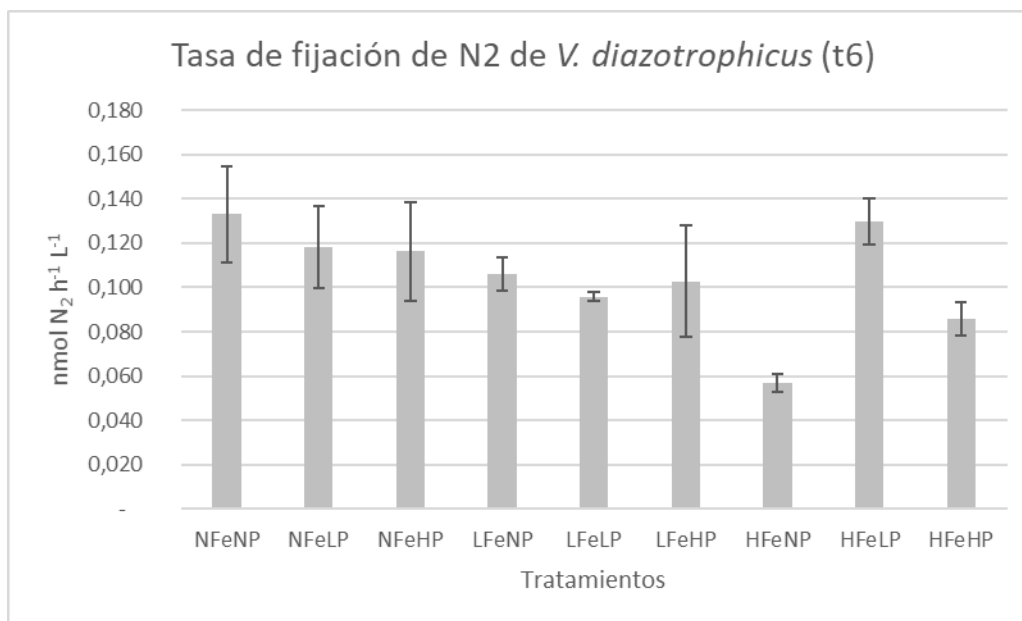


Gráfico 4. Promedio (de 2 réplicas por grupo) de fijación de nitrógeno en los diferentes tratamientos el sexto día de cultivo (t6). La prueba de ANOVA no fue significativa ($p > 0.05$).

Los tratamientos con una tasa de fijación de nitrógeno durante el sexto día son NFeNP ($0,133\pm 0,022$ nmol N₂ h⁻¹ L⁻¹) y HFeLP ($0,130\pm 0,011$ nmol N₂ h⁻¹ L⁻¹), y los de menor tasa son HFeNP ($0,057\pm 0,006$ nmol N₂ h⁻¹ L⁻¹) y HFeHP ($0,086\pm 0,008$ nmol N₂ h⁻¹ L⁻¹).

Sin embargo, aunque podemos intuir unas ciertas diferencias en la fijación de nitrógeno entre los grupos y un rápido crecimiento de esta actividad, no se correlacionan el tiempo de actuación (3 y 6 días) con la eficacia de los tratamientos (Tabla 2), ni se hallan diferencias significativas entre los diferentes tratamientos (Tabla 3).

Fuente	df	MS	F	p
Tratamientos	8	0,001	1,140	0,385
Tiempo	1	0,063	48,888	0,000
Tratamiento x tiempo	8	0,001	0,796	0,614*
Error	18	0,001	-	-

Tabla 2. ANOVA de dos factores. Efecto de los tratamientos (según las concentraciones de Fe y P) según el tiempo en la tasa de fijación de nitrógeno de *V. diazotrophicus*. La prueba no fue significativa ($p > 0.05^*$).

Fuente	df	MS	F	p
Tratamientos	8	0,001	2,288	0,120*
Error	9	0,000	-	-

Tabla 3. ANOVA de un factor. Efectos de los tratamientos (según las concentraciones de Fe y P) en la tasa de fijación de nitrógeno de *V. diazotrophicus*. La prueba no fue significativa ($p > 0.05^*$).

Actividad alcalina fosfatasa

En relación a la prueba de la APA se observó que había grandes diferencias realmente significativas entre los tratamientos (Tabla 3) según la presencia o ausencia de hierro y los niveles de disponibilidad de fósforo (Gráfico 5).

Fuente	df	MS	F	p
Tratamientos	8	0,199	7,430	0,003*
Error	9	0,027	-	-

Tabla 3. ANOVA de un factor. Efectos de los tratamientos (según las concentraciones de Fe y P) en la hidrólisis de MUF de *V. diazotrophicus*. La prueba fue significativa ($p < 0.05^*$).

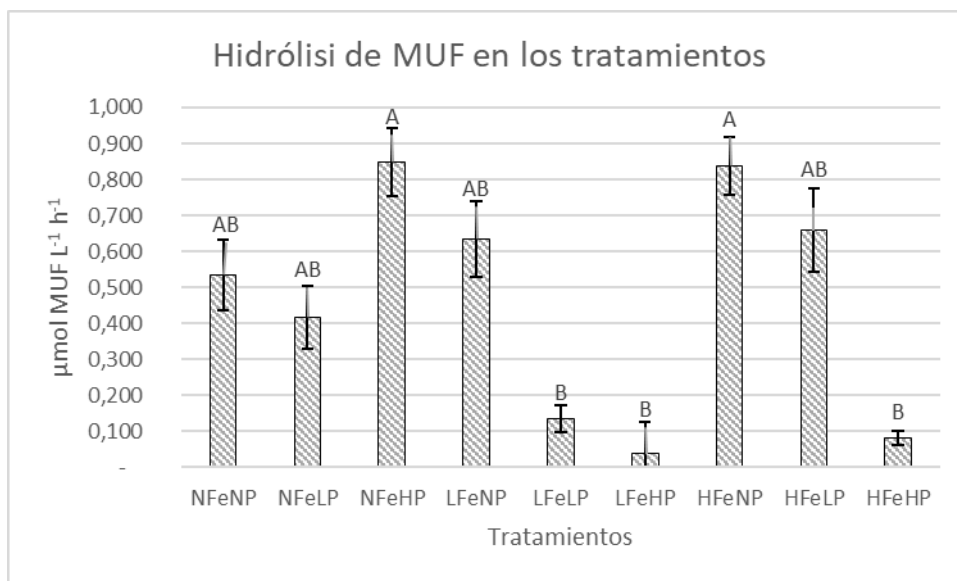


Gráfico 5. Promedio de la hidrólisis de MUF (APA) de cada uno de los tratamientos. Las diferentes letras denotan diferencias ($p < 0.05$) entre tratamientos (Test post hoc de Tukey, después de ANOVA de la Tabla 3).

Los tratamientos con una hidrólisis de MUF mayor durante el sexto día son NFeHP ($0,849 \pm 0,094 \mu\text{mol MUF h}^{-1} \text{L}^{-1}$) y HFeNP ($0,838 \pm 0,081 \mu\text{mol MUF h}^{-1} \text{L}^{-1}$), y los de menor tasa son LFeHP ($0,038 \pm 0,087 \mu\text{mol MUF h}^{-1} \text{L}^{-1}$) y HFeHP ($0,081 \pm 0,021 \mu\text{mol MUF h}^{-1} \text{L}^{-1}$).

Una vez realizado el post-hoc, las mayores diferencias entre grupos las encontramos entre el tratamiento NFeHP con LFeHP, HFeHP y LFeLP ($p=0,013$; $0,019$; $0,029$, respectivamente) y entre el tratamiento HFeNP con LFeHP, HFeHP y LFeLP ($p=0,013$; $0,019$; $0,029$, respectivamente).

Discusión

En el estudio se han observado diferencias significativas en la actividad de la enzima fosfatasa alcalina dependiendo de los tratamientos ($p=0,003$, Gráfico 5), en que se destaca la diferencia entre los grupos con una alta actividad de la fosfatasa (HFeNP, NFeHP) y los grupos en que ésta es muy baja (HFeHP, LFeHP, LFeLP). Estos resultados teóricamente son debidos a que cuanto mayor es la disponibilidad de fósforo inorgánico menor se la actividad de esta enzima. A pesar de esto, sólo se cumple en los tratamientos en los que hay presencia de hierro, mientras que en los tratamientos sin hierro vemos que los valores son discordantes según sus concentraciones de fósforo. Por ejemplo, el grupo sin hierro, pero con una gran cantidad de fósforo inorgánico (NFeHP) en el medio de cultivo, presenta una gran actividad de la enzima.

Recientemente, se ha estado determinando que factores o elementos podrían ser los limitantes de las fosfatasas alcalinas ya que juegan un papel crucial en la adquisición de fosfatos por los microorganismos. En la determinación de la estructura de la fosfatasa alcalina microbiana (PhoX) por parte de Chien Yong *et al.* (2014) se determinó que esta enzima contiene un cofactor con un complejo sitio de activación que comprende de dos iones hierro férrico (Fe^{3+}), lo cual plantea que la biodisponibilidad de hierro limita la adquisición de fosfato microbiano debido a la presencia de este elemento en PhoX.

Si tenemos en cuenta este supuesto, en el caso de que se desestime los grupos en los que no hay hierro y solo se analizasen los grupos en que existe la presencia de este elemento, ya sea en baja (LFe) o en alta (HFe) concentración, nos encontramos que la diferencia entre los grupos es todavía más acusada y significativa (aproximadamente con un p valor de 0,0003). Por lo que podríamos estar ante el supuesto de que las fosfatasas alcalinas se ven activadas con la presencia de hierro. Estos resultados podrían aproximarnos a descubrir cómo funcionan los procesos metabólicos en estas bacterias y cómo influyen estos en las necesidades y desarrollo en fanerógamas como la *P. oceanica* a las que están asociadas.

En este estudio también hemos observado que tanto el número de bacterias, su tasa de crecimiento diaria y su tasa de fijación de nitrógeno no eran significativamente diferentes entre tratamientos (todas $p>0.05$). A pesar de esto podemos observar que hay una cierta tendencia en la tasa de crecimiento diaria en los diferentes tratamientos según las concentraciones de hierro, por ejemplo, la tasa es relativamente alta en todos los tratamientos con altas concentraciones de hierro (HFe) de igual manera que estas tasas son mucho menores en los tratamientos sin hierro

(NH₄). Por tanto, podemos intuir que el hierro en este tipo de bacterias heterotróficas promueve su crecimiento y puede ser un factor limitante en varios procesos metabólicos (a parte de la activación de la enzima fosfatasa alcalina), aunque en este caso, debido posiblemente a que las réplicas por tratamiento eran bajas (n=2) no pudimos obtener una estimación más acertada de este efecto.

Para los fijadores de nitrógeno heterotróficos, prácticamente no se conoce nada sobre sus mecanismos celulares bajo condiciones limitadas en hierro, y menos, en la microbiota heterotrófica asociada a *P. oceanica*. En general, cuando se encuentran en concentraciones bajas en hierro, la mayoría de las células procariotas (entre ellas las bacterias marinas heterotróficas) secretan sideróforos que son compuestos con pequeñas masas moleculares que unen iones férricos con alta afinidad y así poder captar este elemento cuando es insoluble (Guan *et al.* 2001). En cambio, en un estudio alterno (Webb *et al.* 2001) se mostró que, para las cianobacterias marinas de procedencia oceánica, este efecto sucedía a la inversa, la deficiencia de hierro aumenta el crecimiento y las tasas de fijación de nitrógeno en cultivos deficientes en fósforo. Esto pone en tela de juicio el supuesto común de que los bajos niveles de hierro sólo pueden tener efectos negativos sobre los productores primarios marinos. Por lo tanto, los estudios que evalúan el impacto de la limitación de hierro y fósforo deberían considerar los posibles efectos interactivos de ambos factores.

Finalmente, las tasas de fijación de nitrógeno no resultaron ser significativamente diferentes entre tratamientos debido a que se estimó equívocamente que podrían ser visibles los resultados a partir del tercer día, pero todavía estaban en fase de adaptación al cultivo; por lo que consecuentemente en el sexto día vemos que las tasas han crecido y se han normalizado, pero no lo suficiente. En caso de haber realizado la prueba correctamente, se podría haber determinado el efecto del hierro y el fosforo como factores limitantes en la tasa de fijación de nitrógeno ya que se estima que el proceso de fijación de nitrógeno en diazotrófos tiene unas demandas adicionales muy elevadas de hierro para su funcionamiento y crecimiento.

En conclusión, se ha podido determinar que la actividad de la enzima alcalina fosfatasa en *V. diazotrophicus* se ve afectada por los niveles de fosforo inorgánico y hierro en el medio de cultivo. Aun así, esta es tan sólo una de las muchas bacterias asociadas a *P. oceanica*, por lo que sería interesante seguir investigando la relación de estos elementos tanto en la fijación de nitrógeno en fanerógamas marinas, como en otras reacciones químicas o aspectos en los que podrían verse afectadas a lo largo del tiempo.

Bibliografía

Agawin N. S. R., Ferriol P., Cryer C., Alcon E., Busquets A., Sintes E., Vidal C., Moyà G. (2013). Diversity of N₂ fixers in the phyllosphere of Mediterranean seagrass *Posidonia oceanica* and their significant role as source of new N in the community. Poster presentations at the Aquatic Microbial Ecology Congress, Stresa, Italy.

Agawin N. S. R., Ferriol P., Cryer C., Alcon E., Busquets A., Sintes E., Vidal C., Moyà G. (2016). Significant nitrogen fixation activity associated with the phyllosphere of Mediterranean seagrass *Posidonia oceanica*: first report. *Marine Ecology Progress Series* 551:53-62.

Agawin N. S. R., Tovar-Sánchez, A., Knoth, K., Duarte, C. M., Agustí, S. (2013). Variability in the abundance of *Trichodesmium* and nitrogen fixation activities in the subtropical NE Atlantic. *Journal of Plankton Research* 35: 1126–1140.

Alcoverro, T., Duarte, C. M. & Romero, J. (1995). Annual growth dynamics of *Posidonia oceanica* contribution of large-scale versus local factors to seasonality. *Marine Ecology Progress Series* 120, 203-210.

Blain, S., Bonnet, S. & Guieu, C. (2008). Dissolved iron distribution in the tropical and sub tropical South Eastern Pacific. *Biogeosciences* 5, 269-280

Béthoux, J. P., G. Copin-Montegut. (1986). Biological fixation of atmospheric nitrogen in the Mediterranean Sea. *Limnology & Oceanography* 31: 1353–1358.

Capone, D. G. (1988). Benthic nitrogen fixation. *Nitrogen Cycling in Coastal Marine Environment*, T. H Blackburn & J.Sorensen. John Wiley, Chichester. 88-123.

Cembella, A. D., Antia, N. J., Harrison, P. J. (1984). The utilization of inorganic and organic phosphorus compounds as nutrients by eukaryotic microalgae: A multidisciplinary perspective: Part 1. *Critical Reviews in Microbiology* 10: 317–391.

Chien Yong, S., Roversi, P., Lillington, J., Rodriguez, F., Krehenbrink, M., Zeldin, O.B., Garman, E. F., Lea, S. M., Berks, B. C. (2014) A complex iron-calcium cofactor catalyzing phosphotransfer chemistry. *Science* 245, 1170.

Den Hartog, C. (1971). *The Seagrasses of the World*. Amsterdam, London: North Holland Publishing Company 56:141.

Díaz-Almela, E., Duarte, C.M. (2008). Management of Natura 2000 habitats. 1120
*Posidonia beds (Posidionion oceanicae). European Commission.

Duhamel S., Björkman K. M., Van Wambeke F., Moutin T., Karl D. M. (2011). Characterization of alkaline phosphatase activity in the North and South Pacific subtropical gyres: implications for phosphorus cycling. *Limnology & Oceanography* 56, 1244-1254.

Guan, L. L., Kanoh, K. & Kamino, K. (2001) Effect of exogenous siderophores on iron uptake activity of marine bacteria under iron-limited conditions. *Applied and Environmental Microbiology* 67, 1710-1717.

Hamisi M.I., Lyimo T.J., Muruke M.H.S. (2004). Cyanobacterial occurrence and diversity in seagrass meadows in coastal Tanzania. *Western Indian Ocean Journal of Marine Science* 3: 113–122.

Hemminga, M. A., Duarte C. M. (2000). *Seagrass ecology*. Cambridge University Press. ISBN 0-521-66184-6

Herbert, R. (1999). Nitrogen cycling in coastal marine ecosystems. *FEMS Microbiology Reviews* 23: 563–90.

Hoppe, H. G. (2003). Phosphatase activity in the sea. *Hydrobiologia* 493: 187–200.

Invers, O., Perez, M. & Romero, J. (1995). Alkaline phosphatase activity as a tool for assessing nutritional conditions in the seagrass *Posidonia oceanica* (L) Delile. *Scientia Marina* 59, 41-47.

Kustka, A., Carpenter, E. J. & Sanudo-Wilhelmy, S. A. (2002). Iron and marine nitrogen fixation: progress and future directions. *Research in Microbiology* 153, 255-262.

Marbà, N., Duarte, C.M., Holmer, M., Calleja, M., Álvarez, E., Díaz-Almela, E., Garcias-Bonet, N. (2008). Sedimentary iron inputs stimulate seagrass (*Posidonia oceanica*) population growth in carbonate sediments. *Estuarine, Coastal and Shelf Science* 76, 710-713.

Martinez-Crego, B., Romero, J. & Alcoverro, T. (2006). The use of surface alkaline phosphatase activity in the seagrass *Posidonia oceanica* as a biomarker of eutrophication. *Marine Ecology* 27, 381-387.

Montefalcone, M. (2009). Ecosystem health assessment using the Mediterranean seagrass *Posidonia oceanica*: A review. *Ecological Indicators* 9: 595–604

Orth, R.J., T.J.B. Carruthers, W.C. Dennison, C.M. Duarte, J.W. Fourqurean, K.L. Heck, A.R. Hughes, G.A. Kendrick, W.J. Kenworthy, S. Olyarnik, F.T. Short, M. Waycott and S.L. Williams. (2006). A global crisis for seagrass ecosystems. *Bioscience* 56: 987-996.

Perry, M. J. (1972). Alkaline phosphatase activity in subtropical Central North Pacific waters using a sensitive fluorometric method. *Marine Biology* 15: 113–119.

Pinhassi, J., Gómez-Consarnau, L., Alonso-Sáez, L., Montserrat, M., Vidal, M., Pedrós-Alió, C., Gasol, J.M. (2006). Seasonal changes in bacterioplankton nutrient limitation and their effects on bacterial community composition in the NW Mediterranean Sea. *Aquatic Microbial Ecology* 44, 241-252.

Richardson, S.L. (2006). Response of epiphytic foraminiferal communities to natural eutrophication in seagrass habitats of Man O'War Cay, Belize. *Marine Ecology* 27: 404-416.

Ruiz, J.M., Pérez, M., Romero, J. (2001). Effects of fish farm loadings on seagrass (*Posidonia oceanica*) distribution, growth and photosynthesis. *Marine Pollution Bulletin* 49: 749-760.

Ruttenberg, K. C., Dyhrman, S. T. (2005). Temporal and spatial variability of dissolved organic and inorganic phosphorus, and metrics of phosphorus bioavailability in an upwelling-dominated coastal system. *Journal of Geophysical Research* 110: C10S13.

Tovar-Sanchez, A., Basterretxea, G., Rodellas, V., Sánchez-Quiles, D., García-Orellana, J., Masqué, P., Jordi, A., López, J. M., Garcia-Solsona, E. (2014). Contribution of Groundwater Discharge to the Coastal Dissolved Nutrients and Trace Metal Concentrations in Majorca Island: Karstic vs Detrital Systems. *Environmental Science & Technology* 48: 11819-11827.

Uku J, Björk M, Bergman B, Díez B. (2007). Characterization and comparison of prokaryotic epiphytes associated with three East African seagrasses. *Journal of Phycology* 43: 768–779.

Van Wambeke, F., Christaki, U., Giannokourou, A., Moutin, T. & Souvemerzoglou, K. (2002). Longitudinal and vertical trends of bacterial limitation by phosphorus and carbon in the Mediterranean Sea. *Microbial Ecology* 43, 119-133.

Webb, E. A., Moffett, J. W., Waterbury, J. B. (2001). Iron stress in open-ocean cyanobacteria (*Synechococcus*, *Trichodesmium*, and *Crocospaera* spp.): Identification of the IdiA protein. *Applied and Environmental Microbiology* 67, 5444-5452.