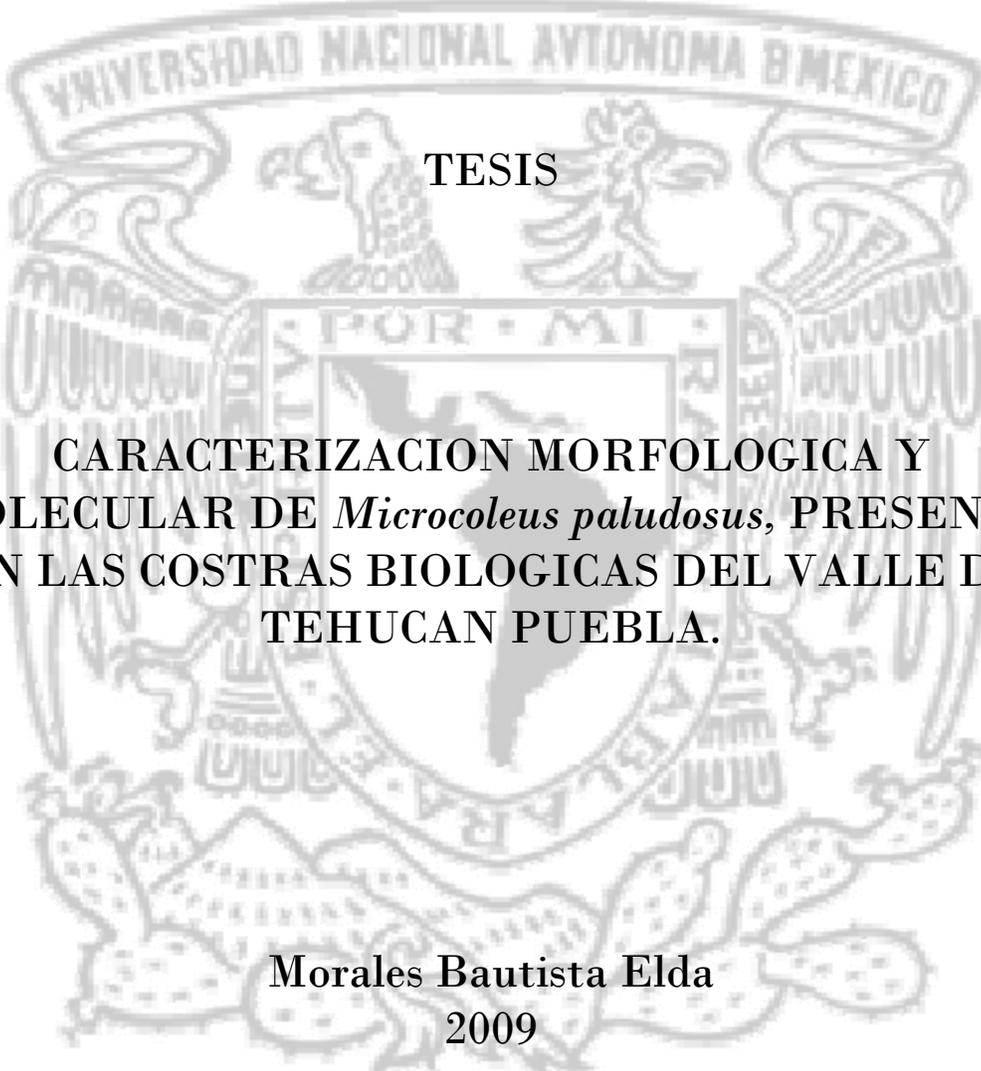

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA
DE MEXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES IZTACALA



TESIS

CARACTERIZACION MORFOLOGICA Y
MOLECULAR DE *Microcoleus paludosus*, PRESENTE
EN LAS COSTRAS BIOLÓGICAS DEL VALLE DE
TEHUCAN PUEBLA.

Morales Bautista Elda
2009

Director de Tesis: M. en C. Ramón Victor Moreno Torres



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.

Este trabajo fue realizado en el laboratorio de Microbiología (Ecología y Evolución Microbiana) en la UBIPRO, gracias al apoyo económico de PAPPIT DGAPA IN207807

Y

Gracias al apoyo económico del Consejo Mexiquense de Ciencia y Tecnología, mediante el programa de becas de Licenciatura.

*“Saber no es suficiente, debemos aplicar. Desear no es suficiente,
debemos hacer”*

Johann W. Van Goethe

“Lo que la mente puede concebir y creer, lo puede lograr”

Napoleón Hill

AGRADECIMIENTOS

Primero quiero agradecer a mis padres por todo el cariño y apoyo durante mi formación profesional, siempre han estado a mi lado, son un gran estímulo para alcanzar mis metas, gracias a ustedes puedo terminar mis estudios.

A mis hermanos Naty, Santos y Jacob, gracias por estar conmigo y hacerme tan alegre los días, están locos pero me divierten, los quiero mucho.

Armando, gracias por tu cariño, tus estímulos, tu comprensión y tolerancia, te amo.

A mi princesa Valentina, eres la razón para seguir adelante, gracias por tu cariño me hace más fuerte.

A mi profesor y director de Tesis Ramón Víctor Moreno, gracias por sus consejos profesionales y apoyo brindado durante estos años me fueron de gran utilidad.

Al Dr. Salvador, gracias por sus comentarios y apoyo durante este estudio.

A mis sinodales Dr. Víctor Rivera, M. en C. Irma Elena y Dr. Gustavo, gracias por sus comentarios y consejos durante este trabajo.

A mi compañero y amigo Joel y a todos mis compañeros de microbiología, hacen muy ameno el tiempo en el laboratorio.

Gracias

INDICE

RESUMEN	8
ABSTRACT	9
I. INTRODUCCION	10
I.1. Costras Biológicas del Suelo (CBS)	10
I.2. Importancia de CBS	13
I.3. Cianobacterias	15
I.4. Justificación	22
II. OBJETIVOS	24
II.1. Objetivo general	24
II.2. Objetivos particulares	24
III. MATERIALES Y METODOS	25
III.1. Área de Estudio	25
III.2. Toma de la muestra	27
III.3. Cultivo	27
III.4. Extracción y determinación de pigmentos fotosintéticos	29
III.5. Descripción morfológica y ciclo de vida.	29
III.6. Extracción de DNA	30
III.7. Amplificación del gen de la ficocianina (PC) mediante PCR	31
III.8. Secuenciación del gen de la ficocianina (PC).	33

IV. RESULTADOS	34
IV.1. Condiciones de cultivo	34
IV.2. Determinación de pigmentos fotosintéticos	36
IV.3. Morfología	37
IV.4. Ciclo de vida	46
IV.4. Extracción de DNA y PCR	51
IV.5. Secuencia de PC	53
V. DISCUSION	55
VI. CONCLUSIONES	62
BIBLIOGRAFIA	64

RESUMEN

En México la mayor parte del territorio está cubierto por zonas áridas que presentan problemas de manejo y aprovechamiento, debido al poco conocimiento sobre la diversidad, composición y ecología de los organismos que las habitan. Nuestros estudios se realizaron en el Valle de Tehuacan-Cuicatlan, Puebla que es una de las zonas áridas más importantes de nuestro país, donde las Costras Biológicas son una porción significativa de la cobertura viva de la región y tienen, entre los organismos mas importantes a la cianobacteria *Microcoleus paludosus* objeto de este estudio. Encontramos que el crecimiento óptimo de *M. paludosus*, en condiciones de cultivo, fue en el medio con nitratos BG16:1 a una concentración 0.52g/L NaNO₃ a un fotoperíodo de 12:12 luz-oscuridad, una temperatura de 25 °C y humedad de 70 %, posteriormente se obtuvieron las fases del ciclo de vida de esta especie en cultivo y se caracterizo morfológicamente. De la especie cultivada se realizó la extracción de DNA y se aisló el gen de la ficocianina, este último se secuencio y se realizó un árbol filogenético.

ABSTRACT

The most Mexico territory are covered for arid areas, that present problems both advantage and use, due to the little knowledge about the diversity, composition and ecology of the organisms that you live in. Our studies were carried out in the Tehuacan-Cuicatlan , Puebla Valley that is one of the most important arid areas in our country, where the Biological Crust are a significant portion of the alive covering of the region and they have, among the organisms but important to the *Microcoleus paludosus* cyanobacteria object of this study. We find that the good growth of *M. paludosus*, under cultivation conditions, was in the means with nitrates BG16:1 to a concentration 0.52g/L NaNO₃ to a photoperiod of 12:12 light-darkness, a temperature of 25 °C and humidity of 70%, later on the phases of the life cycle of this species were obtained in cultivation and you characterizes morphological. Of the cultivated species was carried out the extraction of DNA and the phycocyanin gene, this last was isolated, sequence and was carried out a phylogenetic tree.

I. INTRODUCCION

I.1. Costras Biológicas del Suelo

En las regiones áridas y semiáridas alrededor del mundo, la vegetación es por lo regular escasa o ausente (Belnap et al. 2001). No obstante, los espacios abiertos están típicamente cubiertos por Costras Biológicas del Suelo (CBS), una comunidad de organismos altamente especializados (Harper y Marble 1988). Las CBS juegan un papel vital en asegurar el proceso de estabilidad, formación y fertilidad del suelo; previniendo la erosión causada por viento o agua, aumentan la colonización por plantas vasculares y la estabilización de dunas de arena, fijan nitrógeno atmosférico y contribuyen al aumento de materia orgánica del suelo (Belnap 2003; Belnap y Eldridge 2001; Eldridge y Greene 1994).

Las CBS pueden estar presentes en regiones áridas y semiáridas calientes, templadas y frías; y pueden llegar a constituir hasta el 70% de la cobertura viva de estas zonas (Belnap 1994).

Estructuralmente las CBS son una capa áspera y desigual (0.1 a 10 cm. de grosor), sobre el suelo diferentes poblaciones de organismos forman una matriz que los une junto con partículas del suelo (**Fig. 1**). Horizontalmente, ocupan zonas de pocos nutrientes en la mayoría de los tipos de vegetación árida. En muchas comunidades áridas y semiáridas hay a menudo más especies asociadas con las CBS que con otros organismos del sitio (Belnap 1995; Rosentreter 1986; Ponzetti et al. 1998).

Las CBS son un mosaico compuesto principalmente por bacterias, algas verdes, líquenes, musgos, microhongos y cianobacterias. Las Cianobacterias y microhongos filamentosos se entrelazan en los primeros milímetros del suelo,

adhiriendo partículas formando una matriz que estabiliza y protege la superficie del suelo de las fuerzas erosivas. (Friedmann y Ocampo 1976; Belnap y Gardner 1993).

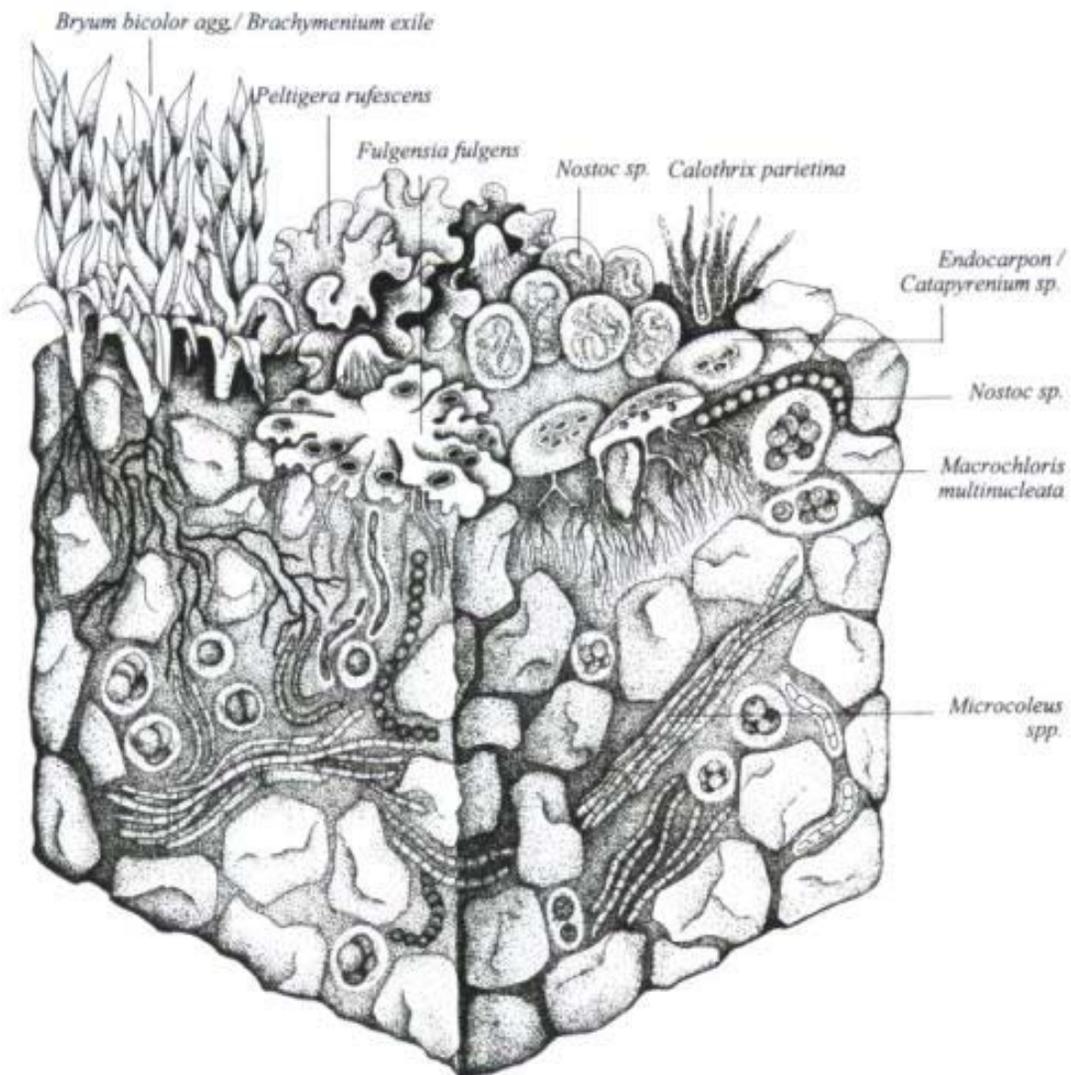


Figura 1. Diagrama esquemático de un bloque de las CBS con algunos de sus colonizadores, estos pueden variar dependiendo del hábitat (Ilustración Renata Klein tomado de Belnap 2003).

Los diferentes grupos de organismos que comprenden las CBS comparten características fisiológicas tales como:

Son capaces de suspender temporalmente su respiración, sin efectos negativos, al secarse el medio, a diferencia de las plantas vasculares que mueren o deben de generar nuevos tejidos (Belnap et al. 2001).

Los organismos de la costra son fisiológicamente activos solo cuando hay humedad y empiezan sus funciones metabólicas casi inmediatamente. La respiración comienza en menos de 3 minutos después de hidratarse, mientras la actividad completa de la fotosíntesis se alcanza después de 30 min, la concentración de oxígeno en el suelo producido por la fotosíntesis alcanza un estado estable entre 1 o 2 horas después de la hidratación (García-Pichel y Belnap 1996).

Los componentes dominantes de las costras son fotosintéticos y por lo tanto requieren de luz. Cuando la tierra esta seca, la biomasa de cianobacterias se localiza entre los 0.2 a 0.5 mm debajo de la superficie del suelo donde la luz es suficiente para la ganancia neta de carbono, pero la exposición a la radiación UV está reducida. *M. vaginatus* que carece de pigmentos protectores contra rayos UV, migra a la superficie por cortos periodos de tiempo cuando el suelo está húmedo y regresa cuando está seco, *Nostoc* y *Scytonema* contienen pigmentos que los protegen contra rayos UV y es mas común encontrarlos en la superficie del suelo (Belnap et al. 2001).

I.2. Importancia de las CBS

En una región dada, el papel ecológico de las CBS puede variar en su importancia y depende de la composición y biomasa de la costra así como de las características específicas del ecosistema considerado (Belnap 2003). Por ejemplo, las entradas de carbón son superiores cuando los musgos y líquenes están presentes que cuando la costra es dominada por cianobacterias. La entrada de nitrógeno es más alta con mayor biomasa de cianobacteria y mayor con la cobertura de ciano-líquenes. La infiltración del agua y la estabilidad de la superficie del suelo está relacionada con la biomasa de las cianobacterias así como con la cobertura de musgos y líquenes (Belnap et al. 2001).

Diferentes factores tales como el clima, textura, química del suelo, distribución e historia de los hábitats pueden influir en la composición de especies y la morfología externa de las CBS. Basado en esta morfología externa las costras del suelo pueden ser clasificadas en tres diferentes tipos lisas, rugosas y mixtas (Johansen 1993; Eldridge y Greene 1994). Esta morfología externa puede determinar los efectos físicos y ecológicos de las CBS. Por ejemplo, la costra rugosa es probable que atrape más materia orgánica que la costra lisa, debido a que la superficie rugosa disminuye el volumen y la velocidad de la infiltración del agua (Johansen 1986). También, las costras lisas pueden tener temperaturas más altas que las costras rugosas y mixtas, debido a que la superficie plana está completamente expuesta a la radiación solar (West 1990; Eldridge y Rosentreter 1999).

Las CBS pueden ser una fuente importante de fijación de carbono en áreas de escasez de plantas como en el occidente de Norteamérica (Beymer y Klopatek

1991). Mientras las plantas vasculares contribuyen con la materia orgánica directamente al suelo sobre el que se encuentran, grandes espacios entre las plantas reciben una pequeña entrada de materia, donde las CBS están presentes, el carbono proporcionado por éstas ayuda a mantener los espacios entre las plantas fértiles (Belnap et al. 2001). Esta contribución de carbono provee energía para la población microbiana del suelo, apoyando así el crecimiento de las plantas superiores (Evans y Johansen 1999). Los informes del índice máximo de fotosíntesis neta (NPmax) de las costras bajo condiciones óptimas varía ampliamente en un intervalo de 0.1 a 11.5 mol CO₂ m⁻² s⁻¹, el último valor es de una magnitud similar al de la vegetación superior indicando la importancia potencial de los organismos de la costra en la dinámica del carbono en el ecosistema, particularmente en ambientes perturbados (Lange 2001). Cuando el área relativa de la cobertura por las costras es a menudo mucho más grande que las plantas superiores, las CBS contribuyen substancialmente a la entrada de carbón de los ecosistemas áridos y semiáridos donde la producción por las plantas vasculares es baja (Burgheimer et al. 2006).

Las cianobacterias y ciano-líquenes son una fuente importante de fijación de nitrógeno en ecosistemas desérticos (Evans y Ehleringer 1993; Belnap 1995). Estos organismos son capaces de fijar nitrógeno en condiciones de luz y oscuridad (Rychert y Skujins 1974; Pearson et al. 1981; Paerl 1990). La fijación de nitrógeno es altamente dependiente de los regímenes de luz y agua, así como la composición de especies (Rychert et al. 1978; Belnap 1994).

Las CBS pueden ser usadas como indicadores ecológicos de factores abióticos, tales como la presencia de suelos calcáreos (McCune y Antos 1982). La pérdida de estas costras está implicada como un factor que conduce a una erosión acelerada y otras formas de degradación de suelo. Con el propósito de tener acciones encaminadas a asegurar la sustentabilidad de los ecosistemas desérticos, se requiere información de la cobertura potencial y de la composición de la costra (Matthew et al. 2006).

Las CBS son extremadamente vulnerables a una variedad de perturbaciones, tales como cambios climáticos, actividad humana intensa, invasiones anuales de pastos exóticos y el incremento de incendios; además, en varios estudios se ha reportado que las CBS poseen una tasa de recuperación lenta, que oscila en un rango de años a décadas (Chen et al. 2005). Por lo anterior se ha considerado como prioridad en regiones desérticas la presencia de CBS (Belnap 2003) sobre todo bajo las recientes condiciones en las cuales las regiones desérticas están experimentando el calentamiento global y el incremento de la actividad humana (Chen et al. 2005). Un trabajo preliminar para la protección de las CBS es estudiar su distribución y monitorear sus cambios espaciales y temporales (Karnieli et al. 2001).

Cada componente de la comunidad puede proveer información que puede explicar las características y evaluación del sitio; los componentes de las CBS son buenos indicadores de disturbio físico (Belnap 1995). La cobertura de los organismos de las costras se puede usar como un indicador de la estabilidad del suelo así como de la cantidad de nutrientes (Pellant et al. 2000; Tongway y Hindley 1995).

I.3. Cianobacterias presentes en las CBS

Las cianobacterias son un grupo filogenético en el dominio Bacteria, es uno de los grupos más amplios entre los procariotas, con aproximadamente 56 géneros descritos y más de 1000 especies (Casamayor et al. 2002).

Las cianobacterias constituyen un grupo de microorganismos fotosintéticos con características morfológicas y fisiológicas capaces de responder a cambios ambientales extremos de intensidad luminosa, salinidad y pH (Whitton 1992). Las cianobacterias sufren cambios en la estructura, el metabolismo celular y la

expresión de genes en respuesta a la limitación de nitrógeno. Los primeros cambios implican la degradación de las ficobiliproteínas, las cuales constituyen una fuente importante de nitrógeno (Tandeau y Houmar 1993, Liotenberg et al. 1996).

Los efectos ambientales que producen consecuencias bioquímicas, inducen a adaptaciones fisiológicas similares; por ejemplo, incremento de salinidad, estrés osmótico y desecación, todas resultan en un descenso en el potencial hídrico y pérdida de agua a través de la membrana (Mori 2003). Los mecanismos de tolerancia a la desecación, son muy interesantes y entre estos destacan la síntesis de exopolisacáridos (EPS); equilibran el agua de la células con la atmosfera y controlar el potencial hídrico (Potts 1999). Son capaces de suspender temporalmente su respiración, sin efectos negativos, al secarse el medio, a diferencia de las plantas vasculares que mueren o deben de generar nuevos tejidos (Belnap et al. 2001).

Los EPS son excreciones extracelulares de sustancias poliméricas que forman estructuras mucilaginosas, aglutinan las partículas del suelo, retienen la humedad y protegen de factores negativos externos (Amelio et al. 1987). Además, estos EPS son un gran reservorio de agua ya que cuando están hidratados retienen hasta el 99%, también evitan la difusión de metales tóxicos, cuya presencia genera, en ocasiones, una excesiva producción de sustancias poliméricas (Philipps et al. 1998).

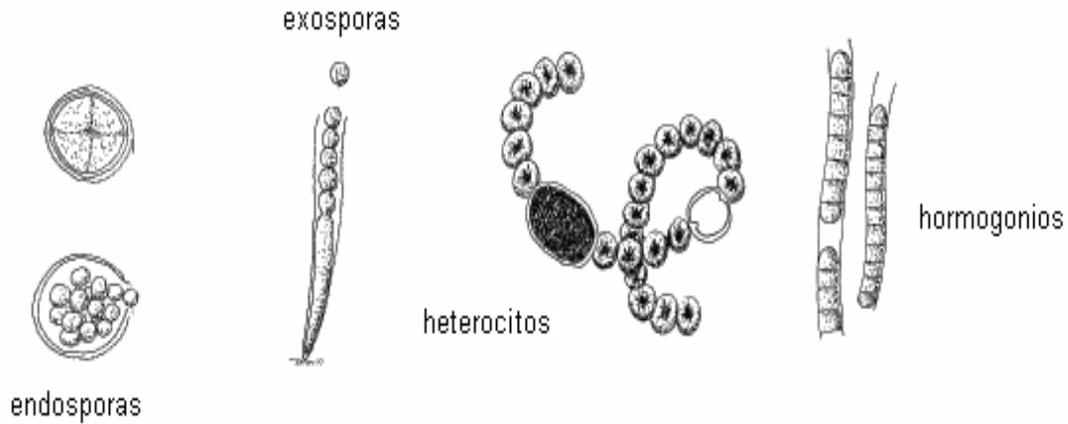
La mayoría de estos organismos equilibran su contenido de agua con la humedad atmosférica o la humedad contenida en la superficie del suelo, estos tipos de organismos son referidos como "poiquilohídricos", generalmente son muy rápidos al estar activos fotosintéticamente, produciendo carbohidratos y azúcares momentos después de captar agua. Sin embargo, muchas especies requieren de altos niveles de hidratación para desarrollar sus funciones fisiológicas en forma

óptima. La humedad contenida al inicio de la actividad es especie-específica y ayuda a determinar la distribución de varios taxa que están sobre la costra, muchos de estos organismos carecen de una epidermis cerosa y se secan rápidamente (Belnap et al. 2001).

En las CBS se pueden encontrar cianobacterias unicelulares y filamentosas, pero el tipo más frecuente son las cianobacterias filamentosas (Belnap y Harper 1995). Las cianobacterias filamentosas son organismos multicelulares en los cuales las células individuales intercambian nutrientes y probablemente regulan moléculas. Se ha observado que las cianobacterias filamentosas tienen células con pared gram-negativa, que consta de una capa de peptidoglicanos (mureina) y otra membrana que es externa a la membrana citoplasmática que parece ser continua a lo largo de las células del filamento, lo que podría constituir un conducto de comunicación para transferir compuestos, lo cual es esencial para la formación de este sistema bacteriano como organismo multicelular (Flores 2006). La pared celular está rodeada por una capa viscosa mucilaginosa compuesta por ácidos pectínicos y mucopolisacáridos, en ocasiones puede existir una vaina mucilaginosa segregada por la célula, de grosor variable, estratificada o lisa y con o sin color (Álvarez 1994).

Las cianobacterias filamentosas están organizadas en tricomas que constituyen una unidad de crecimiento y se reproducen por fragmentación (Woese 1987). Cada fragmento del filamento es un hormogonio que actúa como un cuerpo reproductivo y presenta movilidad (Álvarez 1994). En algunas especies su ciclo de vida se caracteriza por presentar varios procesos de diferenciación celular en respuesta a factores internos y externos (**Fig. 2**) (Hense y Beckmann 2006). En algunas especies las condiciones ambientales inducen al desarrollo de acinetos, endosporas, exosporas, heterocistos u hormogonios (Herrero et al. 2004), estos son filamentos cortos de células móviles que tiene función de dispersión, y/o en

algunas especies, participan en el establecimiento de simbiosis con varias plantas (Meeks y Elhai 2002).



Los organismos pertenecientes tienen una variedad de pigmentos accesorios, en los cuales se ha basado su clasificación, no obstante a pesar de esta variación, está aceptado que los cloroplastos son derivados de un solo ancestro cianobacteriano. **Figura 2-** Algunos tipos de diferenciación celular en cianobacterias (Álvarez 1994)

Las ficobilinas son el único pigmento accesorio identificado que está presente en procariontes fotosintéticos (cianobacterias) y eucariontes (Rodofitas y Glaucocitofitas) (Tomitani 1999).

El aparato fotosintético de las cianobacterias es conocido por estar compuesto por un núcleo central que contiene clorofila-a unida a un complejo de ficobilisomas el cual le da el típico color azul (Benedetti et al. 2006). El ficobilisoma es el principal sistema cosechador de luz en las cianobacterias; esta antena está unida a la membrana fotosintética y consiste de un macrocomplejo compuesto de proteínas cromofosforiladas denominadas ficobiliproteínas y de polipéptidos de unión (Gómez 2003). Las ficobiliproteínas están compuestas de dos subunidades α y β las cuales se asocian dentro de α - β -monómeros (Padyana et al. 2001).

El núcleo o corazón del ficobilisoma contiene como ficobiliproteína, a la aloficocianina y los brazos pueden contener ficocianina y ficoeritrina o exclusivamente ficocianina. (Gómez 2003). El estudio de la heterogeneidad de la

secuencia del gen de la ficocianina (PC) es ideal para la clasificación de cianobacterias.

Las cianobacterias son los únicos organismos diazótrofos (organismos que fijan nitrógeno) y que producen oxígeno como derivado del proceso de la fotosíntesis, esto es interesante, debido a que la reducción biológica del nitrógeno es catalizada por la nitrogenasa, la cual es inhibida irreversiblemente por el oxígeno molecular (Berman et al. 2003).

La nitrogenasa parece ser un complejo enzimático altamente conservado. Este se encuentra en un grupo diverso de procariontes, Bacteria y Archea (Zehr et al. 2001) pero este no se ha descrito en algún genoma eucarionte. El análisis filogenético sugiere que la secuencia de la nitrogenasa desciende de un ancestro común y las subunidades catalíticas y el complejo enzimático indican que la enzima existió antes de la oxigenación de la tierra (Broda y Peschek 1983).

Las cianobacterias son determinadas usando claves taxonómicas botánicas y bacteriológicas. La determinación de especies en particular basada sólo en su morfología no es posible (Neilan 1995).

Para el estudio y determinación de estos organismos se consideran los siguientes criterios: 1) La forma y arreglo *in situ*, 2) Su aislamiento, identificación y cuantificación, datos acerca de ultraestructura; 3) Evaluación de actividades: biología global, enzimática y metabólica, características bioquímicas de su estabilidad 4) Evaluación de biomasa y 5) Reconocimiento y conocimiento de microorganismos en ambientes naturales por técnicas genéticas y moleculares; principalmente para el conocimiento acerca de su diversidad, procesos de diversificación, especiación y relaciones filogenéticas (Komárek y Čáslavská 1991; Castenholz 2001; Suda et al. 2002; Flechtner et al. 2002).

Diversas cepas de cianobacterias son de interés de acuerdo con sus condiciones fisiológicas y por eso es necesario optimizar su crecimiento en función de la temperatura, irradiación, salinidad, agitación, concentración y naturaleza de nutrientes en condiciones de laboratorio (Loreto 2003).

Los requerimientos nutritivos para un crecimiento *in vitro* varían con la especie, e incluso son específicos de acuerdo con la respuesta que se desea obtener, en el caso de cianobacterias un factor importante es la fuente de nitratos que puede ser en forma de N_2 , $NaNO_3$ o NH_4Cl . Varios resultados muestran que se produce gran variabilidad tanto en el crecimiento como en la composición bioquímica debido a las variaciones en la concentración de nitrógeno. Asimismo, las fuentes nitrogenadas varían en cuanto a la influencia que pueden ejercer sobre la fisiología de las cianobacterias (Loreto 2005).

Una gran variedad de medios han sido designados para el cultivo de cianobacterias, el medio BG11 es usado para cepas de agua dulce, suelo de origen termal y algunas cepas aisladas de ambientes marinos; este medio utiliza concentraciones de nitrato muy altas y concentraciones de fósforo relativamente bajas; una modificación de este medio es BG11₀, donde se omite el nitrato, es empleado para cepas que fijan nitrógeno (PCC).

El medio Allen y Arnon contiene altas concentraciones de nitratos (sal sódica y potásica) y moderadas concentraciones de fósforo (10:1). Este medio se ha diseñado para conseguir altos rendimientos celulares. Por lo general, cuando se realizan cultivos líquidos se utiliza diluido a 1/8 e incluso a 1/16. En cultivos sólidos se suele mantener la composición original. Para crecer las cianobacterias en condiciones de fijación de nitrógeno se elimina la solución de nitratos (PCC).

La aplicación de técnicas moleculares para la identificación de cianobacterias tiene diversas dificultades, puesto que los exopolisacaridos (EPS) que muchas de ellas

producen, dificultan la extracción de DNA, también interfieren con muchos protocolos de purificación de ácidos nucleicos (López et al. 2001; Tillett y Neilan 2000). Las células de cianobacterias también contienen endo y exo nucleasas y pigmentos fotosintéticos, los cuales pueden inhibir las reacciones enzimáticas especialmente la transcripción reversa. En consecuencia las técnicas desarrolladas para el aislamiento de ácidos nucleicos de cianobacterias son complejas y laboriosas; en 1992 Jhingan introdujo un nuevo método para la extracción de DNA basado en el uso del metal xantato, en la presencia de grupos amino, este polisacárido xantato forma complejos insolubles que son precipitados selectivamente. Además, el xantato liga los iones metálicos, mientras inhibe potencialmente la actividad de enzimas degradantes del DNA, así como inhibidores iónicos quelantes de las reacciones de amplificación de DNA (Tillett y Neilan 2000).

Aproximadamente se han reportado 100 especies de cianobacterias para CBS en zonas áridas y semi áridas alrededor del mundo; en norte América se han descrito 50 especies de cianobacterias y los géneros mas frecuentes son *Nostoc*, *Scytonema* *Schizothrix* y *Microcoleus* (Rivera 2006).

El género *Microcoleus* pertenece al orden *Oscillatoriales*, a la familia *Phormidiaceae*, el orden está representado por bacterias filamentosas que presentan una división celular por fisión binaria en un solo plano, reproduciéndose por fragmentación del tricoma (Castenholz et al. 2001). El género se caracteriza por presentar filamentos isopolares que contienen varios tricomas cilíndricos en una misma vaina, los tricomas pueden salir de la vaina por sus movimientos de deslizamiento que son fototácticos y aerotácticos; hay aproximadamente 36 especies dentro de este género (Temes 2000).

M. paludosus es una cianobacteria filamentosa sin heterocistos, de color azul verdoso oscuro, de 5.5 a 6 μm de diámetro, es una de las especies más representativas del valle de Tehuacan y ésta se encuentra en asociación con *Schizothrix sp.* (Rivera et al. 2006).

A nuestro grupo de trabajo le interesa el conocimiento de las respuestas de las comunidades microbianas a ambientes extremos. Además nos parece importante conocer todas las fases del ciclo de desarrollo de las cianobacterias presentes en ambientes desérticos. Actualmente las herramientas moleculares son de gran utilidad para el desarrollo de estudios comparativos de la filogenia y como marcadores especie- específicos del grupo.

El principal interés de este trabajo es que con los resultados obtenidos de su caracterización en futuras investigaciones se puedan dar alternativas de estudio de la situación del suelo, a través de la cianobacteria *M. paludosus*, ya que éste podría ser un indicador biológico y por lo tanto es importante saber su participación en el ciclo de nutrientes, sus variaciones e interacciones con otros organismos, así como sus respuestas a las variaciones fisicoquímicas del suelo.

En este estudio también se pretende determinar las fases de desarrollo en su ciclo de vida en el laboratorio, debido a que en la zona de estudio no se pueden observar todas las fases de ciclo de vida, en función de la fisiología de los organismos de las CBS. El conocimiento de las diferentes fases del ciclo de vida de *M. paludosus* es importante para determinar su diferenciación y desarrollo celular y la respuesta del ciclo ante condiciones ambientales adversas como las del Valle de Tehuacán.

I.4. Justificación

En México, aproximadamente 60% del territorio está cubierto por zonas áridas que presentan problemas de manejo y aprovechamiento, debido al poco conocimiento sobre la diversidad, composición y la ecología de los organismos que las habitan, ya que no existen inventarios completos de muchos de ellos. El estudio de las CBS y de otros aspectos relacionados con el monitoreo de estas comunidades de microorganismos es esencial, no solo para entender el funcionamiento de estos ambientes, sino también para contribuir a su conservación (Rivera et al. 2004).

El Valle de Tehuacan-Cuicatlan, Puebla es una de las zonas áridas más importantes de nuestro país, debido a la alta riqueza específica, diversidad biológica y endemismo de diversos grupos vegetales y animales. El valle presenta un mosaico de suelos degradados de manera natural y deteriorados por el uso humano (Villaseñor et al. 1990; Dávila et al. 2002). Los estudios realizados en el Valle de Tehuacan-Cuicatlan sugieren que las CBS son una porción significativa de la cobertura viva de la región y éstas pueden incrementar la germinación y el crecimiento de algunas especies de plantas vasculares como la leguminosa *Mimosa luisana* y el cactus columnar *Myrtillocactus geometrizans* (Rivera et al. 2004). Estas comunidades complejas tienen entre los organismos dominantes a las cianobacterias, *Scytonema javanicum*, *Chroococidiopsis sp* y *Microcoleus paludosus* **Fig. 4**, estas tres cianobacterias están ampliamente distribuidas en el valle (Rivera et al. 2006).

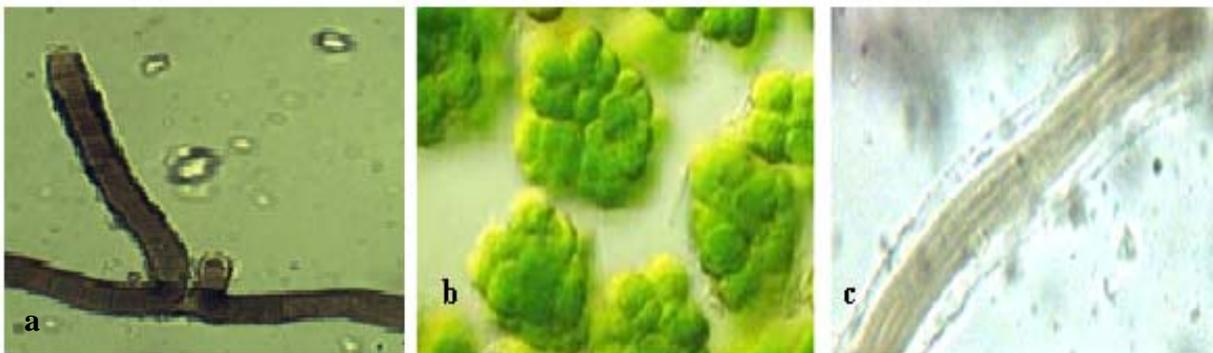


Figura 3.- Cianobacterias presentes en las costras Biológicas del Valle de Tehuacan

II. OBJETIVOS

II.1. Objetivo general

- ❖ Contribuir al conocimiento de *M. paludosus* presente en las CBS en el Valle de Tehuacan-Cuicatlan Puebla, realizando su caracterización morfológica en las diferentes fases de su ciclo de vida y su caracterización molecular, a través de estudios de aislamiento y caracterización de su genoma y de uno de sus genes.

II.2. Objetivos particulares

- ❖ Determinar las condiciones de cultivo de *M. paludosus*
- ❖ Determinar las fases del ciclo de vida de *M. paludosus* en condiciones de cultivo y compararlo con lo obtenido en condiciones naturales.
- ❖ Aislar DNA de poblaciones cultivadas de *M. paludosus* e iniciar su caracterización mediante:
 - a) Aislamiento y secuenciación del gen de la ficocianina-C.

III. MATERIALES Y METODOS

III.1. Área de Estudio

El valle de Tehuacán-Cuicatlán, se localiza en el sureste del estado de Puebla, entre los 17°39' y los 18°53' de latitud N y los 96°55' Y 97°44' de longitud W **Fig. 5**. A una altitud de 1.676 m, de clima semicálido y semiseco; considerada una región semiárida, con una precipitación anual entre 400 y 450 mm y una temperatura media anual de 21 °C (Dávila, et al 2002). La vegetación de esta región se caracteriza como matorral xerófilo y es relativamente bien conocida. Se calcula que el 30% de las plantas de esta región son endémicas (Vergara, 1997).

ZAPOTITLAN DE LAS SALINAS, PUEBLA, MÉXICO.



Figura 4. Localización del área de estudio, señalado con una estrella el Valle de Zapotitlán.

En la Reserva de la Biosfera Tehuacan-Cuicatlán, existe una serie de ecosistemas diversos, clasificados en 19 tipos de vegetación, incluyendo seis variantes En la Reserva de la Biosfera Tehuacan-Cuicatlán, existe una serie de ecosistemas diversos, clasificados con 19 tipos de vegetación, incluyendo seis variantes consideradas como de vegetación secundaria, además el suelo presenta diferentes usos. La diversidad de ambientes ha favorecido la presencia de endemismos. Entre las categorías de vegetación más representativas están los matorrales xerófilos **Fig. 6**, que ocupan el primer lugar en extensión (32.9 %) y que incluye el matorral crasicaule que se caracteriza por la presencia de cactáceas columnares el matorral desértico rosetófilo donde dominan los agaves y las lechugillas; los mezquitales ubicados en las planicies aluviales; los chaparrales que se encuentran como vegetación de transición en la parte baja de las sierras altas complejas, también bastas extensiones de selvas de hoja caediza, que son el segundo tipo de vegetación dominante en la Reserva, con un 24.1% de la superficie total (Dávila, et al 2002).



Figura 5. Matorral xerófilo del Valle de Tehuacan, en la imagen se observa *Myrtillocactus geometrizans*, una de las especies dominantes.

El Valle de Tehuacán es una de las zonas áridas más importantes de nuestro país, debido a la alta riqueza específica, diversidad biológica y endemismo de diversos grupos vegetales y animales. Así, se ha reportado una alta diversidad de mamíferos (Rojas y Valiente 1996), aves, anfibios y reptiles, así como para varios grupos de plantas (Villaseñor, et al 1990; Dávila, et al 2002).

Entre las causas de esta elevada diversidad y riqueza de especies en el Valle destacan su compleja historia geológica, la actual influencia de las zonas biogeográficas Neártica y Neotropical, así como la cercanía de áreas húmedas de varios estados como Oaxaca y Guerrero, las cuales forman un corredor estacional y altitudinal que permite la entrada de especies de afinidad métrica (Dávila et al, 2002). Asimismo, el Valle se caracteriza por la presencia de un complejo escenario fisiográfico y un diverso rango altitudinal que tienen como consecuencia la formación de diferentes tipos de suelo y de vegetación (Dávila et al. 2002).

III.2. Toma de la muestra

Se realizaron dos colectas en el Valle, una al terminar el periodo de lluvias (14 de noviembre del 2006) y la otra en temporada de secas (13 abril de 2007). En cada colecta se tomaron varias muestra al azar, se tomó una porción de la costra con ayuda de una espátula, y ésta se colocó en cajas petri desechables, las cuales fueron transportadas al laboratorio de Microbiología, UBIPRO FES-I.

III.3. Cultivo

En el laboratorio, se revisaron cinco muestras al azar de cada colecta, se tomaron fragmentos de la costra que fueron revisados mediante el microscopio estereoscópico y se aisló a la cianobacteria *M. paludosus*, la cual se sembró en cajas

petri estériles que previamente fueron llenadas con medio de cultivo solidó BG11 a diferentes concentraciones de nitrógeno 0.52g/L NaNO₃ (BG16:1), 1.5g/L NaNO₃ (BG11) y 0g NaNO₃ (BG11₀) (**Tabla 1**). Después, las cajas fueron colocadas en la cámara de crecimiento modelo EGC TC2, controlando las condiciones de crecimiento, una temperatura de 25 °C y humedad de 70%, con un fotoperíodo de 12:12 luz-oscuridad.

Para revisar el crecimiento de la cianobacteria en condiciones de oscuridad, las cajas petri a las diferentes concentraciones de nitrato fueron cubiertas evitando el paso de la luz.

Tabla 1. Composición media estándar

Ingredientes por litro											
Medio	H ₂ O _{dd} (ml)	NaNO ₃ (g)	K ₂ HPO ₄ (g)	MgSO ₄ • 7H ₂ O (g)	CaCl ₂ • 2H ₂ O (g)	Ác. Cítrico (g)	Citrato férrico de amonio (g)	EDTA ^a (g)	NaCO ₃ (g)	Metales Traza A ^{5b} (ml)	Agar Purificado (g)
BG0	1000	0	0.04	0.075	0.036	0.006	0.006	0.001	0.02	1	10
BG16:1	1000	0.52	0.04	0.075	0.036	0.006	0.006	0.001	0.02	1	10
BG11	1000	1.5	0.04	0.075	0.036	0.006	0.006	0.001	0.02	1	10

^aEDTA, Etilenediaminatetraacetato (sal disódica).

^bA⁵ Solución de metales traza (gramos por litro): H₃BO₃, 2.86; MnCl₂•4H₂O, 1.81; ZnSO₄•7H₂O, 0.222; NaMoO₄•2H₂O, 0.39; CuSO₄•5H₂O, 0.079; Co(NO₃)₂•6H₂O, 0.0494.

Para realizar la caracterización morfológica y determinar las fases del ciclo de vida de *M. paludosus*, en el medio sólido BG11 a las diferentes concentraciones de nitrógeno se sembraron 10 filamentos de la especie del mismo tamaño en promedio, separando estos varios milímetros entre sí. Del cultivo BG16:1 donde se favoreció el crecimiento de *M. paludosus*, se hicieron resiembras hasta obtener un cultivo axénico para la extracción de DNA.

III.4. Extracción y determinación de pigmentos fotosintéticos

Para la extracción de clorofila se tomaron 30mg de cultivo a las diferentes concentraciones de nitrato, cada muestra se colocó en solución y se centrifugó en un tubo eppendorf a 14 000 rpm durante 10 min para quitar el exceso de agar; el precipitado se resuspendió en 1 ml de metanol puro, se agitó la muestra y se mantuvo 24 hrs a 4°C en oscuridad, posteriormente se centrifugó a 14 000 rpm durante 5 min, se midió la densidad óptica del sobrenadante a 665 nm, usando metanol como blanco.

Para calcular la concentración de clorofila, se aplicó la fórmula de (Marker 1972), midiendo la concentración de clorofila en µg/ml a partir de la siguiente ecuación:

$$\mu\text{g de clorofila/ml} = 13.14 \times \text{DO } 665\text{nm}$$

III.5. Descripción morfológica y ciclo de vida.

Se realizaron preparaciones permanentes fijadas con gelatina glicerizada de la especie *M. paludosus* en condiciones naturales, las cuales después se observaron en microscopio óptico.

Para observar el efecto de las diferentes concentraciones de nitrógeno sobre *M. paludosus*, se hicieron preparaciones permanentes del crecimiento en el medio a las tres diferentes concentraciones de nitrógeno. Las preparaciones fueron observadas en microscopio óptico. Se tomaron fotografías de las preparaciones en condiciones naturales y en cultivo y se hizo un registro gráfico aproximadamente cada dos días a partir de que se cultivo para obtener las fases del ciclo de vida y realizar la caracterización morfológica, para lo cual se tomaron en cuenta caracteres como el

color, tamaño y forma de las células. Además realizamos mediciones del ancho y largo de 50 células de diferentes tricomas presentes en cada tipo de medio. Los datos obtenidos de la medición fueron analizados con ANOVA de 1 factor.

III.6. Extracción de DNA

Del cultivo axénico de *M. paludosus* se tomaron de 10-20 mg de biomasa y se realizó la extracción de DNA mediante el método de Xantogenato de (Tillett y Neilan 2000) La muestra se resuspendió en 50 μ l de TER (10mM Tris.HCl, pH7.4; 1 mM EDTA, pH8; 100 μ l/ml RNasa), posteriormente se le adicionaron 750 μ l de buffer XS (1% Xantogenato etil de potasio; 100 mM Tris.HCl, pH 7.4; 20 mM EDTA, pH 8; 1% SDS; 800 mM acetato de amonio), se incubó a 70° C por 120 min en baño maría, se colocó 30 min en hielo, se centrifugó 14000 rpm durante 10 min. Se transfirió el sobrenadante a un tubo limpio, al cual se le agregó previamente 750 μ l de isopropanol, se centrifugó 14000 rpm 15 min, el pellet se lavó con etanol 70%, se secó a temperatura ambiente y después se le agregó 100 μ l de TE (10mM Tris.HCl, pH7.4; 1 mM EDTA).

Para ver la integridad del DNA se realizó una electroforesis en gel de agarosa al 1% en TBE 1x (Tris base 108 g, A. Bórico 55g, EDTA 9.3 gr pH 8 10X), teñido con bromuro de etidio. En cada pozo se colocaron 5 μ l de DNA con 2 μ l de amortiguador de corrida que lleva azul de bromo fenol, la muestra se corrió durante 60 min a 100 volts. Posteriormente se observó el gel en un transluminador con lámpara de luz UV y se fotografió con un programa de digitalización alfa imager.

III.7. Amplificación del gen de la ficocianina (PC) mediante PCR

El operon de PC contiene genes que codifican para dos subunidades, α y β . El espacio intergénico entre las dos subunidades, es una región altamente variable, la que puede ser usada para la identificación de cianobacterias a nivel de género **Fig. 3** (Neilan 1995).

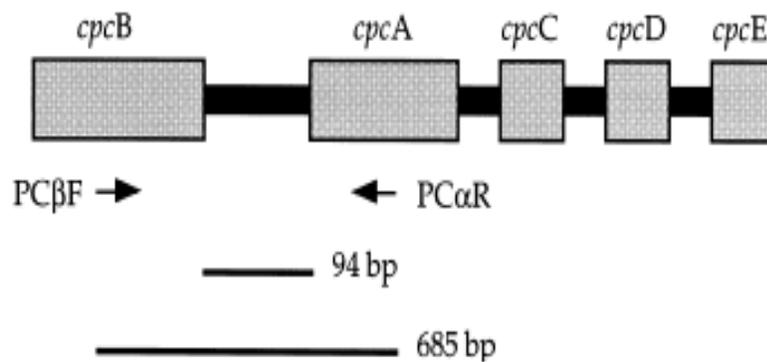


Figura 6.- Representación esquemática del operon PC. Las regiones negras indican las secuencias intergénicas; los marcos de lectura abiertos (subunidades de PC) están mostrados con los recuadros sombreados; Para la cianobacteria *Anabaena* PCC7120 (Neilan 1995).

Se diseñaron *cebadores* de 18 bases de cada uno de los extremos que flanquean al gen PC, también se utilizaron *cebadores* previamente descritos por Neilan (1995) (**Tabla 2**). Situados entre las subunidades α y β del gen PC, flanqueando una región intergénica variable.

Tabla 2- Cebadores para amplificación de PC

Cebadores	Secuencia	Referencia
RV <i>Microcoleus</i> F	GGC ATG GAA ATC ATC TTA	
RV <i>Microcoleus</i> R	ACT AAG CAG TAG GTG ATC	
PCβF	GGC TGC TTG TTT ACG CGA CA	Neilan et al. 1995
PCαR	CCA GTA CCA CCA GCA ACT AA	Neilan et al. 1995

La reacción de PCR se realizó de acuerdo al protocolo que se describe en la **Tabla 3**. La desnaturalización inicial se realizó por incubación en un termociclador a 94°C por 2 min, seguido por 30 ciclos 20s a 94°C 30s a 42°C y 60s a 72°C.

Tabla 3. Protocolo para PCR
DNA polimerasa Taq

Componente	Concentración final	Volumen
10x buffer Taq	1x	2.5 µl
2 mM dNTP	0.2 mM	2.5 µl c/u
Primer 1	0.1-1 µM	-
Primer 2	0.1-1 µM	-
Taq	1u	0.2 µl
25 mM MgCl ₂	1 mM	2 µl
DNA	10pg - 1µg	-
H ₂ O	-	-

Para visualizar el producto de la reacción se realizó una electroforesis en gel de agarosa al 1% en TBE 1x, teñido con bromuro de etidio. En cada pozo se colocaron 5 µl del producto, con 2 µl de amortiguador de corrida con azul de bromo fenol, la muestra se corrió durante 90 min a 100 volts. Posteriormente se observó el gel en un transiluminador con lámpara de luz UV y se fotografió y se analizó con el programa de digitalización alfa imager.

III.8. Secuenciación del gen de la ficocianina (PC).

Del producto de PCR, en donde se obtuvo una banda del fragmento de tamaño esperado se, tomaron 5 µl, los cuales se purificaron con Exonucleasa I y Fosfatasa Alcalina (EXOSAP) y se enviaron al laboratorio de Bioquímica Molecular de la FES-Iztacala en donde fueron secuenciados. Posteriormente la secuencia de *cpcA*, *cpcB* y la región Intergénica se alineo con MegaBLAST NCBI y las secuencias obtenidas se analizaron con el programa ClustalW, y se realizo un árbol filogenético Bootstrap con 1000 repeticiones.

IV. RESULTADOS

IV.1. Condiciones de cultivo

Se observó que la cianobacteria *M. paludosus* crece en el medio BG11 en las tres diferentes concentraciones de Nitrógeno. Las condiciones de cultivo fueron un fotoperíodo de 12:12 luz-oscuridad, una temperatura de 25 °C y humedad de 70 %, en condiciones de oscuridad no se observó crecimiento de la cianobacteria (**Tabla 4**).

Tabla 4 - Cultivo de *M. paludosus* bajo diferentes condiciones de crecimiento

Cultivo	Luz	NaNO ₃	Crecimiento
BG16:1	+	0.52g/L	+++
	-		-
BG11	+	1.5g/L	++
	-		-
BG110	+	0 g	+
	-		-

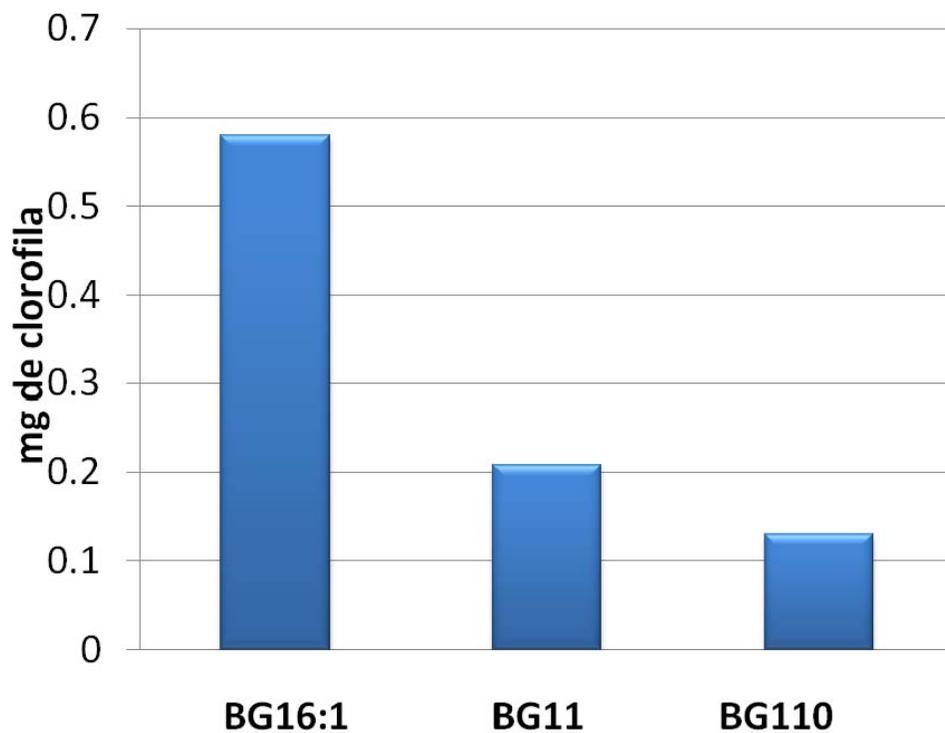
El crecimiento óptimo de la especie se observó a las dos semanas de la siembra, después de esto el medio se comenzó a deshidratar y disminuyó el crecimiento de los ejemplares. Se presentó el mejor desarrollo en BG16:1, con una concentración de 0.52g/L de NaNO₃ seguido de BG11, 1.5g/L NaNO₃ donde también se observó crecimiento, aunque éste fue más lento y en menor proporción con respecto al primero. En el medio sin nitratos BG110, 0g NaNO₃, se obtuvo un crecimiento mínimo (**Fig. 7**).



Figura 7. Dos semanas después de la inoculación observamos el crecimiento en cajas petri, acorde a los condiciones descritas en materiales y métodos **1** y **1a**) BG16:1 se observan gran cantidad de ramificaciones de los filamentos cubriendo mas del 50% de las cajas, **2**) BG11 el crecimiento es apropiado pero la filamentación es menor, no alcanzando el 50% como lo observado en BG16:1 y **3**) BG0 No se observa desarrollo de ramificación de los filamentos, además de una coloración amarillenta.

IV.2. Determinación de pigmentos fotosintéticos

En el medio BG16:1 se obtuvo una mayor concentración de clorofila 0.58 μg de clorofila por mg de cultivo, seguido de BG11 con 0.208 μg de clorofila / mg de cultivo y BG110 con 0.13 μg de clorofila /mg de cultivo (**Grafica 1**). Los resultados fueron analizados con el método estadístico ANOVA de 1 factor, siendo significativamente diferentes entre estos con α de 0.5.



Grafica 1- Se muestra la concentración de clorofila en *M. paludosus* crecido en las diferentes concentraciones de nitratos presentes en el medio, observándose diferencias significativas entre las tres determinaciones en todos los casos se tomaron 30 mg de cultivo.

IV.3. Morfología

En condiciones naturales en ambas colectas (época de secas y lluvia) se observó que la cianobacteria *M. paludosus* presenta un talo constituido por superposición de numerosos tricomas, (filamentos unitarios) de color verde azulado, agrupados dentro de una vaina gelatinosa e incolora, que se dispone distante de los tricomas y se encuentra abierta en los extremos; las células de los tricomas son rectangulares, ligeramente mas largas (5-6 μm) que anchas (3.5-4.5 μm), las células apicales se observan ligeramente cónicas. Se observó que algunos de los tricomas se pueden encontrar fuera de la vaina **Fig. 8 y 9**. Y estos tricomas presentan movimiento, que se aprecia en las cajas petri, ya que después del cultivo se empiezan a formar otras agrupaciones de *M. paludosus*.



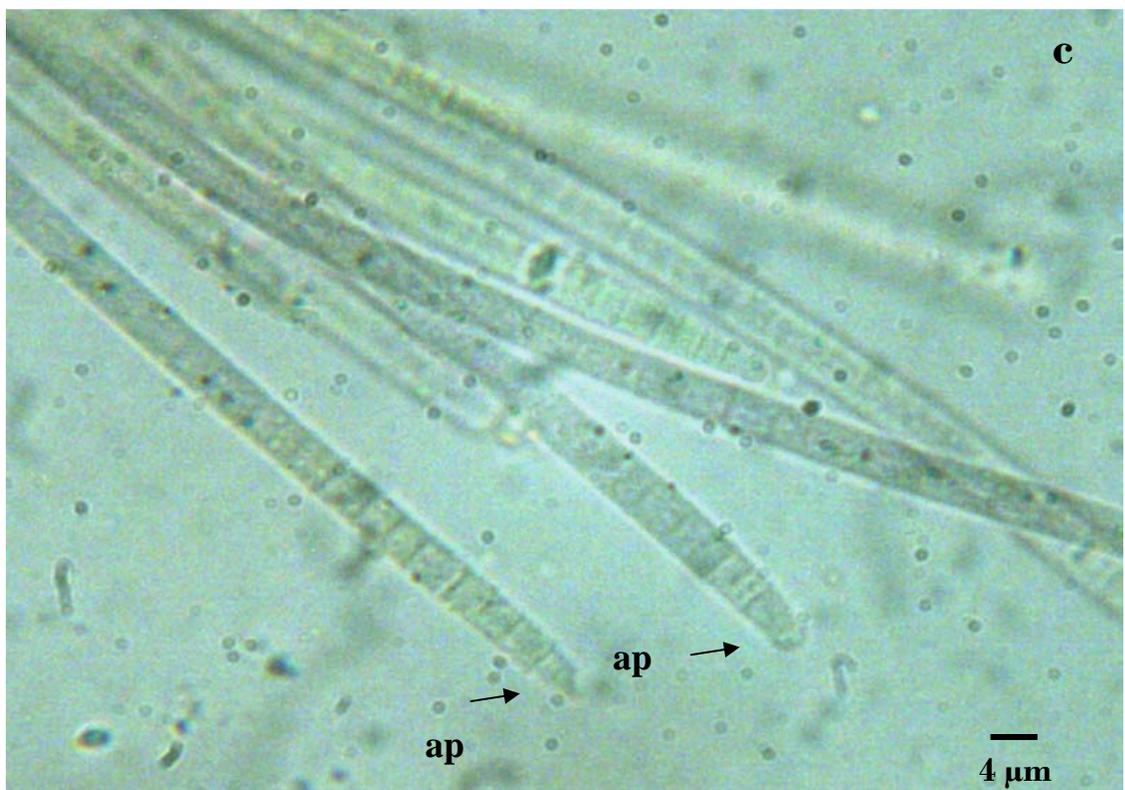


Figura 8- *M. paludosus* obtenido en condiciones naturales en la colecta al terminar el periodo de lluvias **a)** se observa la vaina (v) con el extremo abierto y filamentos (f) fuera de ésta **b)** en un mayor acercamiento se observa que la vaina es incolora y se encuentra distante de los tricomas y **c)** las células de los tricomas presentan forma rectangular, ligeramente mas largas que anchas y las apicales (ap) son ligeramente cónicas.





Figura 9- *M. paludosus* obtenido en condiciones naturales en temporada de secas **a)** se puede observa el extremo abierto de la vaina (v) y los filamentos (f) fuera de ésta **b)** se observan las células septadas de forma rectangular mas largas que anchas y **c)** se observan las células apicales (ap) con forma cónica señaladas por las flechas.

En condiciones de cultivo se observó que la vaina es mas compacta y ceñida a los filamentos, después de que se presenta un crecimiento vigoroso se desintegra y los filamentos crecen sin ésta, formando un talo unitario por superposición de tricomas, también se pueden observar ramificaciones, y filamentos libres. En los medios BG16:1 (**Fig. 10**) y BG11 (**Fig.11**) se observó una coloración azul verdosa muy intensa en comparación con la coloración en condiciones naturales, sin embargo, en el medio BG11₀ (**Fig. 12**) se obtuvo el menor crecimiento de la especie, se observó una coloración amarilla muy tenue, las células son de la misma forma que en condiciones naturales se observaron rectangulares a excepción de las células apicales que se observaron ligeramente cónicas.

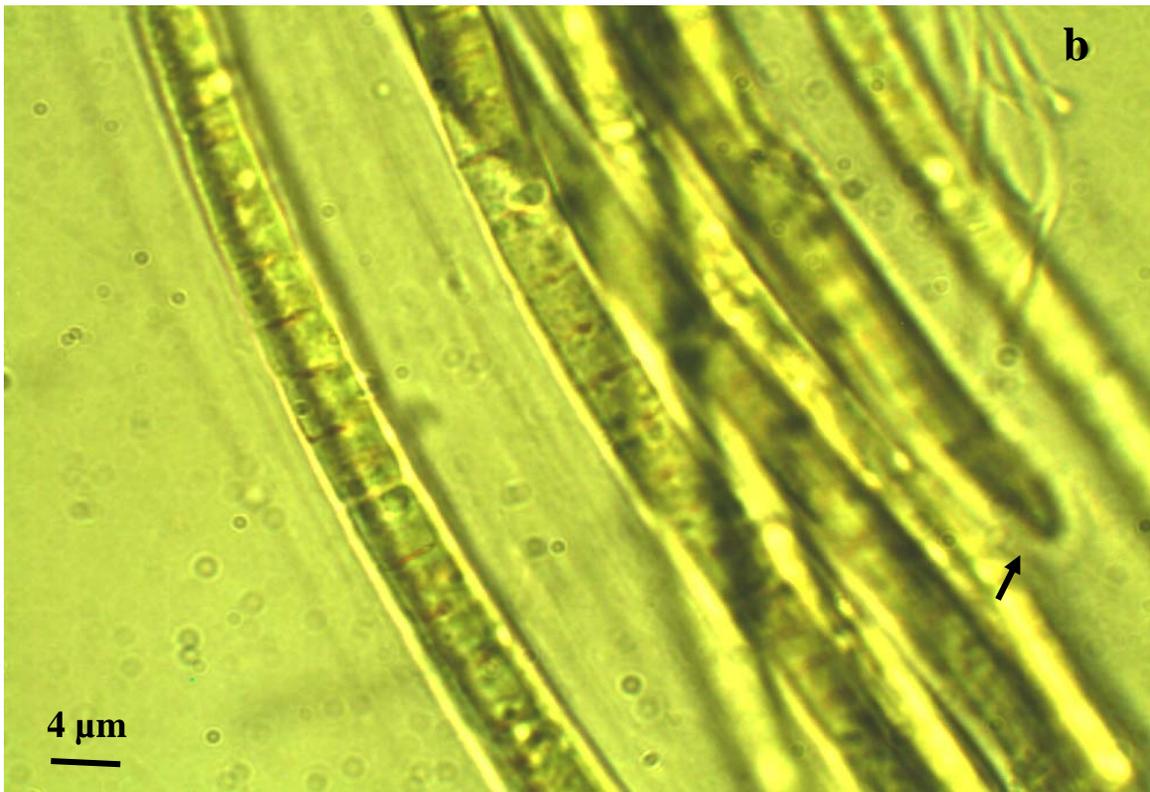


Figura 10- *M. paludosus* en el medio BG16:1 0.52g/L NaNO₃, en el que se obtuvo el mejor crecimiento de la especie **a)** se puede observar que no hay desarrollo de la vaina y los tricomas se asocian como un talo **b)** se observan las células de forma rectangular perfectamente septadas ligeramente mas largas que anchas y las células apicales, señaladas con una flecha, con forma cónica.

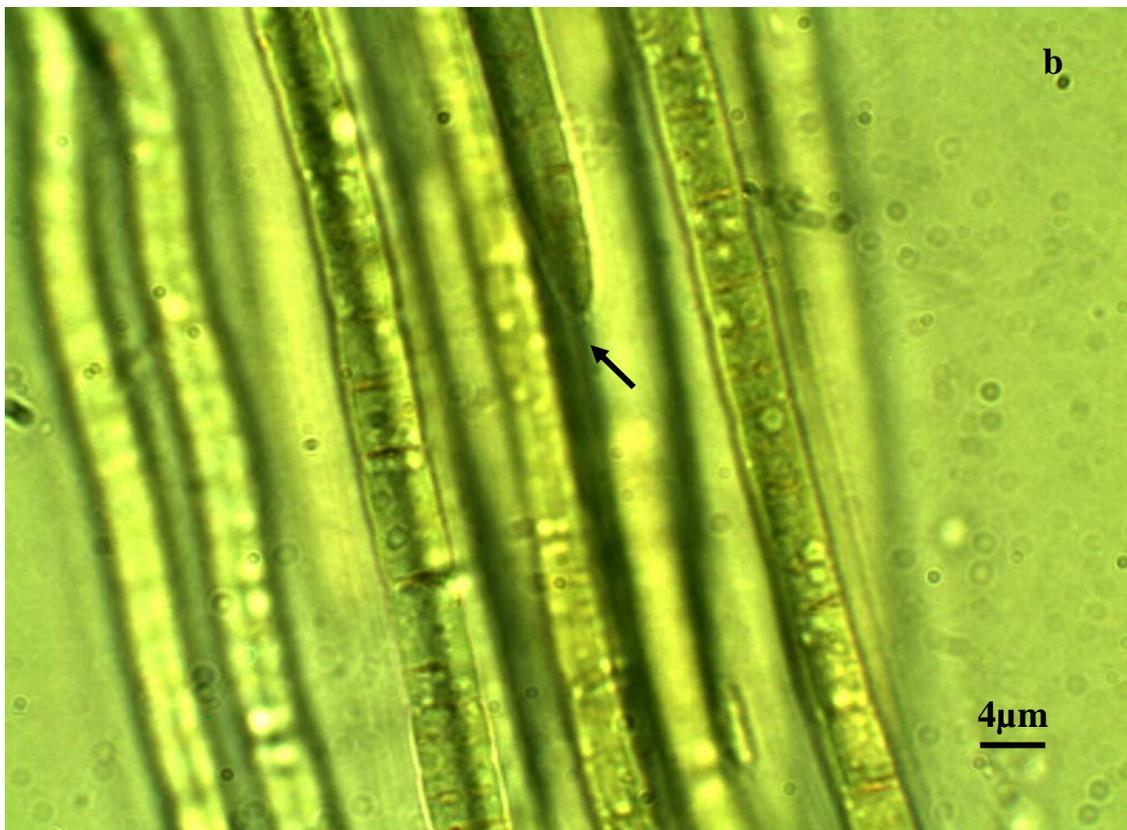


Figura 11- *M. paludosus* en el medio BG11, 1.5g/L NaNO₃, **a)** Los tricomas se observan superpuestos formando un talo unitario y las células septadas **b)** se observan mejor la forma rectangular de las células y se señalan con una flecha las células apicales cónicas.

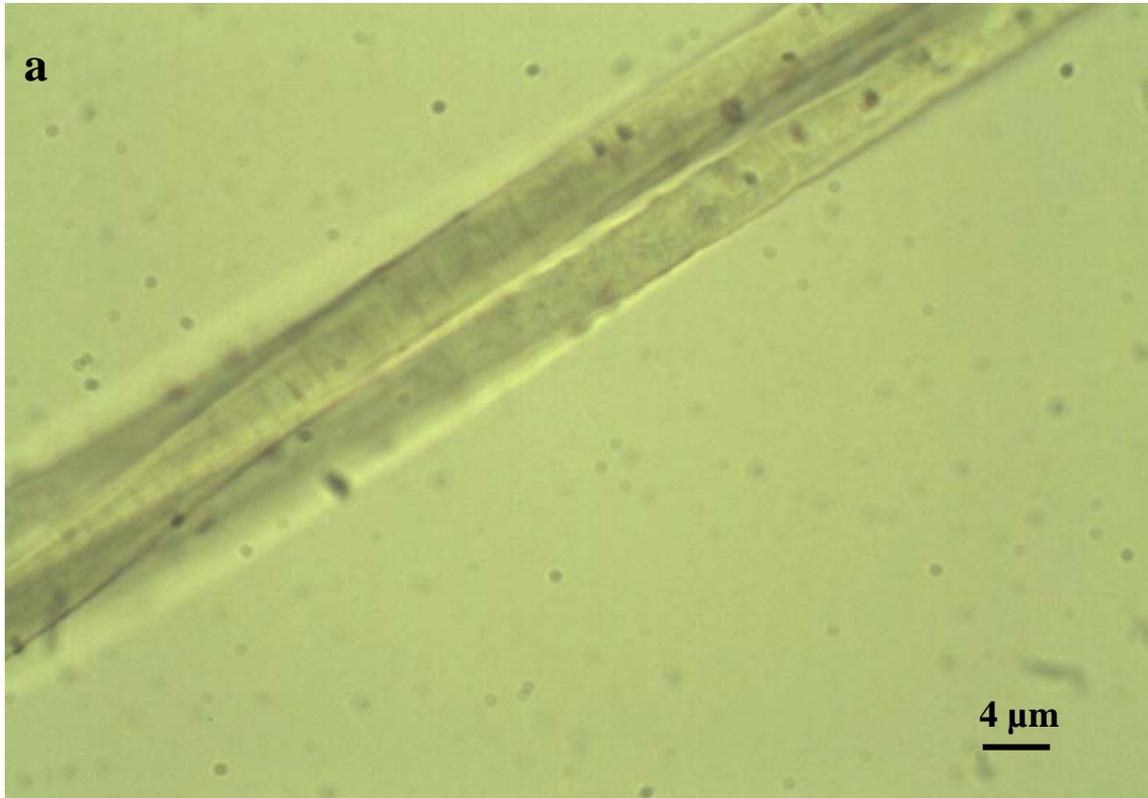
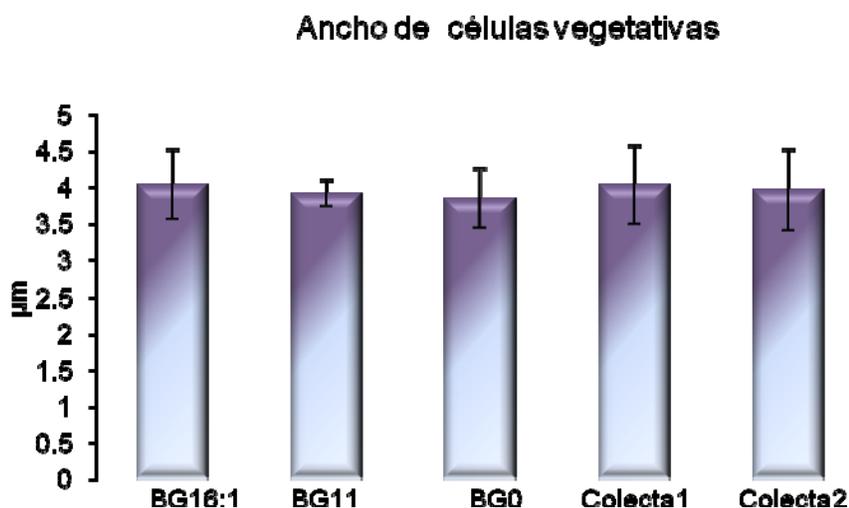
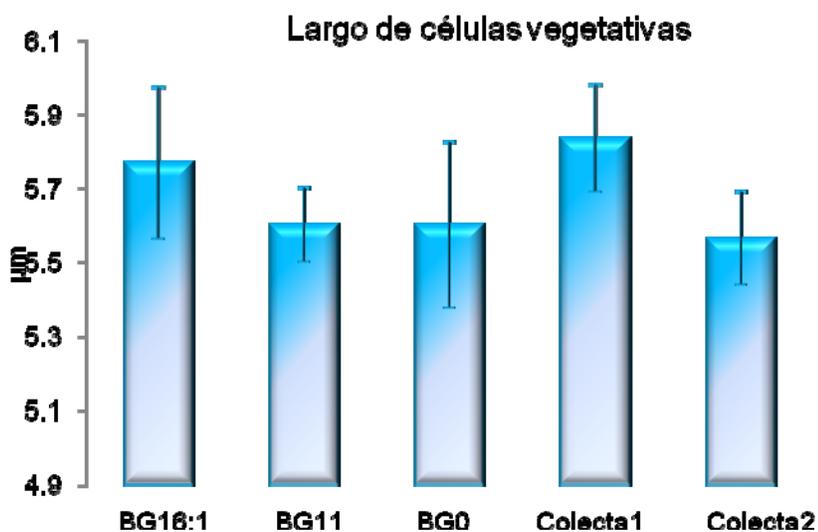


Figura 12- *M. paludosus* en el medio BG11₀, en el que se obtuvo el menor desarrollo de la especie **a)** se observa que el talo está formado por menos filamentos y no hay desarrollo de la vaina **b)** se observan las células de forma rectangular, más largas que anchas, las células apicales, señaladas con una flecha, son ligeramente cónicas.

Se cuantificó el tamaño de las células tanto en condiciones naturales y de cultivo nuestros resultados muestran largo de (5-6 μm) y ancho de (3.5-4.5 μm), indicando que no hubo diferencias significativas en ninguna de las condiciones de crecimiento, según el análisis estadístico ANOVA de un factor (Gráfica 2 y 3).



Gráfica 2- Medición del ancho de las células vegetativas del tricoma de *M. paludosus* en condiciones de cultivo y condiciones naturales, no hay diferencia significativa entre estos α 0.5



Gráfica 3- Medición del largo de las células del tricoma de *M. paludosus* en condiciones de cultivo y condiciones naturales, no hay diferencia significativa entre estos α 0.5

En la (Tabla 5) se hace una comparación de las características morfológicas de *M. paludosus* en condiciones naturales y en el medio de cultivo a las diferentes concentraciones de nitratos.

Tabla 5. Características Morfológicas de *M. paludosus* en condiciones naturales y de cultivo

Vaina		Tricomas				
		color	forma	c. apicales	ancho	largo
C. naturales						
Colecta 1	Gelatinosa e incolora, abierta a los extremos, ligeramente distante de los tricomas	verde azulado	rectangulares, ligeramente más largas que anchas	cónicas	3-4.5 µm	5-6 µm
Colecta 2	Gelatinosa e incolora, abierta a los extremos, ligeramente distante de los tricomas	verde azulado	rectangulares, ligeramente más largas que anchas	cónicas	3-4.5 µm	5-6 µm
Medio						
BG11	Carece de vaina ó se observa ceñida y desaparece.	verde azulado intenso	rectangulares, ligeramente más largas que anchas	cónicas	3.5-4 µm	5.5-6 µm
BG16:1	Carece de vaina	verde azulado intenso	rectangulares, ligeramente más largas que anchas	cónicas	3.5-4.5 µm	5.5-6 µm
BG11 ₀	Carece de vaina	amarillo tenue	rectangulares, ligeramente más largas que anchas	cónicas	3-4.5 µm	5-5.5 µm

IV.4. Ciclo de vida

La división de la cianobacteria *M. paludosus* en condiciones naturales se da intercalando la división de las células vegetativas por fisión binaria longitudinal y la rotura del filamento por necridios. Las células comienzan a dividirse nuevamente hasta que alcanzan el tamaño original, la fragmentación del filamento se da por necridios, los cuales pueden dar origen a hormogonios que son pequeños fragmentos del tricoma que sirven para la dispersión. **Fig. 13.**

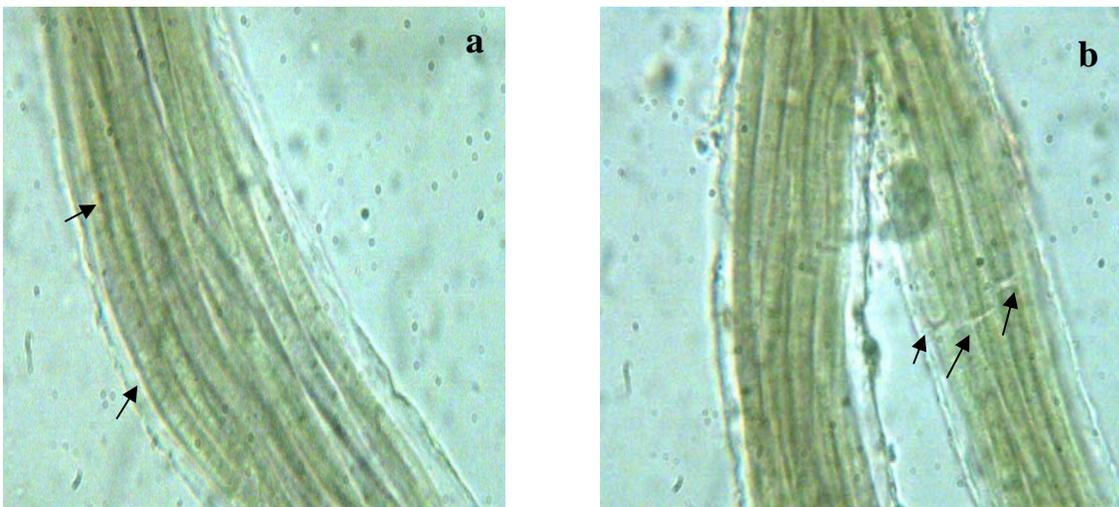


Figura 13- División de la cianobacteria *M. paludosus* en condiciones naturales **a)** se puede observar la fisión longitudinal de las células vegetativas señalado por medio de flechas, las células resultantes son más pequeñas y **b)** se observa la fragmentación de los tricomas, señalado por medio de flechas.

En condiciones de cultivo, en presencia de nitrógeno se observó un mayor número de hormogonios, éstos se forman cuando hay un estímulo, en este caso positivo, seguido de esto se da la liberación del hormogonio, el cual comienza a dividirse. No obstante en el medio BG110, no se observó la formación de hormogonios,

solamente se presentó la división de células vegetativas, probablemente porque no hay nitrógeno. Fig. 14.

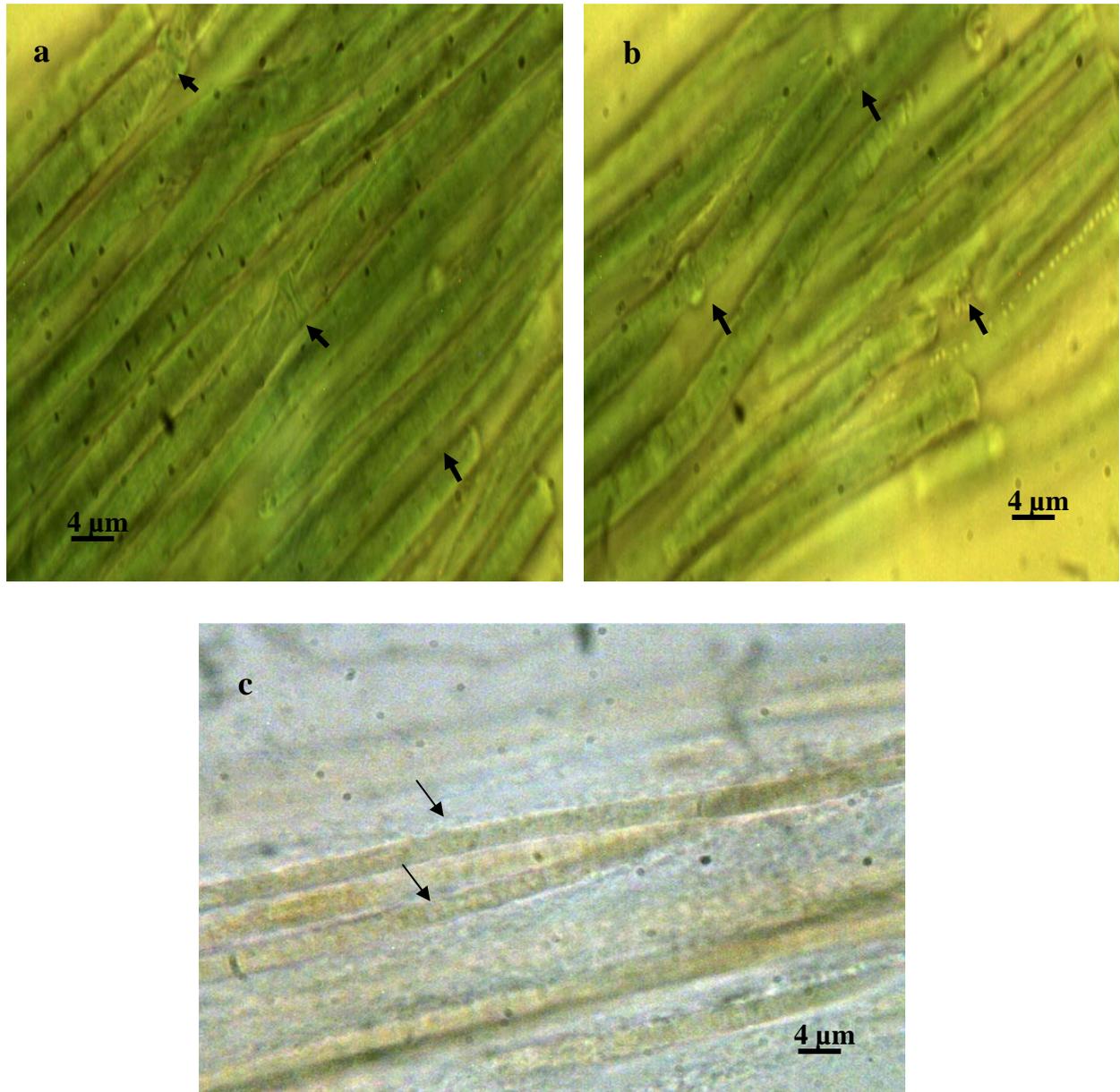


Figura 14.- División de la cianobacteria *M. paludosus* en condiciones de cultivo a) medio BG16:1, y b) BG11, en ambos las flechas señalan el gran número de necridios por los que se originan los hormogonios que se presentan en esta condición. c) División de las células vegetativas en BG110 señalado con flechas, en este último no se observaron hormogonios.

En la **fig. 15** se muestra, por medio de fotografías la secuencia del ciclo de vida de *M. paludosus* haciendo una composición de lo observado en condiciones naturales y de cultivo.

a) Se inicia con un filamento que está compuesto por un talo unitario formado por superposición de numerosos tricomas envueltos por una vaina transparente y gelatinosa.

b) Cada uno de estos tricomas está formado por células vegetativas de forma rectangular, las cuales se dividen por fisión binaria transversal al eje del tricoma, en condiciones naturales observamos principalmente este proceso.

c) El color azul-verdoso de los filamentos y la vaina (v) mucho más ceñida respecto al conjunto de tricomas fue una imagen característica del crecimiento en condiciones de laboratorio. Además en estas condiciones observamos células necridiales (N) que fragmentan el tricoma y liberando estructuras de dispersión, las denominadas hormogonios.

d) También, como ya describimos antes en este trabajo, pudimos observar la fragmentación del tricoma mediante necridios, este proceso está mediado por las condiciones ambientales ya que en condiciones de cultivo se formaron muchos más necridios (N) y por tanto más hormogonios.

e) Los hormogonios son estructuras que permiten la dispersión y reinician el ciclo de vida cuando las condiciones ambientales lo permiten, en esta imagen se observan dos hormogonios liberados.

En la **fig. 16** se propone esquemáticamente la representación de todas las fases del ciclo de vida de la especie *Microcoleus paludosus*, colectada en las costas Biológicas de Zapotitlan de las Salinas, Pue., y crecidas en medios de cultivo en nuestro laboratorio.

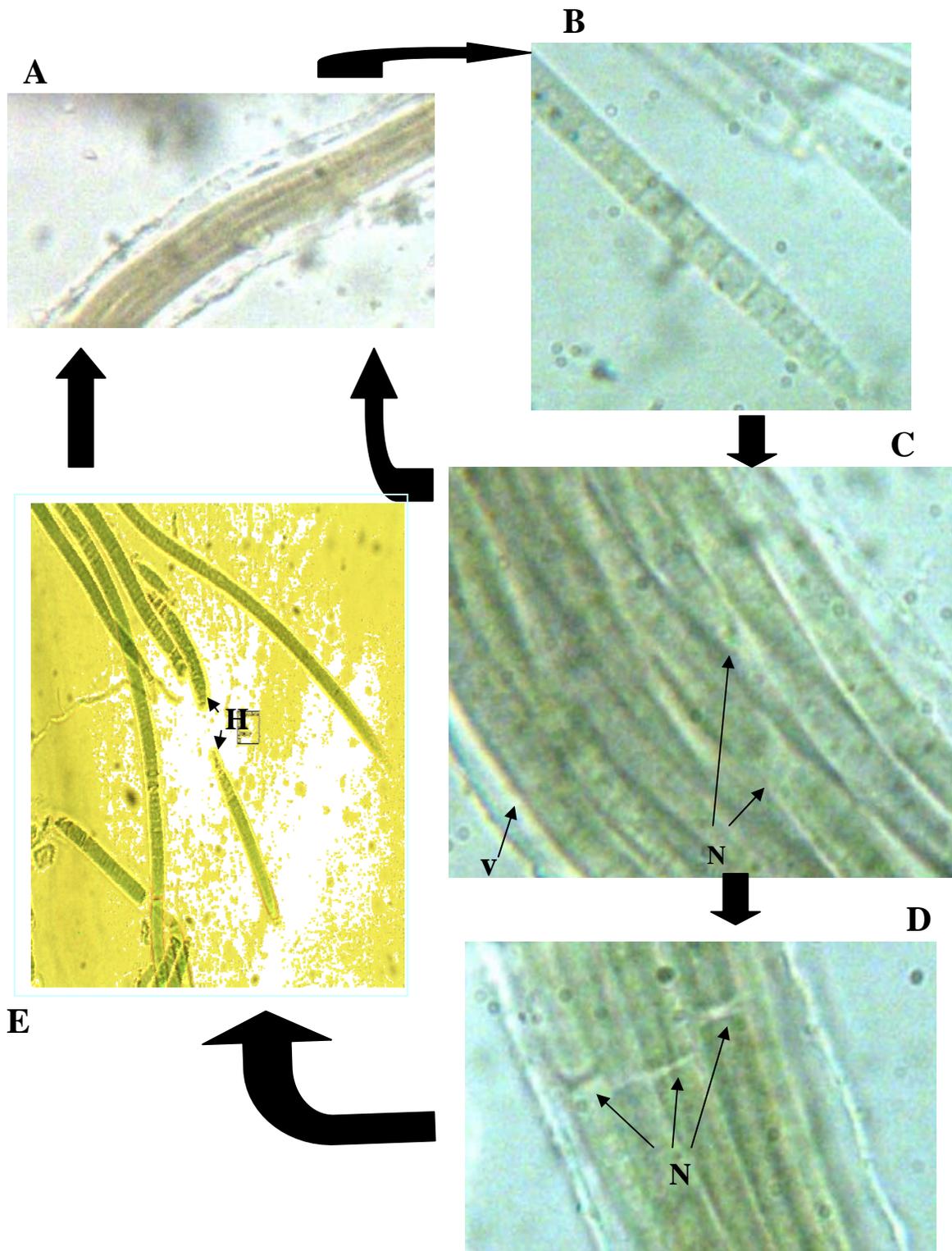


Figura 15. División de la cianobacteria *M. paludosus* A) Filamento formado por numerosos tricomas, rodeados por una vaina, B) Tricoma donde se observa las células vegetativas de forma rectangular y de coloración azul verdosa, C) cada una de estas células comienza a dividirse por fisión binaria, dando lugar a la formación de un nuevo filamento D) fragmentación de tricoma por necridios, éstos pueden formar hormogonios que son estructuras de dispersión, E) Se observa la liberación de un hormogonio, éste puede dividirse formando un nuevo filamento.

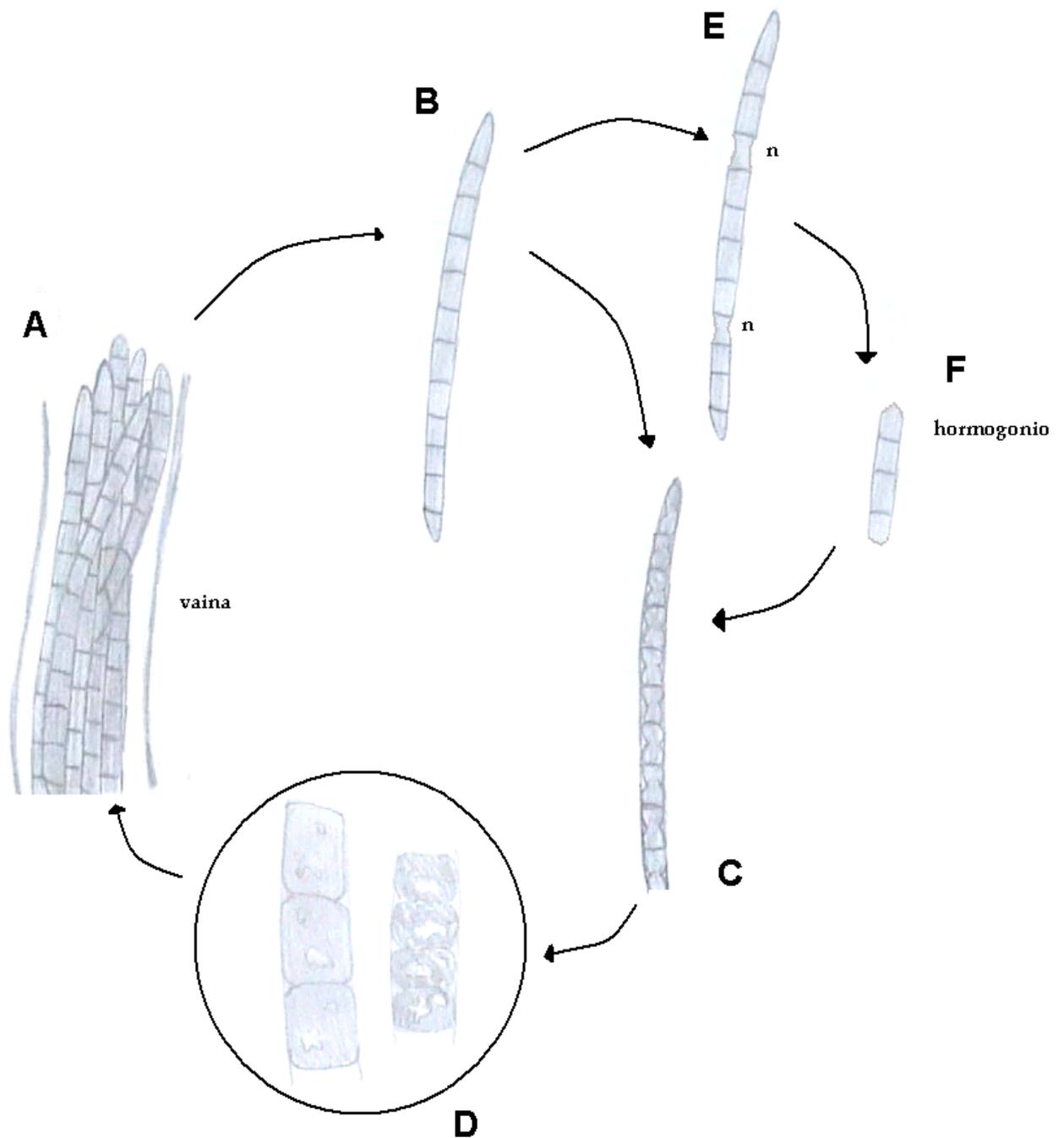


Figura 16 - Representación grafica del ciclo de vida de *M. paludosus*; **a)** *M. paludosus* en condiciones naturales donde se observan de 7 a 12 tricomas formando un talo unitario envueltos por la vaina. **b)** un solo tricoma formado por células rectangulares de 5 a 6 μm de largo y de 3.5 a 5 μm de ancho con coloración azul-verde, **c)** división de las células vegetativas por fisión binaria, **d)** recuadro de c, donde se observa que las células comienzan a dividirse y aumentan de tamaño hasta alcanzar el tamaño de la célula progenitora, **e)** Cuando hay un estímulo ambiental, se inicia la formación de hormogonios que le sirve para su dispersión ésta se da mediante necridios (n) que ayudan a la fragmentación del tricoma, **e)** liberación del hormogonio, este comienza a dividirse, una vez que las células han crecido formando un talo unitario constituido por superposición de numerosos tricomas

IV.5. Extracción de DNA y PCR

Mediante el método Xantogenato se obtuvo DNA de alto peso molecular de la cianobacteria *M. paludosus*, el DNA fue observado después de hacer electroforesis en gel de agarosa al 1% y teñirlo con Bromuro de Etidio Fig 17.

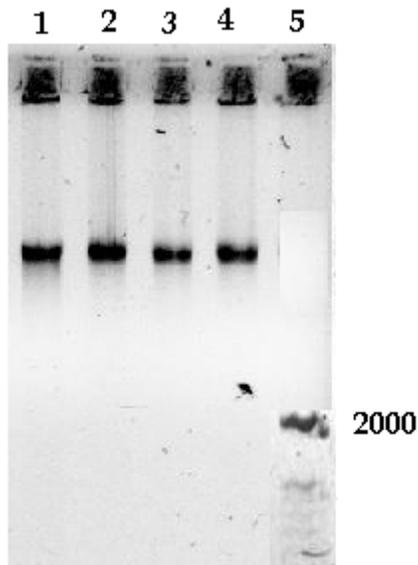


Figura 17- Electroforesis en gel de agarosa 1%, teñida con bromuro de etidio 100v 60 min. Carriles 1-4) muestras de DNA de alto peso molecular extraídas independientemente a partir de 20 mg de cultivo de *M. paludosus*. 5) Marcadores de peso molecular, el peso molecular de la banda superior del marcador corresponde a 2 kd.

Se realizaron varios ensayos de PCR con los cebadores diseñados en el laboratorio y los descritos por Neilan (1995) para el gen de la ficocianina y los ciclos de amplificación se desarrollaron conforme describimos en Materiales y Métodos. Inicialmente al realizar las reacciones a 42°C obtuvimos amplificaciones inespecíficas con los cebadores diseñados en nuestro laboratorio en tanto que los cebadores de Neilan no amplificaron (**Fig. 18**).

Con base en estos resultados ajustamos y probamos temperaturas desde 42°C hasta 50°C.

En la figura 19 se observa la obtención de una sola banda de amplificación utilizando los cebadores de Neilan (1995) y cuyo peso molecular corresponde al fragmento esperado de aproximadamente 700 pb.

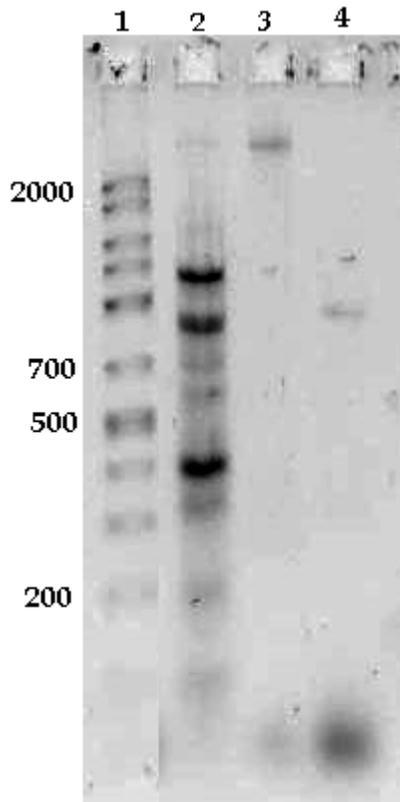
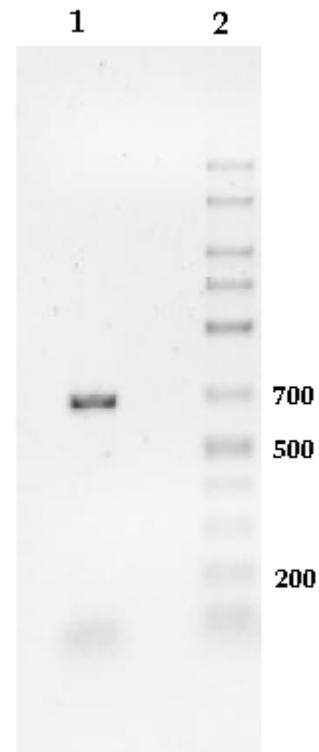


Figura 18- Electroforesis en gel de agarosa 1% teñida con bromuro de etidio, 100v 90 min.

- 1) Marcador de peso molecular.
 - 2) Amplificaciones inespecíficas con cebadores diseñados en el laboratorio, las más conspicuas no tienen el tamaño esperado.
 - 3) Amplificación con cebadores de Neilan no se observan bandas.
 - 4) Grupo control se colocó la mezcla de reacción de PCR sin DNA.
- La Temperatura de alineación en todos los casos fue de 42°C.

Figura 19- Electroforesis en gel se agarosa 1% teñida con bromuro de etido, 100v 90 min.

- 1) Amplificación del gen de la ficocianina como producto de PCR con los cebadores de Neilan
 - 2) marcador de peso molecular de 100-2000pb.
- La temperatura de alineación fue de 50°C



IV.6. Secuencia de PC

La secuenciación realizada en el laboratorio de Bioquímica molecular en la UBIPRO FES-I. de nuestro fragmento indicó que tenemos una secuencia de 660 pb. La cual se anota a continuación

```
1-60   CATTGGCATG CCGCGTCACC AGCAGCCAGT CTCGAGCTCG CTTTGGATTT GCCGCGAGAA
61-120 TCAGCAGCGT ACTGAGGTCC CTGCATCTGG GTGGTGTAGG GGAACTTTTG GTACACGGCT
121-180 TGAGCTGCAC CATCAATCAG TTGCTGAGCC TTTTGGGTCA ATGCGCGAGC AGCTTCCATG
181-240 CTGGCAGCGG CACGCTCAA GCGACCGTTA ACGGCTTGCA GTTCGGTGTG GCCTAAGAAA
241-300 CGACCTTGGG TATCGGCTGC ACCGATGGCT TCGGTAATCG GGGTCTTCAT TGTTGAGGTA
301-360 TCTCCCTAAA AGTGTTTGCA AAGTTTTCGA CTAACAACG CGATCGCTCG CGCCTATCCA
361-320 ACAGCAAGCT TGCTAGTTGT TCTTAAGCAA CAGCAGAAGA AGCACGATCG AAGTAGCTAG
321-480 CTACTTCAGA CATCAGTTGG CTACAGTCAC CCTTGGTGAT GCCAATTGGG GATCGTTAGC
481-540 GATTTTACT GCAGCTTCTT TCATCTTTTG CACGCCACCA GCAAACAAA CCACCGGGAA
541-600 ACGCCTAGGA GCTTGGTAAG GTTTCGCGCA AACCGTTCAA GGCAGCGGGT CATCCAACAC
601-660 GCTAGAATCA CCTGCGATTG TGGCGTAAGG TAACGTAGCG AAGGAAGGAT TTCCATGTCG
660-720 CGAAAACAAG CGGCCAATGG AAATTATTG CCGGGGGGAA TTGGAAAAAA AAAAAAACAA
720-735 GAAAATTAAT GATGC
```

La secuencia se analizó con el programa BLAST de NCBI, dicho programa comparó nuestra secuencia e indicó que se alinea significativamente con catorce secuencias de diferentes cianobacterias: *Nostoc sp*, *Oscillatoria sp*, *N. linckia*, *Phormidium uncinatum*, *Nodularia sp*, *Anabaena sphaerica*, *N. spumigena clone*, *Scytonema sp*, *Chroococcales cyanobacterium* y *N. spumigena*. Posteriormente cada una de las secuencias se alineó con la secuencia de *M. paludosus* mediante el programa ClustalX y se realizó un árbol filogenético Bootstrap con 1000 repeticiones (**Fig. 20**). El árbol presenta una tricotomía agrupando especies pertenecientes a dos ordenes, *Nostocineae* y *Oscillatoriineae*, *M. paludosus* presenta mayor similitud 70% con *Anabaena* lo cual coincide con el árbol realizado con la subunidad 16S RNA (Komárek 2005).

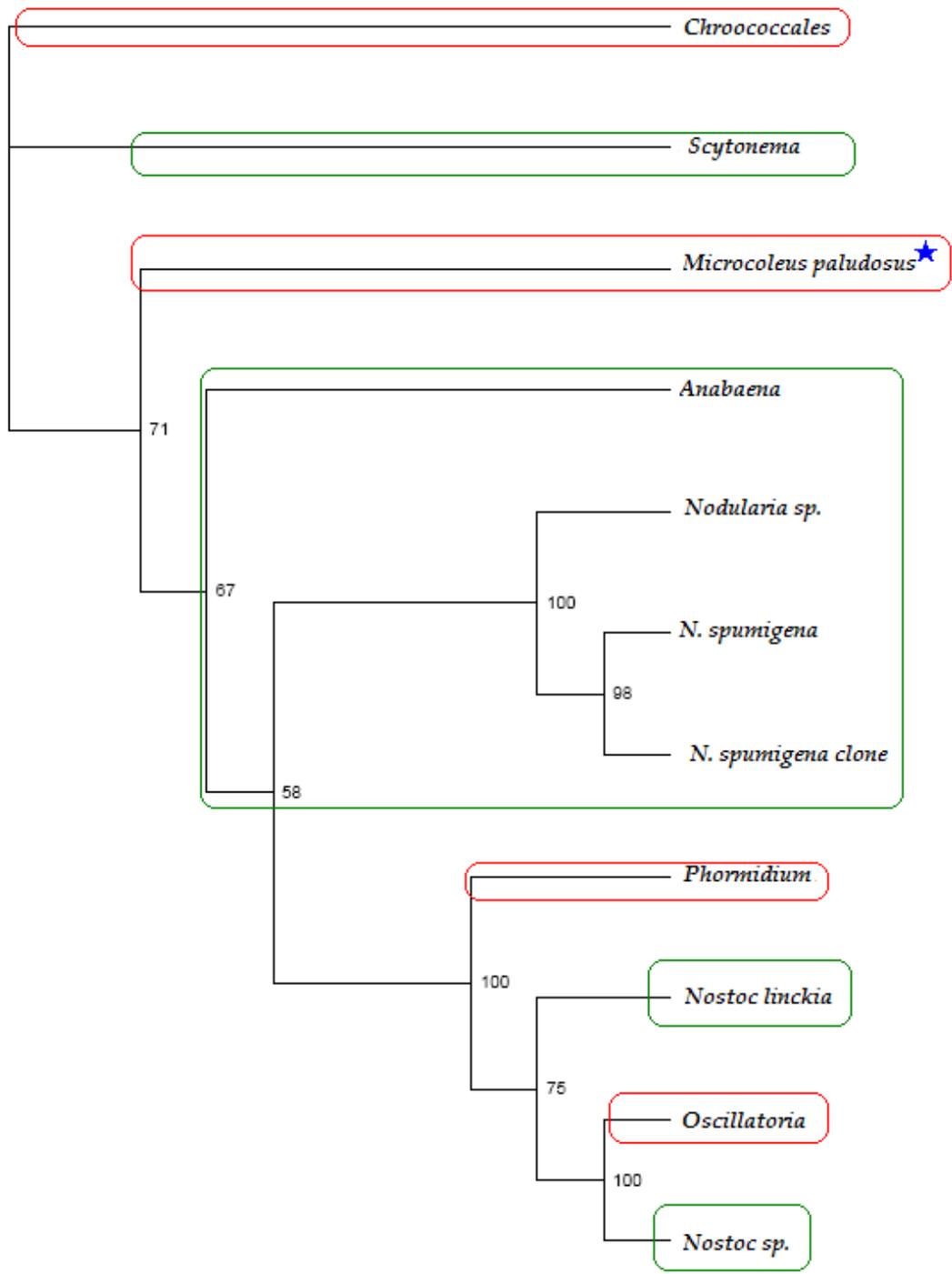


Figura 20. Árbol filogenético de la secuencia del gen de la ficocianina de diferentes cianobacterias, señalado con una estrella a *M. paludosus*. En el esquema se observa una tricromía que agrupa a dos ordenes de cianobacterias señalado con verde el orden *Nostocineae* y con rojo *Oscillatoriineae* de acuerdo a la clasificación de Komárek 2005.

V. DISCUSION

Para el estudio de diversas cepas de cianobacterias (de acuerdo con sus condiciones fisiológicas) es necesario optimizar su crecimiento en medios de cultivo, estos varían de acuerdo a la especie, el medio BG11 es usado para cepas de diferentes hábitats incluyendo zonas áridas, este medio utiliza concentraciones de nitrato muy altas y concentraciones de fósforo relativamente bajas. Para profundizar el estudio y caracterización de la cianobacteria *M. paludosus*, se optimizó su crecimiento en condiciones de cultivo, utilizando medio BG11 a diferentes concentraciones de Nitratos, encontrando que las mejores condiciones para su crecimiento en este trabajo fueron el medio de cultivo con nitratos (BG16:1 0.52g/L NaNO₃) a un fotoperiodo de 12:12 luz-oscuridad, una temperatura de 25 °C y humedad de 70%. Podemos decir que existe una concentración óptima en el uso del Nitrógeno en forma de Nitrato ya que como se observa en la gráfica 1 donde se midió la concentración de clorofila, el medio que contiene 0.52g/L NaNO₃ es en el que mayor cantidad de clorofila por mg de cultivo se obtuvo. Los requerimientos nutritivos para un crecimiento *in vitro* óptimo varían con la especie, e incluso son específicos de acuerdo a la respuesta que se desea obtener, en el caso de cianobacterias un factor importante es la fuente de nitratos que ésta produce gran variabilidad tanto en el crecimiento como en la composición bioquímica (Loreto 2005). El nitrógeno es un elemento necesario en la composición de proteínas, ácidos nucleicos, y otros componentes moleculares, siendo así una molécula esencial para el crecimiento de todos los organismos. Las cianobacterias pueden utilizar el N₂ atmosférico, el cual es reducido y luego fijado en la forma de iones NH₄⁺, este proceso es mediado por la nitrogenasa (Figueroa 2004). *M. paludosus* es una cianobacteria filamentosa sin heterocistos, fijadora de N₂ (Sroga 1997), en condiciones naturales pero debido a que la nitrogenasa es inactivada por el O₂, el proceso se lleva a cabo separado de la fotosíntesis, de tal manera que la fijación de N₂ solo ocurre durante la oscuridad, en el fotosistema I, donde no se

libera O_2 (Bergman 1997) También derivado de nuestra grafica 1 pudimos observar que cuando no hay $NaNO_3$ en el medio la cantidad de clorofila sintetizada fue la menor.

En condiciones de cultivo, la proliferación de la cianobacteria *M. paludosus* en el medio BG11 indica que esta especie puede desarrollarse a diferentes concentraciones de nitratos, o sin éstos. En el medio BG16:1 y BG11 la cianobacteria toma el nitrógeno del sustrato así se reduce la actividad de la nitrogenasa, que es el mecanismo conformacional que proteja la nitrogenasa de su inactivación por O_2 . Sin embargo, en el medio sin nitratos se observa una disminución en el crecimiento de la especie, con respecto a lo observado en BG16:1 y BG11, debido quizás, al no haber nitratos en el sustrato, ésta tiene que fijarlo de N_2 atmosférico, puesto que en las condiciones experimentales el medio está limitado de N_2 la cianobacteria no se está desarrollando, para corroborar si esto limita su crecimiento se tendría que dar un flujo de aire, y medir la actividad de la nitrogenasa; de acuerdo con Bergman (1997) quien explica que las cianobacterias sin heterocistos pueden fijar nitrógeno aeróbicamente, pero la síntesis de la nitrogenasa solo se da en presencia de aire.

El crecimiento óptimo de la cianobacteria *M. paludosus* fue en el medio BG16:1 0.52g/L $NaNO_3$, seguido del medio BG11, 1.5g/L, a esta concentración la cianobacteria se desarrolla pero en menor proporción de lo observado en BG16:1, esto debido tal vez a que una concentración elevada de nitratos esta afectando el crecimiento de la cianobacteria, sin embargo no se observó que esté alterando la morfología.

El crecimiento de la cianobacteria se dio en un fotoperíodo de 12:12 hrs luz-oscuridad, ya que *M. paludosus* es una cianobacteria fotosintética. Los organismos fotosintéticos capturan la energía lumínica a través de la clorofila y otros pigmentos; esta energía hace que fluyan electrones del H_2O , a un aceptor

electrónico, convirtiéndola en energía química de compuestos orgánicos reducidos, la cual es utilizada para fabricar glucosa y otros componentes orgánicos (Leninger, 1999). Aunque está reportado que algunas cianobacterias pueden crecer y fijar nitrógeno en condiciones de oscuridad si disponen de suficientes sustratos orgánicos. En el cultivo de la cianobacteria *M. paludosus*, en condiciones de oscuridad no se observó desarrollo de la misma, debido quizás a la carencia de la fuente principal para la ruptura de la molécula de H₂O que es la energía lumínica, que es necesaria para la formación de ATP. Y esto quizás limita su capacidad de tomar los nutrientes del medio, y esto se reflejó afectando el crecimiento.

Las cianobacterias como otros organismos vivos, responden a cambios físicos y químicos en su ambiente con las adaptaciones fisiológicas genéticamente programadas, algunas de estas modificaciones se pueden percibir fenotípicamente (Mori 2003).

Las muestras para este estudio se colectaron en el Valle de Tehuacan-Cuicatlan Puebla, que es una región semiárida, con una precipitación anual entre 400 y 450 mm, la precipitación es un factor importante que influye significativamente en los organismos de la costra, ya que estos son fisiológicamente activos solo cuando esta húmedo y empiezan sus funciones metabólicas casi inmediatamente al llover. Por eso un factor importante es la cantidad y tiempo de las precipitaciones en un lugar dado y estas tiene impactos significativos en la función fisiológica de estas comunidades (Belnap 2004).

Las colectas se realizaron una en temporada seca y otra en temporada de lluvia, encontrando que no hubo diferencias significativas en cuanto a la morfología de la cianobacteria *M. paludosus*. En ambas colectas, en condiciones naturales, se observó que la cianobacteria presenta un talo constituido por numerosos tricomas de color verde azulado, agrupados dentro de una vaina gelatinosa e incolora, las células de

los tricomas son rectangulares, más largas que anchas, aunque en temporada seca éstas fueron aparentemente mas pequeñas, este resultado no es estadísticamente significativo.

Debido a estos resultados se infiere que el régimen de humedad causado por las temporadas secas y de lluvias no alteraron la morfología de la especie, lo cual concuerda con los datos reportados por (Belnap 2004), quien evaluó la respuesta de la CBS a alteraciones en la frecuencia de las precipitaciones encontrando que en las costras dominadas por *Microcoleus* no se ven respuestas negativas en cuanto a su abundancia y concentración de pigmentos.

En condiciones de cultivo se observó que la cianobacteria *M. paludosus* crece formando un talo constituido por superposición de los tricomas, las células se observan rectangulares ligeramente más largas que anchas, el tamaño de las células no difiere significativamente en las diferentes concentraciones de nitratos, lo que nos indica que éste no esta influyendo en su tamaño.

La vaina que se observa en condiciones naturales es una excreción de sustancias poliméricas o bien exopolisacaridos, que le sirve para retener la humedad y de protección a factores externos negativos, en condiciones de cultivo se observa mucho mas compacta, la cual después de un crecimiento vigoroso se pierde, debido a que en el medio hay una elevada humedad (70%) y esto favorece su compactación, la vaina también sirve para la unión de los filamentos, y como estos siguen creciendo formando un talo unitario se infiere que la vaina no se desintegra

En condiciones de cultivo en el medio BG16:1 y BG11 se observó una coloración azul verdosa muy intensa, sin embargo en el medio carente de nitratos se observó una coloración amarillenta muy tenue, debido a que la concentración de nitratos está influyendo en el contenido de pigmentos, ya que la ficocianina-c es una

reserva de nitrógeno y obedece a la deficiencia de éste y al proceso de degradación a fin de movilizar el nitrógeno a otras rutas metabólicas inherentes al crecimiento y síntesis de otras macromoléculas, según lo reportado por Lewitus (1990). Según los estudios de Kumar (2003) la limitación de nitrógeno resulta en la reducción de pigmentos fotosintéticos así como de clorofila a, carotenoides y ficocianina resultando en clorosis.

En cuanto a su reproducción se observó que la división de esta especie es por multiplicación vegetativa; las células vegetativas crecen y se dividen consecutivamente para perpetuar el ciclo celular cuando los nutrientes son ilimitados, estas células vegetativas se pueden diferenciar en hormogonios, mediante la fragmentación del tricoma dentro de pequeños filamentos con ayuda de necridios. En condiciones naturales se va intercalando la división de las células vegetativas por fisión binaria longitudinal y rotura del filamento, estas células comienzan a dividirse nuevamente hasta que alcanzan el tamaño original, la fragmentación del filamento se da por necridios, los cuales pueden dar origen a hormogonios que son pequeños fragmentos del tricoma que sirven para la dispersión.

La diferenciación de hormogonios puede ser iniciada al sembrar un tricoma de condiciones naturales al medio, esto se observó en el medio a las concentraciones de nitrógeno BG11 y BG16. En el medio sin nitratos, se observó la división de las células vegetativas, pero no se observó la formación de hormogonios, lo que nos sugiere que la diferenciación de las células vegetativas requiere nitratos, o bien de la energía que se produce del metabolismo de éste.

La diferenciación de los hormogonios es parte del ciclo de vida de las cianobacterias, los hormogonios están involucrados en la dispersión y sobrevivencia de cianobacterias en hábitats naturales. El desarrollo de la cianobacteria *M.*

paludosus es determinado por las señales ambientales. El ciclo de las células vegetativas se mantiene cuando los nutrientes son suficientes. Una variedad de cambios ambientales, tanto positivos como negativos para el crecimiento inducen una diferenciación transitoria en los hormogonios que funcionan en la dispersión.

La morfología de las cianobacterias esta fuertemente influenciada por estímulos ambientales y dificulta la clasificación de grupos taxonómicos. Las secuencias de DNA juegan un papel importante en la reconstrucción de relaciones evolutivas entre organismos y en la clasificación genética que puede solucionar el conflicto con la taxonomía tradicional. Por eso la aplicación de técnicas moleculares para la identificación de cianobacterias es muy importante; pero éstas tiene diversas dificultades, puesto que los exopolisacaridos dificultan la extracción de DNA, también interfieren con muchos protocolos de purificación de ácidos nucleicos (López et al. 2001). La extracción de DNA de la cianobacteria *M. paludosus* se logró mediante la técnica de Xantogenato debido a que este compuesto digiere los polisacáridos.

La extracción de DNA de alto peso molecular fue exitosa y de buena calidad como lo mostraron los ensayos de PCR a partir de los cuales pudimos amplificar el gen de la ficocianina. Como lo mostraron nuestros resultados, fue necesario probar diferentes temperaturas para obtener amplificado el fragmento correspondiente al tamaño molecular del gen en cuestión. La secuenciación del fragmento nos permitió iniciar la caracterización molecular de la especie. Una vez comparada la secuencia obtenida con las reportadas y depositadas en los bancos de genes se pudo generar el árbol filogenético mostrado en la figura 20. El operon de la ficocianina puede ser usado como marcador filogenético, la sustitución de nucleótidos en regiones codificantes nos muestran pequeñas divergencias de la secuencia entre especies relacionadas cercanamente, mientras que las regiones intergenicas perciben una mayor variabilidad. Aunque relativamente pobre en

número de grupos y especies, ésta es la primera aproximación para elaborar un árbol filogenético con este gen. Nuestros resultados muestran que *M. paludosus* perteneciente al orden *Oscillatoriineae* está más relacionado filogenéticamente a la cianobacteria *Anabaena* del orden *Nostocineae*, lo cual difiere a la clasificación de Komarek 2005 donde hace análisis filogenético con 16SRNA. La distribución dispersada de las cianobacterias del orden *Oscillatoriineae* en el árbol indican que el orden es polifiletico y tiene una historia evolutiva compleja, según los resultados de Premanandh 2006 quien hace una clasificación de sepas del orden *Oscillatoriineae* obteniendo diferencias en el patrón de las ramas del árbol, indicando que el orden es polifiletico. Para evitar patrones evolutivos complejos de la región intergenica del gen PC dentro de cianobacterias Jason y Graneli 2002 sugieren incluir un locus genético adicional durante el análisis filogenético, por ejemplo, la utilización del gen *hetR* que codifica para una serin proteasa y que ha mostrado ser más específica y carece de anomalías en la secuencias, además solo se ha encontrado en cianobacterias filamentosas.

VI. CONCLUSIONES

↗ El crecimiento óptimo de la cianobacteria *M. paludosus* en condiciones de cultivo fue en el medio con nitratos BG16:1 a una concentración 0.52g/L NaNO₃ a un fotoperíodo de 12:12 luz-oscuridad, una temperatura de 25 °C y humedad de 70 %.

↗ La cianobacteria *M. paludosus* puede desarrollarse en el medio de cultivo a las diferentes concentraciones de nitratos y sin estos, demostrando que esta puede adaptarse fisiológicamente a los cambios en la concentración de este nutriente, sin alteraciones morfológicas en forma y tamaño de las células.

↗ El menor crecimiento de la especie se obtuvo en el medio sin nitratos, aunque esta cianobacteria es fijadora de N₂ se necesitaría cambiar las condiciones de cultivo para poder evaluar la actividad de la nitrogenasa.

↗ En condiciones de oscuridad no se observó crecimiento de la cianobacteria.

↗ En condiciones naturales *M. paludosus* presenta un talo constituido por numerosos filamentos unitarios de color verde azulado, agrupado dentro de una vaina, la cual en condiciones de cultivo se observó compacta y desaparece debido a que en el medio hay una elevada humedad, la vaina también sirve para la unión de los filamentos, y como estos siguen creciendo formando un talo unitario se infiere que la vaina no se desintegra.

↗ En el medio BG16:1 y BG11 *M. paludosus* conserva la coloración verde azulado que se observa en condiciones naturales, mientras que en el medio BG0 carente de nitratos presenta una coloración amarillenta debido a que la concentración de nitratos influye en el contenido de pigmentos, resultando en la reducción de pigmentos fotosintéticos.

↗ La reproducción de la especie es por multiplicación vegetativa por fragmentación de los filamentos mediante hormogonios, en condiciones naturales la especie se divide intercalando la división de las células vegetativas por fisión binaria longitudinal estas células comienzan a dividirse nuevamente hasta que alcanzan el tamaño original, en condiciones de cultivo en el medio con nitratos, se observa diferenciación de hormogonios debido a los nutrientes del medio.

↗ En el medio sin nitratos, se observó la división de las células vegetativas, pero no se observó la formación de hormogonios, debido a que la diferenciación de las células vegetativas requiere nitratos, o bien de la energía que se produce del metabolismo de este.

↗ La extracción de DNA de *M. paludosus* se realizó mediante la técnica de Xantogenato, obteniendo DNA de alto peso molecular.

↗ La secuenciación del fragmento amplificado por PCR demostró que se trata del gen de ficocianina.

↗ El árbol obtenido con este gen muestra relaciones filogenéticas de distribución dispersada de las cianobacterias del orden *Oscillatoriiineae* e indican que el orden es polifilético.

BIBLIOGRAFIA

- Amelio, E. D., Cohen, Y. and Marais, D. J., 1987, Association of a new type of gliding, filamentous, purple phototrophic bacterium inside bundles of *Microcoleus chthonoplastes* in hypersaline cyanobacterial mats, *Arch. Microbiol*, 147:213-220.
- Álvarez, A. H., 1994, Aspectos Biológicos Generales Folleto de Algas Escuela Superior Politécnica del Litoral, Pág. 1-7.
- Becerra, A. H., 2006, Efecto del nitrógeno en el ciclo de vida, morfología y el crecimiento de *Nostoc sphaericum* Vaucher, Cyanoprokaryota de un humedal tropical, Tesis de maestría, UNAM, Facultad de Ciencias.
- Belnap, J. 1994, Potential role of cryptobiotic soil crust in semiarid rangelands. In: Monsen, S.B., and S.G. Kitchen, eds. *Proceedings—Ecology and Management of Annual Rangelands*. General Technical Report INT-GTR-313. USDA Forest Service, Intermountain Research Station, Ogden, UT. Pages 179-185.
- Belnap, J., 1995, Surface disturbances: their role in accelerating desertification. *Environmental Monitoring and Assessment* 37:39-57.
- Belnap, J., 2003, The world at your feet: desert biological soil crusts, *Frontiers in Ecology and the Environment* 1:181-189.
- Belnap, J. and Eldridge, D.J., 2001. Disturbance and recovery of biological soil crusts. In: Belnap, J., Lange, O.L. (Eds.), *Biological Soil Crusts: Structure, Function, and Management*. Springer, Berlin, pp. 363-384.
- Belnap, J. and Gardner, J. S., 1993, Soil microstructure of the Colorado Plateau: the role of the cyanobacterium *Microcoleus vaginatus*. *Great Basin Naturalist* 53: 40-47.
- Belnap, J. and Harper, K.T., 1995, The influence of cryptobiotic soil crusts on elemental content of tissue of two desert seed plants: *Arid Soil Research and Rehabilitation*. 9:107-115.
- Belnap, J., Kaltenecker, J.H., Rosentreter, R., Williams, J., Leonard, S. and Eldridge, D., 2001, *Biological Soil Crusts: Ecology and Management*.
- Benedetti, S., Rinalducci, S., Benvenuto, F., Francogli, S., Pagliarani, S., Giorgi, L., Micheloni, M., D'Amici, G. M., Zolla, L and Canestrari, F., 2006, Purification

and characterization of phycocyanin from the blue-green alga *Aphanizomenon flos-aquae*, *Journal of Chromatography B*, 833:12–18

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

Bergman, B., Gallon, J. R., Rai, A. N. and Stal, L. I., 1997, N₂ Fixation by non-heterocystous cyanobacteria *Microbiology Reviews* 19:139-185.

Beymer, R.J. and Klopatek. J.M., 1991, Potential contribution of carbon by microphytic crusts in pinyon-juniper woodlands. *Arid Soil Research and Rehabilitation* 5: 187-198.

Broda, E. and Peschek, G.A., 1983, Nitrogen fixation as evidence for the reducing nature of the early atmosphere, *Biosystems* 16:1–8.

Burgheimer, J., Wilske, B., Maseyk, K., Karnieli, A., Zaady, E., Yakir, D. and Kesselmeier, J., 2006, Ground and space spectral measurements for assessing the semi-arid ecosystem phenology related to CO₂ fluxes of biological soil crusts. *Remote Sensing of Environment* 101:1-12.

Casamayor, E. O., Massana, R., Benlloch, S., Orreas, L., Diez, B., Goddard, V.J., Gasol, J. M., Joint, I., Rodriguez, V. F. and Pedros, A., 2002, Changes in archeal, bacterial and eukaryal assemblages along a salinity gradient by comparison of genetic fingerprinting methods in a multipond solar saltern, *Appl Environ Microbiol* 4:338-348.

Castenholz, R.W., 2001, Oxygenic photosynthetic bacteria. - In: Boone D.R. & Castenholz R.W. (eds): *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology* (2nd edition), 1: 473-600, Springer-Verlag, New York.

Chen, J., Zhang, M.Y., Wang L., Shimazaki, H. and Tamura, M., 2005, A new index for mapping lichen-dominated biological soil crusts in desert areas, *Remote Sensing of Environment* 96:165 – 175.

Dávila, P., M.C. Arizmendi, A. Valiente, B., Villaseñor, J. L., Casas, A. and Lira, R., 2002, Biological Diversity in the Tehuacán-Cuicatlán Valley, México. *Biodiversity. Conserv.* 11:421-422.

Eldridge, D.J. and Greene, R.S.B., 1994. Microbiotic soil crusts: a view of their roles in soil and ecological processes in the rangelands of Australia. *Australia Journal of Soil Research* 32, 389–415.

- Eldridge, D.J. y Rosentreter, R., 1999, Morphological groups: a framework for monitoring microphytic crusts in arid landscapes. *Journal of Arid Environments* 41, 11-25.
- Evans, R.D. and Ehleringer, J.R., 1993, A break in the nitrogen cycle in aridlands? Evidence from ^{15}N of soils. *Oecologia* 94: 314-317.
- Evans, R. D. and Johansen, J. R., 1999, Microbiotic crusts and ecosystem processes. *Critical Reviews in Plant Sciences*, 18(2), 183-225.
- Figueroa, R. I., Garce's, E. and Bravo, I. 2007 Comparative study of the life cycles of *Alexandrium tamutum* and *Alexandrium minutum* (gonyaulacales, dinophyceae) in culture, *J. Phycol.* 43:1039-1053.
- Flechtner, V. R., Boyer, S.L., Johansen, J.R. and DeNoble, M.L, 2002, *Spirestis rafaensis* gen. et sp. nov. (Cyanophyceae), a new cyanobacterial genus from arid soils. - *Nova Hedwigia* 74: 1-24.
- Flores, E., Herrero, A., Peter, Wolk, P.C. and Maldener, I., 2006, Is the periplasm continuous in filamentous multicellular cyanobacteria?, *Trends in Microbiology*, 14(10), 439-443.
- Friedmann, E.I. and Ocampo P. R., 1976, Endolithic blue-green algae in the Dry Valley: primary producers in the Antarctic Desert ecosystem. *Science* 193: 1247-1249.
- Garcia, P. F., and Belnap, J., 1996. The microenvironments and microscale productivity of cyanobacterial desert crusts. *Journal of Phycology* 32: 774-782.
- Gómez, L. C, Pérez, G. B, Shen, G., Schluchter, W. M. and Bryant, D., 2003 Interaction of ferredoxin: NADP⁺ oxidoreductase with phycobilisomes and phycobilisome substructures of the cyanobacterium *Synechococcus* sp. strain PCC 7002. *Biochem* 42: 13800-13811
- Harper, K. T., and Marble, J.R., 1988. A role for nonvascular plants in management of arid and semiarid rangeland. In: Tueller, P.T., ed. *Vegetation Science Applications for Rangeland Analysis and Management*. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht. Pages 135-169.

- Hense, I. and Beckmanna, A., 2006, Towards a model of cyanobacteria life cycle, effects of growing and resting stages on bloom formation of N₂-fixing species, *Ecological Modelling* 195:205–218.
- Herrero, A. et al., 2004, Cellular differentiation and the NtcA transcription factor in filamentous cyanobacteria. *FEMS Microbiol. Rev.* 28:469–487
- Janson, S. and E. Granéli. 2002. Phylogenetic analyses of nitrogen-fixing cyanobacteria from the Baltic Sea reveal sequence anomalies in the phycocyanin operon. *Int. J. System. Evol. Microbiol.* 52, 1397-1404.
- Johansen, J.R., 1986, Importance of Cryptogamic Soil Crusts to Arid Rangelands: Implications for Short Duration Grazing and Current Issues in Grazing Management Shortcourse. Washington State University, Kennewick, WA.
- Johansen, J.R., 1993. Cryptogamic crust of semiarid and arid lands of North America. *Journal of Phycology* 29, 140–147.
- Karnieli, A., Kokaly, R.F., West, N.E. and Clark, R.N., 2001, Remote sensing of biological soil crusts. In: Belnap, J., Lange, O.L. (Eds.), *Biological Soil Crust: Structure, Function, and Management*. Springer, New York, pp. 431–455.
- Komárek, J. and Čáslavská, J., 1991, Thylakoidal patterns in oscillatorialean genera. - *Arch. Hydrobiol./Algolog. Stud.* 64: 267-270.
- Komárek, J., 2005, The Modern Classification of Cyanoprokaryotes (Cyanobacteria). *Oceanological and Hydrobiological Studies*. XXXIV: (3) 5-17.
- Kumar, S. S., Uma, L. and Subramanian, G., 2003 Nitrogen stress induced changes in the marine cyanobacterium *Oscillatoria willei* BDU 130511, *Microbiology Ecology* 45:263- 272.
- Lange, O. L., 2001, Photosynthesis of soil-crust biota as dependent on environmental factors. In J. Belnap, & O. L. Lange (Eds.), *Biological soil crusts: Structure, function and management* New York' Springer. 217– 240.
- Lewitus, A. and Caron, D., 1990. Relative effects of nitrogen and phosphorus depletion and light intensity on the pigmentation, chemical composition and volume of *Pyrenomonas salina* (Cryptophyceae). *Marine Ecology Progress Series* 61: 171-181.
- Liotenberg, S., Campbell, D., Rippka, R., Houmar, J. and Tandeau, N., 1996, *Microbiology* 142: 611-622.

- Lopez C. A., García, P.I., Nübel, U. and Vazquez, J. R., 2001 Cyanobacterial diversity in extreme environments in Baja California, Mexico: a polyphasic study, *Int Microbiol*, 4:227-236.
- Loreto, C., Rosales, N., Bermúdez, J. and Morales, E., 2003, Pigment and protein production of the cyanobacterium *Anabaena* PCC 7120 in relation to nitrogen concentration and irradiance. *Gayana Bot.* 60(2): 83-89.
- Loreto, C., Mora, R., Marco, E. y Morales, E. 2005, Influencia del nitrato sobre la producción de biomasa, pigmentos y proteínas de la cianobacteria *Anabaena* sp. PCC 7120, *ciencia completa* 12(2):1-8.
- Marker. 1972, The use of acetone and methanol in the estimation of chlorophyll in the presence of phaeophytin, *Freshwater Biology* 2: 361-385.
- Matthew A., Bowker, Belnap, J. and Mark, E.M., 2006. Spatial Modeling of Biological Soil Crusts to Support Rangeland Assessment and Monitoring *Rangeland Ecol Manage* 59:519-529.
- McCune, B. and Antos, J. A., 1982, Epiphyte communities of the Swan Valley, Montana. *The Bryologist* 85: 1-12.
- Meeks, J.C. and Elhai, J., 2002, Regulation of cellular differentiation in filamentous cyanobacteria in free-living and plant-associated symbiotic growth states. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 66, 94-121.
- Mori, S., Castoreno, A., b, Mulligan, M. E. and Lammers, P. J., 2003, Nitrogen status modulates the expression of RNA-binding proteins in cyanobacteria *Microbiology Letters* 227: 203-210.
- Neiland, B., Jacobs, D and Goodmant, A., 1995 Genetic Diversity and Phylogeny of Toxic Cyanobacteria Determined by DNA Polymorphisms within the Phycocyanin Locus *Applied and Environmental Microbiology*, p. 3875-3883 Vol. 61, No. 11.
- Padyana, A.K., Bhat, V.B., Madyastha, K.M., Rajashankar, K.R. and Ramakumar, S., 2001, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 282:893.
- Paerl, H.W., 1990, Physiological ecology and regulation of N₂ fixation in natural waters. *Advanced Microbial Ecology* 2: 305-344.

- Pearson, H.W., Malin, G. and Howsley, R., 1981, Physiological studies on *in vitro* nitrogenase activity by axenic cultures of *Microcoleus chthonoplastes*. *British Phycology Journal* 16: 139-143.
- Pellant, M., Shaver, D. A. and Herrick, J. E., 2000, Interpreting indicators of rangeland health. Bureau of Land Management Technical Reference 1734-6.130p.
- Phillips, S.L., and J. Belnap. 1998. Shifting carbon dynamics due to the effects of *Bromus tectorum* invasion on biological soil crusts. *Ecological Bulletin* 79: 205.
- Ponzetti, J., Youtie, B., Salzer, D. and Kimes, T., 1998, The effects of fire and herbicides on microbiotic crust dynamics in high desert ecosystems. Unpublished report submitted to the U.S. Geological Survey, Biological Resources Division, Forest and Rangeland Ecosystem Science Center, Portland, OR. 89 Pp.
- Potts, M., 1999, Mechanisms of desiccation tolerance in cyanobacteria, *European Journal of Phycology*, 34:4,319-328.
- Premanandh, J., Priya, B., Teneva, I., Dzhambazov, B., Prabakaran, D. and Uma, L., 2006, Molecular Characterization of Marine Cyanobacteria from the Indian Subcontinent Deduced from Sequence Analysis of the Phycocyanin Operon (*cpcB-IGS-cpcA*) and 16S-23S ITS Region, *The Journal of Microbiology*, 44:6, 607-616.
- Rivera, V. A., Manuell, C. I. y Godinez, A. H., 2004. Las costras biológicas del suelo y zonas áridas, *Ciencias* 75:24-27.
- Rivera, A. V., Montejano, G. S., Rodríguez, Z. A. and Durán, D., 2006, Distribution and composition of cyanobacteria, mosses and lichens of the biological soil crusts of the Tehuacán Valley, Puebla, México, *Journal of Arid Environments* 67 :208-225.
- Rojas, M., y Valiente, B., 1996, Análisis comparativo de la quiropterofauna del Valle de Tehuacán-Cuicatlán, Puebla-Oaxaca. *Acta Zool. Mex.* 67:1-23.
- Rosentreter, R., 1986. Compositional patterns within a rabbitbrush (*Chrysothamnus*) community of the Idaho Snake River Plain. Intermountain Research Station, Ogden, UT. Pages 273-277.

- Rychert, R.C. and Skujins, J., 1974, Nitrogen fixation by blue-green algae-lichen crusts in the Great Basin Desert. Soil Science Society of America Proceedings 38: 768-771.
- Rychert, R.C., Skujins, J., Sorensen, D. and Porcella, D., 1978, Nitrogen fixation by lichens and free-living microorganisms in deserts. Stroudsburg, PA. Pages 20-30.
- .Sroga, G. E., 1997, Regulation of nitrogen fixation by diferent nitrogen sources in the filamentous non-heterocystous cyanobacterium *Microcoleus sp* Microbiology Letters 153 :11-15.
- Suda, S., Watanabe, M.M., Otsuka, S., Mahakahant, A., Yongmanitchai, W., Nopartneraporn, N., Liu, Y. and Day J.G., 2002, Taxonomic revision of water bloom-forming species of oscillatoriod cyanobacteria. – Internat. J. Syst. Evol. Microbiol. 52: 1577-1595.
- Tandau N. and Houmar J. 1993 FEMS Microbiol Rev 104: 119-190
- Temes, C.M. y Noguerol, S. A.; 2000, Estudio del género *Microcoleus* (Oscillatoriales, Cyanophyta) en el río Lourido (A Coruña, N.O. España), Portugaliae Acta Biol, 19:71-79.
- Tillett, D. and Neilan, B., 2000, Xanthogenate nucleic acid isolation from cultured and environmental cyanobacteria, Journal of Phycology, Vol 36, 251-258.
- Tomitani, A., Okada, K., Miyashita, H., Hans C. P., Matthijsk, Ohno, T.,and Tanaka, A., 1999, Chlorophyll b and phycobilins in the commonancestor of cyanobacteria and chloroplasts, Nature 400:159-162.
- Tongway, D.J., and Hindley, N., 1995, Manual for assessment of soil condition of tropical grasslands. CSIRO, Canberra, Australia. 60 Pp.
- Vergara, H. C., 1997, Abejas y cactáceas en el Valle de Zapotitlan de las Salinas, Instituto de Investigación y Postgrado/ Departamento de Química y Biología.
- Villaseñor, J. L., Dávila, P. y Chiang, F., 1990, Fitogeografía del Valle de Tehuacán-Cuicatlán. Bol. Soc. Bot. México 50:135-149.
- West, N., 1990, Structure and function of microphytic soil crusts in wildland ecosystems of arid to semi-arid regions. Advances in Ecological Research 20, 179-223.

Whitton, B., 1992, Photosynthetic Procarriotes (Eds. Mann N. H; Carr N. G.) Plenum Press, New York (USA), pp 1-51.

Woese, C.R., 1987, Bacterial evolution. *Microbiol. Rev.* 51, 221-271

Zehr, J.P. et al., 2001, Unicellular cyanobacteria fix N₂ in the subtropical North Pacific Ocean, *Nature* 412:635-638.

Pasteur Culture Collection of Cianobacteria [http ://www. pasteur.fr/ recherche/ banques/ PCC/](http://www.pasteur.fr/recherche/banques/PCC/)