



Universidad Nacional Autónoma de México

Facultad de Estudios Superiores Iztacala

**Caracterización morfológica de
Chroococcidiopsis spp. aislada del Valle de
Tehuacán, Puebla.**

Tesis que para obtener el título de bióloga

Presenta:

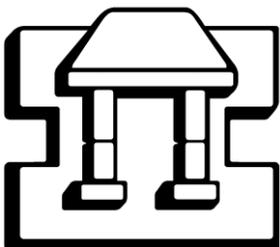
Anahi Montserrat Elias Quevedo

Director de tesis

M. en C. Ramón Víctor Moreno Torres

Unidad de Biotecnología y Prototipos (UBIPRO), Laboratorio de
Ecología Microbiana

Tlalnepantla, Estado de México 2012





Universidad Nacional
Autónoma de México



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.

ÍNDICE

	Pág.
Resumen	1
Abreviaturas y acrónimos	3
Introducción	4
Las costras biológicas del suelo	4
Importancia	5
Formación y composición	6
Cianobacterias	8
Antecedentes	14
Justificación	16
Hipótesis	17
Objetivos	
Objetivo general	18
Objetivos particulares	18
Material y método	19
Área de estudio	19
Colecta del material	22
Identificación de <i>Choococidiopsis</i> spp.	22
Descripción morfológica de <i>Chroococidiopsis</i> spp. en condiciones naturales	23
Aislamiento y condiciones de cultivo	23
Purificación del cultivo	24
Crecimiento heterotrófico facultativo	25
Descripción morfológica de <i>Chroococidiopsis</i> spp. en condiciones de cultivo	26
Resultados	28

Identificación de <i>Choococidiopsis</i> spp.	28
Descripción morfológica de <i>Chroococidiopsis</i> spp. en condiciones naturales	29
Aislamiento y condiciones de cultivo	30
Purificación del cultivo	32
Crecimiento heterotrófico facultativo	33
Descripción morfológica de <i>Chroococidiopsis</i> spp. en condiciones de cultivo	35
Formación de colonias	36
Morfología celular	43
Discusión	54
Conclusiones	65
Bibliografía	66
Apéndice I	74
Apéndice II	76

Resumen

Las costras biológicas del suelo (CBS), son el resultado de una íntima asociación entre las partículas del suelo y una comunidad de organismos altamente especializado. Por ello es posible encontrarlas en regiones del planeta con condiciones extremas para la vida; lugares donde juegan un papel esencial en la ecología, principalmente en los ciclos de nutrientes. Las cianobacterias son un grupo de bacterias fotoautótrofas, cuyo rol principal dentro de las CBS, se encuentra en la fijación de N_2 , liberación de C y formación de agregados. No obstante, a pesar del valor potencial de las cianobacterias, en el manejo de las zonas áridas, la mayoría de los estudios se han basado en cultivos de cépas; por la gran dificultad que presenta su cultivo a partir de poblaciones naturales. Esta situación representa un conflicto al comparar la morfología de los organismos en cultivo con los de poblaciones naturales, ya que muchas veces no coinciden, por expresar un fenotipo diferente, como consecuencia del ambiente al que están expuestas. Por ello el presente estudio pretende caracterizar morfológicamente al género *Chroococcidiopsis* a partir de cultivos y de poblaciones naturales de las CBS del Valle semiárido de Tehuacán, Puebla. A partir de las muestras de CBS colectadas en la región de Zapotitlán Salinas, Puebla, se realizó la identificación de los microorganismos en base a las claves del manual Bergey's, las de Waterbury, artículos especializados en el género. Se aislaron y cultivaron en los medios medio BG 11 al 1.2% de agar, BG 11 líquido estándar, BG 11 con glucosa, BG 11 con fructosa, BG 11 con glicerol y BG 11 con sacarosa a 32 °C, bajo un fotoperiodo 12/12 hrs. oscuridad/luz (los cuatro últimos permanecieron en oscuridad todo el tiempo, para comprobar su capacidad de crecimiento heterotrófico). Se describió la morfología colonial y celular de los organismos de las poblaciones naturales, así como aquellos crecidos en los diferentes medios (exceptuando BG11 con glicerol y BG 11 con sacarosa, por no presentar crecimiento de la cianobacteria). En general se obtuvo un mejor crecimiento de *Chroococcidiopsis* spp. en medio BG11 estándar a 32 °C con un fotoperiodo de 12/12 hrs. Asimismo, los principales cambios morfológicos entre los organismos en condiciones naturales y en cultivos, fueron el cambio en la coloración, la

presencia de vaina, el tamaño y la forma colonial/agregado. Finalmente, es importante recalcar la importancia y necesidad de esta clase de estudios morfológicos de cianobacterias, cuyo enfoque principal se centre en los cambios como respuesta a factores ambientales, ya que estos nos ayudaran a comprender mejor su papel ecológico en el ambiente.

Abreviaturas y Acrónimos

CBS	Costras Biológicas del Suelo
Gy	Gray (unidad básica de exposición a radiación)
Ha	hectárea (10 000 m ²)
K	Potasio
kb	kilo bases
lb	Libras
μl	Micro litros 1x10 ⁻⁶ l
rpm	Revoluciones por minuto
UBIPRO	Unidad de Biotecnología y Prototipos
u.	Unidades
UV	Ultravioleta

Introducción

Las costras biológicas del suelo

Las costras biológicas del suelo (CBS), (llamadas criptogámicas, criptobióticas, microbióticas, microflora, microfíticas o costras del suelo organogénicas) son el resultado de una íntima asociación entre las partículas del suelo y una comunidad de organismos altamente especializados (Belnap et al., 2001). Dentro de ellas se encuentran las briofitas, líquenes, microhongos, protozoos y bacterias heterótrofas y autótrofas (cianobacterias), que se desarrollan sobre la superficie del suelo, o bien en las capas superficiales de éste (Belnap y Lange 2001; Rivera-Aguilar et al., 2004).

Las CBS, a pesar de estar formadas por diversos grupos de organismos, su composición y abundancia dentro de las costras cambia dependiendo del hábitat y el tipo de suelo, variando por consiguiente su morfología externa (Fig. 1), y por tanto su papel ecológico. De acuerdo a la revisión realizada por Belnap y Lange (2001), algunos autores las han clasificado de acuerdo a una gran variedad de criterios; por ejemplo Komáromy se basó en el tipo de algas presentes; Johansen y Evans las clasificaron de acuerdo a su forma; mientras que Eldridge y Greene lo hicieron por la exposición de éstas a la superficie. Sin embargo, Belnap y Lange propusieron la clasificación actualmente reconocida de cuatro tipos de costras, basada en una clasificación topográfica, que facilita su identificación, sin importar a qué región pertenezcan: las *suaves* se encuentran principalmente en desiertos cálidos áridos e hiperáridos (poseen el más alto potencial de evapotranspiración), las *rugosas* en desiertos cálidos áridos, las *pinosas* en desiertos fríos áridos o semiáridos y finalmente las *onduladas* en desiertos fríos semiáridos y totalmente fríos (Belnap y Lange 2001; Morin, 2008).

Esta gran diversidad de formas, ha llevado a las CBS a encontrarse en los siete continentes del mundo, en absolutamente todas las regiones climáticas desde los trópicos hasta la región polar (Mazor et al., 1996; Neher et al., 2003). No obstante los organismos fotosintéticos de las costras, compiten generalmente con las plantas fanerógamas por la luz solar, razón principal de su escasez en regiones donde las plantas vasculares dominan el paisaje. Aun así es posible encontrar a las CBS donde la cubierta vegetal es dispersa (Fig. 1a), llegando incluso a constituir hasta el 70% en zonas áridas o semiáridas, debido principalmente a un aporte insuficiente de agua o a perturbaciones locales (naturales o antropogénicas) (Belnap y Lange, 2001; Belnap et al., 2001).

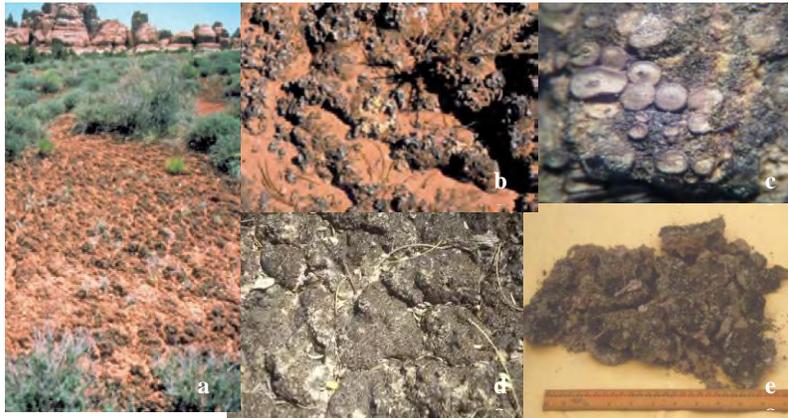


Figura 1. Se muestran diferentes fotografías de costras biológicas del suelo. a) y b) Costra biológica de la meseta del Colorado (Benlap, *et al*, 2001); c), d) y e) Costras biológicas de Zapotitlan de las Salinas, Puebla.

Importancia

Las CBS tienen un papel sumamente importante en la ecología de los lugares donde están presentes, una de sus mayores contribuciones se encuentra en los ciclos de los nutrientes. Como el del nitrógeno, el cual es considerado en muchas ocasiones como un factor limitante en la producción primaria en suelos de zonas áridas, por encontrarse en bajas concentraciones (comparado con otros ecosistemas). No obstante, las CBS son capaces de fijar anualmente hasta 100 kg N/Ha, dependiendo de las condiciones ambientales. Dentro de las CBS, las cianobacterias y algunas otras especies de bacterias son capaces de fijar nitrógeno atmosférico; por ello en lugares donde las costras presentan mayor biomasa de estos microorganismos la fijación de nitrógeno es más alta (Rivera-Aguilar et al., 2004; Belnap et al., 2001, Johansen, 1993).

Asimismo las CBS incrementan el contenido de carbono en el suelo, sobre todo en áreas de vegetación escasa o dispersa, debido a que algunos microorganismos fotosintéticos acumulan grandes cantidades de fotosintetatos. En los desiertos del sureste de Estados Unidos, se estima una producción de aproximadamente 6-23 hasta 350 kg C/Ha al año. Además, de un aumento en elementos como P y K por la presencia de las CBS. Por ejemplo, la concentración de P se logra gracias a la retención de partículas muy finas del suelo, que contienen una gran cantidad de este elemento (Johansen, 1993; Rivera-Aguilar et al., 2004).

Igualmente, esta comunidad de organismos ayuda a la estabilidad del suelo, sobre todo en aquellas costras formadas principalmente por cianobacterias y protozoos. Gracias a su crecimiento filamentososo y liberación de exudados alrededor de las células, logran unir las partículas del suelo formando agregados. De la misma forma los musgos, hongos y líquenes ayudan a la estabilización del suelo al formar agregados de éste, a través de sus hifas y rizoides (Dep. Agriculture, 1997).

Formación y composición

En general la formación de las CBS, comienza con el establecimiento y crecimiento de cianobacterias filamentosas durante eventos episódicos, en donde existe humedad suficiente y disponible para estos organismos, seguida de la captura de partículas minerales por redes de cianobacterias que gracias a la liberación de exudados mucilaginosos y ricinas, consolida el suelo bajo ellas, formando un entramado en la superficie. A continuación, llegan eventualmente pequeños protozoos, cianobacterias y otras bacterias. Finalmente se establecen musgos y líquenes, formando todos los organismos en conjunto una delgada capa áspera y desigual que va de 1 a 10 cm de espesor sobre el suelo (Fig. 2) (Belnap et al., 2001; Belnap y Lange, 2001; García-Pichel et al., 2001; Lange et al., 1992; Johansen, 1993).

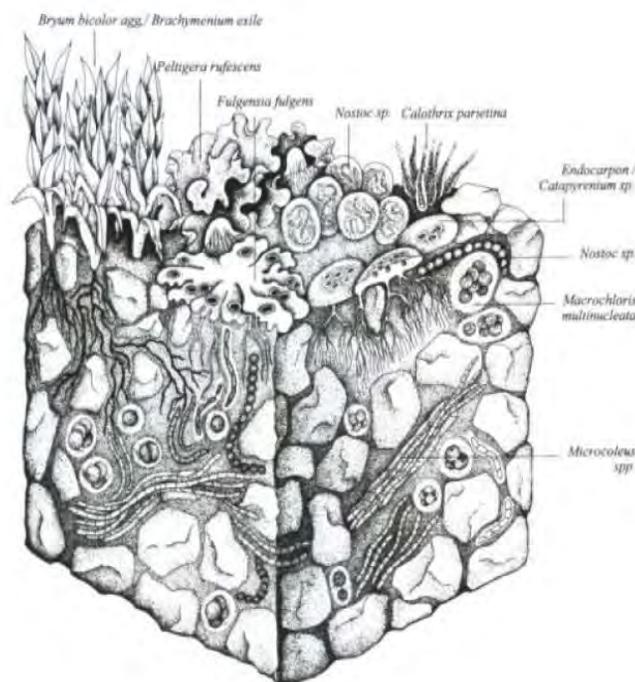


Figura 2. Corte de la capa superficial del suelo, en donde se aprecian algunos de los organismos que conforman las costras biológicas del suelo (Belnap and Lange: 2001)

Todos los organismos de las CBS, poseen características fisiológicas excepcionales que los han llevado a sobrevivir bajo condiciones extremas. Por ejemplo, son capaces de desecarse y suspender temporalmente su respiración sin efectos negativos (organismos poiquilohídricos). Asimismo, la gran mayoría de ellos poseen la habilidad de equilibrar su contenido hídrico con la humedad presente sobre la superficie del suelo o la atmosférica (Belnap et al., 2001).

Las briofitas son un amplio taxa de plantas no vasculares que incluyen a los musgos y hepáticas. Estos organismos sirven de cubierta y protección contra los rayos solares a otros microorganismos de las CBS. Asimismo ayudan a la rápida absorción de agua (Belnap y Lange, 2001).

Los líquenes son organismos formados por la asociación entre un hongo y un organismo fotosintético (alga, cianobacteria o ambas). Estos simbioses degradan la superficie de las rocas, fijan nitrógeno atmosférico (sólo aquellos compuestos de cianobacterias), sirven como refugio y fuente de alimento a moluscos, ácaros, arácnidos entre otros y son fundamentales en la formación de suelos (Coutiño y Montañez, 2000).

Los “microhongos” son el segundo grupo más abundante en los suelos, aunque su presencia y abundancia se ve afectada por la cantidad y la calidad de materia orgánica. Sus principales funciones son descomposición de materia orgánica, agregación de partículas de suelo y capacidad de retención de agua (Belnap et al., 2001; Subba, 2001).

Las algas eucariontes son un grupo de organismos unicelulares fotosintéticos, representados principalmente por especies cocoides. A pesar de tener condicionada su actividad fisiológica a la presencia de luz solar y humedad cumplen funciones importantes como la fijación de carbono (Belnap et al., 2001).

Las bacterias son el grupo dominante de microorganismos en el suelo. Estos procariontes autótrofos y/o heterótrofos cumplen funciones importantes, como fijación del nitrógeno y descomposición de sustancias tóxicas (Belnap et al., 2001; Subba, 2001).

Dentro de las bacterias autótrofas encontramos un grupo sumamente importante llamado cianobacteria. Este grupo cumple funciones muy importantes como fijación de nitrógeno y carbono, liberación de oxígeno y formación de agregados (Flores-Maya et al., 2007).

Cianobacterias

Las cianobacterias, constituyen un grupo muy diverso de procariontes fotosintéticos oxigénicos y fijadores de nitrógeno, características que las han hecho ser reconocidas como uno de los taxa más importantes de microorganismos (Domínguez, 2008; Alba-Lois, et al., 2008). Estos organismos pertenecientes al dominio eubacteria, son un grupo de amplia distribución. Se encuentran en hábitats acuáticos y terrestres, incluyendo ambientes extremos como fuentes termales, regiones polares y desiertos (Tomitani et al., 2006)

Asimismo, algunas de las características de cianobacterias, han resultado en numerosas aplicaciones benéficas para el ser humano, como la agricultura (biofertilizantes), acuicultura (indicadores de la calidad del agua), nutrición (como suplemento alimenticio, ej. *Spirulina* spp.) entre otras. (Alba-Lois et al., 2008) A pesar de la gran importancia del grupo, su estudio es de gran dificultad sobre todo para su determinación, aislamiento, purificación y desarrollo a partir de poblaciones naturales. Además de la existencia de una gran cantidad de criterios para su clasificación, que van desde los morfológicos, hasta las clasificaciones moleculares (Berrendo, 2008).

Dentro de los criterios morfológicos, existen dos códigos de nomenclatura para la clasificación de las cianobacterias, el Botánico y el Bacteriológico. El primero hace referencia a la formación de la colonia, morfología celular y envolturas extracelulares, pigmentación y reproducción. Por otro lado el código Bacteriológico, además de tomar en cuenta la morfología, también incluye características fisiológicas, bioquímicas, genéticas y ecológicas a partir de cultivos axénicos de especies aisladas. Gracias a los aportes de este último código, se reordenaron las relaciones filogenéticas de un gran número de organismos, tomándose además como referencia para futuras caracterizaciones de cianobacterias a partir de poblaciones naturales (Stanley et al., 1989; Berrendo, 2008).

Actualmente el código de Nomenclatura Bacteriológico es el más aceptado para la determinación taxonómica de las cianobacterias, gracias a su reconocimiento como

bacterias. Entre las características morfológicas a tomar en cuenta para la determinación taxonómica y caracterización de una cianobacteria (Stanley et al., 1989; Madigan et al., 2000; Waterbury, 2006; Whitton y Potts, 2009) se encuentran:

:

1. *Forma*, puede ser unicelular (*Chroococcus*) o filamentosa (*Anabaena*).
2. *Color*, depende de la concentración de clorofila a (verde), ficobilinas (azul) y ficoeritrinas (rojo-marrón).
3. *Número de planos de división*, en uno, dos o tres, existiendo además especies con divisiones asimétricas.
4. *Tamaño celular*, (diámetro), desde las especies más pequeñas que van de 0.5-1 µm hasta las especies más grandes de hasta 40µm.
5. *Vaina* (también conocida como glucocalix, cápsula, mucílago) es una cubierta mucilaginoso que une a los organismos entre si y los protege de la desecación (color y grosor).
6. *Vacuolas de gas*, son típicas de organismos planctónicos que necesitan regular su flotabilidad en la columna de agua.
7. *Heterocistos*, son células vegetativas diferenciadas terminales o intercalares en el tricoma, en donde se realiza la fijación de nitrógeno atmosférico (*Anabaena*, *Gloeotrichia*).
8. *Acinetos* son esporas de resistencia con gran contenido de sustancias de reserva, que protegen al microorganismo de desecación o congelación.
9. *Baeocitos* son producto de fisiones múltiples típicos del orden Pleurocapsal.

Del mismo modo, se toman en cuenta características de la morfología colonial o del tricoma, entre las que se encuentran (Stanley et al., 1989; Flores-Maya et al., 2007):

1. *Forma de la colonia* (en especies unicelulares), siendo circulares, rizoides, filamentosas, irregulares o espirales, asimismo se debe de considerar tanto el borde de éstas (entero, filamentosos, ondulado o lobulado) como su elevación (elevada, plana o convexa).
2. *Tipo de tricoma* (en especies filamentosas) si es cónico, recto o helicoidal, constreñido o septado, con ramas verdaderas o falsas.
3. *Patrones de formación y localización de heterocistos y acinetos*, solo en cianobacterias filamentosas

Por otra parte algunas de las características fisiológicas/bioquímicas tomadas en cuenta para la determinación y caracterización de las cianobacterias son (Stanley et al., 1989; Waterbury, 2006; Flores-Maya et al., 2007; Madigan et al., 2009):

1. *Tipos de pigmentos ficobilínicos presentes*, como son las ficocianobilinas de color azul (aloficocianina y ficocianina) y ficoeritrobilinas de tono rojo-marrón (ficoeritrinas).
2. *Temperatura óptima y su límite superior*, a pesar de existir un amplio rango de temperaturas de crecimiento, típicamente la óptima se encuentra entre los 20-35 °C, registrando casos extremos de cianobacterias capaces de tolerar hasta 74 °C.
3. *Capacidad de crecimiento heterotrófico en oscuridad y fotoheterotrofia utilizando algún sustrato*, aunque las algas verde-azules se consideran generalmente fotoautótrofos obligados, se ha evidenciado esta facultad bajo condiciones de laboratorio y con una cantidad suficiente de nutrientes (glucosa, fructosa, sacarosa).
4. *Requerimientos vitamínicos*, algunas especies marinas para su óptimo desarrollo requieren vitamina B₁₂.

Igualmente las condiciones de cultivo de las cianobacterias son de suma importancia sobre todo al describir una nueva especie, entre los puntos a tomar en cuenta están (Stanley et al., 1989; Ferris y Hirsh, 1991; Watanabe et al., 1998; Waterbury, 2006):

1. *Medio específico*, depende de la composición química del ambiente a partir de aislamiento.
2. *Intensidad de luz*, aunque todas las cianobacterias son autótrofas, no todas necesitan la misma cantidad de luz, por ello su posición en la columna de agua o en las CBS varía.
3. *Método de aislamiento*, depende completamente del ambiente y forma del propio microorganismo, no obstante se debe de tener cuidado ya que muchas técnicas utilizadas limitan en muchas ocasiones el número de cianobacterias cultivadas.
4. *Purificación*, resulta en muchas ocasiones una operación complicada y frustrante por la baja tasa de éxito al tratar de obtener cultivos axénicos. A pesar de la gran cantidad de métodos empleados no todos son aplicables a todas las especies de cianobacterias.

Las características del hábitat y/o ecológicas de las cianobacterias siempre deben de ser consideradas al momento de identificar una cianobacteria a partir de poblaciones naturales, ya que ésta nos aportará información acerca de sus requerimientos nutricionales, así como de sus características fisiológicas y bioquímicas. Por ello, es necesario realizar una descripción general del hábitat, especificando si es una especie marina, dulceacuícola (aguas estáticas o con corriente), o terrestre; desarrollada en un ambiente aerobio o anaerobio, si se encuentra en asociación con otros microorganismos (biopelículas) o en alguna relación simbiótica (cianlíquenes). Asimismo se debe especificar su hábito de crecimiento, ya sea en grupos, fascículos o no agregadas (Stanley et al., 1989; Flores-Maya et al., 2007).

En base al código de nomenclatura Bacteriológico, se han propuesto cinco grupos de cianobacterias, los cuales son (Figura 3):

- I. Orden Chroococcales; son organismos unicelulares de 0.5 a 30 μm . con reproducción por fisión binaria la cual puede ocurrir en uno, dos e incluso en tres planos (en ángulos rectos o irregulares).
- II. Orden Pleurocapsales; son cianobacterias que van desde formas unicelulares cuya reproducción es por bipartición múltiple, hasta formas que producen agregados celulares por fisión de sus células vegetativas.
- III. Orden Oscillatoriales; son algas verde-azules filamentosas sin heterocistos cuya división ocurre en un sólo plano por la fragmentación de un tricoma.
- IV. Orden Nostocales; son células filamentosas con capacidad de diferenciación (heterocistos, acinetos, hormogonios o tricomas) que se dividen en un sólo plano a lo largo del axis del tricoma.
- V. Orden Stigonematales; son microorganismos filamentosos con heterocistos capaces de diferenciar sus células como los nostocales, sin embargo se dividen por fisión binaria en múltiples planos (Stanley et al., 1989; Waterbury, 2006; Berrendo, 2008).

Chroococidiopsis es un género de cianobacterias pertenecientes al orden Pleurocapsal, cuya investigación resulta de gran interés para el estudio de la vida bajo condiciones extremas, por las características fisiológicas y ecológicas que presenta. En la naturaleza poseen una amplia distribución a nivel mundial, encontrándolas en ambientes

dulceacuícolas, marinos e hipersalinos; en espacios porosos de rocas (endolíticas e hipolíticas) o como parte de las costras biológicas del suelo en desiertos fríos y cálidos, como el de Atacama en Chile, El Valle Seco en la Antártica, y algunos otros desiertos de Indonesia y África. En México, las podemos encontrar formando parte de costras biológicas del Valle de Tehuacán, Puebla (Grilli et al., 1996; Fewer et al., 2002; Rivera-Aguilar et al., 2006; Billi et al., 2010).

En su entorno natural, *Chroococcidiopsis* es capaz de tolerar el estrés ambiental. Por ejemplo, es extremadamente tolerante a estados de desecación prologados, adaptada a crecer y realizar la fotosíntesis a bajo potencial hídrico. Esto se debe a su gran capacidad para regular su metabolismo, de acuerdo a las condiciones ambientales extremas, aprovechando al máximo los cortos periodos de agua disponible. Se ha demostrado que tienen la capacidad de sobrevivir hasta por más de 60 meses en condiciones de desecación, gracias al aumento en el grosor de su vaina (polisacaridos), entre otras cosas. Asimismo es uno de los organismos conocidos más resistentes a las radiaciones ionizantes, tolerando hasta 15 kGy, en comparación con otros microorganismos como *Eschericia coli* que resiste hasta 1 kGy o *Synechococcus* sp. cuya resistencia no supera los 2.5 kGy (Grilli et al., 1996; Billi et al., 2000; Rivera-Aguilar et al., 2006; Billi et al., 2010)

Los miembros del género *Chroococcidiopsis* son organismos unicelulares que se dividen a través de fisiones binaria (en tres planos de división), cuyo producto son agregados celulares regularmente cúbicos y fisiones múltiples simultáneas, que traen como consecuencia la liberación de numerosas células no móviles denominadas baeocitos (Waterbury, 2006).

Todas estas características han hecho que *Chroococcidiopsis* sea propuesto como modelo de investigación, para entender y apreciar los mecanismos de supervivencia de los organismos bajo condiciones de desecación extrema en la tierra. Del mismo modo, se pretende en futuras investigaciones aprovechar estas habilidades para explorar una supervivencia potencial en el espacio (ej. el planeta Marte). Asimismo, otros estudios buscan conocer más acerca de las relaciones simbióticas, por ello se han interesado en *Chroococcidiopsis*, *Gleocapsa* y *Cyanosarcina*, quienes están involucradas en la simbiosis líquénica mas antigua conocida, que data del periodo devónico. No obstante existen pocos estudios que se enfoquen en la caracterización de *Chroococcidiopsis* a partir de

poblaciones naturales, que comparen su desarrollo en campo y en cultivo (Fewer, 2001; Billi et al., 2010; Billi, 2010).



Figura 3 Microfotografías de los cinco órdenes de cianobacterias, reconocidos por el código de Nomenclatura Bacteriológico. a) Orden Chroococcales (*Chroococcus* sp.), b) Orden Pleurocapsales (*Chroococcidiopsis* sp.), c) Orden Oscillatoriales (*Oscillatoria* sp.), d) Orden Stigonematales (*Stigonema* sp.) y e) Orden Nostocales (*Calothrix* sp.) (protist.i.hosei.ac.jp/Protist_menuE.html, 2012)

Antecedentes

La mayoría de los estudios revisados sobre caracterización morfológica de cianobacterias, se centran en especies dulceacuícolas, debido a su importancia en la salud humana. Por ello se tomaron en cuenta los siguientes estudios, a pesar de tener una relación distante, (en cuanto a hábitats y géneros) con el presente estudio.

Domínguez en 2008, realizó un estudio sobre la evolución y la morfología de cianobacterias relacionadas con *Calothrix*, de cuatro sitios diferentes. Los primeros organismos provenían del Mar Báltico, los segundos de Zanzíbar (Tanzania), los terceros de Isla de Heron (Australia) y los cuartos de Cuatro Ciénegas (México). La descripción morfológica de los organismos indicó variación dentro y entre cada uno de los cultivos en cuanto a carboxisomas, vainas y temperaturas óptimas de cultivo. Las variaciones encontradas entre los organismos colectados, fueron reflejo de las diferentes condiciones ambientales de los sitios de colecta. Se analizó a los cultivos desde un enfoque ecológico, para tratar de dilucidar qué interacciones ambientales generaron las diversas morfologías de los filamentos.

Berrendo en 2008, realizó una caracterización morfológica, genética y fisiológica de cianobacterias dominantes en sistemas fluviales, donde analizó 29 cépas, de las cuales, 11 pertenecían al género *Rivularia*, 11 de *Calothrix* y 7 de *Tolypothrix*. Todos los géneros de cianobacterias descritas fueron identificadas fácilmente en la naturaleza, pero indistinguibles en cultivos de laboratorio. No obstante, gracias a técnicas tanto moleculares como morfológicas se pudieron identificar las cépas. Entre los aspectos morfológicos tomados en cuenta, se incluyeron tanto análisis macroscópicos como microscópicos, así como descripciones de los sitios de colecta. Finalmente se recomendó una aproximación polifásica al realizar un estudio de esta clase, es decir, se deben integrar datos morfológicos, fisiológicos, ecológicos y filogénicos, para evitar confusiones taxonómicas y evolutivas.

Pineda-Mendoza y colaboradores en 2011, realizaron una caracterización morfológica y molecular de cianobacterias filamentosas, aisladas de un florecimiento de tres lagos urbanos eutróficos de la ciudad de México. Lograron aislar e identificar hasta género y/o especie a la mayoría de los organismos a través de caracteres morfológicos como: forma

y tamaño de las células intercalares y terminales del filamento, grosor del filamento, presencia o ausencia de constricciones en el cruce de la pared, ausencia/presencia y color de la vaina y número de tricomas por filamentos, así como forma y tamaño de los heterocistos. De un total de 17 aislados, identificaron cépas de los géneros *Anabaenopsis*, *Arthrospira*, *Leptolyngbya*, *Limnothrix*, *Geitlerinema*, *Phormidium*, *Planktolyngbya*, *Planktothrix*, *Pseudanabaena* y *Spirulina*.

No obstante, las cianobacterias del suelo, específicamente aquellas que forman parte de las CBS son igualmente importantes tanto para el ecosistema como para el ser humano. No solo por el conocimiento de la diversidad biológica de una región, si no por sus beneficios reales y potenciales, que solo el estudio de sus características ecológicas, fisiológicas, morfológicas y genéticas nos podrá proporcionar. Por ello se hace énfasis en los dos estudios siguientes, que refieren a cianobacterias terrestres del área de estudio del presente trabajo.

Rivera-Aguilar y colaboradores en 2006, realizaron una investigación sobre la distribución y composición de cianobacterias, musgos y líquenes de las CBS, del Valle de Tehuacán, Puebla. En su estudio encontraron siete especies de cianobacterias entre las muestras de suelo colectadas. El grupo cianobacteria estuvo presente en todas las costras colectadas, de ellas las especies más comunes fueron *Scytonema javanicum*, *Microcoleus paludosus* y *Chroococcidiopsis* sp. La última especie fue dominante en las costras de áreas expuestas, debido a su gran resistencia tanto a la desecación como a la radiación UV.

Morales en 2009, realizó la caracterización morfológica y molecular de *Microcoleus paludosus*, presente en las costras biológicas del suelo en el Valle de Tehuacán-Cuicatlán, Puebla. Se registraron cambios en la morfología de la cianobacteria, sobre todo en coloración, talo y vaina, la cual varió en base a las condiciones de su entorno (CBS y los medios de cultivo BG 11, BG 16:1, BG11₀). Se encontró que este organismo, bajo condiciones de cultivo, tiene un crecimiento óptimo en medio BG 16:1 a una concentración 0.52g/L NaNO₃, con un fotoperiodo 12:12 luz/oscuridad, a una 25 °C y 70% de humedad. Finalmente a partir de los organismos en cultivo, se describieron las fases del ciclo de vida, probando además la nula capacidad de crecimiento heterotrófico de *M. paludosus*.

Justificación

Los organismos pertenecientes al género *Chroococcidiopsis* tienen entre sus principales características, una gran tolerancia a la desecación, estando adaptados para sobrevivir con muy poca agua. De igual forma, estos microorganismos poseen la capacidad de fijar nitrógeno y carbono, además de ostentar una capa de mucílago, la cual retarda la pérdida de agua de las células. Todas estas características hacen que sean muy importantes en las zonas áridas y semiáridas formando parte de las CBS, como es el caso de Zapotitlán Salinas, Puebla.

No obstante, a pesar de su gran valor potencial en las zonas áridas, por las características de *Chroococcidiopsis*, la mayoría de los estudios se han basado en cultivos de cépas; principalmente, por la gran dificultad que presenta el cultivo de estos microorganismos (cianobacterias en general) a partir de poblaciones naturales.

Esto dificulta los acercamientos reales a este género ya que existen inconvenientes en la expresión de ciertas características morfológicas (que pueden reflejar su ecología) debido a las condiciones de crecimiento o incluso perderse a causa de mutaciones.

Es por esto que resulta necesario realizar estudios que muestren tanto la morfología del género *Chroococcidiopsis* en condiciones de cultivo como en condiciones naturales.

Por ello, el presente estudio pretende caracterizar al género *Chroococcidiopsis* a partir de cultivos y de poblaciones naturales de las CBS del Valle semiárido de Tehuacán, Puebla, lo que nos permitirá identificar así posibles alteraciones en la morfología y/o fisiología propiciadas por las condiciones de cultivo.

Todo ello nos llevó a generarnos la siguiente pregunta:

¿Qué cambios morfológicos presentan los organismos del género *Chroococcidiopsis*, al encontrarse bajo diferentes condiciones ambientales, ya sean naturales o de cultivo?

Hipótesis

Si las características del medio de cultivo cambian, entonces la morfología de los organismos pertenecientes al género *Chroococcidiopsis*, de las costras biológicas del suelo cambiará en respuesta al medio en el que se encuentre. Las principales características afectadas muy probablemente serán el color (diferencia en la irradiación UV), el tamaño (cantidad de nutrimentos disponibles) y la presencia de vaina (diferencias en la cantidad de humedad).

Objetivo general

Caracterizar morfológicamente a la cianobacteria del género *Chroococcidiopsis* a partir de cultivos y de poblaciones naturales de las costras biológicas del suelo, del Valle de Tehuacán, Puebla.

Objetivos particulares

- Identificar morfológicamente a los microorganismos del género *Chroococcidiopsis* en las costras biológicas del suelo de del Valle de Tehuacán, Puebla.
- Determinar las características morfológicas que presentan los organismos pertenecientes al género *Chroococcidiopsis* provenientes de las costras biológicas del suelo del Valle de Tehuacán, Puebla en condiciones naturales.
- Determinar las características morfológicas que presentan los organismos pertenecientes al género *Chroococcidiopsis* provenientes de las costras biológicas del suelo del Valle de Tehuacán, Puebla en diferentes condiciones de cultivo.
- Comparar cualitativamente las morfologías que presentan los organismos pertenecientes al género *Chroococcidiopsis* en condiciones naturales y en condiciones de cultivo.

Materiales y métodos

- Área de estudio

El Valle de Zapotitlán Salinas se encuentra enclavado en la porción occidental del Valle de Tehuacán-Cuicatlán; es considerado parte de la región xerofítica mexicana y está localizado al Sureste del estado de Puebla y al Noreste de Oaxaca, entre los 17°39' y 18°53' latitud Norte y entre los 96°55' y 97°44' longitud Oeste (Fig. 4). El Valle limita al Este con las Sierras de Atzingo y Miahuatepec, al Norte con los cerros Chacateca y Pajarito, al Oeste con los cerros Gordo y Oate y al Sur con los cerros Yistepec y Acatepec (Dávila et al., 2002; López-Galindo et al., 2003; Rzedowski, 1981)

El área de Zapotitlán Salinas cubre un región aproximada de 400 km² (de los casi 10 000 km² totales del Valle de Tehuacán-Cuicatlán), y es considerada un centro global de endemismos y megadiversidad a nivel mundial por la *International Union for the Conservation of Nature* (IUCN). Recientemente fue declarada (1998) Reserva de la Biósfera por el gobierno mexicano y la *United Nations Educational, Scientific and Cultural Organization* (UNESCO) (Dávila et al., 2002; Rivera-Aguilar et al., 2006).

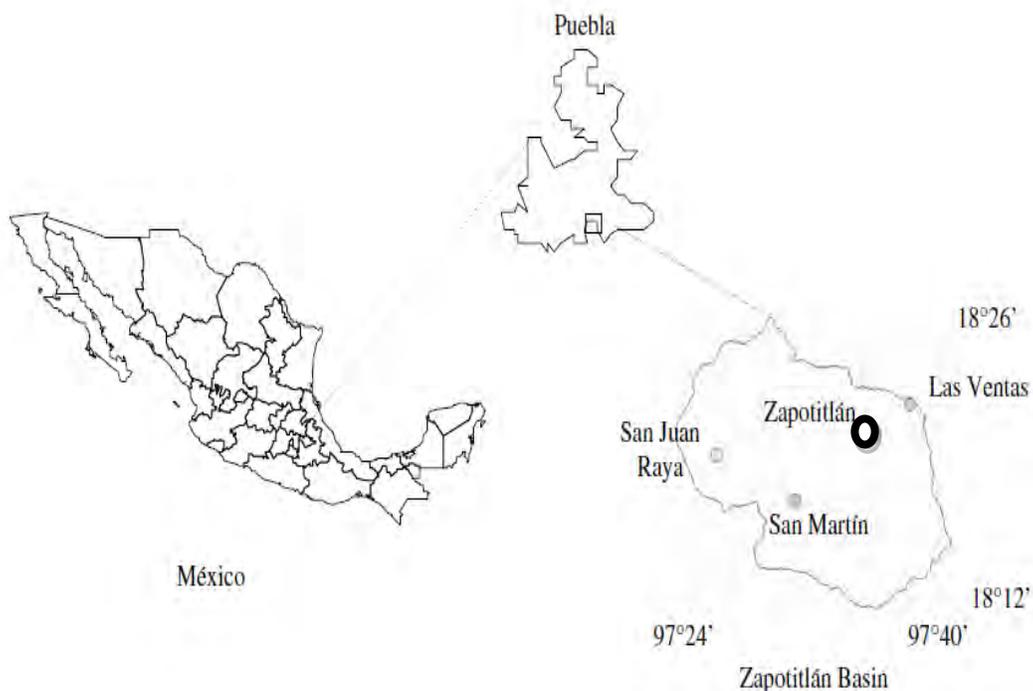


Figura 4. Localización del área de estudio, haciendo énfasis en el Valle de Zapotitlán Salinas, ubicada entre los 17°39' y los 18°53' de latitud N y los 96°55' y 97°44' de longitud O.

El clima de la región de acuerdo a el sistema de clasificación de Köppen y modificada por García, es seco semiárido, con lluvias durante el verano (BSohw) y poca oscilación térmica, variando entre 5 y 7 °C, con una temperatura fluctuante entre los 17.6 y los 23.7 °C y una media anual 21 °C. El Valle de Zapotitlán tiene una precipitación anual que va de los 400 a los 450 mm, que alcanza su mayor proporción durante la estación lluviosa, la cual se extiende de junio a agosto, con un periodo bien definido de sequía intraestival durante el mes de julio, conocido como “canícula”. Por otro lado, los vientos dominantes en el área siguen direcciones Este y Sureste con una velocidad de entre 6 y 11 km/h para los primeros y de 13 a 26 km/h, para los segundos, especialmente en los meses de febrero y marzo (Dávila et al., 2002; www.Tehuacán.gob.mx, 2009; López-Galindo et al., 2003; Rivera-Aguilar et al., 2006).

Desde el punto de vista edáfico, los suelos del Valle suelen ser someros, pedregosos, alomórficos (con diferentes estados de alcalinidad y salinidad), en la mayor parte del área, con superficies extensas de rocas sedimentarias plegadas, metamórficas y basálticas. En la región, suelen dominar los suelos con escaso desarrollo, siendo las principales unidades reportadas los litosoles, cambisoles cálcicos y xerosoles cálcicos derivados de evaporitas del Cretácico Inferior y Medio (López-Galindo et al., 2003; Méndez, 2005).

La región posee una amplia variedad de flora y fauna, la cual constituye una sola unidad biogeográfica de relevancia mundial. Esta gran variedad de especies se debe, principalmente, a la amplia gama de hábitats con características bióticas y abióticas específicas (Fig. 5). Algunas de estas especies, se encuentran incluidas como endémicas, amenazadas y/o en peligro de extinción (Dávila et al., 2002).



Figura 5 Fotografía panorámica del área de muestreo, en el Valle de Zapotitlan de las Salinas, Puebla.

La vegetación de Zapotitlán Salinas es considerada matorral xerófilo, en el que predominan los cactus columnares como *Neobuxbamia tetetzo*, seguido de *Prosopis levigata* (mezquite), *Fouquieria formosa* (ocotillo), *Parkinsonia praecox* (palo verde) y *Beaucarnea gracilis* (Fig. 6). De igual forma, se encuentran en el área musgos, (flora no vascular) y muchas especies de plantas vasculares, de las cuales una gran mayoría son cactáceas. Además, alrededor del 30% de las plantas conocidas en esta región son endémicas (Dávila et al., 2002; López-Galindo et al., 2003; Rzedowski, 1981; Vergara, 1997).

De igual forma la fauna del valle ha sido escasamente documentada, encontrándose vertebrados como anfibios, reptiles, aves y mamíferos. Por otro lado, en cuanto a los invertebrados algunos estudios han descrito especies de Coreidos (Hemiptera-Heteroptera), asimismo observaciones en campo señalan una gran diversidad de hormigas, termitas, arañas y escorpiones (CONANP, 2010; Méndez, 2005).



Figura 6 a) Se muestra una parte de la vegetación del valle de Zapotitlán Salinas, Puebla.
b) Acercamiento de las costras biológicas del suelo.

- Colecta del material biológico

Las CBS fueron colectadas en la localidad de Zapotitlán de las Salinas en el mes de octubre de 2009 (final de la temporada de lluvias). Las muestras fueron tomadas al azar con un total de cinco repeticiones. La colecta se realizó en zonas con CBS, con ayuda de una pala de jardinería, evitando extraer la capa de suelo (Fig. 7). Cada muestra fue colocada en contenedores plásticos etiquetados. Posteriormente se transportaron, dentro de una hielera, al laboratorio de ecología microbiana de la UBIPRO, FES-Iztacala.



Figura 7 Fotografía que muestra la forma de colecta de CBS en el sitio de muestreo (Zapotitlán de las Salinas, Puebla).

- Identificación de *Chroococcidiopsis* spp.

En el laboratorio, las CBS se observaron bajo el microscopio estereoscópico (Iroscope, ES-24 PLIT), para ubicar los agregados formados por *Chroococcidiopsis* spp. Con ayuda de una aguja de disección y pinzas de relojero, fueron extraídos y colocados en un frasco vial. A partir de ellos se realizaron preparaciones frescas, observándose en un microscopio de contraste de fases (Nikon, Labophot 2) a 20x y 40x.

La determinación taxonómica del organismo, se basó en las claves del manual Bergey's (Stanley et al., 1989), las de Waterbury (2006), artículos especializados en el género y comunicaciones personales con el Dr. Rivera-Aguilar (2009), quien es especialista en microorganismos de las CBS.

- Descripción morfológica de *Chroococcidiopsis* spp. en condiciones naturales

Se realizó la descripción de los agregados de *Chroococcidiopsis* spp. extraídos, empleando un microscopio estereoscópico (Iroscope ES-24 PLIT). Los organismos se observaron a partir de preparaciones frescas a 10x y 20x. Entre los criterios morfológicos tomados en cuenta, se encuentran, el color, la forma y la ubicación de los agregados dentro de la costra.

La morfología celular de *Chroococcidiopsis* spp. extraída de las costras biológicas del suelo, se describió empleando un microscopio de contraste de fases Labophot 2 de Nikon. Los organismos se observaron a partir de preparaciones frescas a 20x y 40x. Para la descripción, se tomaron en cuenta los siguientes aspectos: color, forma de las células vegetativas, presencia de baeocitos, presencia, apariencia y color de la vaina. Se tomaron fotografías de los agregados celulares y de los organismos individuales (Berrendo et al., 2008; Pineda-Mendoza et al., 2011).

- Aislamiento y condiciones de cultivo

Los agregados de *Chroococcidiopsis* spp. extraídos de las costras biológicas del suelo, se limpiaron cuidadosamente, con pinzas de relojero y aguja de disección, tratando de separarlos de otras cianobacterias filamentosas. A continuación, se colocaron ligeramente separados unos de otros, en cajas petri con aproximadamente 40 ml de medio BG 11 al 1.5 % de agar (anexo 1). Se realizaron varios ensayos para estandarizar las condiciones de cultivo de *Chroococcidiopsis* spp. En un primer momento, los organismos se incubaron a 25 °C, con un fotoperíodo de 12/12 h luz/oscuridad.

Los organismos del género *Chroococcidiopsis*, se dejaron crecer por aproximadamente tres meses, hasta obtener un cultivo estable. Se sembraron en medio BG 11 líquido, cortando pequeños cuadros de agar de 0.5 cm² (cuidando tomar el mayor número de colonias posibles), con ayuda de un asa de siembra y un portaobjetos estériles. En seguida se inocularon en viales de vidrio con 5 ml de medio BG 11 líquido, dejándolos crecer por al menos tres semanas después de la resiembra. Todos los cultivos en medio BG 11 líquido, se mantuvieron estáticos, es decir, sin agitación ni aeración.

A partir del primer cultivo en medio BG 11 líquido, se realizaron resiembras periódicas, tanto en medio BG 11 al 1.2% de agar, como en BG 11 líquido, para evitar el envejecimiento y muerte de los cultivos. Para las resiembras de medio líquido a sólido, se tomaron 40 µl de cultivo líquido y se traspasaron a una caja petri con agar sólido BG 11, extendiendo la alícuota por todo el agar con un asa de vidrio (plaqueo). En las resiembras de medio líquido-líquido, se tomaron alícuotas de 40 µl, depositándose en frascos viales con 5 ml de medio BG11.

- Purificación del cultivo

Se prepararon 300 ml de medio BG 11 líquido estándar (anexo I), dividiéndose en dos matraces con 150 ml c/u, al primero se le adicionaron 10 g/l de glicerol (BG 11 g) y al segundo 5 g/l de d-glucosa (BG 11d); esto con el objeto de inducir a los microorganismos a alimentarse de forma heterotrófica (colocándolos en sitios oscuros) (O'Grady y Morgan, 2011).

Por otro lado, se elaboró un stock del antibiótico meropenem para eliminar otras bacterias que se encontraran creciendo junto con *Chroococcidiopsis* spp.; para ello se preparó cloruro de sodio al 0.9% y se esterilizó (se decidió utilizar este diluyente por tener un periodo de acción más prolongado en las condiciones de incubación a las que fueron sometidos los cultivos, 32 °C). Se dejó enfriar la solución, posteriormente se agregó el meropenem, 3 000 µg/ml de la solución de NaCl y se almacenó a -20 °C.

Una vez preparado el antibiótico, se adicionaron a tubos estériles (cada uno con capacidad de 8 ml), 4 ml de medio BG 11g ó BG 11d y 130 µl del stock de meropenem (concentración final de 100 µg/ml; basada en el trabajo de Ferris y Hirsh (1991), mezclándose varias veces por inversión. En cada uno de ellos, se inocularon 40 µl de los cultivos de 80 ó 234 días, como se muestra en la tabla 1.

Tabla 1. Elementos adicionados a cada uno de los cultivos mixtos de *Chroococcidiopsis* spp. para purificarlos

Cultivo	Medio BG 11 (g)	Medio BG 11(d)	Meropenem (antibiótico)	Cultivo 80 días	Cultivo 234 días	Repeticiones
a80	+		+	+		3

b234	+		+		+	3
CN 80	+			+		2
CN 234	+				+	2
a80		+	+	+		3
b234		+	+		+	3
CN 80		+		+		2
CN 234		+			+	2

Finalmente los cultivos fueron sellados con parafilm, se colocaron dentro de una caja negra y se incubaron a 32 °C. Se realizaron revisiones cada tercer día por dos semanas, para verificar el crecimiento de bacterias heterotróficas y/o hongos.

- Crecimiento heterotrófico facultativo

Se realizaron varias pruebas para comprobar la capacidad de crecimiento heterotrófico facultativo de *Chroococcidiopsis* spp., después de haberse desarrollado bajo condiciones fotoautótrofas. Se probaron cuatro fuentes diferentes de carbono, entre las que se encuentran, D-glucosa, fructosa, sacarosa y glicerol. Se utilizó medio sin antibiótico y con antibiótico como controles para evitar falsos positivos (el proceso se resume en la tabla 2).

Se prepararon cinco matraces con 250 ml de medio BG 11 estándar (anexo I), adicionándole a cada uno: 5 g/l de d-glucosa, 5 g/l de fructosa, 5 g/l de sacarosa ó 10 g/l de glicerol, una vez mezclados perfectamente los medios se llevaron a esterilizar en un autoclave a 121 °C durante 15 minutos.

Se vertieron en viales limpios y estériles, cuatro mililitros de los siguientes medios: BG 11 con d-glucosa, BG 11 con fructosa, BG 11 con sacarosa y BG 11 con glicerol (cinco viales por cada medio). A cada uno de los frascos, se le adicionaron 130 µl del stock de meropenem, mezclando el contenido por inversión.

Por último, se inocularon 40 µl de cada cultivo (de los cultivos que habían crecido durante 80, 234 y 306 días en condiciones fotoautótrofas), en frascos separados, quedando los tratamientos como se muestran en la tabla 2 (se hicieron tres repeticiones). Los viales fueron sellados con parafilm, colocados dentro de una caja negra completamente cerrada,

e incubados a 32 °C. Cada 48 h se revisaron los cultivos, en un microscopio invertido (Olympus CK2) y en contraste de fases (Nikon Labophot 2), a partir de preparaciones frescas, para verificar el crecimiento de los organismos.

Tabla 2. Elementos adicionados a cada uno de los cultivo realizados para comprobar o descartar el crecimiento heterotrófico facultativo de *Chroococcidiopsis* spp.

Cultivo	Luz	BG 11	Dex	Fruc	Gli	Sac	Mero
BG 11 (d)	--	+	+				+
BG 11(f)	--	+		+			+
BG 11 (g)	--	+			+		+
BG 11 (s)	--	+				+	+
BG 11 (m)	--	+					+
BG 11 (0)	--	+					

Símbolos y abreviaturas: +, elemento añadido; - - ó espacio en blanco, elemento omitido; Dex, d-glucosa (5g/l); Fruc, fructosa (5g/l); Gli, glicerol (10g/l) ; Sac, sacarosa (5g/l); Mero, meropenem (100 µl/ml)

Todos los procedimientos de cultivo, siempre tuvieron lugar bajo condiciones de esterilidad, en una campana de flujo laminar irradiada previamente con luz UV por al menos 15 minutos.

- Descripción morfológica de *Chroococcidiopsis* spp. en condiciones de cultivo

El análisis morfológico de *Chroococcidiopsis* spp. bajo condiciones de cultivo se dividió en morfología colonial y celular. La descripción, se realizó a partir de los cultivos sólidos y líquidos: BG 11 sólido, BG 11 líquido estándar, BG 11 con glucosa, BG 11 con fructosa, BG 11 con sacarosa y BG 11 con glicerol.

La morfología colonial de *Chroococcidiopsis* spp, se describió empleando un microscopio estereoscópico Iroscope ES-24 PLIT y un microscopio invertido CK2. Las colonias

formadas por los organismos se observaron directamente de las cajas de Petri a 10x y 20x. Entre los criterios morfológicos tomados en cuenta se encuentran, el color, la forma, el tamaño, la elevación, el margen, la superficie, la textura de las colonias y el proceso de formación. Se observó la formación y el progreso de las colonias en medio BG 11 al 1.2% de agar, después de haber resembrado las cianobacterias a partir de cultivos líquidos en medio BG 11 estandar. Se siguió durante 65 días el crecimiento y desarrollo de las colonias de *Chroococidiopsis* spp., realizando revisiones periódicamente.

Se describió la morfología celular de *Chroococidiopsis* spp. con un microscopio de contraste de fases Nikon Labophot 2. Los organismos se observaron a partir de preparaciones frescas y semipermanentes (fijadas con gelatina glicerizada) a 20x y 40x. Para la descripción, se tomaron en cuenta los siguientes aspectos: color, forma de las células vegetativas, presencia de baeocitos y presencia, apariencia y color de la vaina. Se tomaron fotos de las colonias y las células individuales en diferentes fases de su desarrollo (Berrendo et al., 2008; Pineda-Mendoza et al., 2011).

Resultados

- Identificación de *Chroococcidiopsis*

En base a las claves del manual Bergey's (Stanley et al., 1989), modificadas por Waterbury (2006), y comunicaciones personales con el Dr. Víctor Rivera Aguilar, se determinó que los agregados aislados de las costras pertenecían al género *Chroococcidiopsis*. Sin embargo, no se encontró suficiente información para poder determinar la especie, con base en las características morfológicas observadas (Fig. 8).

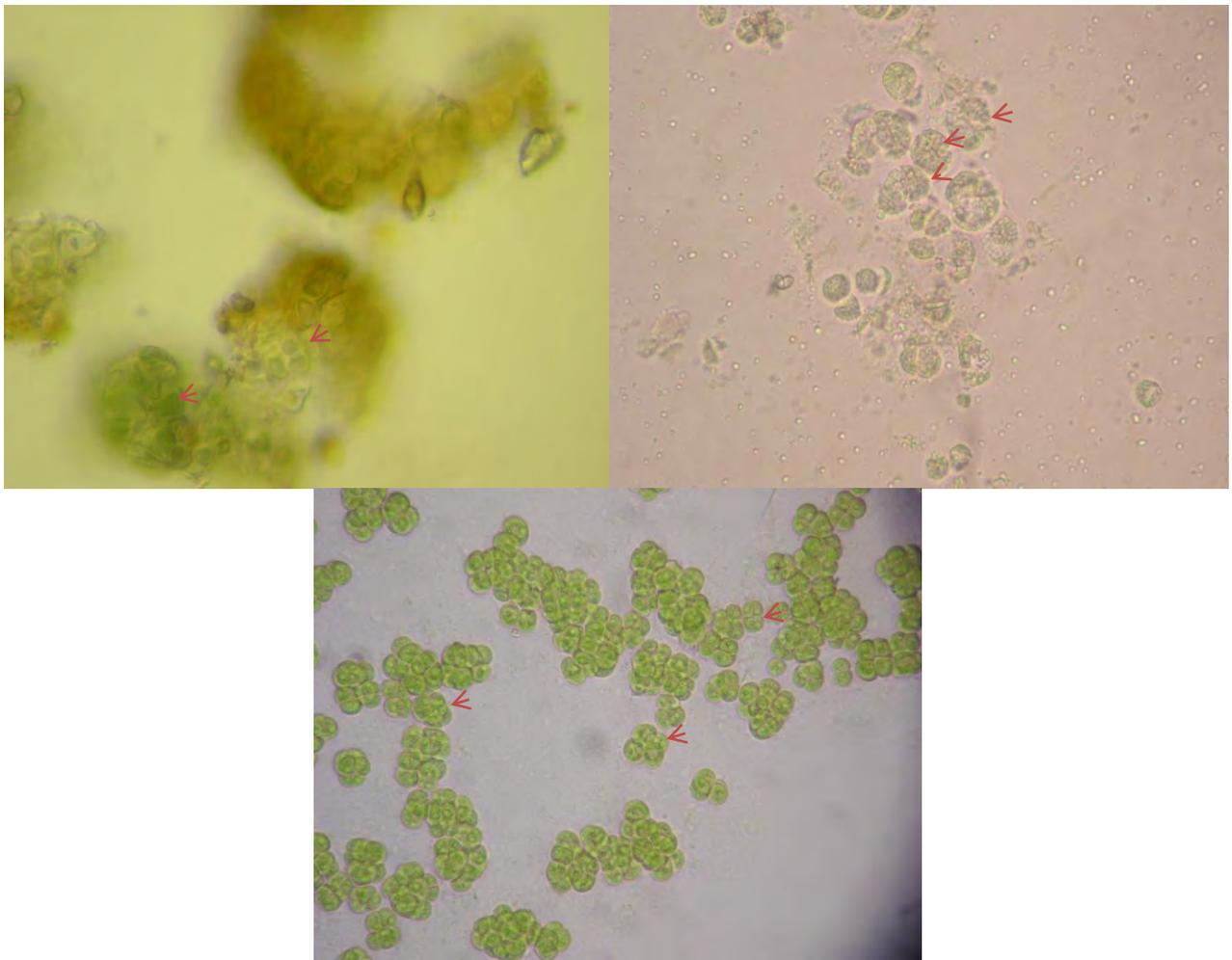


Figura 8. a) Micrografía a 40x de una población natural de *Chroococcidiopsis* spp, de una costra biológica del suelo de Zapotitlán de las Salinas, Puebla. en donde se puede observar la vaina rodeando a las cianobacterias (flechas rojas). b) Micrografía a 40x de un cultivo en medio BG 11 con D-glucosa de *Chroococcidiopsis* spp,, en donde se observan varias colonias de baecitos (flechas rojas). Se puede observar la vaina. c) Micrografía a 40x de un cultivo en medio BG 11 estándar líquido de *Chroococcidiopsis* spp, en donde se observa la forma de las cianobacterias (flechas rojas)

- Descripción morfológica de *Chroococcidiopsis* spp. en condiciones naturales

La mayor parte de las *Chroococcidiopsis* spp. creció sobre la capa más superficial de las CBS de Zapotitlán Salinas (Fig. 9). Se encontraron algunos agregados de estas cianobacterias debajo de los líquenes. Estos organismos, formaron pequeñas “colonias” semi-esféricas de 0.4 mm de color negro o marrón oscuro (Fig. 9 a y b); sin embargo, al ser observadas bajo el microscopio estereoscópico, se distinguió un color verde olivo/marrón claro (Fig. 9 b). Dichos agregados en varias ocasiones se encontraron entremezclados con otras cianobacterias filamentosas, lo cual no pareció afectar la forma de los agregados.



Figura 9. a) Fotografía *in situ* de las CBS de Zapotitlán de las Salinas, Puebla. b) Fotografía a 4x de las CBS en el microscopio estereoscópico, en donde se señalan los agregados de colonias de *Chroococcidiopsis* spp.

Por otro lado, las células de *Chroococcidiopsis* spp. presentaron una forma semi-esférica e incluso en algunos casos poligonal. Asimismo, se observaron diversas tonalidades, desde un color verde olivo hasta un café claro. Todas las células revisadas, se encontraron rodeadas por una gruesa vaina incolora (fig. 10 a y b).

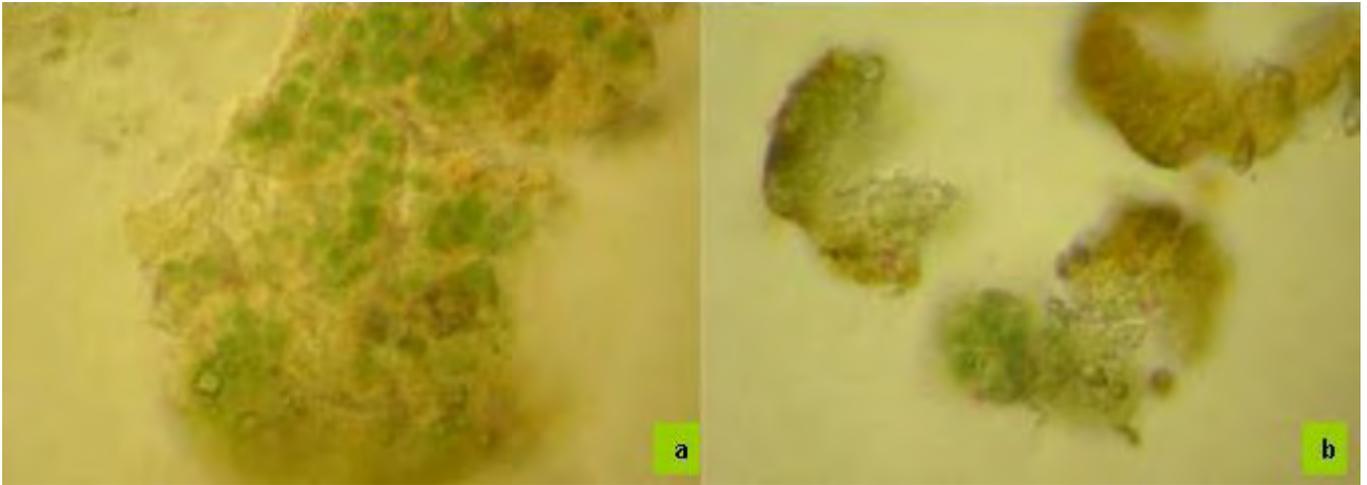


Figura 10. a) y b) Micrografía a 40x de una población natural de *Chroococcidiopsis* spp, de una costra biológica del suelo de Zapotitlan de las Salinas, Puebla

- Aislamiento y condiciones de cultivo

Los primeros ensayos para establecer las condiciones óptimas de cultivo, solo favorecieron a algunos hongos y bacterias. Todos estos, se extendieron a lo largo de las cajas petri en pocos días, creciendo incluso sobre los agregados de cianobacterias, quienes permanecieron totalmente inertes. Después de no observar crecimiento de *Chroococcidiopsis* spp. en los primeros ensayos de estandarización, se analizaron las posibles causas, relacionadas con la temperatura y la preparación de los medios de cultivo.

Se modificó el protocolo descrito en 1989 por M. Grilli Caiola, tomado de Grilli-Caiola (1996) para el crecimiento de organismos del género *Chroococcidiopsis*, con el fin de optimizar el desarrollo de los cultivos realizados a partir de poblaciones naturales de costras biológicas del suelo.

La preparación del medio BG 11 agarizado se modificó, por reportes de inhibición en el crecimiento de las cianobacterias, cuando se combinan la solución de nutrientes y el agar antes de la esterilización. Por ello ambas soluciones se esterilizaron en autoclave por separado, mezclándose solo al finalizar el proceso, preferentemente a una temperatura de 50 °C (Fig. 11 a).

La limpieza de los instrumentos utilizados se cuidó al extremo, para evitar una posible contaminación por metales traza y/o toxinas presentes en el medio ambiente.

Se observó una disminución en el crecimiento de hongos y bacterias heterotróficas al aumentar la temperatura a 32 °C

Se encontró que las condiciones óptimas de crecimiento son en medio BG 11 líquido estándar a 32 °C, con un fotoperiodo de 12/12 h luz/oscuridad, bajo un foco de luz fría de 60 vatios (Fig. 11b).

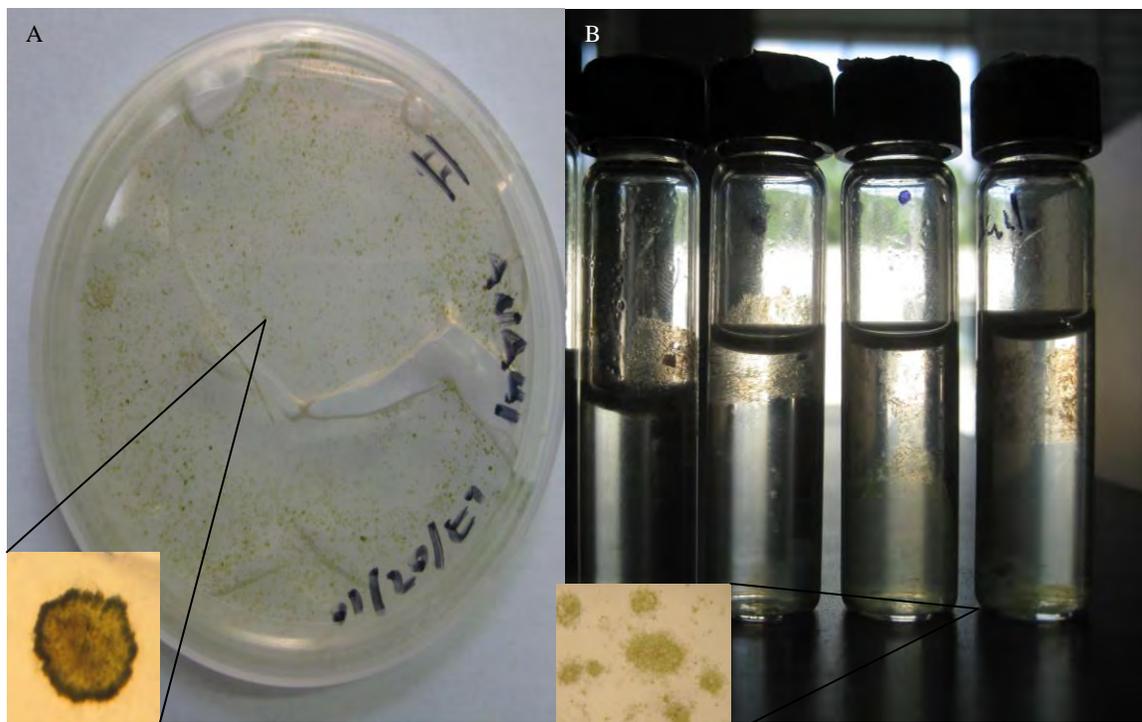


Figura 11. a). Se observa el crecimiento de *Chroococidiopsis* spp, en medio BG 11 al 1.2 % de agar, con acercamiento en el recuadro de su forma colonial. b) Se muestra el desarrollo de *Chroococidiopsis* spp, en medio BG 11 líquido estándar, con acercamiento en el recuadro de su forma colonial.

- Purificación del cultivo

A dos días de la inoculación de *Chroococcidiopsis* spp. en medio BG 11 con glicerol y meropenem, no se observó crecimiento ni de cianobacterias, ni de otras bacterias y hongos. Sin embargo, revisiones en los siguientes días, mostraron un ligero crecimiento de bacterias heterótrofas así como de algunos hongos (Tabla 3).

A los dos días posteriores a la resiembra de *Chroococcidiopsis* en medio BG 11 con glucosa y meropenem, se observó crecimiento de las cianobacterias, mientras que otras bacterias y hongos no mostraron desarrollo alguno. Sin embargo en revisiones posteriores a los cuatro y seis días, se percibió un incremento en los agregados formados por las cianobacterias. En esta ocasión se percibió crecimiento de bacterias heterotróficas y de algunos hongos (Tabla 3).

En los controles sin meropenem, con medio BG 11 con glicerol, (CN 80 y CN 234, en la tabla 3), o BG 11 con D-glucosa (CNd 80 y CNd 234, de la Tabla 3), se observó crecimiento de bacterias heterotróficas en todos los tubos. Presentándose una mayor densidad de bacterias en los controles con D-glucosa.

Al comparar los resultados de ambos controles, CN (glicerol) y CNd (D-glucosa) con los tratamientos que contenían meropenem, se observó que a pesar de no cesar por completo el crecimiento de otras bacterias y hongos, sí disminuyó lo suficiente para que *Chroococcidiopsis* spp. pudiera crecer. En los cultivos con D-glucosa, incluso se percibió un ritmo de crecimiento similar a los otros microorganismos (densidad de los cultivos). en los cultivos bajo fotoperíodo, ya que al momento de existir sobrecrecimiento de otro microorganismo diferente de la cianobacteria, esta última disminuía rápidamente su crecimiento, perdiendo además su coloración.

Tabla 3. Resultados de la purificación de los cultivos mixtos de *Chroococcidiopsis* spp., utilizando meropenem

Cultivo	BG 11 (g)	BG 11 (d)	Meropenem	Crecimiento bacterias heterotróficas	Crecimiento <i>Chroococcidiopsis</i>
a80 (1)	+	--	+	+-	--
a80 (2)	+	--	+	+-	--
a80 (3)	+	--	+	+-	--
b234 (1)	+	--	+	+-	--
b234 (2)	+	--	+	+-	--
b234 (3)	+	--	+	+-	--
CN 80 (1)	+	--	--	++	--
CN 80 (2)	+	--	--	++	--
CN 234 (1)	+	--	--	++	--
CN 234 (2)	+	--	--	++	--
c80 (1)	--	+	+	+	+-
c80 (2)	--	+	+	+	++
c80 (3)	--	+	+	+	++
d234 (1)	--	+	+	+	++
d234 (2)	--	+	+	+	++
d234 (3)	--	+	+	+	++
CNd 80 (1)	--	+	--	+++	+-
CNd 80 (2)	--	+	--	+++	+-
CNd 234(1)	--	+	--	+++	+-
CNd 234(2)	--	+	--	+++	+-

Símbolos y abreviaturas: +, positivo; -, negativo; BG 11(g), BG 11 con 10g/l de glicerol; BG 11 (d), BG 11 con 5g/l de D-glucosa; a80, cultivo de 80 días en medio BG 11 con 10g/l de glicerol y meropenem; b234, cultivo de 234 días en medio BG 11 con 10g/l de glicerol y meropenem; CN 80 cultivo de 80 días en medio BG 11 con 10g/l de glicerol, CN 234, cultivo de 234 días en medio BG 11 con 10g/l de glicerol; c80, cultivo de 80 días con 5g/l de D-glucosa y meropenem, d234, cultivo de 234 días con 5g/l de D-glucosa y meropenem; CNd 80, cultivo de 80 días con 5g/l de D-glucosa; CNd 234, de 234 días con 5g/l de D-glucosa

- Crecimiento heterotrófico facultativo

El retraso en el crecimiento de hongos y otras bacterias heterotróficas, observado en los cultivos mixtos de *Chroococcidiopsis* spp, tratados con meropenem, llevó al uso de este antibiótico en las pruebas de heterotrófia facultativa. Así las cianobacterias crecieron sin

verse aparentemente afectadas por la presencia de bacterias heterotróficas u hongos. Y el crecimiento de *Chroococcidiopsis* spp. sólo se vio afectado por su habilidad para utilizar los azúcares disponibles en los medios de cultivo.

El crecimiento de *Chroococcidiopsis* spp. fue más rápido en los cultivos con medio BG 11 con D-glucosa y con fructosa, comparados con los cultivos bajo fotoperiodo. A los siete días de haber resembrado a *Chroococcidiopsis* spp. en este medio, la densidad de organismos era similar a uno de 30 días bajo condiciones de fotoperiodo en el medio BG 11 líquido estándar.

Bajo condiciones heterotróficas, *Chroococcidiopsis* spp. fue capaz de crecer en los medios BG 11 con D-glucosa y BG 11 con fructosa a 32 °C (Tabla 4). En el primer medio, bajo las condiciones mencionadas, se obtuvo una mayor densidad de cianobacterias, comparada con otros medios y condiciones (autótrofas).

Chroococcidiopsis spp. no fue capaz de crecer en los medios de cultivo BG 11 con sacarosa, BG 11 con meropenem y BG 11 líquido estándar, a 32 °C en oscuridad (Tabla 4).

Tabla 4. Crecimiento heterotrófico facultativo de *Chroococcidiopsis* spp. en diferentes medios de cultivo

Cultivo	Luz	Dex	Fruc	Gli	Suc	Mer	Crecimiento
BG 11 (a)	+						++
BG 11	+						++
BG 11 (d)		+				+	+++
BG 11(f)			+			+	+
BG 11 (g)				+		+	--
BG 11 (m)						+	--
BG 11 (s)					+	+	--
BG 11 (0)							--

BG 11 a (cultivo de 39 días), BG 11 (cultivo de 2 meses), BG 11 (d) y BG 11 (f) (cultivos de 8 días), (BG 11 (s) y BG 11 (g) (cultivo de 11 días)

Símbolos y abreviaturas: +, positivo; -, negativo; Dex, d-glucosa; Fruc, fructosa; Suc, sacarosa; Gli, glicerol; Mer meropenem; BG 11 (0), en oscuridad (Tabla con resultados de cada repetición en el apéndice II)

- Descripción morfológica de *Chroococidiopsis* spp. en condiciones de cultivo

Las colonias de *Chroococidiopsis* spp. en medio BG11 al 1.2% de agar mostraron una morfología irregular con un tamaño de 500 μm . Se agruparon formando agregados muy grandes desde dos hasta siete colonias fusionadas. Las colonias siempre pudieron ser fácilmente distinguidas a pesar de encontrarse aglutinadas, por la coloración de las células centrales (verde oscuro). Al contrario de las células periféricas (presentan una coloración verde intensa así como un mayor tamaño) quienes tienden a formar un borde continuo sin corte abrupto alguno.

El crecimiento de la colonia fue en un solo plano, es decir, las células se agruparon formando un semicírculo (en la mayoría de los casos) extendiéndose solo de manera horizontal, formando consecuentemente colonias planas y con borde lobulado. Por ello en las colonias fue posible observar las cianobacterias (Fig. 12).

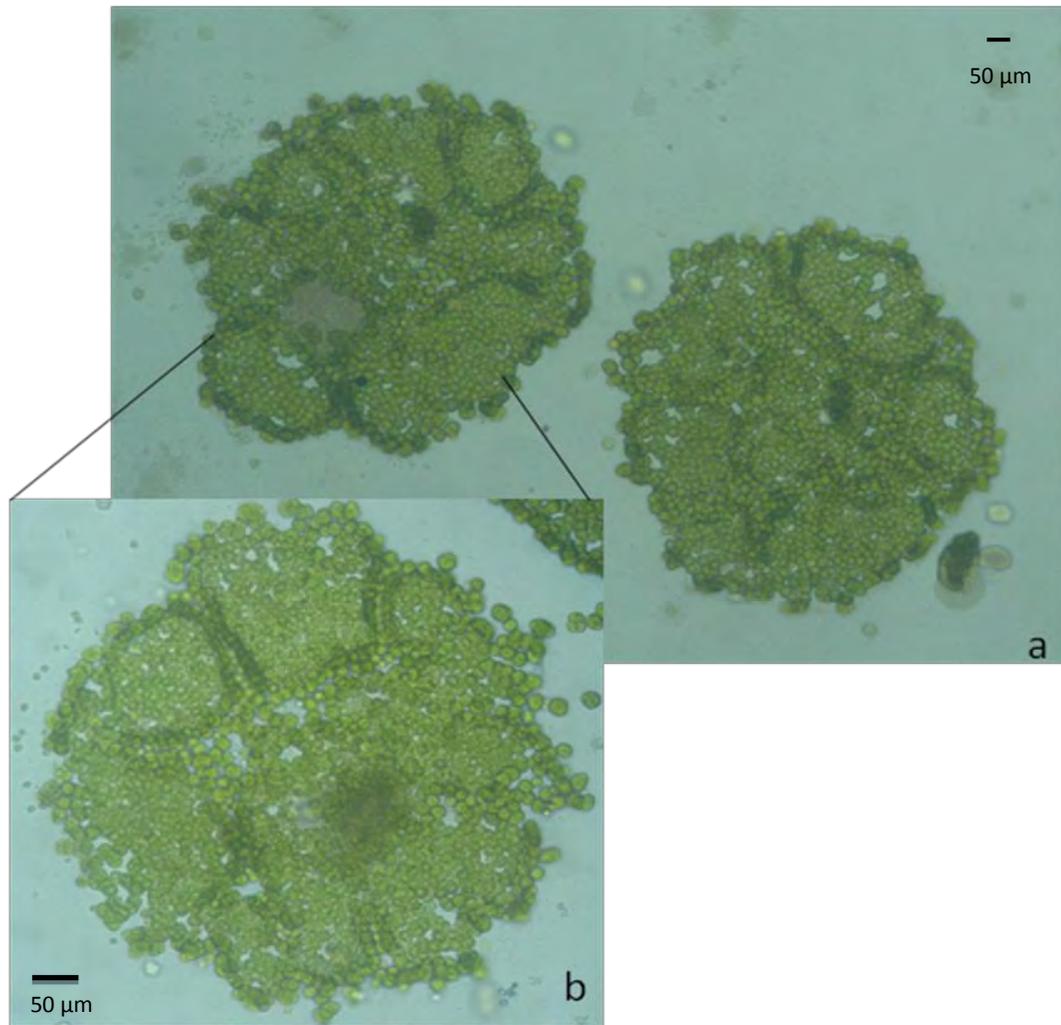


Figura 12. Microfotografía de colonias de *Chroococcidiopsis* spp obtenidas en el microscopio invertido a) Se muestran colonias formadas por células esféricas que en ocasiones presentan diferentes tonalidades en su coloración (10X). b) la imagen obtenida a 20X muestra que las células cuyo tono es más oscuro mantienen la morfología del toda la colonia- El cultivo fue crecido durante 38 días en medio BG 11 agarizado.

○ Formación de las colonias

Durante las revisiones realizadas cada 48 h, en la primera semana, no se observaron diferencias en los agregados transferidos a partir de los cultivos líquidos. Al octavo día se advirtió la presencia de pequeñas células de *Chroococcidiopsis* spp. semicirculares de un color verde intenso, sin planos de división notorios y con una diminuta esfera claramente delimitada en el interior de los organismos (Fig. 13). En este período, las cianobacterias solo se encontraban dispersas cerca de los agregados resebrados a partir del medio líquido, es decir, no formaban ninguna congregación.

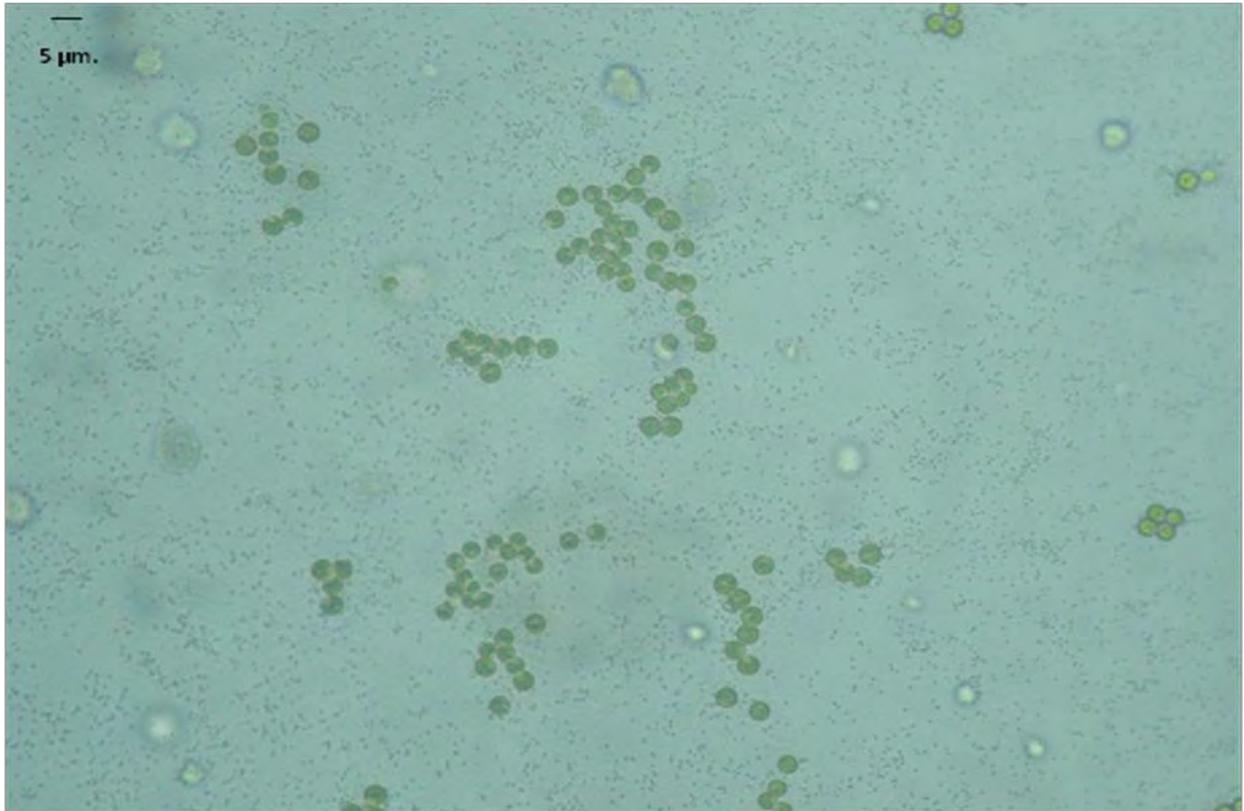


Figura 13. Microfotografía 20X en el microscopio invertido, en donde se observa el crecimiento y esparcimiento de *Chroococcidiopsis* spp. a ocho días de su resiembra en medio BG 11 agarizado. Se aprecian pequeñas agrupaciones, como la del lado derecho de la imagen un grupo de 4 células, en tanto que arriba al mismo lado se observa un grupo de tres.

Observaciones periódicas en los siguientes 20 días revelaron aumento tanto en el número como en el tamaño de las células (Fig. 14a). Las más grandes se encontraron en las orillas, mientras que las más pequeños permanecían muy juntas al centro de las grandes congregaciones. Las *Chroococcidiopsis* spp continuaron sin formar colonias bien delimitadas.

Al día 32, algunas *Chroococcidiopsis* spp, a pesar de seguir aglutinadas, comenzaron a manifestar ciertos cambios morfológicos. Estas células, además de mostrar una coloración más oscura en comparación con las demás cianobacterias (Fig. 14b), círculos rojos), formaron pequeñas agrupaciones lineales.

Para el día 35 se observó un aumento en el número de organismos que presentaron una coloración más oscura. Los grupos lineales previamente establecidos empezaron a

aumentar el número de sus integrantes, los cuales comenzaron a circundar pequeños grupos celulares, encerrándolos en agrupaciones semicirculares.

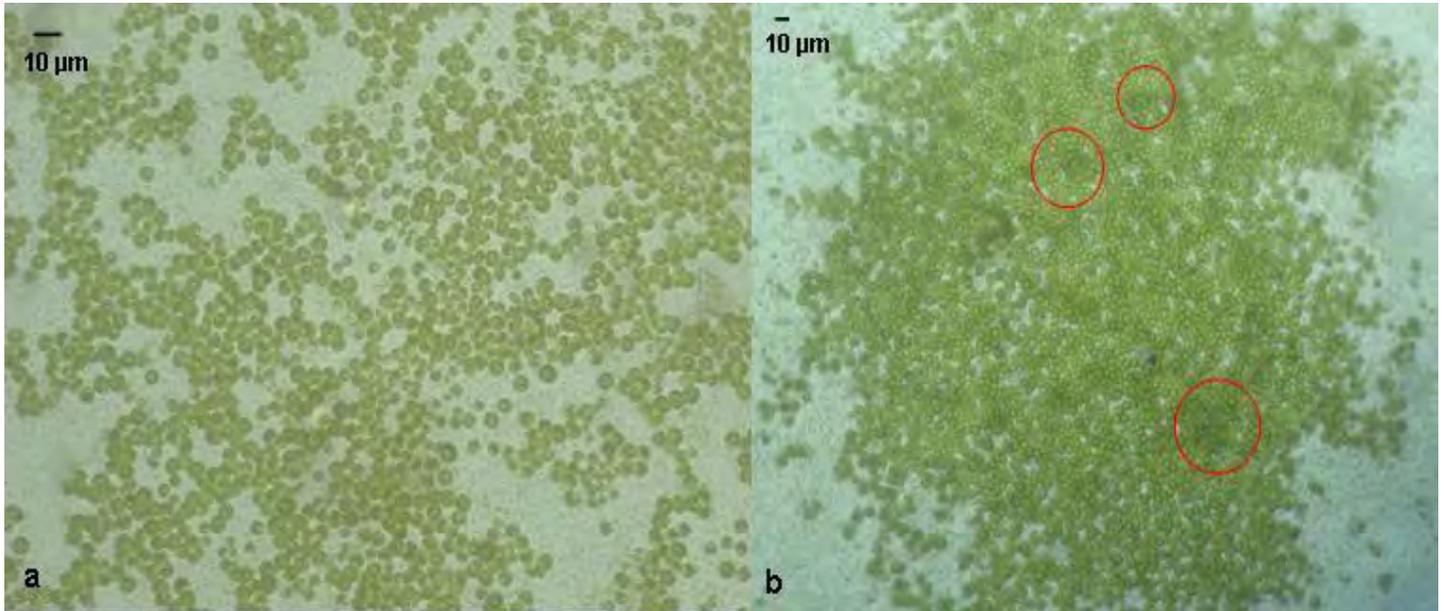


Figura 14 a) Microfotografías de cultivos con diferentes días de crecimiento en el panel a) el cultivo tiene 25 días y se encuentra en BG11 agar observe que la mayoría de las células son esféricas y tienen el mismo tamaño, la imagen está tomada a 20x . b) Microfotografías de un cultivo en agar BG11 de 32 día, en donde se muestra el cambio de coloración de algunos organismos, pasando a un verde mucho más intenso (círculos rojos).

Para el día 36, se observó que los organismos de color verde ligeramente más intenso, ya habían rodeado por completo a grupos de células, formando varias “colonias” semicirculares. En el centro de cada nueva colonia, se establecieron varias células con una coloración más oscura, semejante a las células perimetrales (Fig. 15). Estas células bajo el microscopio invertido presentaban un aspecto borroso, consecuencia de mantener una distribución desigual por encontrarse superpuestas, es decir, una arriba de otra. La colocación de estas células influyó también en la coloración más oscura observada en el centro y el perímetro de la colonia.

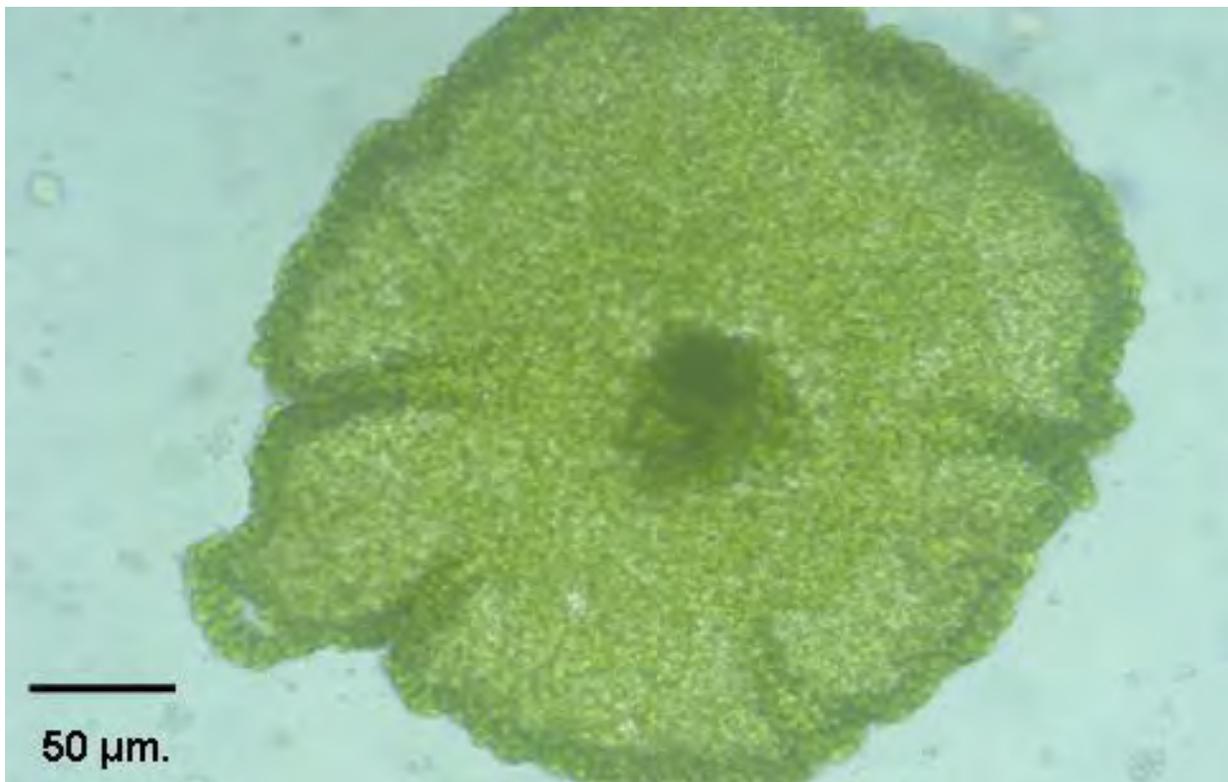


Figura 15 Microfotografía de una colonia de *Chroococcidiopsis* spp. de 36 días, en donde se observa cierta diferenciación de las células periféricas y centrales, las periféricas presentan una tonalidad más oscura de la misma forma que los bordes de la colonia.

Para el día 40, se observó un aumento en el número de colonias semicirculares con borde y centro oscuro. Además, se advirtió la presencia de líneas perpendiculares al centro, formadas por las células perimetrales, las cuales fueron detectables fácilmente, por presentar la misma coloración y distribución superpuesta que las células nucleares (Fig. 16 a y b). Durante esta fase, alrededor de las colonias, se formó una especie de "halo", el cual estaba conformado por células mucho más pequeñas que las integrantes de las colonias y ligeramente más alargadas (Fig. 16c). No obstante este fenómeno solo se presentó en una sola ocasión, y no se volvió a observar.

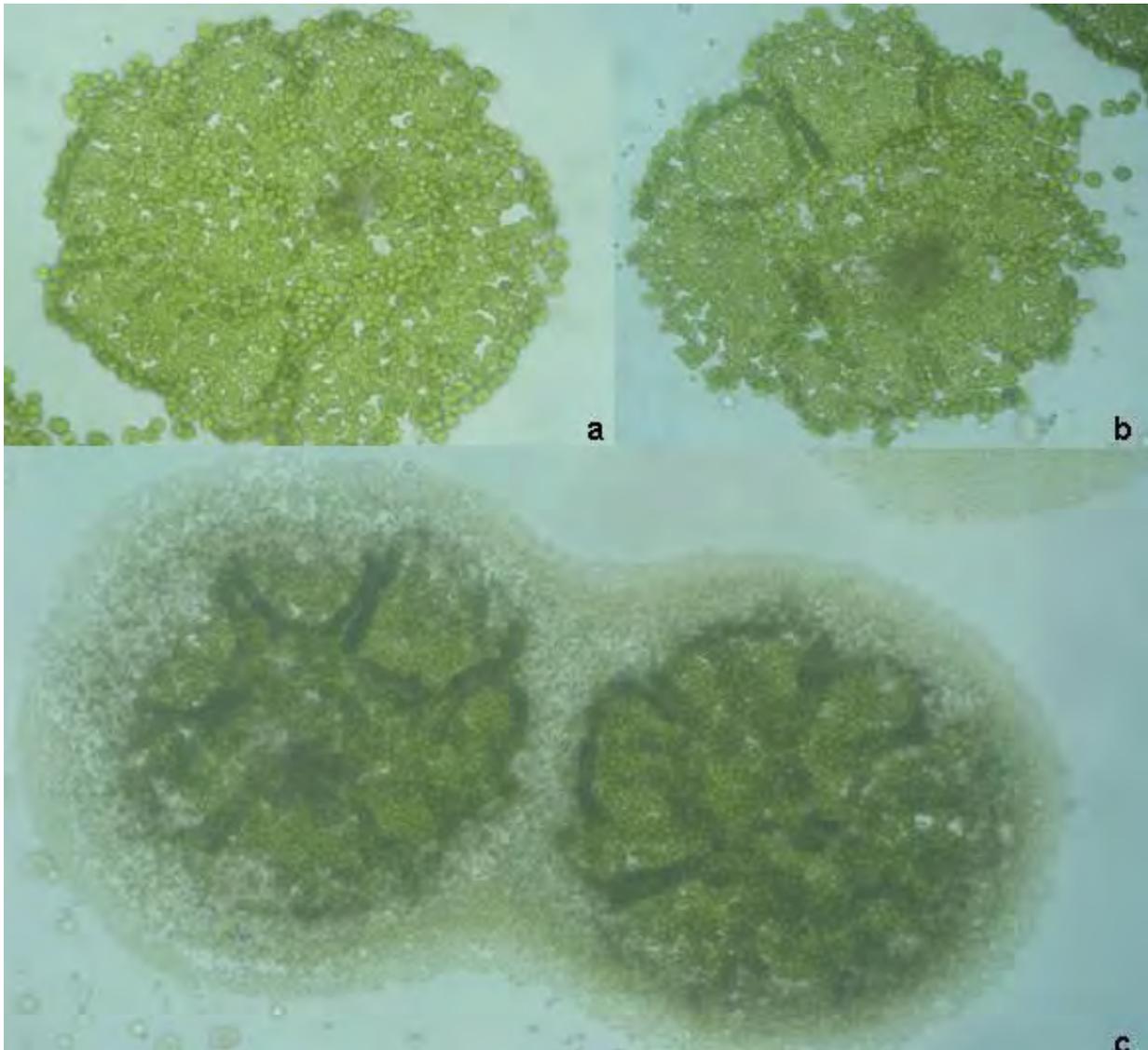


Figura 16 a),b) y c). Microfotografía de colonias de *Chroococcidiopsis* spp. de 40 días de cultivo en medio BG 11 agarizado. C) Se observa alrededor de las colonias células pequeñas y alargadas, formando un “halo”.

Entre los días 50-60, se observó en las colonias una tendencia a fusionarse, formando supercolonias de dos, tres, cuatro, cinco y hasta seis colonias (Fig. 17a). Los agregados inicialmente formados conservaron cierta individualidad marcada por las células centrales (que poseen una tonalidad más oscura), las cuales se fusionan mucho más lentamente (Fig. 17 b y d). Las células perimetrales lentamente se fueron uniendo para formar un solo borde, igual que las células perpendiculares al centro de la colonia (Fig. 17c).

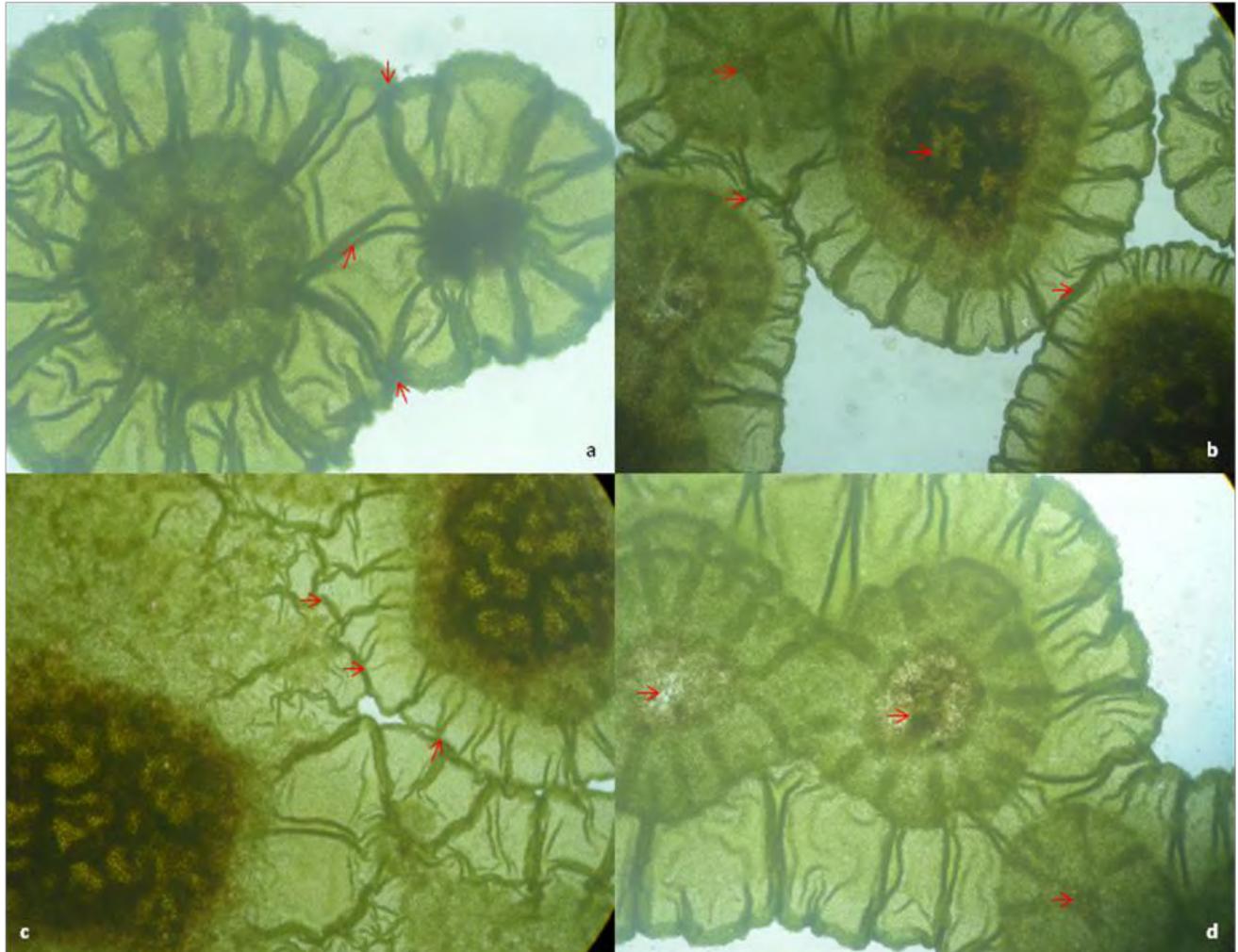


Figura 17. a),b),c) y d) Microfotografías de diversas colonias de *Chroococidiopsis* spp. de 55 días, en donde se observa su tendencia a fusionarse. a, b y c) Se muestran los puntos de unión de las colonias (flechas rojas), asimismo se puede apreciar la disolución de los bordes existentes entre ellas. d) Se advierte la fusión de tres colonias, que a pesar de tener los bordes fusionados aun se aprecian los núcleos de cada una en proceso de fusión (flechas rojas).

En las siguientes semanas, las observaciones no revelaron cambios en la morfología colonial de *Chroococidiopsis* spp.

Por otro lado los organismos pertenecientes al género *Chroococidiopsis* cultivados en medio BG11 estándar líquido (bajo fotoperiodo), BG 11 con glucosa y BG 11 con fructosa (oscuridad), en la primera semana posterior a la resiembra, mostraron tendencia por adherirse a las paredes de los frascos (Fig. 18 a y b).

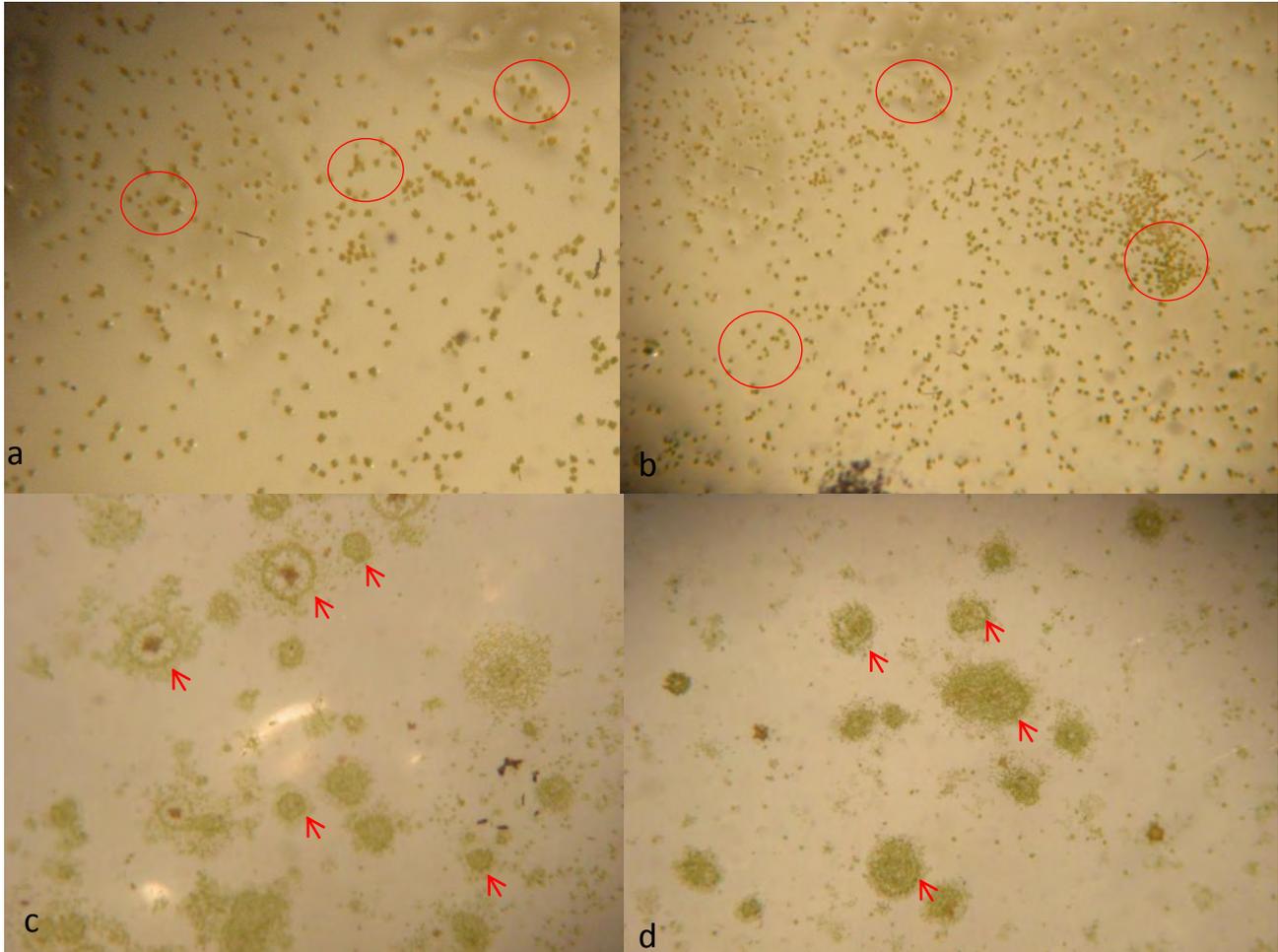


Figura 18 a) y b) Micrografía a 20x en el microscopio estereoscópico, de un cultivo de 2 meses en medio BG 11 líquido, en donde se observan varias células de *Chroococidiopsis* spp. adheridas a las paredes de los frascos de cultivo de forma individual, es decir no formaron colonia alguna. (círculos rojos).
 c) y d) Micrografía a 20x en el microscopio estereoscópico, de un cultivo de 2 meses en medio BG 11 líquido, en donde se observan varias colonias irregulares de *Chroococidiopsis* spp (señaladas con flechas rojas)

Posteriormente algunos organismos comenzaron a formar pequeñas congregaciones con propensión a formar agregados más grandes (semejantes a lo ocurrido con las colonias crecidas en medio BG11 agarizado).

Algunas otras células permanecieron adheridas de forma individual a las paredes de los frascos, sin formar alguna agrupación. Asimismo se presentó un tercer grupo de células las cuales quedaron embebidas en una matriz de polisacáridos formando grandes agregados flotantes.

La coloración observada fue verde claro, e incluso, en algunos casos se encontraron células sin coloración alguna, es decir completamente transparentes. En cuanto a la forma colonial, en los cultivos de medio BG11 estándar, se observaron agregados semicirculares de aproximadamente 5 mm.

○ Morfología celular

La células de *Chroococcidiopsis* spp. de los cultivos líquidos, presentaron una forma irregularmente esférica, y en algunos casos llegó a ser poligonal (Fig. 19, 22, 23 y 25). Los diámetros encontrados en los diferentes cultivos van desde 5 µm hasta 20 µm (Tabla 4) con una media general de 10.61 µm (medidas tomadas en base a 100 células de diversos cultivos de BG 11).

Tabla 4. Tamaño celular de 100 organismos a partir de preparaciones semipermanentes y frescas de diversos cultivos

Cultivo	5 µm	7.5 µm	10 µm	12.5 µm	15 µm	17.5 µm	20 µm	Media (µm)
BG 11 agarizado	11	61	24	4	--	--	--	8.02
BG 11 estándar	--	--	10	55	24	7	4	13.42
BG 11 (d)	--	23	35	36	5	1	--	10.65
BG 11 (f)	--	26	36	36	2	--	--	10.38
BG 11 (s)	--	--	--	--	--	--	--	--
BG 11 (g)	--	--	--	--	--	--	--	--
media								10.61

BG 11 agarizado (cultivo de 39 días), BG 11 (cultivo de 2 meses), BG 11 (d) y BG 11 (f) (cultivos de 8 días), (BG 11 (s) y BG 11 (g) (cultivo de 11 días)
 Símbolos y abreviaturas; --, negativo; BG 11 (d), con d-glucosa; BG 11 (f), con fructosa; BG 11 (s), con sacarosa, BG 11 (g), con glicerol

La coloración de *Chroococcidiopsis* spp. se vio ligeramente afectada dependiendo de las condiciones del cultivo. Los organismos en medio BG 11 estándar y BG 11 al 1.2% de agar, presentaron un color verde intenso ligeramente más claro que aquel observado en las cianobacterias de las CBS (Fig. 19). No obstante, los microorganismos crecidos bajo

condiciones heterótrofas (BG 11 con D-glucosa y BG 11 con fructosa), mostraron un tono verde-amarillo, visiblemente más claro al visto en las cianobacterias crecidas en fotoautotofia (Fig. 23 y 25). Sin embargo, no se conservaron los cultivos por más tiempo para comprobar si existía disminución en el color.

Los organismos del género *Chroococcidiopsis* mantenidos en medio BG 11 líquido estándar, presentaron una vaina compacta, translúcida y en algunos casos ligeramente amarillenta (Fig. 20). En los cultivos crecidos en medio BG 11 al 1.2 % de agar (fotoautotófo), BG 11 con D-glucosa y BG 11 con fructosa no se advirtió vaina alguna en las cianobacterias.

En los cultivos BG 11 líquido estándar (Fig. 21), BG 11 con D-glucosa (Fig. 23 y 24) y BG 11 con fructosa (Fig. 25) se encontró formación de varias células esféricas de menor tamaño, producidas por las múltiples fisiones de las cianobacterias (*baeocitos*) (Tabla 5). En los cultivos BG 11 con D-glucosa y BG 11 con fructosa, se encontraron más de diez baeocitos por célula, mientras en los cultivos en BG 11 líquido estándar, solo 4 células hijas libres en el medio.

Se encontraron baeocitos desde los 1.25 μm hasta 5 μm , con una media 3.06 μm (medidas tomadas en base a 55 y 100 células de los diferentes cultivos) (Tabla 5).

Tabla 5. Tamaño celular de 100 baecitos excepto en BG 11, solo se midieron 55) a partir de preparaciones frescas de diversos cultivos

Cultivo	1.25 µm	1.75 µm	2.25 µm	2.5 µm	2.75 µm	3 µm	3.25 µm	5 µm	Media (µm)
BG 11 agarizado	--	--	--	--	--	--	--	--	--
BG 11	--	--	--	17	--	--	--	38	4.22
BG 11 (d)	11	25	--	61	--	2	1	--	2.2
BG 11 (f)	--	--	19	48	23	4	6	--	2.6
BG 11 (S)	--	--	--	--	--	--	--	--	--
BG 11 (g)	--	--	--	--	--	--	--	--	--

BG 11 agarizado (cultivo de 39 días), BG 11 (cultivo de 2 meses), BG 11 (d) y BG 11 (f) (cultivos de 8 días), (BG 11 (s) y BG 11 (g) (cultivo de 11 días)
 Símbolos y abreviaturas; --, negativo; BG 11 (d), con d-glucosa; BG 11 (f), con fructosa; BG 11 (s), con sacarosa, BG 11 (g), con glicerol

BG 11 líquido estándar

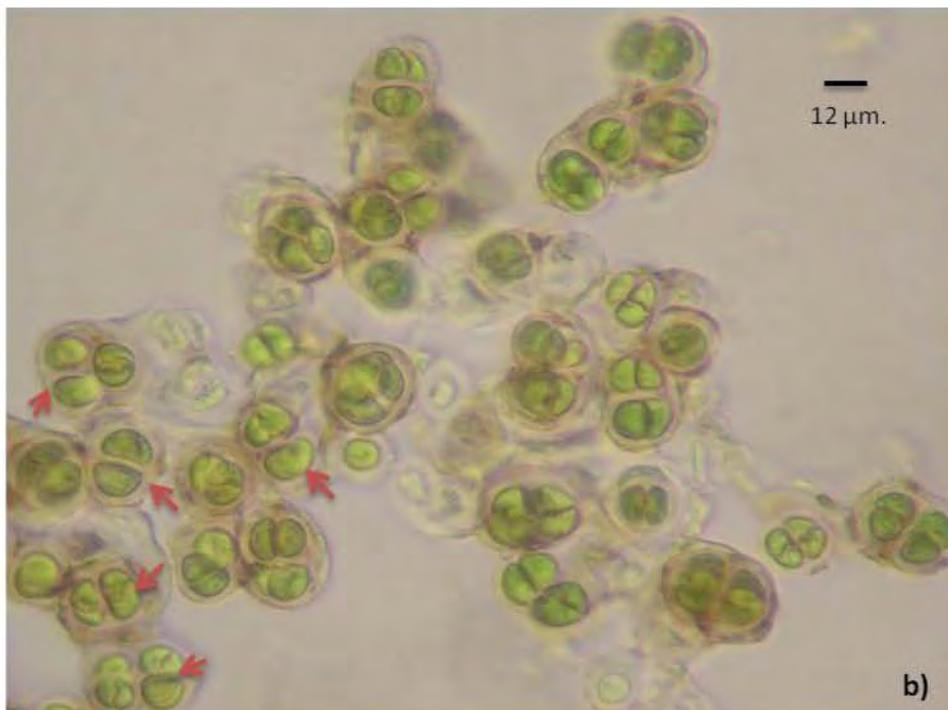
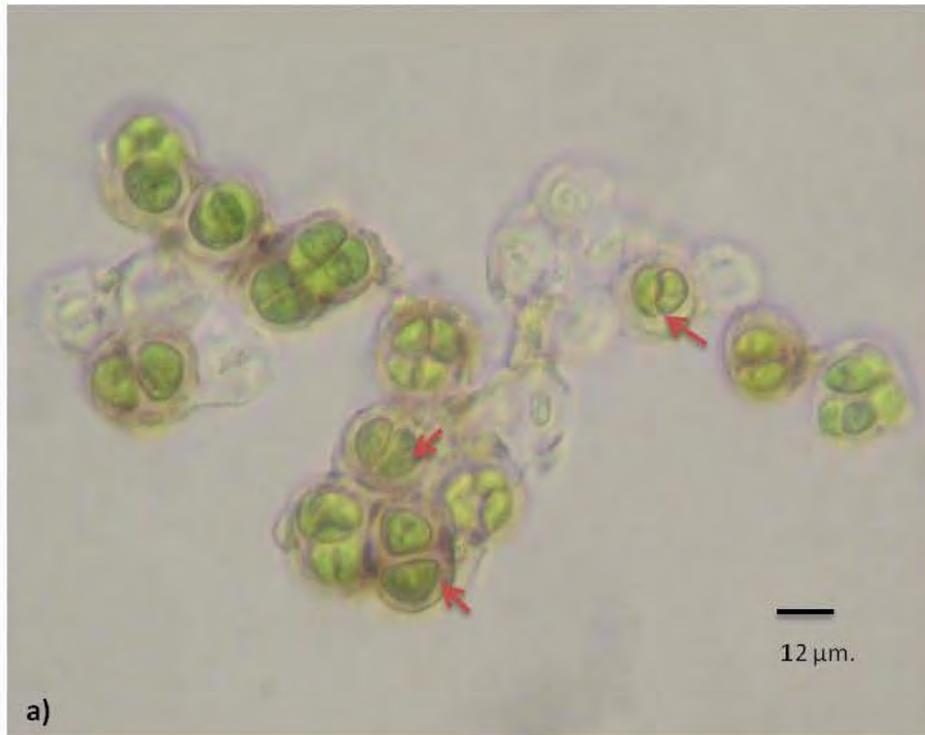


Figura 19 Microfotografías de preparaciones frescas de un cultivo *Chroococcidiopsis* spp. que creció en BG11 líquido durante dos meses. a) Observe la fisión binaria marcada con flechas rojas b) Observe que también se pueden ver dos células vecinas en fisión binaria las cuatro rodeadas por una capa refringente. Estas imágenes fueron obtenidas a 40x Micrografías a 40x de una preparación fresca de *Chroococcidiopsis* spp. (cultivo de dos meses en medio líquido BG 11), en donde se puede observar la fisión binaria de los microorganismos (flechas rojas). imágenes fueron obtenidas a 40x

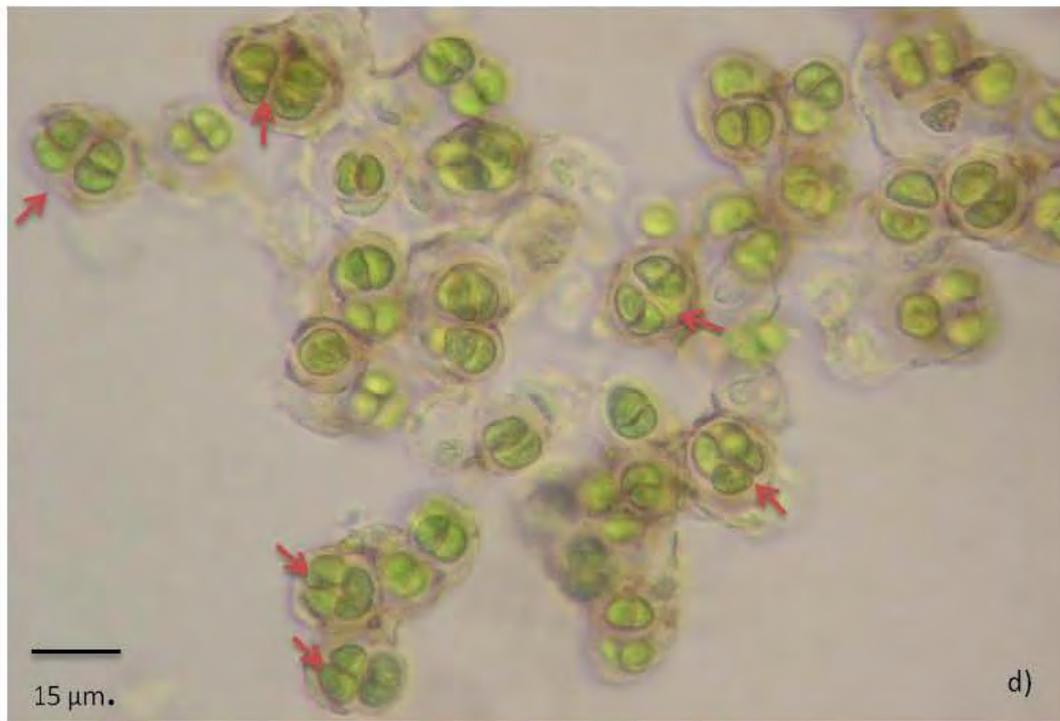
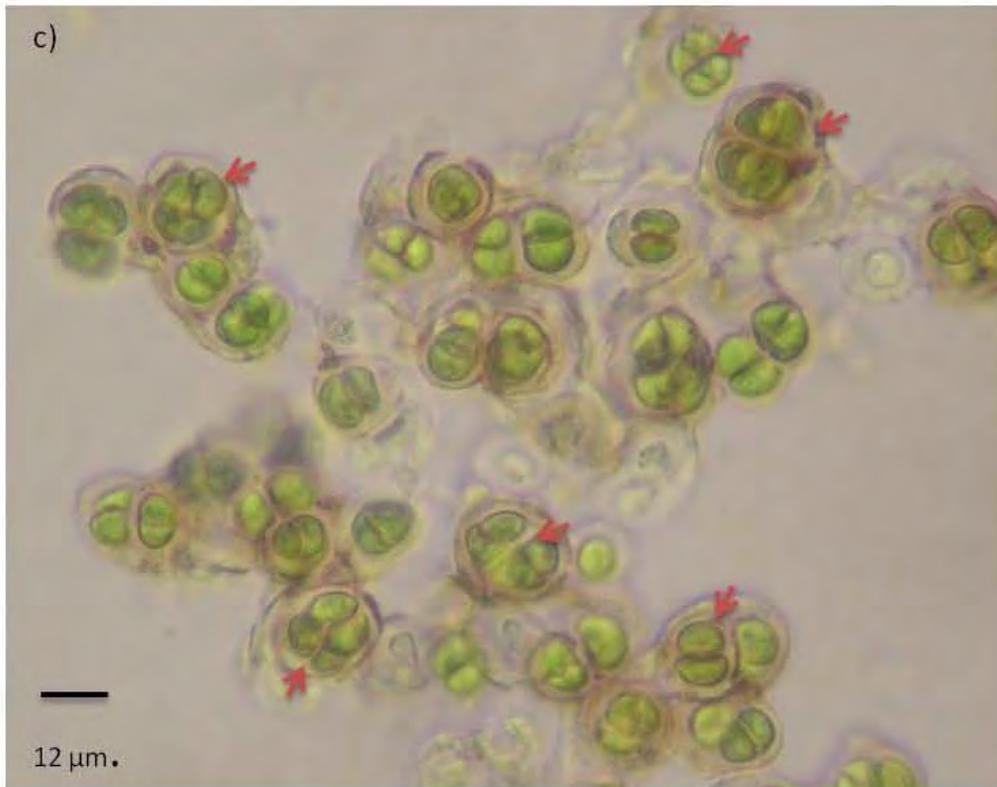


Figura 20 c) y d) Micrografías a 40x. se observan grupos de 2 y 4 células que se ven rodeados por una estructura refringente del tipo de una vaina, también existen aparentemente grupos de 3 células, esto se puede deber al plano de segmentación, en donde la célula que se observa impide observar la fisión. Finalmente observe que la vaina se puede formar en célula individuales como lo muestra la imagen.

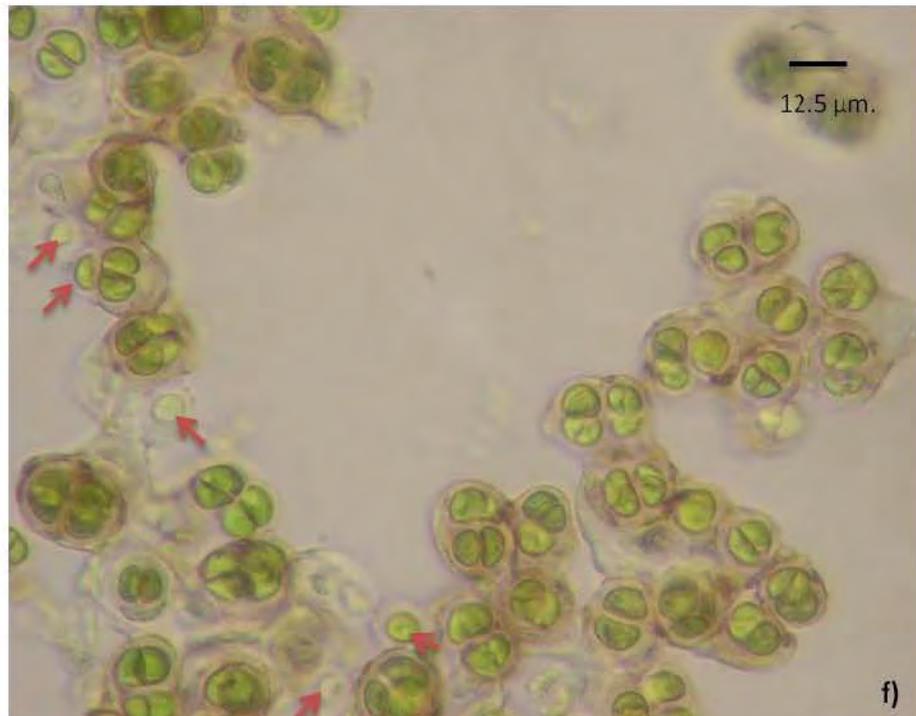
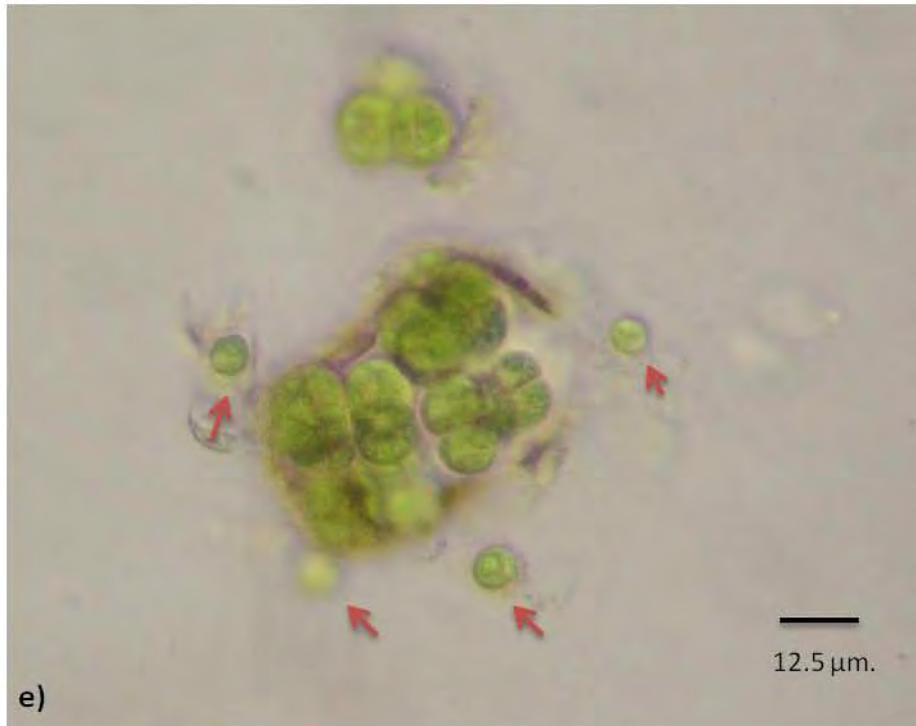


Figura 21 e) Observe que las células todavía se siguen diferenciando, se ven bien los planos de división y liberación de unas células de menor tamaño. f) Por medio de flechas rojas indicamos la presencia de unas células más pequeñas y con otra coloración denominada. f) Micrografías a 40x de una preparación fresca de *Chroococcidiopsis* spp. (cultivo de dos meses en medio líquido BG 11), en donde se puede de células sin fisionarse de menor tamaño (flechas rojas).

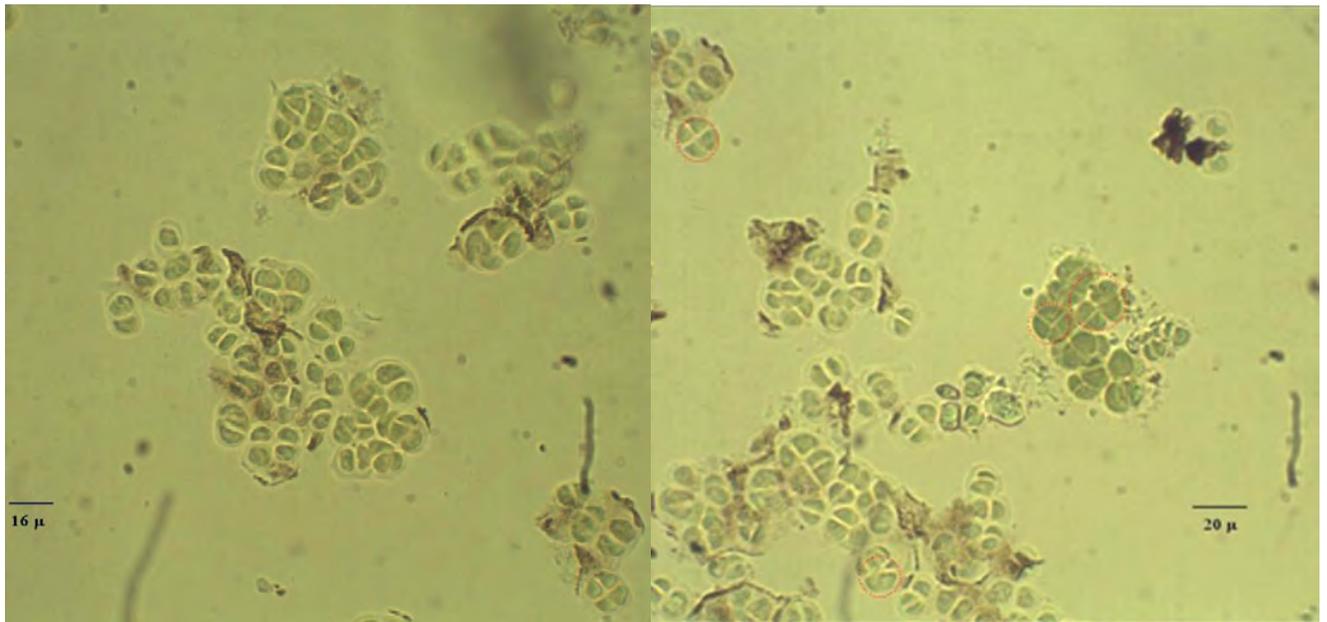
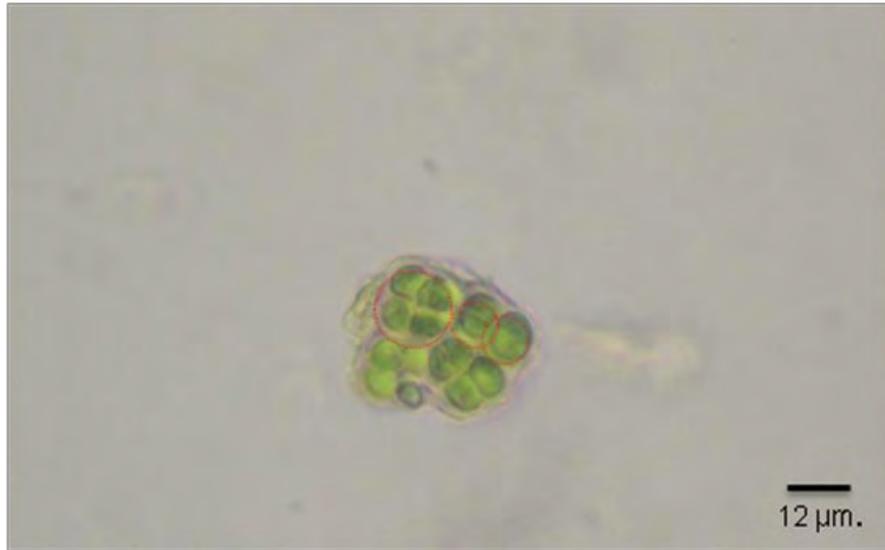


Figura 22. g) y h) Micrografías a 40x de una preparación semi-permanente de *Chroococcidiopsis* spp. (cultivo de 45 días en medio líquido BG 11). l) micrografía a 40x de una preparación fresca de *Chroococcidiopsis* spp. (cultivo de 60 días en medio líquido BG 11). En ambas se puede observar la forma semicircular de los organismos, así como una delgada vaina incolora apenas visible rodeando a todos los microorganismos (círculos punteados rojos).

Cultivo BG 11d (d-glucosa)

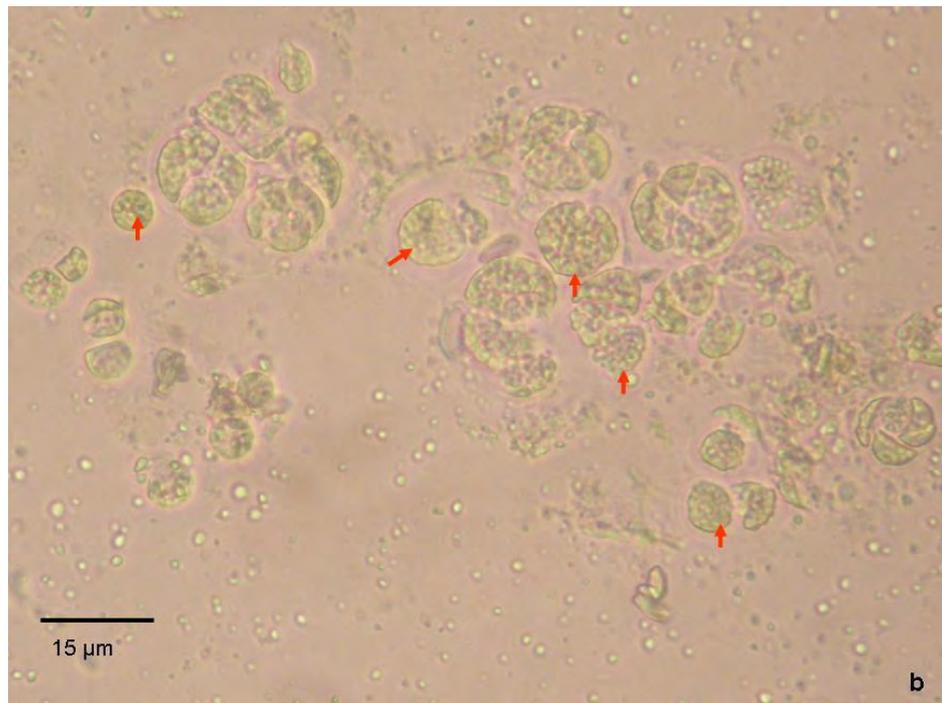
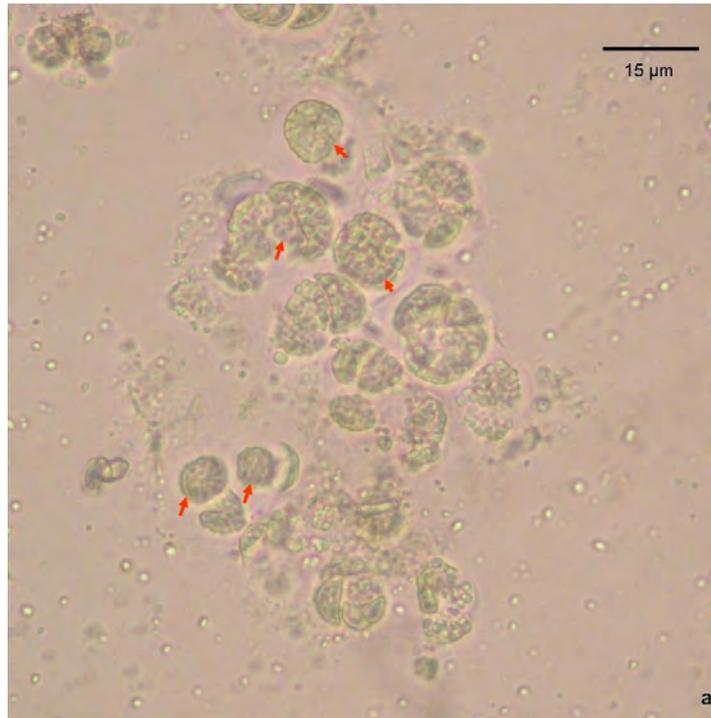


Figura 23 a y b) Micrografías a 40x de una preparación fresca de *Chroococcidiopsis* spp. (cultivo de siete días en medio líquido BG 11 con d-glucosa); en ambas se muestra la formación de baeocitos como consecuencia de múltiples fisiones (flechas rojas)

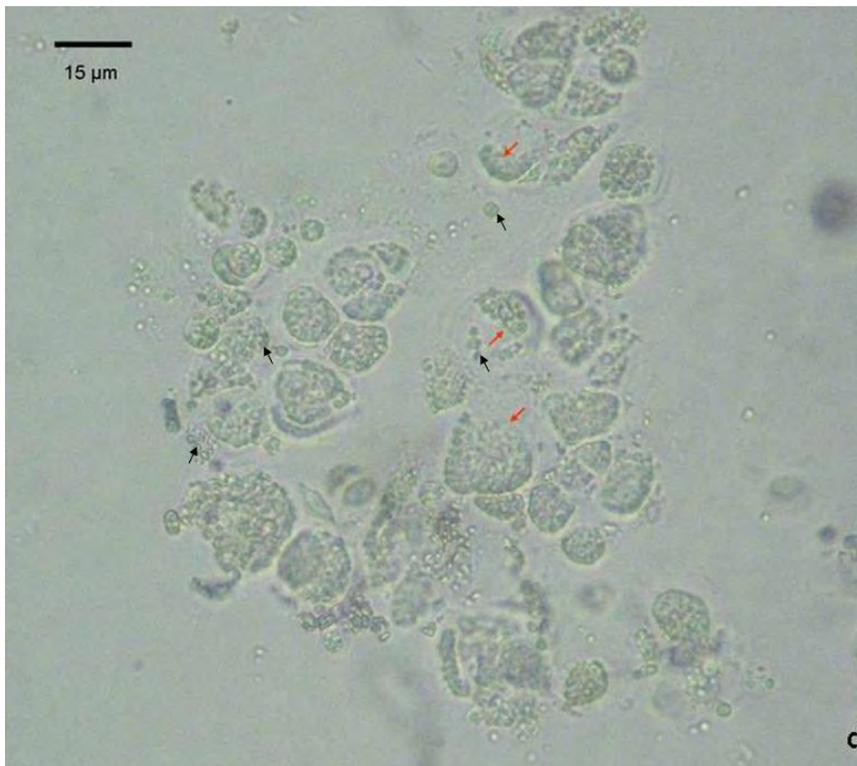
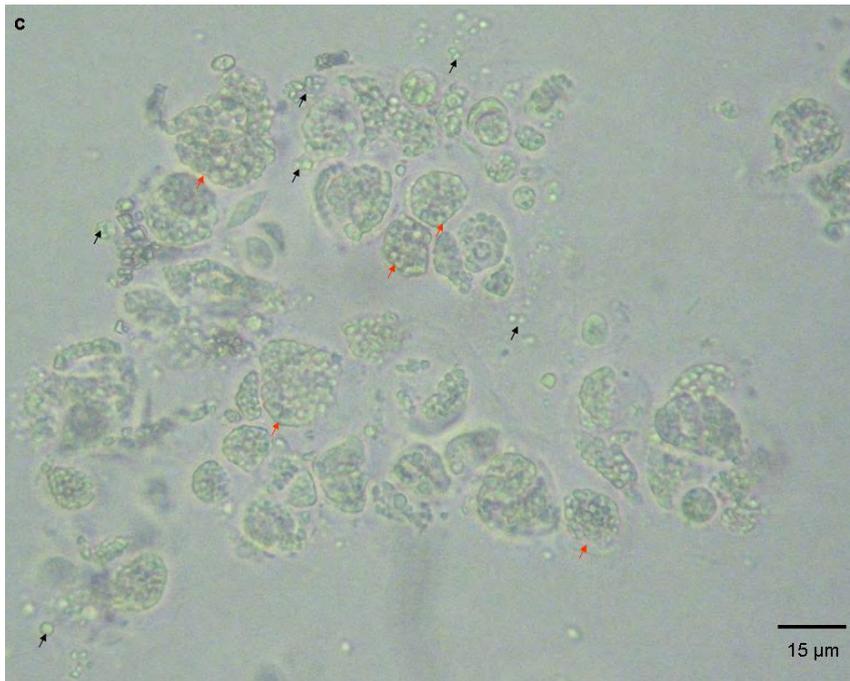


Figura 24 c) y d) Micrografías a 40x de una preparación fresca de *Chroococcidiopsis* spp. (cultivo de siete días en medio líquido BG 11 con d-glucosa); en ella se muestra liberación pequeñas células esféricas llamadas baeoctos (flechas rojas), así como algunas de estas mismas células ya liberadas en el medio (flechas negras).

Cultivo BG 11f (fructosa)

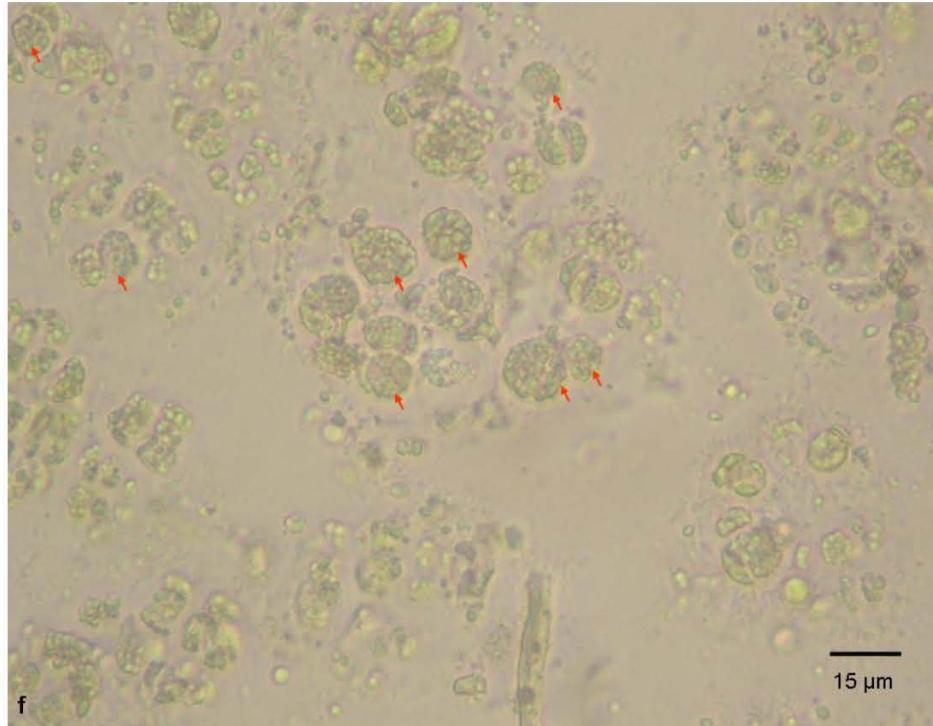
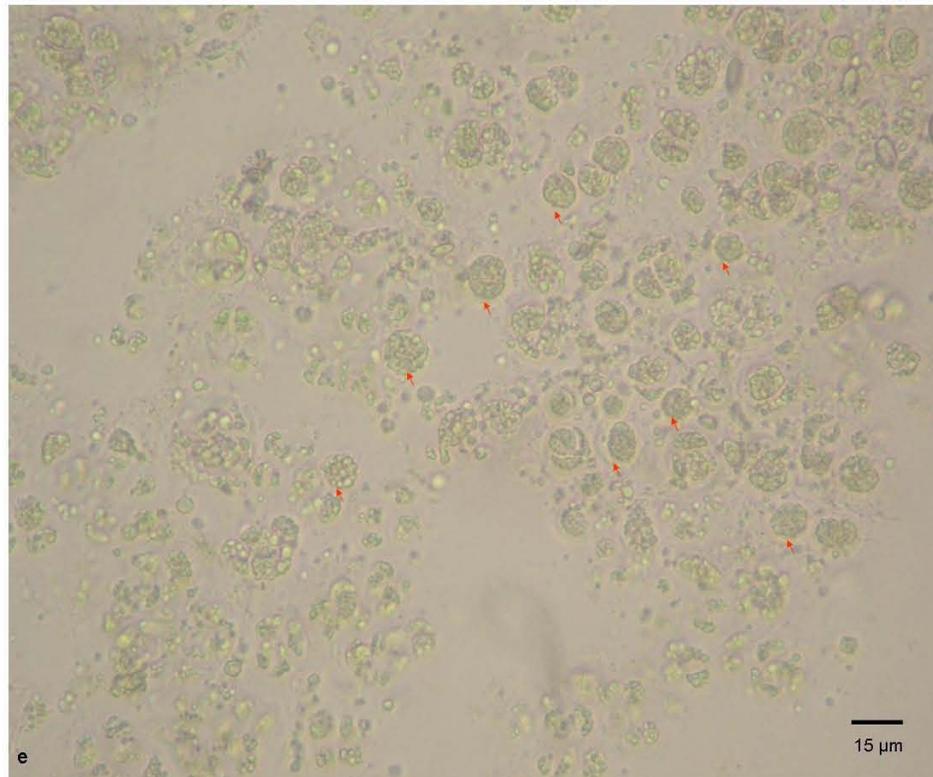


Figura 25 e y f) Micrografías a 40x de una preparación fresca de *Chroococcidiopsis* spp. (cultivo de ocho días en medio líquido BG 11 con fructosa); en ambas se muestra la formación de baecitos como consecuencia de múltiples fisiones (flechas rojas)

Tabla 6. Características morfológicas de *Chroococcidiopsis* spp. en condiciones naturales y en diferentes cultivos

Cultivo	Costra biológica del suelo	BG 11 agar (luz)	BG 11 líquido estándar (luz)	BG 11 D-glucosa (oscuridad)	BG 11 fructosa (oscuridad)
Forma de la colonia	Agregados esféricos	Irregular con borde lobulado	Agregados irregulares flotantes	Agregados irregulares flotantes	Agregados irregulares flotantes
Color de la colonia	Negro/marrón	Verde intenso	Verde	Verde/amarillo	Verde/amarillo
Tamaño de la colonia (μm)	400	500	--	--	--
Forma celular	Semiesférico/poligonal	Semiesférico/poligonal	Semiesférico/poligonal	Semiesférico/poligonal	Semiesférico/poligonal
Color de las células	Verde/café claro	Verde intenso	Verde intenso	Verde/amarillo	Verde/amarillo
Tamaño celular (μm)		8.2	13.42	10.65	10.38
Presencia de vaina	gruesa	--	compacta	--	--
Color de la vaina	Traslúcida	--	Traslucido/amarillo		
Baeocitos	--	--	+	+	+
# de baeocitos	--	--	4	+10	+10
Tamaño de baeocitos (μm)	--	--	4.22	2.2	2.6

Discusión

- Identificación de *Chroococcidiopsis*

Las cianobacterias juegan un papel crucial en nuestra vida cotidiana aunque pocas veces nos percatemos de este hecho. Desde las numerosas aplicaciones benéficas como biofertilizantes agrícolas, en la acuicultura, hasta sus aportes en la nutrición humana. Sin olvidar por supuesto su importante papel como productores primarios, en el pasado, fueron las posibles oxigenadoras iniciales de la atmósfera terrestre. Actualmente son colonizadoras de tierras áridas y fijadoras de nitrógeno atmosférico (N₂), por mencionar solo las características más importantes (Berrendo, 2008).

A pesar de la gran importancia del grupo Cianobacteria, tanto por sus beneficios reales como potenciales; su estudio resulta está plagado de múltiples inconvenientes. Comenzando por la forma de descripción y determinación de los géneros y las especies, hasta la dificultad para obtener un cultivo axénico a partir de poblaciones naturales (Stanley et al., 1989; Redfield *et al.*, 2002).

En primer lugar, la determinación taxonómica de *Chroococcidiopsis* spp. a partir de las CBS resultó laboriosa. Es importante mencionar que la identificación se basó en las características morfológicas de la cianobacteria, tomando como referencia el Código de nomenclatura Bacteriológico. Este código, no solo toma en cuenta la citología de los organismos, sino características genéticas, químicas y fisiológicas. Sin embargo, los criterios descritos en él se basan principalmente en cépas cultivadas por mucho tiempo, las cuales presentan el inconveniente de no expresar e incluso perder algunas características morfológicas por las condiciones de crecimiento. Por otra parte, se omitió el Código de nomenclatura Botánico para evitar confusiones al momento de determinar el género del microorganismo, debido a diferencias en las aproximaciones, reglas de nomenclatura y conceptos de especies. (Berrendo, 2008; Castenholz y Waterbury 1989; Waterbury, 2006).

Todo esto se vio reflejado al momento de describir a los microorganismos, ya que el fenotipo de estos no coincidió completamente con las descripciones consultadas. En primer lugar, es importante mencionar que *Chroococcidiopsis* spp. no presenta muchos caracteres morfológicos observables. Estos organismos pertenecen a un género de

cianobacterias unicelulares cuya característica principal es la fisión múltiple, formando como consecuencia baeocitos no móviles. (Rivera-Aguilar, 2006; Waterbury, 2006).

Empero, los baeocitos no se observaron en las preparaciones microscópicas. Pese a esta situación, la identidad de *Chroococcidiopsis* pudo ser constatada en un primer momento tanto por las claves del manual Bergey's, así como por varias comparaciones con diversas fotografías de artículos especializados en este género de cianobacterias. Ya que en estas últimas a parte de presentar las clásicas "colonias de baeocitos", se pueden observar además otros estadios del microorganismo, específicamente cuando se encuentran en fisión binaria mostrando dos, tres e incluso cuatro células producto de las consecutivas divisiones. Teniendo así un punto de comparación para la determinación taxonómica del organismo ante la ausencia de baeocitos (Billi *et al.*, 2001; Billi *et al.*, 2010; Billi, 2010; Rivera-Aguilar, 2006; Stanley *et al.*, 1989).

- Aislamiento y condiciones de cultivo

Entre los factores modificados durante las condiciones de cultivo, para optimizar el crecimiento de *Chroococcidiopsis* spp., se encuentra la preparación de los medios con agar. Esto debido a la descomposición tóxica de algunos productos, probablemente por la gran cantidad de impurezas en el agar bacteriológico. Por esta razón, las soluciones se elaboraron por separado, mezclándose solo después de salir del autoclave, preferentemente a una temperatura de 50 °C (Allen, 1968; Ferris y Hirsh, 1991, Waterbury, 2006).

Se determinó que la temperatura era un factor sumamente importante en el desarrollo de las cianobacterias. Al aumentar poco a poco la temperatura, se observó un decremento en las poblaciones de hongos. Esto, debido a los efectos en el crecimiento y en la germinación de las esporas fúngicas al elevar la temperatura. Algunos estudios revelan que, rangos cercanos a 35 °C resultan muy poco favorables para una gran cantidad de microorganismos eucariontes fotosintéticos, impidiendo su crecimiento en los cultivos (Allen y Stainer, 1968; Kerry, 1990).

Por su parte, *Chroococcidiopsis* spp. pesar de ser considerado un microorganismo mesófilo, llegó a crecer bastante bien a temperaturas mayores a los 30 °C. Sin embargo, no es un caso excepcional, ya que otras cianobacterias como *Nostoc muscorum* y

Anabaena cylindrica, reportaron temperaturas de crecimiento de 32.5 y 35 °C (Allen y Stainer, 1968).

Las bacterias heterotróficas y hongos, que crecieron en los cultivos mixtos de *Chroococcidiopsis* spp., pudieron haber sido transportados por las propias cianobacterias. Al quedar embebidas en la capa de polisacáridos (vaina), la cual cumple la función principal de evitar la desecación en su ambiente natural, dentro de las CBS, en el desierto de Zapotitlán Salinas (Billi et al., 1998; Billi, 2010; Grilli-Caiola et al., 1996).

- Heterotrofia

Las cianobacterias a pesar de ser predominantemente organismos fotoautotóxicos obligados, diversos estudios han reportado crecimiento fotoheterotrófico y/o heterotrófico, cuando crecen en condiciones de laboratorio siempre y cuando dispongan de sustratos orgánicos suficientes para sustentar su desarrollo. Esta capacidad resulta sumamente valiosa al caracterizar a las cianobacterias a partir de poblaciones naturales, ya que nos da pistas sobre el metabolismo de estos microorganismos en vida libre (por ejemplo, como un mecanismo de supervivencia cuando existe restricción en los nutrientes) (Flores-Maya et al., 2004; Waterbury, 2006).

No obstante existe un mayor número de estudios sobre fotoheterotrofia que de heterotrofia en cianobacterias, ya que solo se considera la existencia de pocos casos de organismos con este tipo de metabolismo. Pese a ello no existe una causa unitaria para explicar este fenómeno. Sin embargo existen algunos estudios sobre heterotrofia, como los de Joset-Espardellier y colaboradores (1978), y el de Morales (2009). Esta última probó que *Microcoleus paludosus* no se desarrolló en condiciones de heterotrofia. Aunque la falta de crecimiento de *M. paludosus* puede deberse a la carencia de fuentes de carbono en el medio de crecimiento durante las pruebas de heterotrofia, y no a la ausencia de esta facultad (Joset-Espardellier et al., 1978; Flores-Maya et al., 2004; Morales, 2009).

En el caso particular de los microorganismos del género *Chroococcidiopsis* se encontró un estudio sobre fotoheterotrofia en el manual Begey's. Se menciona que la mayoría de las cepas fueron capaces de crecer en presencia de glucosa/sacarosa (siete de ocho) y

absolutamente todas con fructosa. Bajo este antecedente, al comparar estos estudios con del presente trabajo encontramos muchas similitudes. En primer lugar todos los organismos del género *Chroococcidiopsis* han demostrado se capaces de crecer en presencia de glucosa/fructosa y ausencia/presencia de luz (en el presente trabajo el crecimiento se dio bajo condiciones de heterotrofia). Todos estos estudios apoyan lo reportado en la literatura, ya que en ésta se describe el desarrollo de varias especies con glucosa, fructosa y sacarosa en condiciones de obscuridad. (Flores-Maya *et al.*, 2004; Stanley *et al.*, 1989).

Asimismo, *Chroococcidiopsis* spp. no presentó crecimiento bajo condiciones de heterotrofia en presencia de sacarosa y glicerol como fuentes de carbono. No obstante, algunas investigaciones como las presentadas en el manual Bergey's, reportan un crecimiento de la mayoría de los organismos de este género (siete de las ocho cépas mencionadas) en presencia de sacarosa y en condiciones de fotoheterotrofia. Esto nos hace pensar probablemente que a pesar de la ruptura de la sacarosa durante el autoclaveado, en azúcares diferentes como glucosa y fructosa, sus productos no son invertidos como sucedería normalmente en la hidrólisis de la sacarosa (para formar d-glucosa y d-fructosa), la cual es necesaria para incorporar sus productos monosacáridos a las rutas metabólicas energéticas (glucólisis, ruta de los fosfatos de pentosa, ciclo del ácido tricarbóxico, activadas principalmente durante la oscuridad). No obstante a pesar de existir registros sobre crecimiento con sacarosa, *Chroococcidiopsis* spp. no pudo crecer con esta fuente de carbono bajo las condiciones de laboratorio establecidas. Sin embargo esto no significa que los integrantes del género *Chroococcidiopsis* sean incapaces de utilizarla bajo otras condiciones, ya que diversos estudios han demostrado la capacidad de estos microorganismos para sintetizar sacarosa bajo condiciones de estrés hídrico, en la "ruta de síntesis de la sacarosa del fosfato" siendo ésta una reacción totalmente reversible. (Lenhinger, 1979; Stanley *et al.*, 1989; Pierik, 1990; Hershkovitz *et al.*, 1991; Fieulaine *et al.*, 2005; Quintana *et al.*, 2011).

En el caso del glicerol se tienen reportes de algunos microorganismos capaces de crecer utilizando esta sustancia como fuente de carbono, por ejemplo los procariontes *Agmenellum quadruplicatum*, *Citrobacter freundii*, *Klebsiella pneumoniae*, *Clostridium pasteurianum*, *C. butyricum*, *Lactobacillus reuterie* y el eucarionte *Chlorella protothecoides*. El glicerol al ser una molécula sin carga atraviesa fácilmente la membrana

citoplasmática, metabolizándose en algunos organismos por óxido reducción o integrándose a algunas vías metabólicas como la glucólisis al ser transformado en gliceraldehído-3-fosfato. No obstante en el presente trabajo *Chroococcidiopsis* spp. no presentó crecimiento alguno cuando se adicionó glicerol al medio de cultivo y se colocaron en oscuridad (condiciones heterotróficas), posiblemente porque no contó con las enzimas específicas para convertir el glicerol en sustancias que pudieran haber sido integradas a las rutas metabólicas del microorganismo. Por otro lado, el uso de glicerol como fuente de energía por parte de *Chroococcidiopsis* spp. no puede descartarse completamente, ya que no se realizaron ensayos para comprobar si bajo condiciones fotoheterotróficas este microorganismo era capaz de crecer (Lamber y Stevens, 1986; Da Silva et al., 2009; O'Gray y Morgan, 2009).

El crecimiento general en los primeros días posteriores a la resiembra de *Chroococcidiopsis* spp, bajo condiciones de heterotrofia, fue considerablemente más rápido, comparado con los cultivos crecidos en fotoperiodo (en cuanto a densidad de microorganismos). No obstante, este resultado parece contrastar completamente con lo reportado por otros investigadores como Joset-Espardellier y colaboradores (1978), y Quintana y colaboradores (2011), quienes reportaron un crecimiento más lento de las cianobacterias ante estas condiciones. Esta situación podría significar una mayor capacidad de *Chroococcidiopsis* spp. para captar y asimilar de los azúcares glucosa/fructosa dentro de las rutas metabólicas como la glucólisis. En el caso de la glucosa, está se obtendría de manera exógena, sin necesidad de producirse constantemente en el organismo durante el ciclo de Calvin-Benson (fase oscura de la fotosíntesis); asimismo no se contaría con parte de la materia prima necesaria para la formación de glucosa, ya que al suspender la fase luminosa de la fotosíntesis no se producirían los ATP y NADH necesarios. De igual forma la fructosa sería incorporada a la glucólisis adicionándole un grupo fosfato, saltando los primeros pasos de la glucólisis, es decir glucosa → glucosa-6-P → fructosa-6-P (Lenhinger, 1979).

- Purificación del cultivo

Se resolvió comprobar la efectividad del meropenem sobre el medicamento original utilizado por Ferris y Hirsh (1991) para la purificación de cultivos de cianobacterias (imipenem), después de haber revisado y comparado las propiedades de ambos. A pesar de ser compuestos químicamente similares, el meropenem tiene una mayor actividad

respecto al imipenem frente a bacterias Gram negativas como *Pseudomonas* spp. (Giner et al., 1995). Se decidió usar la misma concentración del artículo anteriormente mencionado, por no encontrar referencia alguna sobre el uso de este nuevo antibiótico en la desinfección de cultivos.

El adicionar una fuente de carbono (glicerol y d-glucosa), al medio reside en el supuesto de que sí un cultivo mixto es puesto bajo condiciones favorecedoras para las bacterias heterótrofas y restrictivas para las cianobacterias; las primeras, es decir aquellas cuya división celular es más rápida, serán estimuladas a ingerir los nutrientes junto con el antibiótico (meropenem), matándolas así más rápidamente que aquellas cuya fisión es más lenta (Ferris y Hirsch, 1991).

En cuanto a la purificación de cultivos de cianobacterias, con ese objeto se utilizaron varios métodos, desde tratamiento con radiación UV, la utilización de medicamentos ó técnicas de lavados con micropipetas. Investigadores como Watanabe y colaboradores (1998), emplearon el método de vertido en cajas de agarosa con bajo punto de gelificación con muy buenos resultados. No obstante algunos otros como Ferris y Hirsh (1991) optaron por utilizar los antibióticos cefoxitina, ampicilina, penicilina G, imipenem y cicloheximida para obtener cultivos axénicos, obteniendo hasta 80% de éxito al purificar cultivos con imipenem. De igual forma en el presente trabajo se intento obtener cultivos axénicos a través de la acción del medicamento meropenem, el cual tiene una acción muy similar al imipenem. No obstante, y a pesar de su amplio espectro de actividad y alta potencia, no pudo eliminar las bacterias heterotróficas. Aunque se observó que ejercía un retraso en la aparición de las bacterias, al comparar la densidad de estos últimos con los grupos control (sin meropenem) con los grupos de medicamento. Asimismo es importante mencionar que el antibiótico no pareció afectar a *Chroococciopsis* spp. a pesar de inhibir la síntesis de la pared celular bacteriana de gram positivas y gram negativas (su pared es muy similar a la de las cianobacterias), ya que en los cultivos con d-glucosa las cianobacterias se desarrollaron al consumirla. (Stanley et al., 1989; Watanabe et al., 1998; PLM, 2012)

Por otro lado, el meropenem resulta totalmente ineficaz contra los hongos encontrados en los cultivos, debido a las diferencias estructurales entre las células. Por ello se sugiere utilizar en futuros ensayos un antimicótico

- Morfología colonial y celular

En cuanto a morfología colonial de las cianobacterias, no existe un consenso acerca de su importancia, por ello algunos autores suelen excluirla por competir al caracterizar morfológicamente géneros y especies. Por ejemplo autores (Pineda-Mendoza et al., 2011; Sciuto et al., 2011; Morales, 2009 y Domínguez, 2008) en sus respectivas determinaciones de cianobacterias omiten completamente la forma adquirida por los microorganismos al ser cultivados. A pesar de que la forma colonial es un rasgo distintivo para su determinación taxonómica. Asimismo Fonseca y colaboradores (2009), mencionan muy brevemente la apariencia colonial de una cianobacteria, enfocándose más a los resultados moleculares obtenidos. Sin embargo existen algunos otros investigadores como Berrendo (2008), quien dentro de su caracterización de cianobacterias dominantes en los sistemas fluviales, lejos de omitir la morfología colonial, la incluyó dentro de su estudio realizando diversas comparaciones entre los cambios observados en las algas verde-azules y las zonas de colecta.

Las cianobacterias extraídas directamente de las CBS, se presentaron en congregaciones semiesféricas, fuertemente adheridas. No obstante los organismos crecidos en medio BG 11 agarizado presentaron una morfología colonial muy peculiar la cual varió con los días. La forma comenzó siendo circular y al cabo de 40 días terminó semejando la forma de una flor (colonia irregular). Por el contrario los organismos crecidos en medio BG 11 líquido formaron agregados mucho más pequeños que los anteriores e incluso se observó que un gran número de células permanecieron adheridas individualmente a las paredes de los frascos, sin llegar a formar una colonia. No obstante algunas otras células de estos mismos cultivos se adhirieron entre ellas formando grandes agregados flotantes, esto como consecuencia de una gran producción de polisacáridos en estas células. La característica forma colonial de *Chroococcidiopsis* spp. en medio agarizado, al contrario de las agrupaciones observadas en las CBS y en medio BG 11 líquidos, se debe a la inmovilización de las células por los agentes solidificantes del agar, lo cual les permitió crecer formando masas aisladas (colonias) (Flores-Maya et al., 2004; Madigan et al., 2009).

Acercas de la morfología colonial, *Chroococcidiopsis* spp. demostró ser un microorganismo formador de colonias a partir de las consecutivas divisiones de varias células, no solamente de una como suele suceder en muchas otras bacterias, este comportamiento

puede ser atribuido a la propia fisiología del organismo, ya que se ha reportado un lento periodo generacional para estas algas verde-azules (en algunas céepas de hasta 16 días) (Billi et al., 1998).

De la misma manera, los cambios observados tanto en la morfología general de la colonia, como a nivel celular entre los organismos internos y externos, pueden ser interpretados como un comportamiento comunicativo y cooperativo por parte de las células. Pues durante la primera semana posterior a la resiembra, todas las células presentaron la misma forma, tono e incluso un tamaño muy similar, además de una distribución bastante espaciada una de la otra. Sin embargo al paso de los días, conforme la cantidad de cianobacterias aumentaba y el espacio entre una y otra disminuía, se advirtieron algunos cambios en diversas células, principalmente su coloración se tornó más oscura. Esta peculiar situación puede ser consecuencia de una proximidad y densidad celular suficiente que resulta en un comportamiento coordinado y benéfico. Así una serie de señalizaciones moleculares por parte de las células internas es liberada al llegar a una cierta densidad, estas a su vez posiblemente controlaron la expresión de esa variedad de coloración mas oscura en *Chroococcidiopsis* spp. (Dunny et al., 2008; Shapiro, 1998).

En muchas ocasiones la multicelularidad en cianobacterias solo es reconocida en aquellas formas filamentosas, especialmente las que forman acinetos y heterocistos. Sin embargo existe un estudio que revela la descendencia de la mayoría de las cianobacterias a partir de un ancestro multicelular, un clado de una sola célula. De igual forma algunos estudios revelan cierta cercanía entre los organismos del género *Chroococcidiopsis* y algunas algas verde-azules (Nostocales y Stigonematales) formadoras de heterocistos. Esta relación se da por el desarrollo y comportamiento similar de los heterocistos, con la formación de células especializadas bajo condiciones limitantes de nitrógeno en las *Chroococcidiopsis*. La producción de estas células, nos lleva a pensar en una diferenciación celular en las colonias, con diversas explicaciones sobre su utilidad. Por ejemplo, ésta última puede verse implicada en la propia formación colonial (como ocurre en *E. coli*), la cooperación metabólica, la excreción de enzimas degradativas, la producción de una matriz extracelular para formar una biopelícula, entre otras (Shapiro, 1998; Fewer et al., 2002; Dunny et al., 2008; Schirromeister et al., 2011)

En cuanto a la morfología celular, los organismos del género *Chroococcidiopsis* presentaron en todos los casos una forma irregularmente esférica, no obstante existieron grandes diferencias en cuanto al tamaño de las células. Las mas grandes se presentaron entre los cianobacterias crecidas en medio BG11 líquido, con una media de 10.16 μm , mientras que los más pequeños fueron aquellas crecidas en medio BG 11 agarizado con una media de 7.66 μm . Probablemente esto fue una consecuencia de una distribución homogénea de los nutrientes en el medio líquido, comparado con el medio agarizado.

Del mismo modo es importante señalar que el tamaño de los microorganismos no se vio afectado severamente por las condiciones de cultivo, ya que Rivera-Aguilar y colaboradores (2006) reportaron células de 7-12 μm de diámetro, en las CBS del valle de Tehuacán, coincidiendo con las observaciones del presente trabajo. Sin embargo al comparar las dimensiones de estos organismos con otras especies y cépas del mismo género, no coincidieron plenamente ya que las primeras presentan un menor tamaño (5 y 6.3 μm). Pese a ello, el tamaño de estos últimos microorganismos pudo haber cambiado por las condiciones de preservación y/o cultivo (posiblemente un extenso período de tiempo), ya que todos los datos obtenidos en esos trabajos se basaron en cépas del género *Chroococcidiopsis* (Stanley et al., 1989).

Por otra parte se presentaron grandes diferencias en la coloración de *Chroococcidiopsis* spp, acordes a las condiciones a las que fueron sometidas. En general la intensidad de su coloración fue disminuyendo, desde un verde intenso e incluso café, para las extraídas directamente de la costra, pasando por un verde mas claro para aquellas sometidas a fotoperíodo dentro de la incubadora, terminando con un verde-amarillento para aquellas privadas de luz. La tonalidad más oscura observada en los organismos dentro de las CBS puede servirles de fotoprotección ante la intensa irradiación UV, ya que estos microorganismos al ser dominantes en las costras expuestas (aquellas alejadas de la cubierta vegetal), requieren una mayor defensa para evitar la formación de dímeros de timina y/o especies reactivas de oxígeno. Por otro lado el color de aquellos organismos crecidos en oscuridad se debe a que bajo estas condiciones los organismos pierden hasta el 10% de la cantidad normal de ficocianina, el cual es un pigmento accesorio que transfiere la energía luminosa a la clorofila a (Flores-Maya et al., 2004; Rivera-Aguilar et al., 2006; Heres et al., 2008).

En cuanto a la vaina, esta solo fue visible en los organismos extraídos de las CBS y en aquellos cultivados en medio líquido BG 11. En el primer caso, la gran vaina observada en *Chroococcidiopsis* spp. está involucrada (junto con la producción de mucopolisacáridos) con el retardo de la pérdida de agua en las células cuando se encontrasen en su entorno natural, debido a las altas temperaturas reportadas en los diversos sitios donde se han colectado, por ello esta característica ha sido ampliamente reportada por diversos investigadores (Grilli et al., 1996). Por otro lado, los microorganismos en medio BG 11, desarrollaron una gran vaina como respuesta al estado de flotación en que se encontraban, ya que en su entorno natural estaban adheridas a un sustrato fijo; por ello ayudadas en muchas formas por la presencia de exopolisacáridos (mucilago/ vaina firme) los organismos pudieron adherirse a las paredes de los frascos de cultivo, además de formar grandes agregados flotantes pese a no estructurar una colonia como tal (Witthon y Potts, 2000). Del mismo modo, al no ser un cultivo axénico, la gran producción de polisacáridos por parte de los organismos del género *Chroococcidiopsis*, puede ser una estrategia de supervivencia para optimizar los recursos del medio.

Igualmente, en los cultivos de *Chroococcidiopsis* spp. BG 11, BG 11d y BG 11f se observaron baeocitos de forma libre, los cuales son característicos de todos los miembros del orden pleurocapsales. En el primer caso los baeocitos se formaron a partir de la división de la célula madre en cuatro células hijas. Al crecerlas en condiciones heterotróficas, aumento el número de divisiones en las células madre dando como resultado un número mayor de baeocitos más pequeños que los observados en los cultivos BG 11 líquido. Estos resultados nos llevan a pensar en un cambio de estrategia propiciado por las condiciones de crecimiento, es decir las modificaciones fenotípicas observadas en las algas verde-azules, son una respuesta a los cambios físicos y químicos en su ambiente (adición de d-glucosa/fructosa y privación de luz); todas adaptaciones fisiológicas genéticamente programadas. Asimismo el cambio en la producción de cuatro a más de 10 baeocitos, puede ser consecuencia de un intento de la cianobacteria por aprovechar los recursos disponibles (glucosa/fructosa), antes de que estos fueran consumidos por otros organismos presentes en los cultivos (bacterias heterotróficas y hongos), los cuales se desarrollaron al encontrarse bajo estas condiciones heterotróficas. Al observar los cultivos crecidos bajo fotoautotofía, solo se percibió crecimiento de *Chroococcidiopsis* spp., muy probablemente los otros organismos permanecerían en un estado de latencia (endosporas) en espera de condiciones más propicias para su

desarrollo, lo cual ocurrió al resembrar las cianobacterias en un medio rico en azúcares (Flores-Maya et al., 2007; Morales, 2009).

En cuanto al tamaño de los baeocitos de *Chroococcidiopsis* spp, este osciló entre 1.25 μm . y 5 μm , con una media que va de 2.2 μm , 2.6 μm y 4.22 μm en los cultivos de d-glucosa, fructosa y BG 11 líquido respectivamente. Ambas mediciones coinciden plenamente con el estudio de Rivera-Aguilar y colaboradores (2006) quienes reportaron baeocitos de 2-3 μm a partir de poblaciones directas de las CBS. El tamaño de los baeocitos no cambia las condiciones de cultivo a los que fueron sometidos. Asimismo los reportes del manual Bergey's, muestran un tamaño promedio de 3 y 4 μm , los cuales también son muy similares a los reportados en el presente trabajo. Los resultados de los tres estudios son muy próximos, lo cual nos podría indicar cierta constancia en el tamaño de los baeocitos, sin importar las condiciones a las que se someta el microorganismos (no importa si se encuentra dentro de una población natural o bajo condiciones de cultivo en un laboratorio) (Stanley et al., 1989).

El aislamiento, purificación y caracterización de cianobacterias extraídas de diversos ecosistemas, es muy importante para el estudio de la diversidad de las algas verde-azules. A pesar de las novedosas técnicas en biología molecular, cuyo trabajo ha producido miles de secuencias (metagenomas), no se deben dejar a un lado las descripciones morfológicas y/o fisiológicas (tanto en campo como en laboratorio), ya que estas proveen un enfoque integral entre las características fenotípicas y genotípicas, que a su vez nos permiten entender mejor tanto la fisiología como la ecología de las cianobacterias (Domínguez, 2008).

Por otro lado los resultados nos indican que las características morfológicas y fisiológicas no proporcionan suficiente evidencia para identificar a la especie del género *Chroococcidiopsis* encontrada en las CBS del Valle de Zapotitlán. Asimismo resulta difícil discernir entre los organismos que pertenecen o no a este grupo, por la gran cantidad de diferencias observada en los microorganismos al ser sometidos a diferentes condiciones de cultivo. Por ello se sugiere que en los próximos estudios sobre esta cianobacteria, se complementen las descripciones morfológicas y/o fisiológicas con estudios moleculares, los cuales por cuestiones técnicas no se pudieron realizar en el presente trabajo.

Conclusiones

- Las condiciones óptimas de crecimiento de *Chroococcidiopsis* spp. aislada de costras biológicas del Valle de Tehuacán, Puebla, fueron en medio BG11 estándar a 32 °C con un fotoperiodo de 12/12 hrs.
- *Chroococcidiopsis* spp. aislada de costras biológicas del Valle de Tehuacán, Puebla, presentó morfologías muy diferentes en condiciones naturales en comparación con los cultivos *in vitro*. Algunas de las diferencias más notables fueron, cambio en la coloración, presencia de vaina y forma colonial/agregado.
- Los cambios en las condiciones ambientales o de cultivo, afectan la morfología colonial y celular de *Chroococcidiopsis* spp. aislada de las costras biológicas del Valle de Tehuacán, Puebla. Algunas de las diferencias más notables entre los cultivos, fueron la presencia y el número de baeocitos, la coloración de las células, la morfología colonia, el tamaño de las cianobacterias y la presencia de vaina.
- Es necesario realizar estudios morfológicos más a detalle de las cianobacterias presentes en las costras biológicas de Zapotitlán Salinas, Puebla, que se enfoquen en los cambios de los organismos, en respuesta a los factores ambientales para comprender mejor sobre la ecología de estos microorganismos.

Bibliografía

Allen, M. M; 1968; Simple condition for growth of unicellular blue-green algae on plate; Journal phycology; United States of America; 4:1-4.

Allen M. M. and Stainer R. Y; 1968; Selective isolation of Blue-green algae from water and soil; Microbiology; Great Britain; 51:203-209.

Belnap, J. and Lange O. L; 2001; Biological soil crust: structure, function and management; Ecological Studies; 150:479.

Belnap, J. Rosentrer, R. Leonard, S. Kaltenecker, J. H. Williams, J and Eldridge, D; 2001; Biological soil crust: ecology and management; United States Departament of the Interior Bureau of Land Management; U.S.A; 118 pp.

Berrendo-Gómez, E; Caracterización morfológica, genética y fisiológica de cianobacterias dominantes en sistemas fluviales; Tesis doctoral; Facultad de Ciencias, Universidad Autónoma de Madrid; 262 pp.

Berrendo, E. Perona, E. and Mateo, P; 2008; Genetic and morphological characterization of *Rivularia* and *Calothrix* (Nostocales, Cyanobacteria) from running water; International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology; 58, 447–460

Billi, D and Caiola G. M; 1996; Effects of nitrogen limitation and starvation on *Chroococcidiopsis* sp. (Chroococcales); New phitology; 133:563-571.

Billi, D. Caiola, G.M. Paolozzi, L. and Ghelardini, P; 1998; A Method for DNA extraction from the desert cyanobacterium *Chroococcidiopsis* and its application to identification of *ftsZ*; Applied and environmental microbiology; American Society for Microbiology; 64:10:4053-4056.

Billi, D. Friedmann, E.I. Hofer, K.G. Grilli-Caiola, M. and Ocampo-Friedmann, R; 2000; Ionizing-Radiation resistance in the desiccation-tolerant cyanobacterium *Chroococcidiopsis*; Applied and environmental Microbiology; 66:4:1489-1492.

Billi, D. Friedmann I. Helm R. F. and Potts M; 2001; Gene Transfer to the desiccation-tolerant cyanobacterium *Chroococcidiopsis*; Journal of bacteriology; American Society for Microbiology; 183:7:2298-2305.

Billi, D. Wilmotte, A. and McKay C.P; 2010; Desert strains of *Chroococcidiopsis*: a platform to investigate genetic diversity in extreme environments and explore survival potential beyond Earth; European Planetary Science Congress; 5:267.

Billi, D; 2010; Genetic tools for desiccation- and radiation- tolerant cyanobacteria of the genus *Chroococcidiopsis*; Technology and Education topics in applied Microbiology and Microbial Biotechnology; Italy; 1517-1521 pp.

Comisión Nacional de Áreas Naturales Protegidas; 2010; Dirección de la Reserva de la Biosfera Tehuacan-Cuicatlán; "<http://www.conanp.gob.mx>"

Coutiño, B. y Montañez, A. L; 2000; Los líquenes; Ciencias; 59:64-65

Da Silva, G.P. Mack, M. and Contiero, J; 2009; Glycerol: A promising and abundant carbón source for industrial microbiology; Biotechnology Advances; 27:30-39.

Dávila, P. Arizmendi, M. Valiente-Banuet, A. Villaseñor, J.L. Casas, A. y Lira R; 2002; Biological diversity in Tehuacán-Cuicatlán Valley, México; Biodiversity and Conservation; 11: 421- 442.

Department of agriculture; 1997; Introduction to microbiotic crust; United States of America.

Domínguez E. J; 2008; Estudios evolutivos y morfológicos de cianobacterias relacionadas a *Calothrix*; Tesis para obtener el título de biólogo, Facultad de Ciencias, Universidad Nacional Autónoma de México; 64 pp.

Dunny, G. M. Brickman, T. J. and Dworkin, M; 2008; Multicellular behavior in bacteria: communication, cooperation, competition and cheating; BioEssays; 30:296-298.

Ferris, J.M. y Hirsch F.C; 1991; Method for Isolation and Purification of Cyanobacteria; Applied and environmental microbiology; 57:5:1448-1452.

Fewer, D. Friedl, T. and Büdel, B; 2002; Chroococciopsis and heterocyst-differentiating cyanobacteria are each other's closest living relatives; Molecular phylogenetics and evolution; 23:1:82-90.

Fioulaine, S. Lunn, J. E. Borel, F. and Ferrer, J.L; 2005; The structure of a cyanobacterial sucrose-phosphatase reveals the sugar togs that release free sucrose in the cell; The plant cell; Germany; 17:2049-2058.

Flores-Maya, S. Rivera-Aguilar, V. M. y Chávez-Araujo A. M; 2007; Bacteriología básica; Universidad Nacional Autónoma de México; Facultad de Estudios Superiores Iztacala; México; 114 pag.

Fonseca, F. F. A. L. Calijuri, M. C. Sturion, L. A. Yukio, H. R. Bonaldo, G. D. and Fiore, M. F; 2009; Morphological and molecular characterization of cyanobacteria from a Brazilian facultative wastewater stabilization pond and evaluation of microcystin production; Hidrobiología; 627:195–209

Garcia-Pichel, F. López-Cortés, A. and Nübel, U; 2001; Phylognetic and Morphological Diversity of Cyanobacteria in soil desert crust from the Colorado Plateau; Applied and environmental microbiology; 67:4:1902-1910.

Giner- Almaraz, S. Canós-Cabedo, M.*, y Ferrer-Gómez, C;1995; Meropenem: un nuevo carbapenem en el arsenal terapéutico; Farm Hosp 1995; 19 (2): 109-113

Grilli-Caiola, M. Billi, D y Friedman, I. E; 1996; Effect of desiccation on envelopes of the cyanobacterium *Chroococciopsis* sp. (Chroococcales); Journal Europeo de fisiología; Reino Unido.

Heres y Pulido, M. E. Castañeda, S. A. N. Rodarte, M. B. Segal, K. A. A. Dueñas, G. I. E. Castañeda, P. M. L. Ordaz, T. M. G. y Rodríguez, A. R; 2008; Flujo de la información genética, 1 Dogma central de la biología molecular; UNAM, Facultad de Estudios Superiores Iztacala; México; 194 pp.

Hershkovitz, N. Oren, A. and Cohen, Y; 1991; Accumulation of Trehalose and Sucrose in Cyanobacteria exposed to matric water stress; Applied and environmental Microbiology; 57:3:645-648.

Johansen, J. R; 1993; Cryptogamic crust of semiarid and arid lands of North America; Journal of phicology; 29:140-147.

Joset-Espardellier, C. Astier, C. Evans, E. H. and Carr, N. G; 1978; Cyanobacteria grown under photoautotrophic, photoheterotrophic and heterotrophic regimes: sugar metabolism and carbon dioxide fixation; FEMS Microbiology Letters; 4:261-264.

Kerry, E;1990; Effects of temperatura on growth rates of fungi from subantartic Mcquarie Island and Casey, Antarctica; Polar biology; 10:293-299.

Lambert, D. H. and Stevens, S.E; 1986; Photoheterotrophic growth of *Agmenellum quadruplicatum* PR-6; Journal of Bacteriology; 165:2:654-656.

Lange, O. L. Kidron, G. J. Büdel, B. Meyer, Killian, E. and Abeliovich, A; 1992; Taxonomic composition and photosintetic characteristics of “biological soil crust” covering sand dunes in the West Neveg Desert ; Funtional Ecology; 6:519-527.

Leningher, A. L; 1979; Bioquímica; Omega; 2º edición; Barcelona.

López-Galindo, F. Muñoz-Iniestra, D. Hernández-Moreno, M. Soler-Aburto, A. Castillo-López, M. C. y Hernández-Alzate I; 2003; Análisis integral de la toposecuencia y su influencia en la distribución de la vegetación y la degradación del suelo en la subcuena de Zapotitlán Salinas, Puebla; Boletín de la Sociedad Geológica Mexicana; 56:1:19-41.

Madigan, M. T. Martinko, J. M. Dunlap, P. V. and Clarck D. P; 2009; Brock Biología de los microorganismos, Pearson Addison Wesley; España; 1259 pp.

Mazor, G. Kidron G. J. Vonshak, A. and Abeliovich, A; 1996; The role of cyanobacterial exopolysaccharides in structuring desert microbial crust; FEMS Microbiology ecology; 21:121-130

Méndez, L. I; 2005; Zonificación de la Reserva de la Biosfera Tehucán-Cuicatlán: un enfoque fitogeográfico; Tesis de doctorado en ciencias biológicas; Facultad de Estudios Superiores Iztacala, Universidad Nacional Autónoma de México; 115 pag.

Morales, B. E; 2009; Caracterización morfológica y molecular de *Microcoleus paludosus*, presente en las costras biológicas del Valle de Tehuacán, Puebla; Tesis para obtener el título de biólogo; Facultad de Estudios Superiores Iztacala, Universidad Nacional Autónoma de México; 63 pp. 48

Morin, V. C; 2008; Efecto de las costras biológicas sobre la germinación y crecimiento temprano de tres especies vegetales de la región del Valle de Zapotitlán Salinas, Puebla, México; Tesis de Maestría en ciencias biológicas; Facultad de Estudios Superiores Iztacala; Universidad Nacional Autónoma de México; 59 pag.

Neher, D. A. Walters, T. L. Tramer, E. Weicht, T. R. Veluci R. M. and Saiya-Cork K; 2003; Biological soil crust and vascular plant communities in a sand savanna of northwestern Ohio; Journal of the Torrey Botanical Society; 130:244-252.

O'Grady, J. y Morgan, A.J; 2011; Heterotrophic growth and lipid production of *Chlorella protothecoides* on glycerol; Bioprocess Biosyst Eng; 34:121–125

Pierik, R.I.M; 1990; Cultivos *in vitro* de plantas superiores; Ediciones Mudi-Prensa; Madrid; 326 pp.

Pineda-Mendoza, R. Martínez-Jerónimo, F. Garduño-Solórzano, G y Olvera-Ramírez, R; 2011; Caracterización morfológica y molecular de cianobacterias filamentosas aisladas de florecimientos de tres lagos urbanos eutróficos de la ciudad de México; Polibotánica; 31: 31-50.

Portal del Gobierno del municipio de Tehuacán, Puebla; H. Ayuntamiento 2008-2011; 22 de agosto de 2009; "<http://www.Tehuacán.gob.mx>"

Protist information server; 1995-2012; Japan Science and Technology Corporation; protist.i.hosei.ac.jp/Protist_menuE.html.

Quintana, N. Van der Kooy, F. Van de Rhee, M. D. Voshol, G. P. and Verpoorte, R; 2011; Renewable energy from Cyanobacteria: energy production optimization by metabolic pathway engineering; *Applied Microbiol Biotechnol*; 91:471-490.

Redfield, E. Barns, S.M. Belnap, J. Daane L.L. and Kuske C.R; 2002; Comparative diversity and composition of cyanobacteria in three predominant soil crust of Colorado Plateau; *FEMS Microbiology Ecology*; Elsevier; 40:55-63.

Rivera-Aguilar, V. Manuelle Cacheux, I. Godínez Álvarez, H; 2004; Las costras biológicas del suelo y zonas áridas; *Ciencias*; 75: 24-27.

Rivera-Aguilar, V. Montesano, G. Rodríguez-Zaragoza, S. y Duran-Diaz, A; 2006; Distribution and composition of cyanobacteria, mosses and lichens of the biological soil crust of the Tehuacán Valley, Puebla, México; *Journal of arid environments*; 67:208-225.

Rippka, R., J. Deruelles, J. Waterbury, M. Herdman and R. Stanier; 1979; Generic assignments, strain histories and properties of pure cultures of cyanobacteria. *J. Gen. Microbiol*; 111: 1-61

Rocap, G; Moore, R. L and Chisholm, W.S; 1999; Molecular phylogeny of *Prochlorococcus* ecotypes; *Bulletin de l' Institut océanographique, Monaco*; 19:107-115

Rzedowski, J; 1981; *Vegetación de México*; Escuela Nacional de Ciencias Biológicas (I.P.N.); Limusa; 1° reimpresión; México; 430 pag.

Schirrmeister, B. E; Antonelli, A. and Bagheri, H. C; 2011; The origin of multicellularity in cyanobacteria; *BMC Evolutionary Biology*; 11:45.

Sciuto, K. Rascio, N. Andreoli, C. and Moro, I; 2011; Polyphasic characterization of ITD-01, a cyanobacterium isolated from the Ischia Thermal District (Naples, Italy); *Fottea*; 11:1:31-39.

Sharipo, J. A; 1998; Thinking about bacterial populations as multicellular organisms; *Annual Reviews Microbiology*; 52:81-104.

Stainer, R.Y; Kunisawa, R; Mandel, M y Cohen-Bazier, G 1971; Purification and Properties of Unicellular Blue-Green Algae (Order Chroococcales); Reviews bacteriological; USA; 35:2 171-205.

Stanley, T. J. Bryant, P. M. Pfennig, N and Holt, G. J; 1989; Bergey's manual of systematic Bacteriology; Williams and Wilkins; USA; .Vol. III.

Stanley, T. J. Bryant, P. M. Pfennig, N and Holt, G. J; 1989; Bergey's manual of systematic Bacteriology; Section 19 "Oxygenic Photosynthetic Bacteria. Group I Cyanobacteria. Preface; Castenholz, R.W. and Waterbury, USA; 3:1710-1728.

Subba Rao, N. S; 2001; Soil microbiology (Fourth edition of soil microorganisms and plant growth); Science Publishers, Inc; India; 407 pag.

Tomita, A; Knoll, Andrew; Cavanaugh, Colleen M. y Ohno T; 2006; The evolutionary diversification of cyanobacteria: Molecular-phylogenetic and paleontological perspectives; The National Academy of Sciences, USA

Vergara, H. C; 1997; Abejas y cactáceas en el Valle de Zapotitlán de las Salinas, Instituto de Investigación y postgrado/Departamento de química y biología; Universidad de las Américas, Puebla.

Watanabe, M.M. Nakagawa, M. Katagiri, M. Aizawa, K. Hiroki, M. and Nozaki, H; 1998; Purification of freshwater picoplanktonic cyanobacteria by pour-plating in "ultra-low-gelling-temperatura agarose"; Phycological Research; 46:71-75.

Waterbury, J; 2006; Prokaryotes, Chapter II: The cyanobacteria-Isolation, purification and identification; 4:1053-107

Whitton, B. A. and Potts, M; 2000; The ecology of cyanobacteria: their diversity in time and space; Springer; 669 pp.

Won Hong, J. Hang-Gu, C. Sun-Ho, K. and Hon-Sun, Y; 2010; Axenic purification and cultivation of an Arctic cyanobacterium, *Nodularia spumigena* KNUA005, with cold

tolerance potential for sustainable production of algal-based biofuel; Algae; Korea;
25:2:99-104.

Apéndice I

Medio BG-11

El medio BG 11 (modificado por Allen) ha sido ampliamente usado tanto en el aislamiento, como en el mantenimiento de un gran número de cianobacterias. Ya que su alta concentración de nitratos (NaNO_3) soporta muy bien su crecimiento. Además, se ha empleado en múltiples trabajos realizados específicamente sobre el género *Chroococcidiopsis*. (Allen and Stainer, 1968; Billi et al., 2001; Billi and Caiola, 1996; Fewer et al., 2002; Waterbury, 2006; Won Hong et al., 2010)

Tabla 7. Composición media estándar del medio BG 11 utilizado para el crecimiento de la cianobacteria *Chroococcidiopsis* spp.

Compuesto	Solución stock (g/l)	ml/litro
NaNO_3	150	10
$\text{K}_2\text{HPO}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ ó K_2HPO_4	40 ó 30	1
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	75	1
$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	36	1
Acido cítrico	6	1
Citrato de amonio férrico	6	1
EDTA	1	1
Na_2CO_3	20	1
Metales traza*	Ver abajo	1

(*) La solución de metales traza contiene:

H_2BO_3	2.86 g/l
$\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	1.81 g/l
$\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0.222 g/l
$\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0.390 g/l
$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	0.079 g/l
$\text{Co}(\text{NO}_3)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	0.0494 g/l

Antes de meter a esterilizar el medio, se cuidó que el pH fuera semejante a 7.1, una vez estabilizado se llevó a la autoclave a 121 °C o 15 lb. de presión durante 15 minutos, posteriormente fue refrigerado a 4 °C. En el caso del medio BG11 agarizado, las sales y el agar bacteriológico (12 gramos/litro) fueron preparados y esterilizados por separado, después del autoclave se mezclaron para finalmente ser vaciados en cajas petri estériles (Stanier, et al., 1971)

Apéndice II

Tabla 8. Resultados de crecimiento heterotrófico facultativo de *Chroococcidiopsis* spp.

Cultivo	Luz	BG 11	dex	fruc	sac	gli	Meropenem	Crecimiento <i>Chroococcidiopsis</i>
BG11m80	--	+	--	--	--	--	+	--
BG11m80	--	+	--	--	--	--	+	--
BG11m80	--	+	--	--	--	--	+	--
BG11m234	--	+	--	--	--	--	+	--
BG11m234	--	+	--	--	--	--	+	--
BG11m234	--	+	--	--	--	--	+	--
BG11m306	--	+	--	--	--	--	+	--
BG11m306	--	+	--	--	--	--	+	--
BG11m306	--	+	--	--	--	--	+	--
BG11d80	--	+	+	--	--	--	+	++
BG11d80	--	+	+	--	--	--	+	++
BG11d80	--	+	+	--	--	--	+	+
BG11d234	--	+	+	--	--	--	+	+++
BG11d234	--	+	+	--	--	--	+	+++
BG11d234	--	+	+	--	--	--	+	+++
BG11d306	--	+	+	--	--	--	+	+++
BG11d306	--	+	+	--	--	--	+	+++
BG11d306	--	+	+	--	--	--	+	+++
BG11f80	--	+	--	+	--	--	+	++
BG11f80	--	+	--	+	--	--	+	++
BG11f80	--	+	--	+	--	--	+	++
BG11f234	--	+	--	+	--	--	+	++
BG11f234	--	+	--	+	--	--	+	+
BG11f234	--	+	--	+	--	--	+	++
BG11f306	--	+	--	+	--	--	+	++
BG11f306	--	+	--	+	--	--	+	+
BG11f306	--	+	--	+	--	--	+	+
BG11s80	--	+	--	--	+	--	+	--
BG11s80	--	+	--	--	+	--	+	--
BG11s80	--	+	--	--	+	--	+	--
BG11s234	--	+	--	--	+	--	+	--

BG11s234	--	+	--	--	+	--	+	--
BG11s234	--	+	--	--	+	--	+	--
BG11s306	--	+	--	--	+	--	+	--
BG11s306	--	+	--	--	+	--	+	--
BG11s306	--	+	--	--	+	--	+	--
BG11g80	--	+	--	--	--	+	+	--
BG11g80	--	+	--	--	--	+	+	--
BG11g80	--	+	--	--	--	+	+	--
BG11g234	--	+	--	--	--	+	+	--
BG11g234	--	+	--	--	--	+	+	--
BG11g234	--	+	--	--	--	+	+	--
BG11g306	--	+	--	--	--	+	+	--
BG11g306	--	+	--	--	--	+	+	--
BG11g306	--	+	--	--	--	+	+	--
BG 11080	--	+	--	--	--	--	--	--
BG11080	--	+	--	--	--	--	--	--
BG11080	--	+	--	--	--	--	--	--
BG110234	--	+	--	--	--	--	--	--
BG110234	--	+	--	--	--	--	--	--
BG110234	--	+	--	--	--	--	--	--
BG110306	--	+	--	--	--	--	--	--
BG110306	--	+	--	--	--	--	--	--
BG110306	--	+	--	--	--	--	--	--

Abreviaturas y simbología:

dex: d-glucosa (5 g/l)

fruc: fructosa (5 g/l)

sac: sacarosa (5 g/l)

gli: glicerol (7.93 ml/l)

+: elemento adicionado / crecimiento positivo de la cianobacteria

--: elemento omitido / no se observo crecimiento de la cianobacteria

