



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

FACULTAD DE CIENCIAS

SISTEMÁTICA

**Taxonomía integrativa de *Blennothrix ganeshii*
(Cyanobacteria/Cyanoprokaryota) de la región central de México**

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

DOCTORA EN CIENCIAS

PRESENTA:

YENNY PAOLA BELTRÁN MAGOS

TUTOR PRINCIPAL: DR. JAVIER CARMONA JIMÉNEZ
FACULTAD DE CIENCIAS

COMITÉ TUTOR: DRA. GLORIA VILA CLARA FATJÓ
FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES IZTACALA

DRA. GUILLERMINA ALCARAZ ZUBELDÍA
FACULTAD DE CIENCIAS

MÉXICO, D.F.

JUNIO, 2014.



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.



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE
MÉXICO

POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS
FACULTAD DE CIENCIAS
DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO

OFICIO FCIE/DEP/119/14

ASUNTO: Oficio de Jurado

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

Me permito informar a usted que en la reunión ordinaria del Comité Académico del Posgrado en Ciencias Biológicas, celebrada el día **15 de abril de 2013**, se aprobó el siguiente jurado para el examen de grado de **DOCTORA EN CIENCIAS** del (la) alumno (a) **BELTRÁN MAGOS YENNY PAOLA** con número de cuenta **97536828** con la tesis titulada: **"Taxonomía integrativa de *Blennothrix ganeshii* (Cyanobacteria/Cyanoprokaryota) de la región central de México"**, realizada bajo la dirección del (la) **DR. JAVIER CARMONA JIMÉNEZ:**

Presidente:	DR. GUSTAVO ALBERTO MONTEJANO ZURITA
Vocal:	DR. ENRIQUE ARTURO CANTORAL URIZA
Secretario:	DRA. GLORIA VILA CLARA FATJÓ
Suplente:	DRA. PATRICIA GUEVARA FEFER
Suplente	DRA. GUILLERMINA ALCARAZ ZUBELDÍA

De acuerdo con lo anterior, el(a) alumno(a) se acogió a la nueva normatividad, con base en el artículo QUINTO TRANSITORIO en apego a lo establecido en el Artículo 31 del Reglamento General de Estudios de Posgrado (9 octubre de 2006).

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

Atentamente
"POR MI RAZA HABLARA EL ESPÍRITU"
Cd. Universitaria, D.F. a 13 de febrero de 2014.

Dra. María del Coro Arizmendi Arriaga
Coordinadora del Programa



AGRADECIMIENTOS

Al Posgrado en Ciencias Biológicas de la Universidad Nacional Autónoma de México.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por la beca otorgada para realizar mis estudios de posgrado, con número de registro 175787 Asimismo, por los recursos brindados a través del programa “Apoyos integrales para la formación de doctores en ciencias” con los cuales fue posible realizar la estancia de investigación a la Universidad Carl von Ossietzky en Oldenburg, Alemania.

A mi tutor principal el Dr. Javier Carmona Jiménez por confiar en mí, por apoyarme siempre, por alentarme a seguir adelante, por compartir su conocimiento, por sus consejos, por lograr que nuestro ambiente de trabajo fuera inmejorable, pero sobre todo por su amistad.

Al comité tutor integrado por la Dra. Gloria Vilaclara Fatjó y la Dra. Guillermina Alcaraz Zubeldía por haber confiado en mí, los consejos y el ánimo que me brindaron.

AGRADECIMIENTOS A TÍTULO PERSONAL

Al Comité Académico del Posgrado en Ciencias Biológicas por darme la oportunidad de concluir mis estudios de posgrado.

A los miembros del jurado conformado por la Dra. Patricia Guevara Fefer, el Dr. Gustavo Alberto Montejano Zurita y el Dr. Enrique Arturo Cantoral Uriza por sus comentarios y recomendaciones para mejorar el trabajo de tesis.

Al Hidrobiólogo Fermín Sergio Castillo Sandoval del laboratorio de Biogeoquímica Acuática del Instituto de Ciencias del Mar y Limnología, UNAM por su apoyo en la determinación de nutrimentos.

A la Dra. María Aurora Armienta, la I.Q. Alejandra Aguayo Ríos, la Q.F.B. Nora Elia Ceniceros B. y la Q.F.B. Olvia Cruz R. del Laboratorio de Química Analítica del Instituto de Geofísica, UNAM por su colaboración en la caracterización de iones mayores.

A la M. en C. Leticia Baños López del Instituto de Investigaciones en Materiales, UNAM por su ayuda en la determinación de los minerales por medio de difracción de rayos X.

A la Dra. Elvira Perona Urizar de la Universidad Autónoma de Madrid, España por su ayuda en el montaje de la evaluación de la toxicidad en *Artemia salina*.

A la M. en C. Beatriz Zúñiga Ruiz por su apoyo en el montaje del método para realizar el estudio de actividad disuasoria.

A la Dra. Josefina Herrera Santoyo y la Q.A. Verónica Muñoz Ocotero por su ayuda en la determinación de la presencia de los principales grupos de metabolitos secundarios.

A la Dra. Katarzyna A. Palinska de la Universidad Carl von Ossietzky en Oldenburg, Alemania por su apoyo en la implementación de técnicas moleculares y el análisis ultra-estructural realizado durante la estancia doctoral en dicha institución.

A la Dra. Miriam Guadalupe Bojorge García por su asesoría en la utilización de paquetes estadísticos.

A la Dra. Itzel Becerra Absalón por su valiosa ayuda para llevar a cabo el análisis de secuencias genéticas y la elaboración del análisis filogenético.

A la Dra. Miriam Guadalupe Bojorge García, M. en C. Mariana Cartajena Alcántara, M. en C. Rocío Ramírez Rodríguez, M. en C. Ximena Ramírez Lynn y al M. en Arquitectura Octavio Faustino Ruíz por su apoyo en el trabajo de campo.

A la Facultad de Química, UNAM por la donación de cepas de *Escherichia coli* y *Bacillus subtilis* empleadas en el estudio de actividad bactericida y por la realización del estudio de actividad antiinflamatoria utilizando el modelo de edema auricular inducido por TPA.

A mis padres por su apoyo incondicional, por su amor y sus consejos.

ÍNDICE

	Página
1. Resumen	1
2. Abstract	3
3. Introducción	5
4. Capítulo I. Caracterización fisicoquímica	21
4.1. Introducción	21
4.2. Preguntas e hipótesis	23
4.3. Objetivos	24
4.4. Material y método	24
4.5. Resultados	29
4.6. Discusión	40
5. Capítulo II. Evaluación de la actividad biológica	44
5.1. Introducción	44
5.2. Hipótesis	48
5.3. Objetivos	49
5.4. Material y método	49
5.4.1. Determinación de la presencia de los principales grupos de metabolitos secundarios	49
<i>Obtención de los extractos</i>	49

<i>Elaboración de reacciones coloridas</i>	50
<i>Terpenos</i>	50
<i>Flavonoides</i>	51
<i>Glicósidos</i>	51
<i>Alcaloides</i>	51
<i>Elaboración de perfiles cromatográficos</i>	52
5.4.2. Actividad bactericida	52
<i>Determinación de la concentración mínima inhibitoria</i>	52
5.4.3. Actividad citotóxica	53
<i>Obtención del extracto</i>	53
<i>Evaluación de la toxicidad</i>	54
5.4.4. Actividad antiinflamatoria	56
<i>Obtención de los extractos</i>	56
<i>Evaluación de la actividad antiinflamatoria</i>	56
5.4.5. Actividad disuasoria	58
<i>Obtención de los extractos</i>	58
<i>Evaluación del índice anti-apetitivo</i>	58
5.5. Resultados	59
5.5.1. Determinación de la presencia de los principales grupos de metabolitos secundarios	59

5.5.2. Actividad bactericida	61
5.5.3. Actividad citotóxica	62
5.5.4. Actividad antiinflamatoria	64
5.5.5. Actividad disuasoria	65
5.6. Discusión	67
5.6.1. Determinación de la presencia de los principales grupos de metabolitos secundarios	67
5.6.2. Actividad bactericida	68
5.6.3. Actividad citotóxica	68
5.6.4. Actividad antiinflamatoria	69
5.6.5. Actividad disuasoria	70
6. Capítulo III. Caracterización morfológica, morfométrica, genotípica y ultra-estructural	71
6.1. Introducción	71
6.2. Hipótesis	72
6.3. Objetivos	73
6.4. Material y método	73
6.4.1. Colecta y aislamiento	73
6.4.2. Identificación y caracterización morfológica y morfométrica	74
6.4.3. Análisis molecular	74
<i>Extracción de ADN</i>	74

<i>Amplificación y análisis de secuencias</i>	75
6.4.4. Análisis ultra-estructural	77
6.5. Resultados	78
6.5.1. Caracterización morfológica y morfométrica	78
6.5.2. Análisis genotípico	81
6.5.3. Análisis ultra-estructural	84
6.6. Discusión	88
7. Conclusiones	92
8. Literatura citada	96
9. Apéndice I: Glosario	108
10. Apéndice II: Artículo requisito	115
Beltrán-Magos Y., J. Carmona, G. Vilaclara y M. Boorge-García. 2013. Calcification of the filamentous cyanobacterium <i>Blennothrix ganeshii</i> in calcareous tropical streams of central region of Mexico. <i>Hidrobiológica</i> 23(1):9-19.	

LISTA DE FIGURAS Y TABLAS

FIGURAS

Fig. 1. Ubicación de los sitios de estudio, con presencia de poblaciones de agua dulce del género *Blennothrix*, en la región central de México.

Fig. 2. Análisis de componentes principales de la composición química de los sitios de estudio con y sin crecimientos de *Blennothrix*.

Fig. 3. Diagramas iónicos del promedio de cationes y aniones presentes en cada localidad, así como el promedio de la velocidad de corriente; durante las distintas épocas de colecta.

Fig. 4. Calcificación en *Blennothrix*.

Fig. 5. Análisis de componentes principales de la velocidad y la morfometría de las poblaciones de *Blennothrix* evaluadas.

Fig. 6. Microdilución en placa de 96 pozos para determinar la concentración mínima inhibitoria de los diferentes extractos de *Blennothrix*.

Fig. 7. Promedio y error estándar de los discos foliares impregnados con los diferentes extractos [(a) hexano, (b) acetato de etilo y (c) metanol]; correspondientes a las poblaciones de Manantiales y Micos.

Fig. 8. Árbol filogenético que muestra las relaciones entre las poblaciones estudiadas del género *Blennothrix* y Cyanoprokaryota del mismo orden (Oscillatoriales), basado en el análisis de secuencias del gen 16S rRNA, con *Gloeobacter violaceus* como grupo funcional externo.

Fig. 9. Detalles ultra-estructurales de los patrones de perforación en los crecimientos de *Blennothrix*.

Fig. 10. Detalles ultra-estructurales de los patrones de perforación en los crecimientos de *Blennothrix*.

Fig. 11. Detalles ultra-estructurales del patrón tilacoidal en los crecimientos de *Blennothrix*.

TABLAS

Tabla 1. Características climáticas, físicas y químicas de los sitios de estudio.

Tabla 2. Composición química de los sitios de estudio.

Tabla 3. Porcentaje de materia orgánica y carbonatos registrado para cada población de *Blennothrix* perteneciente a los cuatro sitios de estudio, en diferentes épocas de colecta.

Tabla 4. Porcentaje de especímenes mineralógicos encontrados sobre la vaina de *Blennothrix*, perteneciente a los cuatro sitios de estudio en diferentes épocas de colecta.

Tabla 5. Metabolitos secundarios de la familia Oscillatoriaceae.

Tabla 6. Metabolitos secundarios de *Blennothrix*.

Tabla 7. Representación de los resultados de TLC de los extractos de *Blennothrix*, bajo luz UV y visible

Tabla 8. MIC de los extractos de *Blennothrix*, obtenidos con hexano, acetato de etilo y metanol, frente a *Escherichia coli* y *Bacillus subtilis*.

Tabla 9. Relación entre la concentración del extracto y las muertes de *Artemia salina* después de 24 horas.

Tabla 10. Relación entre la concentración del extracto y las muertes de *Artemia salina* después de 48 horas.

Tabla 11. Porcentaje de inhibición obtenido a partir de las pruebas de actividad antiinflamatoria realizadas en ratones.

Tabla 12. Índice anti-apetitivo $[(Dc-Dt)/Dc] \times 100\% \pm$ error estándar (n = 10) de las larvas de *S. frugiperda* de las poblaciones de Los Manantiales y Micos.

Tabla 13. Primers utilizados para la amplificación y secuenciación de las subunidades 16S rARN.

Tabla 14. Características de las poblaciones de agua dulce del género *Blennothrix* de Nepal (Watanabe y Komárek 1989, Komárek 1998) y la región central de México.

Tabla 15. Matriz de similitud de 16 cepas de Cyanoprocaryota, comparando 37 secuencias parciales de nucleótidos del gen 16S rRNA.

1. RESUMEN

Estudios anteriores han evidenciado a *Blennothrix* como un género con una amplia variación morfométrica y tolerancia a un amplio espectro de condiciones microambientales, por tanto, resulta importante incorporar análisis moleculares, que en conjunción con la información ambiental y en cuanto a actividad biológica, permitan confirmar si se trata de poblaciones que corresponden a una sola especie con una gran plasticidad morfológica, morfométrica y ecológica o bien se trata de especies crípticas, es decir, poblaciones que han sido identificadas bajo el mismo nombre utilizando criterios fenéticos y han resultado ser diferentes a nivel molecular. La taxonomía integrativa fue aplicada a poblaciones del género *Blennothrix* para evaluar si la identificación de la especie realizada por medio de caracteres fenotípicos, en realidad corresponde a organismos con requerimientos ecológicos, perfil de metabolitos secundarios, genotipo y ultra-estructura semejantes.

De acuerdo con los datos registrados en este estudio, podemos concluir que la presencia de *Blennothrix* se ve favorecida por la combinación de ciertas características fisicoquímicas (alta concentración iónica, abundancia de bicarbonato y sulfatos, baja profundidad y PAR, así como baja a media velocidad de corriente) y que las poblaciones estudiadas no solo presentan una importante calcificación sino que además tanto la composición como la apariencia de la misma son similares en todas ellas. Tanto la determinación de los metabolitos secundarios por medio de reacciones coloridas como los perfiles cromatográficos coinciden en la presencia de terpenos y flavonoides en los extractos de *Blennothrix*. Los resultados obtenidos mediante la actividad bactericida indicaron diferencias dependiendo del extracto utilizado presentando una actividad más pronunciada frente a *B. subtilis* (bacteria Gram-positiva) que frente a *E. coli* (bacteria Gram-negativa). La actividad citotóxica de *Artemia salina* frente al extracto de clorofila *a* de *Blennothrix* fue positiva. Los extractos de *Blennothrix* no mostraron propiedades antiinflamatorias importantes, de tal manera que no se presenta una inhibición significativa del edema auricular agudo inducido por TPA. Cada población mostró una actividad disuasoria distinta. Además, se observó que el índice anti-apetitivo disminuye conforme aumenta la concentración de los extractos, llegando en la mayoría de los casos a ser considerados como extractos no activos o bien fagoestimulantes.

La clasificación basada en la morfología corresponde con lo anteriormente descrito para la especie *Blennothrix ganeshii*, mientras que la variación registrada en algunas características morfométricas podría suponer una sola especie plástica. Sin embargo, el análisis de las secuencias del gen 16S rRNA no es congruente con dicha identificación morfológica y morfométrica e indica que la población de Los Manantiales es genéticamente distinta del resto de las poblaciones estudiadas. Estos resultados destacan que las especies de *Blennothrix* no pueden ser claramente identificadas con base en su morfología y morfométría por sí sola. La necesidad de llevar a cabo una plena identificación a nivel específico no solo nos lleva a buscar nuevos caracteres sino también a seleccionar aquellos que son importantes taxonómicamente hablando y a considerar metodologías que sean factibles de realizar. La taxonomía de las Cyanoprokaryota debe ser reevaluada y es claro que sólo el enfoque integrativo que combine aspectos ecofisiológicos, quimiotaxonómicos, moleculares, ultra-estructurales, etc. nos permitirá llevar a cabo la identificación de especies confusas.

2. ABSTRACT

Previous studies have shown *Blennothrix* as a genus with a wide morphometric variation and tolerance to a wide range of microenvironmental conditions, therefore, it is important to incorporate molecular analysis, in conjunction with environmental information and biological activity, to confirm whether these are populations that correspond to a single species with great morphological, morphometric and ecological plasticity or it is a cryptic species, populations that have been identified under the same name using phenetic criteria and have proved to be different at the molecular level. Integrative taxonomy was applied to populations of the genus *Blennothrix* to assess whether the identification of the species by means of phenotypic characters, actually corresponds to organisms with ecological requirements, secondary metabolites profile, genotype and similar ultra-structure.

According to the data recorded in this study, we can conclude that the presence of *Blennothrix* is favored by the combination of certain physicochemical characteristics (high ionic content, abundance of bicarbonate and sulfates, shallow depth and photosynthetic active radiation, as well as low to medium current velocity) and the populations studied not only exhibit significant calcification but also both the composition and the appearance of it are similar in all of them. Both the determination of secondary metabolites by colorful reactions and chromatographic profiles coincide in the presence of flavonoids and terpenes in *Blennothrix* extracts. Different bactericidal activity was found depending on the extract used, with a high activity against *B. subtilis* (Gram-positive) than *E. coli* (Gram-negative). Cytotoxic activity of *Blennothrix* chlorophyll *a* extract against *Artemia salina* was positive. *Blennothrix* extracts (hexanic, metanolic and ethyl acetate) did not showed important anti-inflammatory properties, so that it does not present significant inhibition of acute ear edema induced by TPA. Each population showed a distinct deterrent activity. Furthermore, it was observed that the anti- appetitive index decreases as the concentration of the extracts increases, becoming in most cases to be considered as no active extracts or phagostimulants.

Classification based on morphology, as described previously, corresponds to the species *Blennothrix ganeshii*, while the variation recorded in some morphometric characteristics could correspond to a single plastic species. However, sequence analysis of

the 16S rRNA gene is not consistent with such morphological and morphometric identification and indicates that the population of Los Manantiales is genetically distinct from other populations studied. These results highlight that *Blennothrix* species cannot be clearly identified based on their morphology and morphometry alone. The need to conduct an accurate identification at specific level not only leads us to seek new characters but also to select those that are important taxonomically speaking and considers methodologies that are feasible to implement. Cyanoprokaryota taxonomy should be reassessed and it is clear that only the integrative approach combining ecophysiological, chemotaxonomic, molecular, ultra-structural aspects, etc. allow us to carry out the identification of confused species.

3. INTRODUCCIÓN

De acuerdo con Komárek y Anagnostidis (2005), se considera una especie de Cyanoprokaryota al grupo de poblaciones que: (i) comparten el mismo genotipo, (ii) está caracterizado por rasgos fenotípicos estables (definibles y reconocibles, con distintos límites de variación), y (iii) tiene aproximadamente las mismas demandas ecológicas. Estos caracteres deben ocurrir repetidamente (en el tiempo) en varias localidades con las mismas condiciones ecológicas. Pero, ¿hasta qué punto esa variación representa a una especie y no otra?

Las especies son un proceso, no un evento estático, un *continuum* sin límites en el que se presentan cambios determinados por la información genética, cambios debidos a la interacción con el ambiente y cambios ocasionados por la relación con algún otro organismo. Son entidades que no sólo presentan diferentes manifestaciones dependiendo de su estado de desarrollo (célula de resistencia, juvenil, adulto) y del ambiente que habitan (costa, zona intermareal, lagos, ríos, desiertos, etc.); sino que tienen manifestaciones desconocidas aún por los expertos, y manifestaciones por venir, en potencia, que emergerán siempre y cuando las condiciones las hagan emerger (Gold-Morgan y González-González 1998).

La amplia variación morfológica y morfométrica registrada tanto en poblaciones naturales como en cultivo, complica enormemente la correcta identificación de las Cyanoprokaryota (Komárek y Anagnostidis 2005). Las dimensiones celulares y los planos

de división, caracteres taxonómicos importantes en la determinación de Cyanoprokaryota unicelulares, pueden cambiar tan drásticamente debido al cambio en las condiciones ambientales, que llega a ser difícil o hasta imposible una identificación confiable de la especie (Palinska *et al.* 1996). De acuerdo con Casamatta *et al.* (2003), poblaciones que han sido identificadas mediante rasgos morfológicos y morfométricos como *Phormidium retzii*, muestran bajos valores de similitud (<95%) a nivel molecular, lo cual implica que no pertenecen a la misma especie.

Dada la problemática en cuanto a la amplia variabilidad de muchos caracteres empleados para determinar especies, los taxónomos deben, en principio, (i) buscar las diferentes manifestaciones propias de la especie y de las etapas y condiciones bajo las cuales se manifiesta diferencialmente (Gold-Morgan y González-González 1998). Comúnmente, la variación morfológica en diferentes tipos de Cyanoprokaryota aún no es conocida y usualmente está desestimada (Komárek y Anagnostidis 2005). Por tanto, es necesario el llevar a cabo estudios de la variación potencial bajo diferentes condiciones. Asimismo, resulta importante el (ii) analizar y evaluar los caracteres diagnósticos, (iii) comparar las especies problema con la especie tipo y/o especies de otras regiones y (iv) buscar nuevos criterios de clasificación (Montejano-Zurita 1998).

Cualquier carácter que revele parte de la variabilidad de una especie es útil y debe ser considerado. Sin embargo, la elección arbitraria de caracteres, es una situación que debe evitarse. Los estudios muestran que los caracteres tienen distinto valor y por tanto su asignación debe realizarse tomando en consideración categorías taxonómicas particulares (Vandamme *et al.* 1996).

Para conocer la variación morfológica y morfométrica capaz de ser expresada por una especie, es necesario hacer una evaluación temporal y espacial de la misma. Debe realizarse un registro de la variación de los caracteres de material proveniente del mismo sitio en diferentes épocas del año, así como de poblaciones identificadas como la misma especie ubicadas en distintas regiones. Asimismo es importante el comparar esta información con la existente para la especie tipo. La implementación de cultivos también resulta una herramienta importante para conocer la variación originada por ciertos factores ambientales. Sin embargo, debe de tomarse en consideración que el mantenimiento de ciertas cepas, bajo largos periodos de tiempo, en condiciones controladas de laboratorio, en ocasiones origina morfotipos distintos de la población original (Komárek y Anagnostidis 2005). Algunas cepas pueden alterar algunos rasgos importantes, como la forma de la colonia, o perder estructuras (vesículas de gas), lo cual, a final de cuentas, complica su identificación (Rajaniemi *et al.* 2005).

Estimaciones llevadas a cabo por Komárek y Anagnostidis (1989) en Castenholz y Norris (2005) revelan que más del 50% de las cepas de colecciones han sido mal identificadas, por lo cual la búsqueda de nuevos criterios de clasificación resulta imprescindible. El sistema tradicional de las Cyanoprokaryota estaba basado principalmente en rasgos morfológicos (Geitler 1932, Hollerbach *et al.* 1953, Desikachary 1959, Starmach 1966, etc.). No obstante, la taxonomía de las Cyanoprokaryota ha cambiado sustancialmente en las últimas décadas del siglo XX. Estudios ultraestructurales y particularmente la utilización de herramientas moleculares han introducido nuevos criterios de clasificación que han modificado el antiguo sistema. La familia Oscillatoriaceae, dentro de la cual figura el género *Blennothrix*, ha sido reorganizada por

Anagnostidis y Komárek (1988) y Komárek y Anagnostidis (2005) con base en el conocimiento de secuencias moleculares; no obstante la taxonomía fenotípica continúa y continuará siendo importante en la identificación a nivel específico. De acuerdo con Palinska y Krumbein (1998) los métodos moleculares deben ser utilizados paralelamente o como suplemento de la caracterización fenotípica, pero nunca deben reemplazarla. De no ser así, los datos moleculares más precisos y quizá más confiables producirían resultados confusos respecto a la presencia de ciertos géneros y especies en la naturaleza.

Los miembros de agua dulce del género *Blennothrix* han sido divididos en ocho especies por medio de la evaluación de algunos caracteres morfológicos (coloración, tipo de crecimiento del talo, forma de la vaina, número de tricomas por filamento y presencia de caliptra) y morfométricos (diámetro del filamento, anchura del tricoma, espesor de la vaina y largo celular) (Watanabe y Komárek 1989, Komárek 1998). Sin embargo, estudios previos realizados en *B. ganeshii*, muestran que algunos de los rasgos morfológicos y morfométricos, tales como la coloración, el número de tricomas por filamento, la anchura del tricoma y el largo celular, resultan ser inestables y variables (Carmona *et al.* 2005, Beltrán *et al.* 2005). Los crecimientos pertenecientes a varios sitios en México presentan una coloración violeta-café, contraria a la coloración azul-verde reportada para poblaciones de *B. ganeshii* de otras partes del mundo. En general, sólo un tricoma se encuentra presente en cada filamento, lo cual semeja a especies del género *Lyngbya*; y las dimensiones de anchura del tricoma y largo celular extienden su diagnosis. A pesar de lo anterior, las ocho poblaciones registradas por Carmona *et al.* (2005) son reconocidas como una sola especie plástica; en la cual podría verse reflejado el efecto del cambio en ciertos factores ambientales. No obstante, resulta importante la elaboración de cultivos, estudios de su

ecología, fisiología, así como análisis moleculares que indiquen separación genética y no necesariamente variación ecofenotípica.

Entre las causas de variación morfológica en especies algales se encuentra la mutación y la recombinación genética. El término mutación se refiere al cambio ocurrido en el ADN, en un locus particular, de un organismo. Dicho término es utilizado libremente para incluir mutaciones puntuales que involucran el cambio de un solo gen, así como cambios en el cromosoma (Snustad *et al.* 1997). Las mutaciones proveen de nueva variabilidad genética a los individuos de una población. La recombinación genética se refiere a la producción de nuevas combinaciones de genes, no encontradas en los padres, mediante el entrecruzamiento de cromátidas en cromosomas homólogos (Ville 1992, Lehninger 1970). La recombinación es un rasgo esencial de la reproducción sexual. Durante la meiosis, cuando los cromosomas se reúnen e intercambian su información, existe una posibilidad de crear nuevas combinaciones de alelos. La recombinación genética constituye una fuente de polimorfismo genético. Esta se refiere a la existencia de dos o más organismos fenotípicamente diferentes dentro de la misma especie debido a la presencia de más de un alelo para un locus dado (Ville 1992). Un gen es considerado polimórfico si al menos dos alelos del mismo gen son mantenidos en una población (Lehninger 1970).

Tanto la mutación como la recombinación génica proveen de nueva variabilidad y la selección natural o artificial preserva las combinaciones génicas mejor adaptadas para las condiciones ambientales existentes. Algunas de ellas benefician al organismo incrementando su supervivencia o habilidad reproductiva. Con el tiempo, tales

combinaciones se esperaría que se dispersaran entre la población y se convirtieran en rasgos estándar de la estructura genética de la especie (Snustad *et al.* 1997).

En organismos eucariontes, que presentan un ciclo de vida sexual, la recombinación se asume como el principal factor que determina la variación genética. Sin embargo, en organismos procariontes, como las Cyanoprokaryota, las vías de variación morfológica se ven modificadas. Los organismos que se reproducen asexualmente son considerados clones puesto que en ellos la constitución genética del progenitor y sus descendientes es la misma. No obstante, en Cyanoprokaryota ha sido registrada variación clonal, es decir, la ocurrencia de diferencias entre individuos (Snustad *et al.* 1997) que surge a través de diversas fuentes.

La mutación en Cyanoprokaryota presenta tasas muy bajas (Castenholz y Norris 2005). Algunos estudios demuestran que a pesar de la aplicación de agentes mutagénicos a cepas de Cyanoprokaryota, éstas generan muy pocos mutantes con deficiencias fotosintéticas (Castenholz 1992). Asimismo, ha sido observado que las Cyanoprokaryota presentan un alto grado de poliploidia, que enmascara las mutaciones e impide que éstas se fijen. Situación muy distinta a lo que sucede en el caso de organismos eucariontes asexuales haploides en donde una mutación, recesiva o dominante, es seguro que se exprese inmediatamente (Castenholz y Norris 2005). Otra fuente de variación en las Cyanoprokaryota es la transferencia génica lateral (por sus siglas en inglés, LGT, lateral gene transfer) la cual resulta ser muy poco frecuente, al menos en la naturaleza. La transferencia de fragmentos cortos de ADN en algunos cultivos de Cyanoprokaryota unicelulares, tales como *Synechococcus* sp. y *Synechocystis* sp. ha sido registrada por Castenholz (1992). Castenholz y Norris (2005) opinan que debido a la existencia de muy

poca evidencia de LGT en genes de Cyanoprokaryota, se cree que ésta se encuentra concentrada en una clase de genes que no son candidatos de análisis filogenético.

En la actualidad, la mayoría de la evidencia de intercambio genético en Cyanoprokaryota se ha registrado para formas planctónicas que carecen de vainas (Castenholz y Norris 2005). Se ha asumido que la transformación es el principal método de adquisición genética en las Cyanoprokaryota, aunque la transducción por medio de cianofagos es absolutamente concebible. Posiblemente, alguna barrera física, como la presencia de gruesas paredes y vainas extracelulares, las cuales están presentes en muchos tipos de Cyanoprokaryota impidan la transferencia genética. Si esto fuera cierto, las poblaciones de Cyanoprokaryota que se encuentran altamente compactadas, como aquellas capaces de desarrollar crecimientos en forma de matas, contarían con las condiciones ideales para el intercambio de genes. Asimismo, se ha propuesto que ciertas restricciones enzimáticas o sistemas de reparación del ADN podrían representar algunos de los impedimentos de intercambio genético (Castenholz y Norris 2005).

Las Cyanoprokaryota tienen eficientes sistemas de reparación de alteraciones en el ADN. Se cree que tales algas se desarrollaron bajo condiciones de alta incidencia lumínica (incluyendo luz ultravioleta B+C) y otros agentes dañinos para el ADN (radicales oxigénicos); por tanto habría de esperarse que cuenten con eficientes sistemas de reparación del ADN (Castenholz 1992). De acuerdo con Komárek y Anagnostidis (2005), la excelente habilidad de las Cyanoprokaryota de aclimatarse a un amplio intervalo de condiciones ambientales está basada en sus sofisticadas estrategias de adaptación. Similar a lo que ocurre en otros organismos, una situación repentina de estrés origina primero el fracaso de

muchas funciones celulares y el cese del crecimiento. Sin embargo, posteriormente le sigue un periodo de aclimatación en donde los procesos celulares son reajustados o bien nuevas proteínas son inducidas para hacer frente a las nuevas condiciones. Este proceso, aunado al intercambio extracelular de material genético tanto a nivel intra e interpoblacional, explicaría el éxito evolutivo de las Cyanoprokaryota. El intercambio horizontal de material genético permite explicar la amplia plasticidad morfológica y ecológica de las Cyanoprokaryota actuales. La plasticidad morfológica o fenotípica se refiere a las diferencias en la expresión de los rasgos o características entre los individuos de una población y es controlada tanto por los genes como por los factores ambientales que modifican la expresión de los mismos (Snustad *et al.* 1997).

La identificación de Cyanoprokaryota, por tanto, no es un asunto sencillo. En países con una alta reputación ficológica (Europa, Norte América e India) muchas descripciones de taxa han resultado pertenecer al intervalo de variación de otras especies o bien representan ecotipos, condiciones o estados de desarrollo de una especie ya conocida (Anagnostidis y Komárek 1985). Frecuentemente se piensa que los ecotipos, poblaciones de organismos que ocupan el mismo nicho ecológico y utilizan los mismos recursos, son similares genéticamente. No obstante, estudios realizados por Castenholz y Norris (2005), plantean la necesidad de llevar a cabo análisis de las secuencias de múltiples locus para la diferenciación de ecotipos. Utilizando fragmentos de las secuencias de 16S rARN, pertenecientes a tres cepas del género *Prochlorococcus*, ellos demuestran que cada una difiere en menos de un 3%. Sin embargo, cuando son comparados los genomas completos de todas las cepas, éstas difieren significativamente. Este ejemplo muestra como dos

ecotipos que parecen relacionados tan cercanamente a primera vista, presentan diferencias de una magnitud considerable por medio de técnicas genómicas.

Drouet pretendió resolver la problemática en cuanto a la variación morfológica en Cyanoprokaryota, reduciendo significativamente el número de géneros existentes. Postuló que las Cyanoprokaryota son altamente polimórficas, y presentan muy pocas discontinuidades entre ellas; de tal manera que las diferencias morfológicas manifiestas son simples variaciones fenotípicas reversibles del mismo genotipo, originadas por respuestas a cambios en el ambiente (Font-Quer 1985, Anagnostidis y Komárek 1985, Castenholz 1992). Las especies según Drouet representan un cluster polimórfico de “ecofenos” agrupados en unos pocos géneros. Esta visión no corresponde a la diversidad reconocible tanto en la naturaleza como en cultivos y ha probado ser incorrecta y genéticamente confusa, puesto que actualmente se conoce que en su clasificación separó formas que se encuentran estrechamente relacionadas (Desikachary 1959, Komárek y Anagnostidis 2005). De acuerdo a estudios realizados por Palinska *et al.* (1996), la gran diversidad morfológica observada en la naturaleza y (parcialmente) en cultivos no necesariamente refleja diversidad genética. Por lo cual, es posible que hayan sido descritos más ecofenos que especies genéticamente distintas de las que realmente existen.

Con base en lo anterior, es posible discernir que el establecimiento de ecotipos y ecofenos en Cyanoprokaryota, no resuelve la problemática en cuanto a la delimitación de especies. Sin embargo, es importante el reconocer que existen manifestaciones de distintas situaciones o condiciones ambientales, independientemente de cómo éstas sean nombradas.

La información disponible hasta el momento sugiere que el uso combinado de la caracterización fenotípica tradicional y la identificación genotípica son más significativos que el uso individual de sólo una de estas aproximaciones. De acuerdo con Castenholz (1992) se ha demostrado que fenotipos muy similares presentan relaciones distantes en términos de filogenia. Mientras que Komárek (2003), en Castenholz y Norris (2005) cita varios ejemplos de clusters de morfoespecies que son sustentadas por secuencias de 16S rARN similares (en los géneros *Microcystis* y *Planktothrix*) pero que tienen diferente ecofisiología. Lo cual sugiere que estos ecotipos deben estar relacionados a segmentos del genoma que no son vislumbradas por medio de la secuenciación del 16S rARN. En muchos casos ahora es entendido que el conocimiento de las secuencias de 16S rARN por sí solo constituye una información insuficiente como base para explicar variantes fenotípicas (Palinska *et al.* 1996); por lo cual es preferible el llevar a cabo, adicionalmente, el análisis de las secuencias de otros genes además del 16S rARN (Nübel *et al.* 1997).

La problemática en la identificación de miembros de las Cyanoprokaryota pertenecientes al orden Oscillatoriales, al cual pertenece el género *Blennothrix*, surge principalmente por dos razones: i) Los criterios taxonómicos tradicionales fueron establecidos hace más de 100 años y la mayoría de los géneros fueron definidos por medio de caracteres inestables, particularmente, en base a la presencia de vainas y ramas falsas. Estudios experimentales recientes así como años de observaciones en la naturaleza han disputado la validez de estos caracteres, por tanto debe ser examinada la problemática en cuanto al valor de cada carácter. ii) La variación de los caracteres no está clara. La mayoría de las especies ha sido descrita con muestras provenientes del campo, sin embargo, este material sólo presenta un limitado intervalo de variación. Por otro lado, cuando las cepas

son estudiadas en cultivos, éstas muestran una amplia variabilidad de estados, incluyendo aquellos que raramente ocurren en la naturaleza (Anagnostidis y Komárek 1985).

Los factores bióticos y abióticos juegan un papel fundamental en la presencia, abundancia, permanencia y distribución de las especies. Su evaluación nos brinda información acerca de sus requerimientos fisiológicos, su capacidad de variación tanto morfológica como morfométrica, sus límites de tolerancia, su ubicación en determinados ambientes y/o zonas geográficas particulares, así como los mecanismos a través de los cuales las Cyanoprokaryota han logrado ocupar una gran diversidad de ambientes, en ocasiones extremos, y subsistir a través del tiempo.

Las Cyanoprokaryota son organismos que están presentes en la tierra desde hace más de tres mil millones de años (Lee 1980). Su gran variedad de estrategias metabólicas y estructurales les ha permitido tolerar un amplio espectro de condiciones ambientales, tales como sequía, frío, salinidad, limitación de nutrientes, foto-oxidación, anaerobiosis, etc. y les permite vivir en toda clase de ambientes desde manantiales termales, regiones polares, desiertos, océanos, lagos, ríos, suelos y establecer relaciones simbióticas con organismos como hongos y plantas, entre otros.

Un gran número de Cyanoprokaryota son capaces de regular su posición en la columna de agua gracias a las vacuolas de gas que se encuentran en su interior, las cuales les permiten cambiar su posición dependiendo de la variación en las condiciones ambientales. Por otro lado, las algas bénticas, que permanecen adheridas al sustrato, requieren desarrollar cambios a nivel metabólico para sobrevivir en un ambiente con

drásticas fluctuaciones en cuanto a iluminación, pH y concentraciones de oxígeno (Sinha 2003). Una estrategia es la capacidad de cambiar de fotosíntesis oxigénica a anoxigénica, es decir, el pasar de manejarse con ambos fotosistemas (I y II) a utilizar únicamente el primero, utilizando sulfuro de hidrógeno (H_2S) y no agua como donador de electrones. Otro ejemplo es su habilidad de fijar nitrógeno atmosférico (N_2) a través de células especializadas conocidas como heterocitos, cuando las proporciones de nitrógeno en el medio son muy bajas (Darley 1982, Rai y Gaur 2001).

Otro rasgo único de las Cyanoprokaryota es su habilidad de adaptarse tanto a la calidad como cantidad de luz. En ambientes que presentan iluminación muy baja, las algas que se encuentran fijas al sustrato han desarrollado mecanismos que les permiten subsistir en ellos. Mediante el movimiento de deslizamiento, los filamentos se dirigen hacia la superficie del sedimento, previniendo de esta manera su sedimentación. Un gran número de Cyanoprokaryota tiene la habilidad de variar su proporción de ficobiliproteínas (ficocianina/ficoeritrina) para maximizar la absorción de luz azul-verde que domina en ambientes con poca luz. De tal manera que las células que crecen en luz verde (540 nm) presentan mayores concentraciones de ficoeritrina (pico de absorbancia 540-565 nm) mientras que células que crecen en luz roja (640 nm) tendrán mayores proporciones de ficocianina (pico de absorbancia 610-640 nm). Este fenómeno es conocido como adaptación cromática complementaria (Darley 1982). El incremento en el número o tamaño de los centros de reacción también les confieren ventajas adaptativas (Sinha 2003). Mientras tanto, las algas que habitan ambientes con iluminaciones muy elevadas se protegen de la foto-oxidación adoptando una o más de las siguientes estrategias: (i) la producción de pigmentos protectores tales como la Scytonemina o carotenoides, (ii)

cambiando de posición en la columna de agua, a través de la migración hacia sitios con menor exposición a la luz y/o (iii) teniendo mecanismos de reparación tales como la fotoreactivación (Sinha 2003).

Otro factor que afecta el desarrollo de las Cyanoprokaryota es la temperatura, la cual tiene un mayor impacto estacional y latitudinal que debido a las fluctuaciones de la misma durante el día (Norton 1981, Darley 1982). Sin embargo, las Cyanoprokaryota son capaces de sintetizar nuevos grupos de proteínas que las protegen contra cambios bruscos de temperatura (Sinha 2003).

La mayoría de las Cyanoprokaryota macroscópicas responden a la tensión originada por el efecto del flujo del agua. De acuerdo con Sheath y Hambrook (1988) la forma del talo influye en la capacidad para soportar el estrés de rompimiento del agua; y son los filamentos las estructuras que mejor resisten flujos elevados, debido a que su flexibilidad reduce el arrastre (Sinha 2003). No obstante, velocidades de corriente demasiados altas, inevitablemente, provocan el rompimiento de los mismos (Rai y Gaur 2001). Las fuerzas hidrodinámicas también pueden verse reducidas por la secreción de mucílago, la cual incrementa la viscosidad localmente y favorece el flujo laminar en vez de la turbulencia (Sinha 2003, Beltrán *et al.* 2005).

Ciertas estrategias, les permiten competir y contrarrestar el efecto de varios organismos, entre los que se encuentran herbívoros, bacterias, hongos y otras algas, sobre las Cyanoprokaryota: (i) creciendo en sitios con bajas densidades de éstos, (ii) retardando su crecimiento hasta que su abundancia sea baja, (iii) modificando su forma de crecimiento,

(iv) o aumentando sus tasas de crecimiento (Pan y Lowe 1994). No obstante, en el caso de organismos sésiles como las Cyanoprokaryota bénticas, la necesidad de implementar ciertos mecanismos de defensa resulta imperiosa. En ocasiones, varios mecanismos defensivos pueden estar funcionando simultáneamente. Las defensas múltiples parecen actuar conjuntamente para reducir la habilidad de los organismos de adaptarse a las defensas de las algas (McClintock y Baker 2001).

Las Cyanoprokaryota son capaces de producir una gran variedad de compuestos, que colectivamente se conocen como metabolitos secundarios. Dichas sustancias son muy diversas tanto en su estructura química como en su función fisiológica, incluyendo compuestos: antivirales, antifúngicos, antibacteriales, cierto tipo de regulación en el crecimiento de las plantas, algicidas e inhibidores de enzimas (Flint y Moreland 1946, Starr *et al.* 1962, Welch 1962, DeCaire *et al.* 1979; 1997, Mason *et al.* 1982, Canell *et al.* 1987, Bloor y England 1989, Gromov *et al.* 1991, Sveshnikov *et al.* 1997, Skulberg 2000, Issa 1999). El tipo de metabolito secundario y su concentración varía dentro y entre individuos de una población, por la edad de los mismos y entre poblaciones de Cyanoprokaryota (McClintock y Baker 2001).

Los resultados de los trabajos mencionados anteriormente sugieren que el utilizar solamente caracteres fenotípicos para describir y nombrar taxa no es más una búsqueda legítima. Actualmente es bien conocido que las Cyanoprokaryota que poseen una morfología y fisiología similar pueden ser muy diferentes genéticamente, y que Cyanoprokaryota con la misma genética pueden ser muy distintas en términos ecológicos y/o fisiológicos (Castenholz y Norris 2005). Es necesario, por tanto, el implementar una

taxonomía polifásica con el fin de determinar especies y llevar a cabo una clasificación y definición de grupos filogenéticamente coherentes (Komárek 1994, Palinska *et al.* 1996, Vandamme *et al.* 1996, Castenholz y Norris 2005, Komárek y Anagnostidis 2005, Komárek 2010, Komárek 2011, Strunecký *et al.* 2011).

El término taxonomía polifásica fue acuñado en 1970 por Colwell, tiene como objetivo el revisar eficientemente los límites de la variación y diversidad en diferentes grupos de organismos, incluyendo el registro de todos los datos disponibles; y es utilizado actualmente para la determinación de los organismos a nivel específico (Anagnostidis y Komárek 1985, Vandamme *et al.* 1996, Nübel *et al.* 1997). Este tipo de aproximación ha sido exitosamente aplicada en el estudio de Cyanoprokaryota, llegándose a establecer, en ocasiones, nuevas especies (Abed *et al.* 2002, López-Cortés *et al.* 2001) con base en el reconocimiento de caracteres inestables y variables, así como de la evaluación de caracteres que anteriormente no eran considerados. Recientemente la comunidad ficológica ha utilizado el término taxonomía integrativa para describir un método de reclasificación de la diversidad algal, el cual se basa en una caracterización genotípica molecular, combinada con una evaluación bioquímica, morfológica, fisiológica, citológica, ecofisiológica y ultra-estructural que muestre ser consistente con la información filogenética. Dicho término se basa en el enfoque polifásico el cual ha sido utilizado principalmente en plantas.

Estudios anteriores han evidenciado a *Blennothrix* como un género con una amplia variación morfométrica y tolerancia a un amplio espectro de condiciones microambientales (Beltrán-Magos 2002, Beltrán-Magos 2005, Carmona *et al.* 2005), por tanto, resulta importante incorporar análisis moleculares, que en conjunción con la información

ambiental y en cuanto a actividad biológica, permitan confirmar si se trata de poblaciones que corresponden a una sola especie con una gran plasticidad morfológica, morfométrica y ecológica o bien se trata de especies crípticas, es decir, poblaciones que han sido identificadas bajo el mismo nombre utilizando criterios fenéticos y han resultado ser diferentes a nivel molecular (Casamatta *et al.* 2003).

La taxonomía integrativa será aplicada a poblaciones del género *Blennothrix* para evaluar si la identificación de la especie realizada por medio de caracteres fenotípicos, en realidad corresponde a organismos con requerimientos ecológicos, perfil de metabolitos secundarios, genotipo y ultra-estructura semejantes.

4. CARACTERIZACIÓN FÍSICOQUÍMICA

4.1. INTRODUCCIÓN

Los factores bióticos y abióticos juegan un papel fundamental en la presencia, abundancia, permanencia y distribución de las especies. Su evaluación nos brinda información acerca de sus requerimientos fisiológicos, su capacidad de variación -tanto morfológica como morfométrica-, sus límites de tolerancia, su ubicación en determinados ambientes y/o zonas geográficas particulares, así como los mecanismos a través de los cuales las Cyanoprokaryota han logrado ocupar una gran diversidad de ambientes -en ocasiones extremos- y subsistir a través del tiempo.

Este trabajo busca conocer las condiciones fisicoquímicas presentes en el medio donde se desarrolla el alga, y la respuesta de poblaciones de *Blennothrix* a los cambios estacionales, por medio del registro de la proporción de materia orgánica, carbonatos y diversidad de especímenes mineralógicos presentes sobre la misma. Por ejemplo, las sustancias poliméricas extracelulares (EPS, por sus siglas en inglés, *Extracellular Polymeric Substances*), ampliamente producida por *Blennothrix*, son importantes, ya que proveen sitios de nucleación para la precipitación de sales y facilitan la adhesión de sedimento (Riding 2000).

La depositación de sales es un fenómeno común en muchas Cyanoprokaryotas (Riding 2000, Pentecost 2005, Turner y Jones 2005). Los minerales originados a través de una mineralización biológicamente inducida (BIM, por sus siglas en inglés, *Biologically*

Induced Mineralization), generalmente presentan una nucleación y un crecimiento extra e intercelular como resultado de varios procesos metabólicos -tales como la absorción de CO₂ y/o HCO₃⁻ durante la fotosíntesis por parte de las Cyanoprokaryota, así como la amonificación, desnitrificación y reducción de sulfatos por parte de otras bacterias (Riding 2000, Couradeau *et al.* 2012). Los exopolímeros tienen distinta composición, dependiendo de la biología del organismo y las condiciones ambientales, pero comúnmente se encuentran dominados por polisacáridos cargados negativamente (Decho 1990, Turner y Jones 2005). Aunque muchas Cyanoprokaryota tienen procesos metabólicos que favorecen la formación de carbonato de calcio, generalmente es necesario que se presenten condiciones ambientales particulares para que ocurra la precipitación (Merz-Preiß y Riding 1999). Esta calcificación facultativa y dependiente de las condiciones ambientales refleja el estado de saturación del ambiente acuático, así como las actividades metabólicas de las Cyanoprokaryota.

4.2. PREGUNTAS E HIPÓTESIS

¿Cuál es el factor o factores que inducen el crecimiento de *Blennothrix* en condiciones ambientales relativamente parecidas? Sólo algunos de los componentes de la composición química del agua de las localidades (según diversos autores, podrían ser: dureza del agua – Necchi 2004 y Beltrán-Magos 2005-, conductividad y sulfatos –Beltrán-Magos 2005-) limitan la presencia de crecimientos de *Blennothrix*.

La composición y apariencia de las precipitaciones de sales extracelulares en las Cyanoprokaryota que las presentan, varían según la especie. Se mencionan composiciones de calcita (Pentecost 1978, Emeis *et al.* 1987, Reddy 1988, Kleiner 1990, Merz-Preiß y Riding 1999, Rainey y Jones 2009), carbonato de magnesio (Krumbein y Giele 1979), aragonito o hidromagnesita (Couradeau *et al.* 2012); asimismo, se mencionan apariencias amorfas (Rainey y Jones 2009) o con formas muy definidas (en panal –Pentecost 1978-, aguja –Krumbein y Giele 1979-, romboedral –Pentecost 1978, Rainey y Jones 2009-, trigonal -Rainey y Jones 2009-, biterminal -Rainey y Jones 2009-, esféricos -Couradeau *et al.* 2012-). Por tal motivo, el presente estudio pretende responder la siguiente pregunta: ¿Cuál será la composición y apariencia de las sales extracelulares precipitadas en *Blennothrix*? Con base en la química reportada (Beltrán-Magos 2005), en *Blennothrix* se espera: 1) que las sales precipitadas extracelularmente sean principalmente de calcita, y 2) que la apariencia dominante sea de tipo amorfo.

4.3. OBJETIVOS

- i. Caracterizar la composición fisicoquímica del agua de las localidades con presencia de *Blennothrix*.
- ii. Analizar la variación espacio-temporal de los parámetros fisicoquímicos de los sitios con presencia de crecimientos de *Blennothrix*.
- iii. Evaluar el efecto de la química del agua sobre la precipitación de sales extracelulares en *Blennothrix*.
- iv. Caracterizar la composición y apariencia de especímenes mineralógicos precipitados sobre la vaina de *Blennothrix*.

4.4. MATERIAL Y MÉTODO

De las cinco localidades con presencia de poblaciones de *Blennothrix*, “Los Manantiales” se ubica en el estado de Morelos y forma parte de la cuenca del río Balsas; “Tambaque, Micos y Puente de Dios” se encuentran en el estado de San Luis Potosí y “Tzindejéh” en Hidalgo; estas cuatro últimas pertenecen a la cuenca del río Pánuco (Fig. 1).

El agua de las localidades se analizó en cinco ocasiones, de octubre 2003 a mayo 2005, en los momentos más contrastantes del año (pos lluvias -después de lluvias-, así como secas en época fría y caliente), que corresponden a los meses de noviembre, enero-febrero y mayo. Con el objeto de comparar la composición fisicoquímica del agua, se incluyeron dos sitios ubicados en el estado de San Luis Potosí (cuenca del río Pánuco), donde no existe el registro de poblaciones de *Blennothrix* (Santa Anita y Xilitla) (Fig. 1).

Se midieron *in situ* los siguientes parámetros físicos y químicos: temperatura, pH y conductividad específica (K_{25} , corregida a 25°C) con el conductímetro marca Conductronic PC-18; oxígeno disuelto (OD) con el oxímetro YSI-85, y porcentaje de saturación de oxígeno (calculado a partir de los datos de OD, considerando altitud, temperatura y ausencia de salinidad en el agua, Wetzel y Likens 1991); velocidad de corriente y radiación fotosintéticamente activa (PAR, por sus siglas en inglés, *Photosynthetic Active Radiation*) fueron medidas tan cerca al crecimiento algal (2.5–18 cm) como fue posible, utilizando respectivamente un medidor de velocidad de corriente Swoffer 2100 y un medidor de cuantos marca Li-Cor LI-1000 con un sensor plano subacuático (PAR); la profundidad fue evaluada con el flexómetro, mientras que el tipo de substrato se calculó por medio de estimación visual (Necchi 1997), con un visor de 175 cm².

La colecta de agua se realizó siguiendo las técnicas de ASTM (1989) y APHA (1998). Las muestras para el análisis de nutrimentos fueron filtradas *in situ* con membrana de nitrocelulosa de 0.22 y 0.45 μm (Millipore, U.S.A.), y fijadas con una gota de cloroformo; se transportaron al laboratorio, conservándolas en congelación, para su posterior análisis dentro de los siguientes 30 días. Los nutrimentos evaluados fueron: fósforo reactivo soluble (FRS; teóricamente, en su mayoría ortofosfatos, P-PO_4^{3-} -Fuentes y Massol-Deyá 2002-) a través del método de reducción del ácido molibdofosfórico a fosfomolibdeno azul (0.05-4 mM L⁻¹ de intervalo de concentración); nitrógeno como nitritos (N- NO_2^- por medio del método de diazotización con sulfamida, -0.1-20 mM L⁻¹ de intervalo de concentración-); nitrógeno como nitratos (N- NO_3^- , con el método de reducción por cadmio y analizando nitritos -0.1-20 mM L⁻¹ de intervalo de concentración-), nitrógeno como amonio (N- NH_4^+

por la reacción de Berthelot azul de endofenol (-0.2-20 mM L⁻¹ de intervalo de concentración-) y sílice como SiO₂ (por la conversión del ácido silícico a ácido β-silicomolibdico y su reducción a molibdeno azul, -0.02-140 mM L⁻¹ de intervalo de concentración-) (ASTM 1989). La determinación se realizó con el analizador de flujo segmentado (Skalar Sanplus System), por el Hidrobiólogo Fermín Sergio Castillo Sandoval, del laboratorio de Biogeoquímica Acuática del Instituto de Ciencias del Mar y Limnología, UNAM.

Las muestras para la determinación de aniones, salinidad y pH fueron mantenidas en frío y obscuridad, mientras que las muestras para el análisis de cationes fueron preservadas con gotas de ácido nítrico al 40% hasta alcanzar un pH de 2 a 3. La determinación de carbonatos se realizó mediante el método de titulación con ácido sulfúrico 0.2 N, los cloruros por medio del método de electrodo selectivo, la dureza con el método titulométrico de EDTA y el sodio y potasio por medio del método espectrofotométrico de absorción atómica (APHA 1998). La caracterización de iones mayores fue realizada por la I.Q. Alejandra Aguayo Ríos y las Q.F.B. Nora Elia Ceniceros B. y Q.F.B. Olivia Cruz R. del Laboratorio de Química Analítica del Instituto de Geofísica, UNAM.

Con el fin de conocer las diferencias en cuanto a la composición fisicoquímica de los sitios de estudio, así como en la morfometría de las poblaciones se realizaron diagramas iónicos de Maucha (Maucha 1932), Análisis de Componentes Principales (PCA, por sus siglas en inglés, *Principal Component Analysis*) y pruebas de ANOVA mediante el paquete estadístico MVSP versión 3.0 y el programa Statistica versión 6.0.

Se tomaron muestras de *Blennothrix* pertenecientes a cuatro localidades de estudio (excepto Tzindejéh, por contar con poca muestra algal), durante distintas épocas del año, para conocer la cantidad de carbonatos presentes en la muestra, así como para llevar a cabo el análisis de difracción de rayos X (XRD, por sus siglas en inglés, *X-ray Diffraction Analysis*). *In situ*, los crecimientos fueron limpiados lo más posible de cualquier otra alga, resto de planta y/o sustrato, y transportados al laboratorio en frascos con agua de la localidad a temperatura ambiente. La cantidad de carbonato presente en las muestras fue evaluada por el método de pérdida por ignición (LOI, por sus siglas en inglés, *Loss On Ignition method*) (550°C durante 4 h, Heiri *et al.* 2001, Boyle 2004). La morfología de la calcificación y su composición mineral fueron determinadas mediante microscopía óptica (BX51, Olympus Corporation, Tokyo, Japan), microscopía electrónica de barrido (SEM, por sus siglas en inglés, *Scanning Electron Microscopy*) (JSM-6380LV, Jeol, Tokyo, Japan) y espectroscopía de dispersión de energía de rayos X (EDXS, por sus siglas en inglés, *Electron Dispersal X-ray Spectroscopy*) (Oxford instruments, Oxfordshire, UK) por el M. Rafael Quintanar Zúñiga de la Facultad de Estudios Superiores Iztacala. La mineralogía fue confirmada por medio de XRD utilizando un difractómetro de polvos Broker D8-advance (radiación de CuK, monocromador de grafito, Bruker AXS, Wisconsin, USA) por la M. en C. Leticia Baños López del Instituto de Investigaciones en Materiales. Las muestras fueron secadas en la estufa (105°C durante 24 h) (Heiri *et al.* 2001, Boyle 2004) y molidas a polvo fino en mortero de ágata; el análisis se realizó con el software Diffplus Bs y la base de datos del Centro Internacional de Datos de Difracción (ICDD).

El índice de saturación con respecto a la calcita fue calculado de la siguiente manera: (SI), $SI = pH - pH_s$, donde pH es el pH registrado y pH_s es el pH calculado si éste se

encuentra en equilibrio con el CaCO_3 en las concentraciones existentes de Ca^{2+} y HCO_3^- (ASTM 1989).

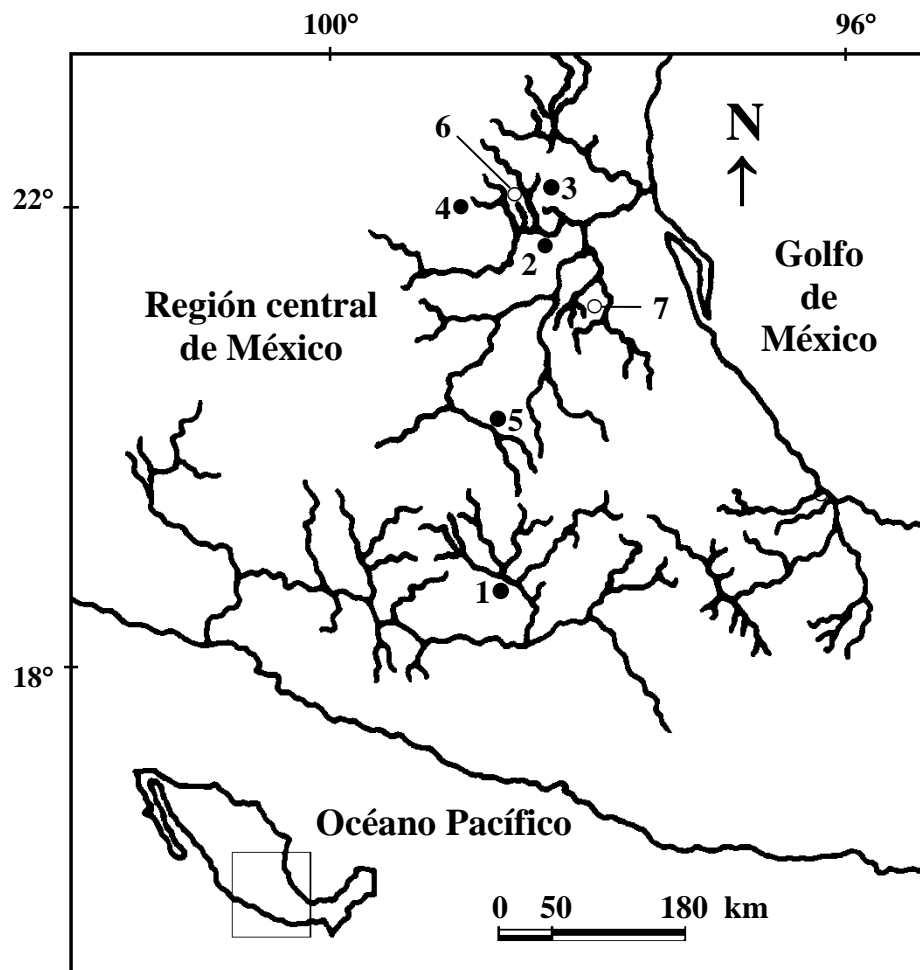


Fig. 1. Ubicación de los sitios de estudio, con presencia de poblaciones de agua dulce del género *Blennothrix*, en la región central de México (●). 1) Los Manantiales, 2) Tambaque, 3) Micos, 4) Puente de Dios, 5) Tzindejéh. Ubicación de los sitios sin presencia de poblaciones de *Blennothrix* (○). 6) Santa Anita, 7) Xilitla.

4.5. RESULTADOS

Las condiciones observadas en los ríos con presencia de *Blennothrix* son las siguientes: baja profundidad, de 3 a 28 cm; moderada a alta velocidad de corriente, entre 13 y 63 cm s⁻¹; aguas siempre por encima de los 20°C, cálidas (23-31°C), dulces a escasamente salinas (conductividades específicas, de 604 a 1740 $\mu\text{S cm}^{-1}$ - y sólidos disueltos totales, entre 0.4 y 4 g l⁻¹- relativamente altos); valores de oxígeno disuelto entre 7.3 y 8.4 mg l⁻¹, aproximadamente correspondientes al 100% de saturación (96-108%); con pH neutro a ligeramente básico (7.3-7.8); media a relativamente altas concentraciones iónicas, entre 13 y 48 meq l⁻¹, con elevadas alcalinidades totales, entre 166 y 239 mg l⁻¹ de CaCO₃, y dominancia iónica de SO₄⁻/HCO₃⁻ y Ca⁺⁺/Mg⁺⁺ (excepto en el sitio 6, que presentó una dominancia de Na⁺/Ca⁺⁺) y diferentes tipos de sustrato (limo, arena, arcilla, grava, canto rodado, roca y sustrato artificial); los segmentos del río fueron sombreados o parcialmente sombreados (11-85 $\mu\text{mol fotón m}^{-2} \text{s}^{-1}$). Todas las poblaciones fueron colectadas en ríos de aguas duras (150-1083 mg l⁻¹ de CaCO₃) (Tablas 1 y 2).

La prueba de ANOVA mostró diferencias significativas entre sitios (F=10.5638, $p=0.00$). Tanto el Análisis de Componentes Principales (PCA, por sus siglas en inglés, *Principal Component Analysis*) como los diagramas iónicos indican la formación de tres grupos, con base en la composición química del agua de las localidades: el primer grupo está formado por cinco sitios (1.Manantiales, 2.Tambaque, 3.Micos, 4.Puente de Dios y 6.Santa Anita), el segundo por el sitio 5.Tzindejéh y el tercero por el sitio 7.Xilitla. Los dos ejes principales del PCA absorbieron un 92% del total de la variación (61% y 31% en los ejes 1 y 2, respectivamente) (Figs 2,3).

En distintas fechas de colecta se encontraron variaciones en la concentración iónica en los sitios 2 y 4, presentándose una mayor concentración iónica durante las épocas de secas y una menor concentración durante lluvias y pos lluvias. El ANOVA indicó que existen diferencias significativas ($p > 0.05$) entre estaciones en ambos sitios.

El PCA de las características mayormente físicas (profundidad, velocidad de corriente, PAR, temperatura del agua, OD-%SO, tipo de sustrato) de los sitios de estudio y la morfometría de *Blennothrix* revelaron que la velocidad de corriente tiene relación con la agrupación de los sitios y las dimensiones de las poblaciones, en cuanto a la longitud y diámetro del filamento, diámetro del tricoma y espesor de la vaina, presentándose mayores dimensiones a velocidades de corriente bajas (Fig. 3). Los dos ejes principales del PCA absorbieron un 90% del total de la variación (70% y 20% en los dos primeros ejes).

Las poblaciones de *Blennothrix* estuvieron presentes en todas las épocas de colecta y en todos los sitios examinados, excepto los sitios 6 y 7, donde ésta nunca fue observada. Todas las poblaciones estudiadas presentaron precipitación de carbonato alrededor de la vaina (Tabla 3). Algunas variantes en cuanto a la precipitación de carbonato se encontraron entre poblaciones de diferentes sitios; los sitios 1 y 4 presentaron una mayor proporción de carbonato, independientemente de la época de colecta (31 y 36%, respectivamente), mientras que los sitios 2 y 3 tuvieron una baja precipitación (13 y 16%, respectivamente).

La calcificación se presenta como una densa incrustación alrededor de la vaina, creando tubos micríticos (inducidos metabólicamente, pero dependientes del ambiente – Merz-Preiß y Riding 1999), típicamente de 10 a 25 μm de espesor, que encierran los

filamentos de *Blennothrix* (Figs 4A, C). Los tubos calcáreos alrededor de los filamentos se encuentran separados unos de otros. La región distal de los mismos permanece sin calcificar y, por tanto en algunos casos, los tricomas son visibles (Fig. 4E). Los cristales de calcita presentan una forma de tipo romboedro con superficies triangulares y una disposición irregular (Figs 4C-D), formando los ya conocidos “arcos góticos” (Rainey y Jones 2009).

El análisis de difracción de rayos X mostró que existe un alto número de minerales (carbonatos, óxidos y silicatos) depositados sobre la vaina de *Blennothrix* (Tabla 4). Los sitios 1 y 2 presentaron más minerales (8 y 11, respectivamente) que los sitios 3 y 4, con cinco minerales cada uno. Se observó una variación temporal de los minerales precipitados en todos los sitios de colecta; sin embargo, no se encontró ninguna correlación entre los materiales de arrastre depositados en la vaina (arcillas, feldespatos, cuarzo y micas) y el flujo de corriente. El mineral predominante en todos los sitios muestreados fue calcita, siendo los sitios 1, 3 y 4 los que presentaron la mayor proporción, con 95, 81 y 88%, respectivamente. Se registró una variación temporal de minerales precipitados alrededor de la vaina en todos los sitios de estudio. Asimismo, se observó que existe una mayor calcificación durante la época de secas, cuando los valores de saturación de calcita fueron mayores.

Sitio y ubicación	Altitud [msnm]	Clima ^a	Precipitación [mm año ⁻¹]	Temperatura del agua [°C]	Oxígeno disuelto [mg l ⁻¹]	Saturación de oxígeno [%]	PAR [$\mu\text{mol fotón m}^{-2} \text{s}^{-1}$]	Profundidad [cm]	Velocidad de corriente [cm s ⁻¹]	Sustrato
Sitio 1 Manantiales 18° 55' N 96° 00' W	800	A w ₀ (w)	800-1000	26-30 29±1	7.2-7.9 7.5±0.4	107	18-276 85±108	2-8 6±2	14-27 20±4	L, A, Ar
Sitio 2 Tambaque 21° 41' N 99° 02' W	150	(A) C (m) (w)	1500	23-24 23±1	7.6-8.4 8.1±0.4	96	13-69 34±25	19-60 28±19	10-48 27±12	A, G, C, R
Sitio 3 Micos 22° 05' N 99° 09' W	120	(A) C (m) (w)	1500	20-27 23±2	8.1-8.8 8.4±0.3	100	3-14 11±5	4-13 10±3	10-51 21±16	L, A, G, C, R
Sitio 4 Puente de Dios 21° 55' N 99° 24' W	450	(A) C (m) (w)	1500	23-27 25±2	7.0-8.2 7.8±0.7	104	4-245 73±116	1-3 3±2	0-29 13±14	L, A, Ar, G, C, R
Sitio 5 Tzindejéh 19° 49' N 100° 40' W	796	B s ₁ k w	3-66	30-32 31±1	7.0-7.5 7.3±0.2	108	7-35 18±12	12-30 23±7	16-119 63±47	S
Sitio 6 Santa Anita 21° 58' N 99° 11' W	160	(A) C (m) (w)	24-25	24-25 24±1	5.0-6.2 5.6±0.8	68	---	100	93-115 106±11	R
Sitio 7 Xilitla 21° 23' N 98° 58' W	465	(A) C (m) (w)	18	18-23 20±2	8.4	97	---	30	0	G

Tabla 1. Características climáticas, físicas y químicas de los sitios de estudio. Los valores representan mínimo, máximo, promedio \pm desviación estándar. Abreviaciones: m s.n.m., metros sobre el nivel medio del mar; OD, oxígeno disuelto; PAR: radiación fotosintéticamente activa, por sus siglas en inglés *Photosynthetically Active Radiation*. Sustratos: L: limo, A: arena, Ar: arcilla, G: grava, C: canto rodado, R: roca, S: sustrato artificial. ^a = Según Instituto Nacional de Estadística, Geografía e Informática (1985), --- = dato no registrado.

	Sitio 1 Manantiales	Sitio 2 Tambaque	Sitio 3 Micos	Sitio 4 Puente de Dios	Sitio 5 Tzindejéh	Sitio 6 Santa Anita	Sitio 7 Xilitla
pH	7.1-7.7 7.5±0.2	7.3-7.7 7.5±0.1	7.0-7.8 7.3±0.4	7.3-7.8 7.7±0.2	7.3-7.9 7.8±0.2	6.7-7.1 6.9±0.1	7.5-8 7.8±0.2
K ₂₅ [μS cm ⁻¹]	1703-1778 1740±31	674-2360 1423±643	701-948 810±109	571-3000 1562±937	586-617 604±10	1032-1209 1138±77	73-400 250±134
Sólidos disueltos totales [g l ⁻¹]	1-7 3±2	0.4-13 3±5	0.4-12 3±5	0.6-13 4±5	0.4 0.4±0.01	0.8-1 0.9±0.06	0.1-23 6±11.6
Alcalinidad total como CaCO ₃	230-250 239±8	178-220 196±16	121-234 166±45	97-204 171±42	173-180 175±3	251-277 262±10	36-142 114±51
HCO ₃ ⁻	225-305 269±37	197-245 229±21	148-286 196±57	118-286 207±64	202-219 210±6	191-338 284±66	44-159 129±56
CO ₃ ⁼	0-31 11±15	0-14 5±7	0-11 3±5	0-20 9±9	0-6 2±2	0-9 2±5	0-10 5±4
Cl ⁻	12-28 16±7	4-6 4±1	5-10 7±2	5-47 29±17	4-48 4±16	2-3 3±0.4	2-4 2±1
SO ₄ ⁼	735-907 859±70	223-806 471±234	196-361 294±67	270-829 588±269	65-68 66±1	358-465 406±45	0-3 1±2
SiO ₂	47-52 49±2	1-10 7±4	2-9 8±3	3-16 10±5	60-80 71±7	8-11 10±1	8-15 11±3
Dureza total como CaCO ₃	1040-1105 1083±28	381-1089 725±264	399-582 476±80	501-1077 828±272	147-153 150±2	687-750 730±29	48-149 123±50
Dureza de Ca como CaCO ₃	772-824 802±21	301-837 575±198	307-464 369±66	386-781 592±172	88-94 90±2	571-623 601±22	48-148 115±45
Dureza de Mg como CaCO ₃	268-299 280±13	80-252 150±71	88-135 108±18	115-351 237±103	58-63 60±2	115-141 129±13	0-20 8±9
Ca ⁺⁺	309-330 321±8	121-335 230±79	123-186 148±26	155-313 237±69	35-38 36±1	229-250 241±9	19-59 46±18
Mg ⁺⁺	65-73 68±3	20-61 36±17	22-33 26±4	28-85 57±25	14-15 14±0.4	28-34 31±3	0-5 2±2
Na ⁺	35-53 47±7	4-15 10±4	9-19 13±4	22-55 41±14	68-73 71±2	7-10 8±1	3-7 5±2
K ⁺	6-7 6±0.4	0.6-2 1±0.4	1-2 2±0.2	2-5 4±1	9 9±0.08	1 1±0.08	0.3-0.8 0.5±0.2
SRP	0.01-0.03 0.02±0.008	0.007-0.02 0.01±0.003	0.005-0.01 0.01±0.003	0.007-0.02 0.01±0.005	0.0009-0.8 0.3±0.3	0.007-0.02 0.01±0.004	0.008-0.01 0.009±0.003
N-NO ₃ ⁻	0.03-237 174±98	69-344 178±107	73-196 143±49	104-195 151±35	40-1049 434±376	170-239 195±31	91-114 144±79
N-NO ₂ ⁻	0.001-0.006 0.004±0.002	0-0.02 0.005±0.008	0.001-0.02 0.007±0.01	0.0005-0.007 0.002±0.002	0.002-0.05 0.02±0.02	0.001-0.01 0.003±0.004	0.005-0.01 0.004±0.006
N-NH ₄ ⁺	0.01-0.5 0.1±0.2	0.01-0.04 0.02±0.01	0.02-0.06 0.04±0.01	0.01-0.04 0.02±0.007	0.02-0.04 1±2	0.02-0.04 0.02±0.01	0.01-0.03 0.02±0.008
DIN	0.04-237 174±98	68-344 178±107	73-196 143±49	103-195 151±35	40-1051 435±377	170-239 195±31	91-261 144±79
Concentración iónica	48	30	20	36	13	29	5
Dominancia iónica	SO ₄ ⁼ >HCO ₃ ⁻ >Cl ⁻ >CO ₃ ⁼ Ca ⁺⁺ >Mg ⁺⁺ >Na ⁺ >K ⁺	SO ₄ ⁼ >HCO ₃ ⁻ >CO ₃ ⁼ >Cl ⁻ Ca ⁺⁺ >Mg ⁺⁺ >Na ⁺ >K ⁺	SO ₄ ⁼ >HCO ₃ ⁻ >CO ₃ ⁼ >Cl ⁻ Ca ⁺⁺ >Mg ⁺⁺ >Na ⁺ >K ⁺	SO ₄ ⁼ >HCO ₃ ⁻ >CO ₃ ⁼ >Cl ⁻ Ca ⁺⁺ >Mg ⁺⁺ >Na ⁺ >K ⁺	HCO ₃ ⁻ >SO ₄ ⁼ >Cl ⁻ >CO ₃ ⁼ Na ⁺ >Ca ⁺⁺ >Mg ⁺⁺ >K ⁺	SO ₄ ⁼ >HCO ₃ ⁻ >CO ₃ ⁼ >Cl ⁻ Ca ⁺⁺ >Mg ⁺⁺ >Na ⁺ >K ⁺	HCO ₃ ⁻ >CO ₃ ⁼ >Cl ⁻ >SO ₄ ⁼ Ca ⁺⁺ >Na ⁺ >Mg ⁺⁺ >K ⁺
Índice de saturación de calcita	0.6	0.7	0.8	1.3	0.4	0.3	0.2

Tabla 2. Composición química de los sitios de estudio. Los valores representan mínimo, máximo, promedio y desviación estándar. Las unidades están expresadas en mg l⁻¹, excepto donde se indica otra unidad. Abreviaciones: K₂₅ (conductividad específica estandarizada a 25°C), Fósforo Reactivo Soluble (SRP, por su siglas en inglés, *Soluble Reactive Phosphorous*), Nitrógeno Inorgánico Disuelto (DIN, por su siglas en inglés, *Dissolved Inorganic Nitrogen*).

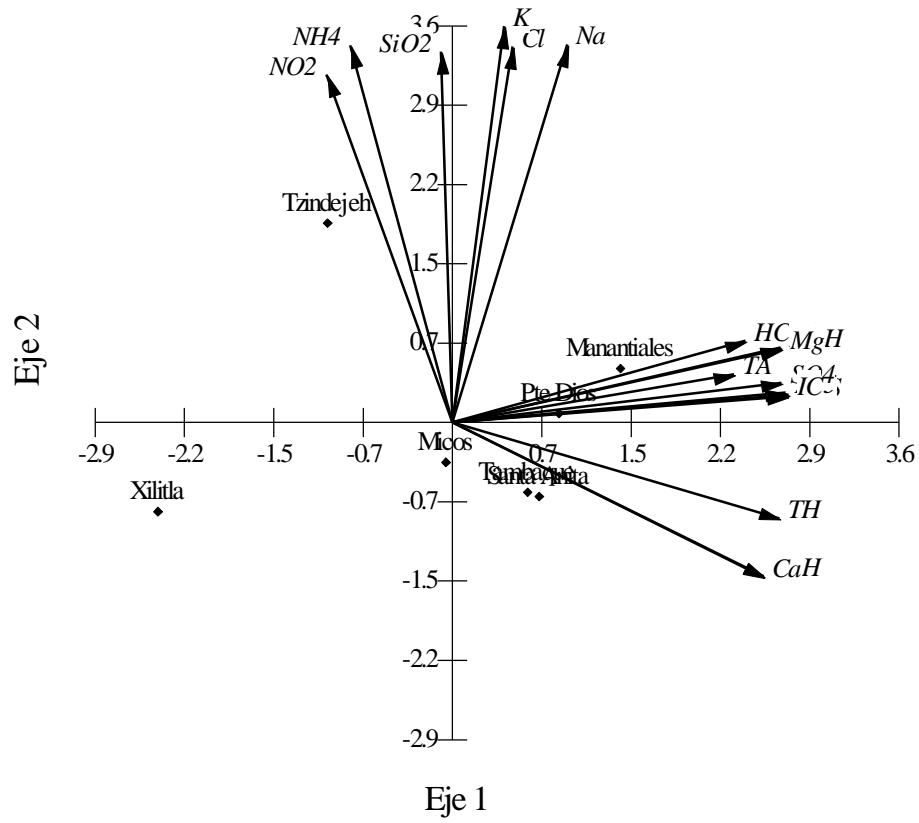


Fig. 2. Análisis de componentes principales de la composición química de los sitios de estudio con y sin crecimientos de *Blennothrix*.

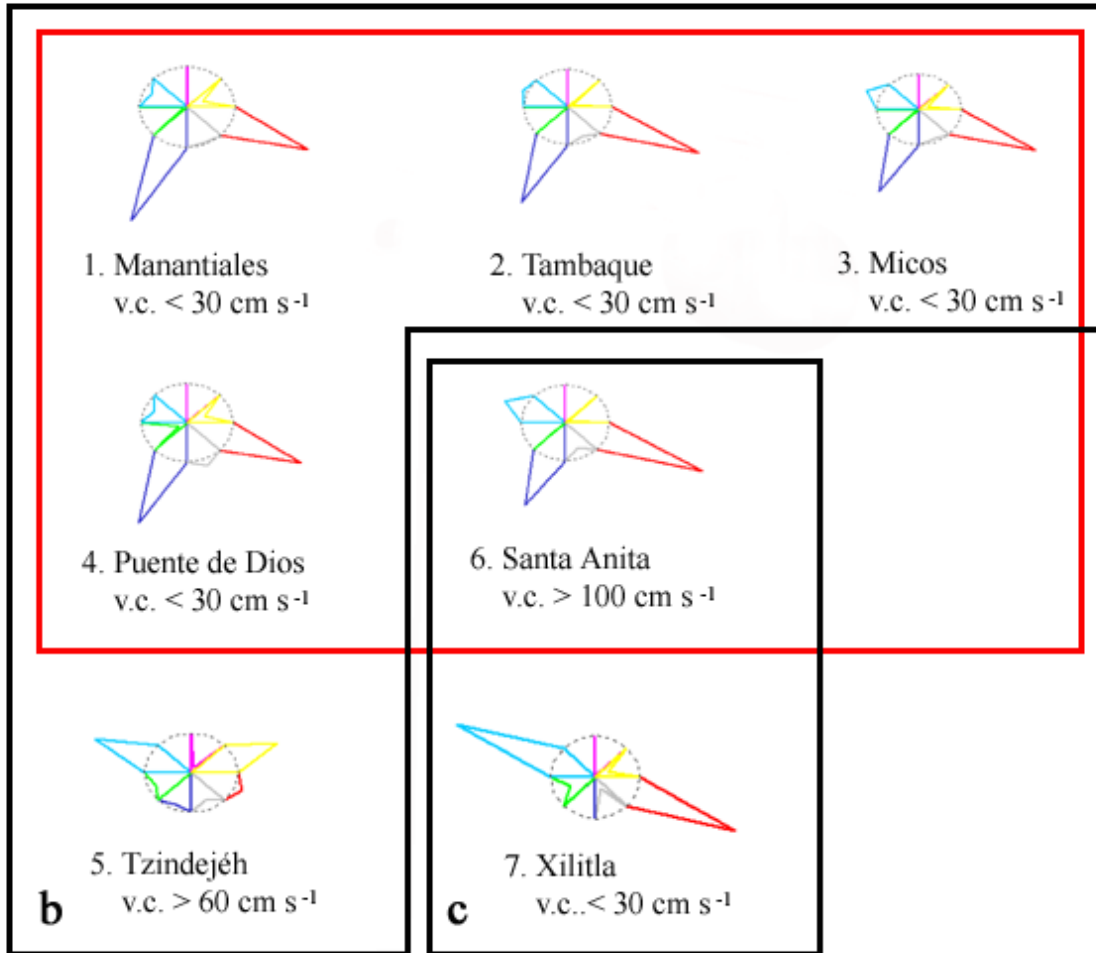
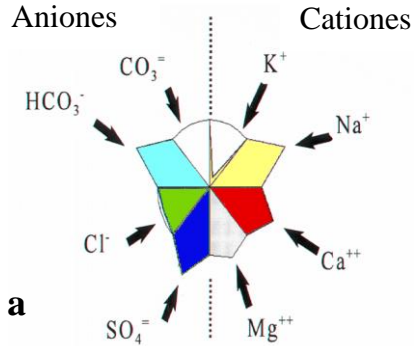


Fig. 3. Diagramas iónicos del promedio de cationes y aniones presentes en cada localidad, así como el promedio de la velocidad de corriente (v.c.); durante las distintas épocas de colecta). **a)** Anatomía del diagrama iónico de Maucha, **b)** Sitios con presencia de crecimientos de *Blennothrix*, **c)** Sitios sin crecimientos de *Blennothrix*. En el rectángulo rojo se encuentran los sitios con composición química semejante.

Sitio y fecha	Materia orgánica (%)	Carbonatos (%)
1.Manantiales		
11.ii.04	48	52
28.v.04	91	9
18.xi.04	87	33
2.Tambaque		
31.i.04	72	28
15.v.04	89	11
05.xi.04	98	2
3.Micos		
01.ii.04	84	16
15.v.04	88	12
06.xi.04	78	22
4.Puente de Dios		
31.i.04	52	48
14.v.04	60	40
07.xi.04	80	20

Tabla 3. Porcentaje de materia orgánica y carbonatos registrado para cada población de *Blennothrix* perteneciente a los cuatro sitios de estudio, en diferentes épocas de colecta.

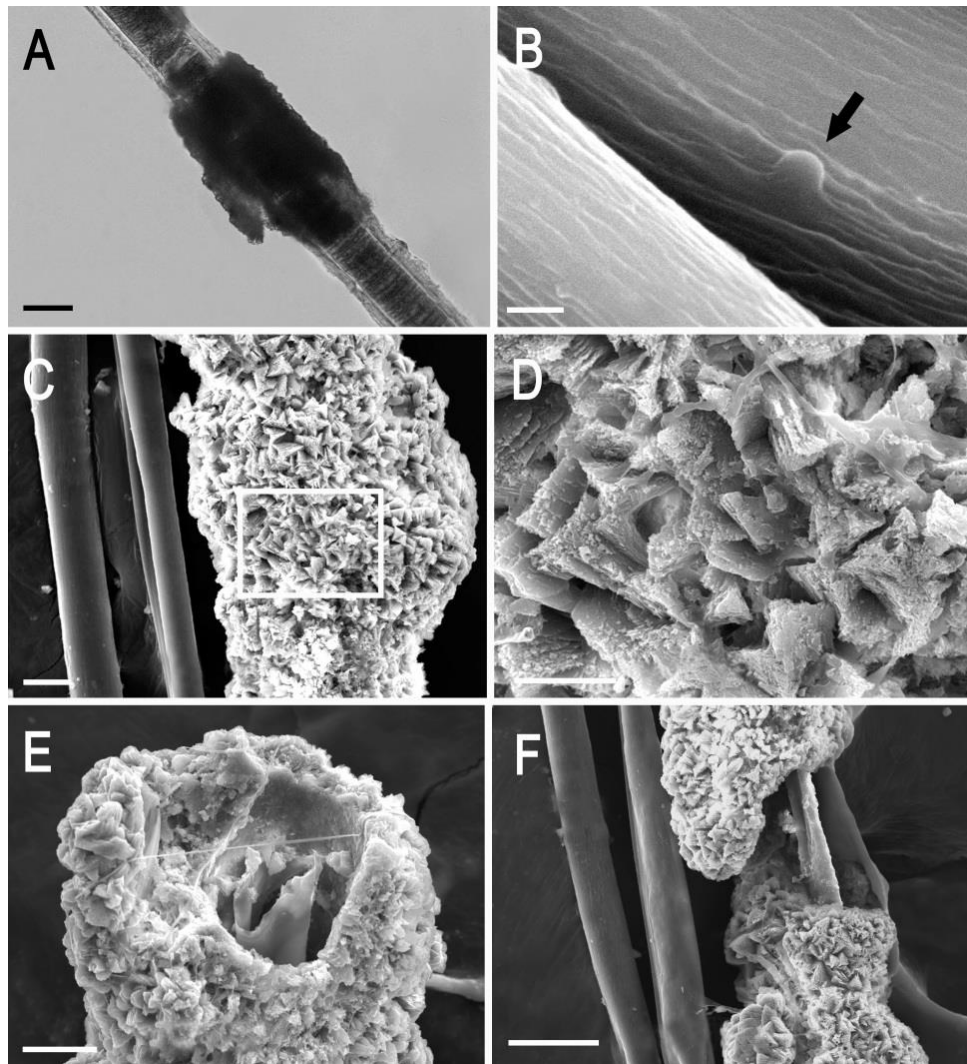


Fig. 4. Calcificación en *Blennothrix*. (A) Vista en microscopía óptica de un segmento de filamento incrustado; la barra de escala representa 30 μm . (B-F) Vista en microscopía electrónica de barrido. (B) Proceso de nucleación en donde se observan partículas esféricas de carbonato de calcio amorfo (flecha); barra de escala = 1 μm , (C) Filamentos sin calcificación (lado izquierdo) y agrupación de triángulos de calcita en un filamento abundantemente calcificado (lado derecho); barra de escala = 20 μm . El área rectangular se encuentra ampliada en (D). (D) Cristales de calcita triangulares; barra de escala = 10 μm . (E) Vista de la sección transversal de un filamento abundantemente calcificado con cristales de calcita; barra de escala = 20 μm . (F) Calcificación rota, mostrando el interior de un tricoma; barra de escala = 50 μm . Imágenes realizadas por el M. Rafael Quintanar Zúñiga de la Facultad de Estudios Superiores Iztacala.

Clase	Grupo	Mineral	Sitio 1		Sitio 2			Sitio 3		Sitio 4	
			28.v.04	18.xi.04	31.i.04	15.v.04	5.xi.04	15.v.04	6.xi.04	14.v.04	7.xi.04
Carbonatos	Calcita	Calcita	97	93	25	49	18	71	90	90	86
Óxidos	Hematita	Hematita	1								
Silicatos	Arcilla	Paligorsquita		2							
Silicatos	Arcilla	Clinocloro		2							
Silicatos	Arcilla	Haloisita					25				
Silicatos	Arcilla	Montmorillonita			24	16		15			
Silicatos	Feldespato	Albita		2	7				5		
Silicatos	Feldespato	Anortita								3	
Silicatos	Feldespato	Microclina					8			2	
Silicatos	Cuarzo	Cuarzo		1	34	27	23	11	2	5	8
Silicatos	Cuarzo	Tridimita	1								
Silicatos	Cuarzo	Cristobalita	1		10						
Silicatos	Mica	Muscovita				8		3	3		6
Silicatos	Mica	Eastonita					8				
Silicatos	Anfíbola	Richterita									12
Silicatos	Zeolita	Laumontita									6

Tabla 4. Porcentaje de especímenes mineralógicos encontrados sobre la vaina de *Blennothrix*, perteneciente a los cuatro sitios de estudio en diferentes épocas de colecta. Los valores están expresados en porcentaje.

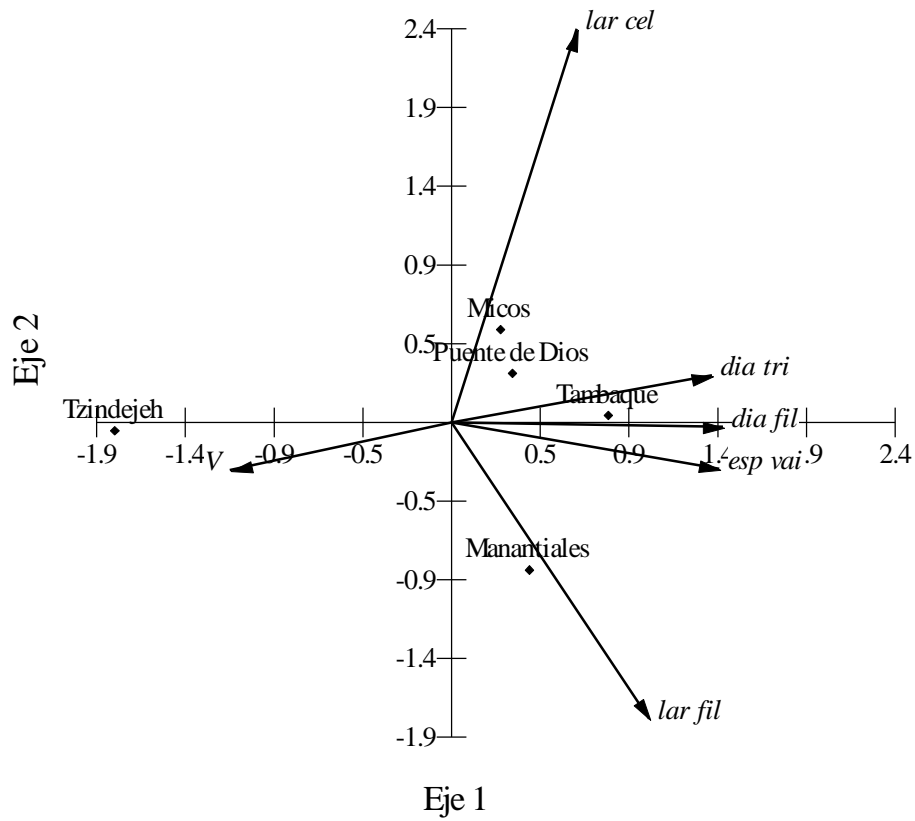


Fig. 5. Análisis de componentes principales de la velocidad y la morfometría de las poblaciones de *Blennothrix* evaluadas. Abreviaturas: lar cel, largo celular; dia tri, diámetro del tricoma; dia fil, diámetro del filamento; esp vai, espesor de la vaina; lar fil, largo del filamento.

4.6. DISCUSIÓN

De los resultados obtenidos a partir del análisis químico del agua, se tiene que todos los sitios con crecimientos de *Blennothrix* presentan condiciones químicas similares, excepto el sitio 5, en el cual se registró una menor concentración iónica y de sulfatos. Cabe hacer notar que en este sitio se registraron las menores dimensiones en cuanto a caracteres morfométricos.

Altas concentraciones de SO_4^{2-} se presentaron en el agua de los sitios 1, 2, 3 y 4, resultado de una disolución de los depósitos de yeso presentes en la región (Consejo de Recursos Minerales 1992, 1993, 2000). De acuerdo con Carmona *et al.* (2005), los sulfatos son un componente esencial de la vaina de *Blennothrix* y algunas otras Cyanoprokaryota. El análisis muestra que los iones de Ca^{++} , HCO_3^- y Mg^{++} son iones prevalecientes en los ríos de estudio, tal como se esperaría para aguas que se encuentran en contacto con rocas calizas y dolomitas, respectivamente (Consejo de Recursos Minerales 1992, 1993, 2000; Ferrusquía-Villafranca 1998). Se encontraron bajas concentraciones de Na^+ , K^+ y Cl^- en las localidades de estudio. Composiciones químicas similares han sido descritas en manantiales termales con presencia de carbonato en Canadá y en lagos cráter mexicanos (Armienta *et al.* 2008, Rainey y Jones 2009).

El nutriente más abundante presente en el agua de todos los sitios de estudio es el nitrógeno como nitrato. Las concentraciones de FSR observadas son bajas debido a la presencia de altas concentraciones de Ca^{2+} . Esta condición ha sido observada en sistemas

cársticos similares (Reddy 1988) debido a la coprecipitación de FSR con el carbonato de calcio (Kleiner 1990).

El análisis químico del agua reveló que los sólidos disueltos totales, conductividad, alcalinidad total, dureza total, concentración iónica, $\text{SO}_4^{=}$, HCO_3^- y Mg^{++} , explican la presencia de *Blennothrix* y el agrupamiento de los sitios.

Los factores fisicoquímicos de los ríos con presencia de *Blennothrix* fueron muy similares a los presentes en el sitio 6, excepto por la velocidad de corriente y la profundidad. La ausencia de poblaciones de *Blennothrix* en este sitio y la reducción de las dimensiones de la población del sitio 5, podrían estar explicadas por la alta velocidad de corriente registrada en ambos sitios. Beltrán-Magos *et al.* (2005) reportaron una correlación negativa entre la velocidad de corriente y la longitud y diámetro del filamento, y el diámetro del tricoma. Esta relación también ha sido observada en algunas poblaciones de Cyanoprokaryota filamentosas de ambientes continentales, tales como *Phormidium tenue* (Menghini) Gomont, *P. retzii* Gomont y *Schizothrix fasciculata* (Nägeli) Gomont (Necchi 1997).

La ausencia de poblaciones de *Blennothrix* en Xilitla parece deberse a una distinta composición química del agua: baja concentración iónica, bicarbonatos y sulfatos, considerando que éste último constituye un componente esencial para la formación de la vaina en *Blennothrix* (Figs 2,3). Carmona *et al.* (2005) reportaron una fuerte tinción de la vaina con el colorante azul-alciano, evidencia de la presencia de polisacáridos sulfatados en la vaina de *Blennothrix*.

Las variaciones estacionales en la concentración iónica de los sitios 2 y 4 podrían indicar un efecto de dilución; sin embargo, esta variación no se ve reflejada en la proporción de carbonatos precipitados sobre *Blennothrix*. La formación de minerales en *Blennothrix* podría estar explicada por la reducción de CO₂ en el medio externo debido a la actividad fotosintética. Debido a que el agua se encuentra sobresaturada con respecto al carbonato de calcio, la reducción induce la mineralización e incrementa los valores de pH, alcalinidad y los iones de CO₃²⁻, por tanto, promueve principalmente la precipitación de calcita. Las sustancias poliméricas extracelulares excretadas por las células favorecen la incrustación de carbonato de calcio, ya que proveen de una superficie ideal para la absorción de iones y nucleación mineral (Emeis *et al.* 1987, Braissant *et al.* 2003, Dittrich y Sibling 2010). Los exopolisacáridos poseen la habilidad de concentrar cationes de Ca²⁺ de las soluciones, debido a la carga superficial negativa que ocurre en ciertas Cyanoprokaryota (*Pleurocapsa sp.*, *Plectonema sp.* y *Scytonema sp.*) (Golubić 1973, Merz-Preiß y Riding 1999, Riding 2000, Frankel y Bazylinski 2003, Pentecost 2005) y, posiblemente, lo mismo ocurre en *Blennothrix*. Pentecost (1978) y Konhauser (2007) propusieron que las especies de Cyanoprokaryota que producen vainas o exopolisacáridos, generalmente precipitan más carbonato de calcio que aquellas especies sin tales estructuras.

Merz-Preiß y Riding (1999) reportaron que la precipitación de carbonato de calcio en ríos de agua dulce llega a ser más conspicua cuando, en promedio, el índice de sobresaturación anual excede el valor de 0.75. Sin embargo, las poblaciones de *Blennothrix* presentaron la formación de minerales extracelulares, a pesar de los relativamente bajos valores de saturación registrados en ciertas estaciones, particularmente en la época cálida

lluviosa. La nucleación puede verse mermada por el efecto de la remoción de minerales debido al efecto mecánico de la velocidad de corriente.

De acuerdo con los datos registrados en este estudio, podemos concluir que la presencia de *Blennothrix* se ve favorecida por la combinación de ciertas características fisicoquímicas (alta concentración iónica, abundancia de bicarbonato y sulfatos, baja profundidad y PAR, así como baja a media velocidad de corriente) y que las poblaciones estudiadas no solo presentan una importante calcificación sino que además tanto la composición como la apariencia de la misma son similares en todas ellas.

La presente investigación muestra la importancia del estudio de las variaciones fisicoquímicas estacionales en ambientes alcalinos de agua dulce y los procesos de calcificación en las Cyanoprokaryota tanto para entender su funcionamiento como su prevalencia en ríos tropicales.

5. EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD BIOLÓGICA

5.1. INTRODUCCIÓN

Las Cyanoprocaryota son un grupo antiguo de organismos procariontes capaces de llevar a cabo la fotosíntesis. Su gran variedad de estrategias les ha permitido tolerar un amplio espectro de condiciones ambientales, tales como: sequía, frío, salinidad, limitación de nutrientes, foto-oxidación, anaerobiosis, etcétera y les permite estar ampliamente distribuidas en hábitats que van desde ambientes acuáticos (océanos, lagos y ríos) a ambientes terrestres y hábitats extremos como aguas termales, aguas hipersalinas, desiertos y regiones polares, así como a establecer relaciones simbióticas con organismos como hongos y plantas (Whitton y Potts 2000, Shweta 2011). El éxito evolutivo que han tenido las Cyanoprocaryota para ocupar diversos ambientes, incluidos los ambientes extremos, está relacionado con una serie de características morfológicas, fisiológicas y reproductivas únicas en el grupo; entre las que destacan: la presencia de un mucílago extracelular que aísla a las células vegetativas y establece un gradiente en relación con su entorno, la formación de pigmentos accesorios y su adaptación cromática los cuales resuelven tanto la deficiencia como los cambios en la intensidad luminosa, y la activación del metabolismo secundario (i.e. la presencia de cianotoxinas) que les permite competir y evitar la depredación y/o herbivoría en los sistemas acuáticos. Además de las rutas del metabolismo primario que son similares en todos los organismos (azúcares, aminoácidos, ácidos grasos, nucleótidos, etcétera), las algas pueden presentar otras rutas metabólicas que llevan a la formación de otros compuestos que generalmente son propios y específicos de cada grupo de algas, a nivel de especie, género o familia. Estas rutas constituyen el metabolismo

secundario y los productos derivados de ellas se conocen como metabolitos secundarios (Smith 1976). La biosíntesis de estos compuestos suele estar restringida a estadios específicos de desarrollo, así como a diferentes partes de las algas y a las estacionalidad.

Durante las últimas dos décadas, los metabolitos secundarios producidos por las Cyanoprokaryota han atraído la atención de los investigadores, debido principalmente a tres razones: (i) la intensa toxicidad de las toxinas producidas por varias especies formadoras de *blooms* en sistemas de agua dulce y su efecto dañino en la salud de animales y humanos, (ii) el uso potencial terapéutico de los mismos y (iii) la información sobre las interacciones de los organismos dentro de sus comunidades (Schlegel *et al.* 1999, Pérez y Vargas 2007, Shweta 2011). Otra de las aplicaciones que tienen los metabolitos secundarios es que pueden ser utilizados como caracteres químicos que coadyuvan en el estudio de trabajos taxonómicos, siendo utilizados en el área de la botánica conocida como quimiotaxonomía. La quimiotaxonomía incorpora a la taxonomía los principios y procedimientos implicados en la elaboración de datos químicos. Básicamente estudia la variabilidad de los compuestos químicos, en particular de los metabolitos secundarios (terpenos, flavonoides, glicósidos, alcaloides, etcétera), con el fin de que puedan ser ubicados como una herramienta más en la clasificación. Esta ciencia es una fuente de caracteres confiables para el estudio de la filogenia de los grupos de plantas en cuestión (Harborne y Turner 1984).

El metabolismo secundario de las Cyanoprokaryota incluye una variedad de compuestos que presentan actividad antibacteriana, anticoagulante, antimicótica, antiinflamatoria, antifertilidad, antipalúdica, antiprotozoarios, antituberculosa, antiviral, antitumoral, hipoglicémica, citotóxica y algicida (Schlegel *et al.* 1999, Skulberg 2000,

Gross 2003, Martínez-Flores 2007, Pérez-Gutiérrez *et al.* 2008, Shweta 2011). Químicamente, estos compuestos representan una amplia gama de fármacos, incluyendo alcaloides y alcaloides de indol, policétidos y terpenos (Grewe y Pulz 2012). Más de 800 compuestos metabólicos secundarios que pertenecen a varias clases de sustancias, incluidos inhibidores de enzimas, inhibidores de la fotosíntesis, antimitóticos, antimicrobianos e inmunosupresores; han sido aislados, clasificados y nombrados sobre la base de su estructura química, el método de bioensayo y sus blancos toxicológicos (Shweta 2011).

De acuerdo con Grewe y Pulz (2012) las Cyanoprokaryota han demostrado ser uno, si no es que la fuente más rica de metabolitos bioactivos. El grupo principal que contribuye a la riqueza química de metabolitos secundarios de las Cyanoprokaryota (773 metabolitos reportados en 2011) es predominantemente las Oscillatoriales (58% de los metabolitos reportados), seguido por las Nostocales (32%) y Chroococcales (10%). Los metabolitos de las Pleurocapsales, rara vez han sido reportados, aunque se han detectado los genes biosintéticos necesarios para la fabricación de péptidos no-ribosomales. Mientras que el grupo marino más importante que contribuye a esta riqueza química son también las Oscillatoriales y está dominada por el género *Lyngbya* (43% de todos los metabolitos de Cyanoprokaryota, 336 compuestos) (Choi *et al.* 2012).

De acuerdo con Shimizu 1996, Kaebernick y Neilan 2001 y Cortés-Altamirano y Sierra-Beltrán 2008, la familia Oscillatoriaceae a la cual pertenece *Blennothrix* es particularmente rica en metabolitos secundarios (Tabla 5).

Especie	Naturaleza química	Toxinas	Efecto
<i>Lyngbya wollei</i> Farlow ex Gomont	Alcaloide carbamato	Saxitoxinas (goniautoxina decarbamoil 2 y 3, PSP)	Paralizante de mariscos
<i>Oscillatoria</i> cf. <i>limnetica</i>	Alcaloide	Ácidos hexadecenoicos delta-7 y delta-9	Afectan el crecimiento de bacterias heterotróficas gram-positivas y gram-negativas
<i>O. erythraeae</i> (Ehr. Ex Gomont) Geitler (= <i>Trichodesmium erythraeum</i>)	Heptapéptido cíclico	Microcistinas	Anoxia y daño en las agallas de los peces
<i>O. thiebautii</i> (Gomont ex Gomont) Geitler (= <i>Trichodesmium thiebautii</i>)			
<i>O. nigro-viridis</i> Thwaites ex Gomont	Heptapéptido cíclico	Dermatotoxinas	Dermatitis, ampollas y necrosis en mamíferos; potente promotor de tumores
<i>O. rubescens</i> De Candolle	Heptapéptido cíclico	Compuestos hepatotóxicos y dermatotoxinas	Inhibición de las proteínas fosfatasa (PP1 y PP2A)
<i>O. morigeotii</i>	Alcaloide carbamato	PSP	Paralizante de mariscos
<i>Oscillatoria</i> sp. y <i>Lyngbya</i> sp.	Alcaloides y éster de guanidina metil-fosfato	Compuestos neurotóxicos (anatoxina-a y saxitoxinas) Dermotoxinas (aplisiatoxinas y lyngbyatoxina-a)	
<i>Schizothrix calcicola</i> (Ag.) Gomont	Heptapéptido cíclico y ésteres de guanidina metil-fosfato	Dermatotoxinas (lyngbyatoxina-a y apsisiatoxinas)	Dermatitis, ampollas y necrosis en mamíferos; potente promotor de tumores Agentes inflamatorios, irritantes gastrointestinales

Tabla 5. Metabolitos secundarios de la familia Oscillatoriaceae.

Entre los trabajos descritos para el género se encuentra la caracterización de lyngbiastatinas 1 y 3 y los ácidos tumonóicos A y D-1 presentes en la especie marina *Blennothrix cantharidosmum* (Clark *et al.* 2008). No obstante debido a problemas en la identificación entre *Blennothrix*, *Schizothrix*, y *Lyngbya* es posible que el ácido tumonoico en realidad pertenezca a la asociación *Lyngbya/B. cantharidosmum*. Así como, la evaluación de la actividad hipoglucemiante y bactericida de *Blennothrix ganeshii* (Martínez-Flores 2007, Pérez-Gutiérrez *et al.* 2008).

El presente estudio busca determinar la presencia de los principales grupos de metabolitos secundarios presentes en extractos orgánicos de *Blennothrix*, con el propósito de establecer comparaciones entre poblaciones ubicadas en distintas localidades y al mismo tiempo obtener información acerca de su actividad biológica que permita comprender su amplia distribución, permanencia, abundancia y estabilidad en ríos tropicales de la región central de México.

5.2. HIPÓTESIS

La composición y actividad biológica de los metabolitos secundarios en las Cyanoprocaryota varía según el género y especie de que se trate. ¿Cuál será la composición de metabolitos secundarios en *Blennothrix*? ¿Habrán diferencias en cuanto a la composición y actividad biológica de los metabolitos secundarios de poblaciones de *Blennothrix* ubicadas en distintos sitios de estudio?

5.3. OBJETIVOS

- i. Determinar la presencia de los principales grupos de metabolitos secundarios presentes en los extractos orgánicos de *Blennothrix* por medio de reacciones coloridas y perfiles cromatográficos.
- ii. Caracterizar la actividad biológica de los metabolitos secundarios de *Blennothrix* a través de la elaboración de cuatro ensayos biológicos de actividad: bactericida, citotóxica, antiinflamatoria y disuasoria.

5.4. MATERIAL Y MÉTODO

5.4.1. Determinación de la presencia de los principales grupos de metabolitos secundarios

Obtención de los extractos

Los crecimientos de *Blennothrix* de la localidad de Los Manantiales fueron transportados al laboratorio en frascos de polietileno con la menor cantidad de agua posible, aproximadamente a 4°C. Las muestras fueron lavadas con agua destilada y fue removido todo material extraño, planta o animal, antes de su subsecuente uso en las pruebas. El material fue deshidratado en una liofilizadora (HETO FD3), las muestras del liofilizado fueron suspendidas en un volumen conocido de disolvente. Se emplearon tres distintos disolventes con distinta polaridad (hexano, acetato de etilo y metanol) con el fin de extraer la mayor cantidad posible de compuestos. Posteriormente se eliminó el disolvente del

extracto mediante una destilación a presión reducida en un rota vapor. Enseguida se trasvasaron en matraces con sus etiquetas correspondientes.

Elaboración de reacciones coloridas

Terpenos

Los extractos se caracterizaron determinando la presencia de los principales grupos de metabolitos secundarios (flavonoides, terpenos, glicósidos y alcaloides) mediante reacciones coloridas y de precipitación (Domínguez 1985, Fransworth 1966). Se determinó la presencia de terpenos mediante la prueba de Liebermann-Burchard (Domínguez 1985), prueba general en la que a partir de los colores obtenidos se identifica el tipo de compuesto presente en el extracto. La intensidad del color depende finalmente de una serie de condiciones, como el tiempo transcurrido entre el inicio de la prueba y la lectura del resultado.

Primero se elaboró el reactivo mezclando el mismo volumen de anhídrido acético y de cloroformo, y por cada mililitro de cloroformo se le agregó a esta mezcla una gota de ácido sulfúrico concentrado.

Por otro lado se llevaron a sequedad las muestras de los extractos y una vez secas se disolvieron en cloroformo. Enseguida las muestras se colocaron en un baño de hielo y a cada una se le agregó 1 ml del reactivo de Liebermann-Burchard. El cambio de coloración a verde-azul o rojiza indica la presencia de terpenos-esteroides.

Flavonoides

Para determinar la presencia de flavonoides se utilizó la prueba de Shinoda. Esta prueba consiste en agregar a los extractos secos y redissueltos en metanol un trozo de limadura de magnesio y dos gotas de ácido clorhídrico concentrado (Guevara 1988). La prueba es positiva si la solución vira a color verde o naranja.

Glicósidos

Para la detección de glicosidos se utilizó la prueba de Mölisch la cual permite detectar la existencia de enlaces hemiacetálicos. A los extractos secos y redissueltos en etanol se les agregaron dos gotas de una solución etanólica de α -naftol al 5% y 1 ml de ácido sulfúrico concentrado. El ácido se añadió por las paredes del tubo para evitar una reacción violenta y permitir la aparición de un anillo en la interfase. La prueba fue considerada positiva si el anillo formado presentó una coloración violeta.

Alcaloides

La presencia de alcaloides se determinó mediante las reacciones de ácido silicotúngstico. Se le agregó a los extractos secos y redissueltos 1 ml de ácido clorhídrico al 1%, posteriormente se agregó una gota de ácido clorhídrico concentrado y dos gotas del reactivo de ácido silicotúngstico. La prueba es positiva si se forma un precipitado de color amarillo paja, mientras que la ausencia de precipitados es indicativa de que no hay alcaloides.

Elaboración de perfiles cromatográficos

Para la resolución de los perfiles cromatográficos se empleó cromatografía en capa fina (TLC, por sus siglas en inglés, *Thin Layer Chromatography*). Se emplearon placas de sílica gel 60F₂₅₄ (MERCK) de 250 µm de espesor CHCl₃:CH₃OH:H₂O (80:18:2) como fase estacionaria y como fase móvil se usaron las mezclas de hexano:acetato de etilo (9:1) y hexano: acetona (6:3) con un indicador de fluorescencia UV 254 nm en soporte de vidrio. Una vez desarrollados los perfiles, se visualizaron los componentes de los extractos bajo luz visible y ultravioleta y posteriormente fueron reveladas con anisaldehído para evidenciar terpenos y 2-aminoetil difenilborato (RPN) para flavonoides.

La velocidad de flujo (Rf, relación existente entre la distancia recorrida por el compuesto y la recorrida por el disolvente en el mismo tiempo) fue calculada con la siguiente fórmula: $Rf = di/dt$, en donde: Rf=velocidad de flujo, di=distancia de la muestra desde el origen y dt=distancia del eluyente desde el origen.

5.4.2. Actividad bactericida

Determinación de la concentración mínima inhibitoria

Por el método de microdilución en placa de 96 pozos se determinó la concentración mínima inhibitoria (MIC, por sus siglas en inglés, *Minimum Inhibitory Concentration*) de los diferentes extractos obtenidos de *Blennothrix*, frente a *Escherichia coli* ATCC 6051 y *Bacillus subtilis* ATCC 6633 (cepas donadas por la Facultad de Química, UNAM). Los extractos de *Blennothrix* fueron obtenidos con el mismo procedimiento realizado en la sección 3.4.1. La MIC es definida como la concentración mínima del extracto, capaz de

inhibir el crecimiento visible de cada microorganismo (Nostro *et al.* 2000). El inóculo de bacteria fue preparado de un medio de cultivo (caldo nutritivo) de 24 h, la suspensión fue ajustada al estándar 0,5 M de la curva de McFarland (lo que corresponde a aproximadamente $1,5 \times 10^6$ UFC/ml). El caldo nutritivo se usó como control negativo del crecimiento bacteriano y como control positivo el caldo nutritivo más el inóculo. El fármaco de referencia fue ampicilina anhidra (Sigma) a partir de una concentración de 0.8 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ se obtienen 4 diluciones (Factor de dilución 2). La prueba se realizó por triplicado de todas las muestras y controles, el periodo de incubación fue de 24 h a 37°C. Se probaron ocho concentraciones de cada extracto (0.25, 0.5, 1, 2, 4, 8, 16 y 32 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$) y cinco del control de inhibición del crecimiento bacteriano (0.05, 0.1, 0.2, 0.4 y 0.8 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$).

Después de incubar 24 h a 37°C se procedió a identificar las concentraciones no inhibitorias del crecimiento bacteriano añadiendo a cada pozo sal de tetrazolio al 2% (TTC, por sus siglas en inglés, 2, 3, 5-Triphenyl-2H-tetrazolium chloride), la cual fue reducida por el metabolismo bacteriano transformándolo en formazán, cuya coloración es rojiza.

5.4.3. Actividad citotóxica

Obtención del extracto

Se colectaron crecimientos de *Blennothrix* provenientes de la localidad de Los Manantiales a los cuales les fue retirada la mayor cantidad de agua posible y se transportaron en frascos de polietileno, a 4°C. La preparación del extracto de clorofila *a* se realizó homogeneizando la muestra de *Blennothrix* con 5 ml de acetona al 90%. El tubo de centrifuga con la muestra

fue colocado en oscuridad y refrigeración (4°C) durante 24 horas. El extracto fue centrifugado durante 15 min a 5000 rpm y le fue retirado el sobrenadante, el cual fue guardado en oscuridad y refrigeración. Se realizó una segunda extracción de toxina de las mismas muestras añadiendo 3-5 ml de acetona y se repitió el procedimiento anterior. Ambas extracciones se juntaron y sus volúmenes fueron sumados. La medida de la concentración de clorofila *a* fue evaluada por medio de espectrofotometría a una absorbancia de 665 y 750 nm (Jeffrey y Humprey 1975, Wyman y Fay 1986). El extracto de clorofila fue evaporado utilizando un rota vapor (60-80°C). Las toxinas se conservaron en congelación y oscuridad, para evitar su fotodegradación, hasta que fue realizado el ensayo en medio salino fresco, resuspendiendo en un volumen final de 1.35 ml.

Evaluación de la toxicidad

La evaluación de la toxicidad de los extractos provenientes de dichos crecimientos se llevó a cabo utilizando nauplios de *Artemia salina*, por medio del cálculo de la concentración media letal (LC₅₀, por sus siglas en inglés, *median lethal concentration*), originada por la incorporación del extracto en agua con un volumen conocido de organismos. Para la realización de los bioensayos fueron necesarios cultivos de *Artemia salina* de 48 horas de edad. *Artemia salina* se cultiva en medio salino (33 g l⁻¹ de sal marina en agua destilada), siempre en medio fresco, a partir de quistes comerciales, con 1 gota de anticloro, en aireación, a 28°C de temperatura, luz constante y fotoperiodo 16 luz: 8 oscuridad.

El bioensayo se realizó en placas multipocillo por triplicado. A continuación se esquematiza la forma en que fue llenada la placa multipocillo:

Fila	Toxina (μl)	Medio salino (μl)	μl con artemias	Volumen total del pocillo
A	---	300	---	300
B	20	180	100	300
C	40	160	100	300
D	75	125	100	300
E	125	75	100	300
F	175	25	100	300
G	---	200	100	300
H	---	300	---	300

En las filas A y H fue puesto medio salino fresco para mantener un grado de humedad en la placa durante el ensayo. La fila G corresponde al blanco o control de artemias. A cada pocillo le fueron añadidos 10 nauplios de artemias capturadas en 100 µl de solución salina. Las placas fueron cerradas con papel parafilm y colocadas en cámaras de cultivo a una temperatura (25°C) y luz constante, y fotoperiodo 16:8 horas. Transcurridas 24 y 48 horas fueron contadas las artemias muertas. Utilizando el número de nauplios de artemias muertas en cada una de las concentraciones de toxina analizadas, se realizó una representación gráfica para calcular el valor de la concentración media letal mediante extrapolación, el cual se refiere a la concentración estimada a la cual se produjo la muerte en el 50 % de la población.

5.4.4. Actividad antiinflamatoria

Obtención de los extractos

Varias muestras de la población de *B. ganeshii* de Los Manantiales, Morelos fueron recolectadas en frascos de polietileno y conservadas a una temperatura de 4°C, sin agua. Posteriormente las muestras fueron sometidas al mismo procedimiento realizado para llevar a cabo el bioensayo de actividad bactericida, utilizando los siguientes disolventes hexano, acetato de etilo y metanol.

Evaluación de la actividad antiinflamatoria

Para evaluar la actividad antiinflamatoria se utilizó el modelo de edema auricular inducido por TPA (13-acetato de 12-tetradecanoilforbol) (Rao *et al.* 1993, Payá *et al.* 1996). Se emplearon ratones machos de la cepa CDI (25-30 g). Los animales ($n= 3$) se colocaron en

cajas de acrílico transparente a una temperatura entre 24-26°C, fotoperiodo de 12 h luz/obscuridad y con libre acceso al agua y alimento. Bajo anestesia general con pentobarbital sódico I.P. (3.5 mg Kg⁻¹ vía intraperitoneal), en la superficie interna y externa de la oreja derecha, fueron aplicados 10 µl de una solución etanólica de TPA (0.25 mg ml⁻¹). Diez minutos después, en la misma oreja se aplicaron 20 µl de la solución metanólica del compuesto (20 mg ml⁻¹). La oreja izquierda recibió solamente los vehículos (10 µl de etanol y 20 µl de metanol). Cuatro horas después los animales fueron anestesiados con éter, sacrificados por dislocación cervical y se tomó una muestra de 7 mm de diámetro de ambas orejas. La diferencia en peso entre la muestra de la oreja derecha y la izquierda representa el edema de cada ratón. El mismo procedimiento fue seguido para elaborar ensayos utilizando hexano y acetato de etilo como vehículos.

El porcentaje de inhibición del edema para cada grupo fue calculado con la siguiente fórmula: % de inhibición= $(C-E/C) \times 100$, en donde: C= edema promedio del grupo tratado con TPA, E= edema promedio del grupo tratado con TPA y extracto.

Los resultados obtenidos se analizaron mediante pruebas de *t* de Student y los valores de $p \leq 0.05$ (*) y $p \leq 0.01$ (**) se consideraron como diferencia significativa con respecto al control.

5.4.5. Actividad disuasoria

Obtención de los extractos

Crecimientos de *Blennothrix* pertenecientes a dos sitios de colecta, Manantiales (Morelos) y Micos (San Luis Potosí), fueron colectados y transportados al laboratorio para su posterior análisis (4 °C, sin agua). La muestra fue liofilizada con el fin de elaborar extractos con diferentes solventes (hexano, acetato de etilo y metanol), siguiendo el procedimiento descrito en la sección 4.4.1.

Evaluación del índice anti-apetitivo

Un total de nueve extractos con distintas concentraciones (500, 1000 y 2000 ppm) fueron elaborados utilizando acetona como vehículo. Quince réplicas de discos foliares hechos a base de lechuga orgánica (5 cm de diámetro) fueron colocados en cajas Petri e impregnados con 200 µl de extracto. Una vez que la acetona se evaporó, un total de tres larvas, de tercer estadio, de la especie *Spodoptera frugiperda* (con ayuno de 3 horas) fueron colocadas en cada una de las cajas. El mismo número de cajas con discos foliares sin extracto, fueron impregnadas únicamente con 200 µl de acetona y se utilizaron como control. Todos los tratamientos fueron incubados a 25°C con una humedad de 60% durante 24 horas.

Los discos foliares fueron escaneados, en escala de grises, como imagen en formato JPG para posteriormente ser analizados con ayuda del programa SigmaScan Pro (versión 5.0). La medición del área consumida fue evaluada por medio de un umbral de intensidad de tal manera que fueron consideradas tanto las raspaduras (tonalidad gris claro) como las hendiduras (tonalidad negra) originadas por las larvas.

El índice anti apetitivo para cada tratamiento fue calculado de acuerdo con Bentley *et al.* (1984) mediante la ecuación: $IA = (Dc - Dt / Dc) \times 100$, en donde: IA= índice anti apetitivo, Dc = ingestión en discos testigo (mm²) y Dt = ingestión en discos tratados (mm²). Si IA=100, existe una disuasión total de la alimentación; IA>25, los extractos se pueden considerar activos; IA<25, los extractos se pueden considerar no activos; IA<0, los extractos se pueden considerar fagoestimulantes.

5.5. RESULTADOS

5.5.1. Determinación de la presencia de los principales grupos de metabolitos secundarios

Los resultados sobre la detección de los principales grupos de metabolitos secundarios en *Blennothrix* se resumen en la Tabla 6.

Extracto	Terpenos	flavonoides	Glicósidos	Alcaloides
Hexánico	+	-	-	-
Acetónico	-	+	-	-
Metanólico	-	-	-	-

Tabla 6. Metabolitos secundarios de *Blennothrix*. + positiva, - negativa.

Los resultados muestran que en los extractos de *Blennothrix* se detectaron terpenos y flavonoides, pero ningún glicósido ni alcaloide. En la tabla 7 se muestran las placas corridas con las fases móviles adecuadas para cada extracto. El análisis de cromatografía de capa fina confirmó la presencia de terpenos en los extractos hexánicos y flavonoides en los extractos de acetato de etilo y metanol.

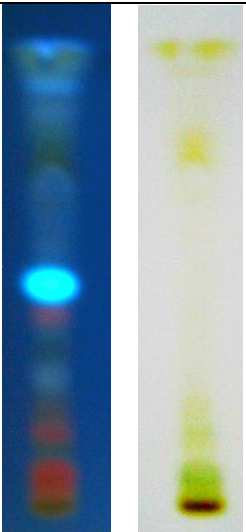
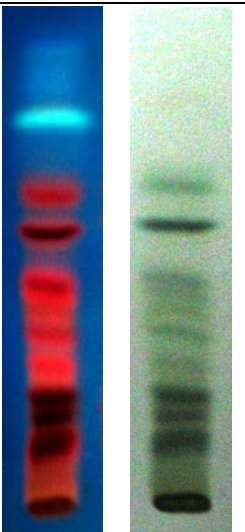
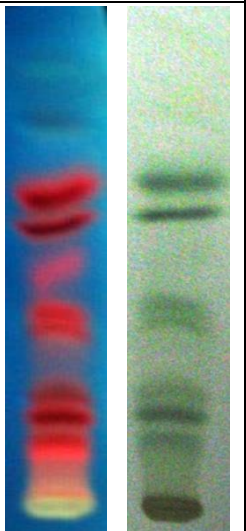
Extracto	Hexano	Acetato de etilo	Metanol
Fase Móvil	Hex:AcOEt (9:1) 2 corridas	Hex:Acetona (6:3) 1 corrida	Hex:Acetona (6:3) 1 corrida
Perfil Cromatográfico			

Tabla 7. Representación de los resultados de TLC de los extractos de *Blennothrix*, bajo luz UV y visible

5.5.2. Actividad bactericida

Fue determinada la actividad bactericida y la concentración mínima inhibitoria (MIC, por sus siglas en inglés, *Minimum inhibitory concentration*) de los extractos de *Blennothrix*. Todos los extractos obtenidos con hexano, acetato y metanol mostraron actividad frente a *Escherichia coli* y *Bacillus subtilis*. Los valores de MIC de los extractos frente a *E. coli* fluctuaron entre 2 y 4 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$, mostrando una actividad máxima con el extracto de acetato de etilo; mientras que la concentración mínima inhibitoria de los tres extractos (hexano, acetato de etilo y metanol) frente a *B. subtilis* fue la misma (Fig. 5, Tabla 8).

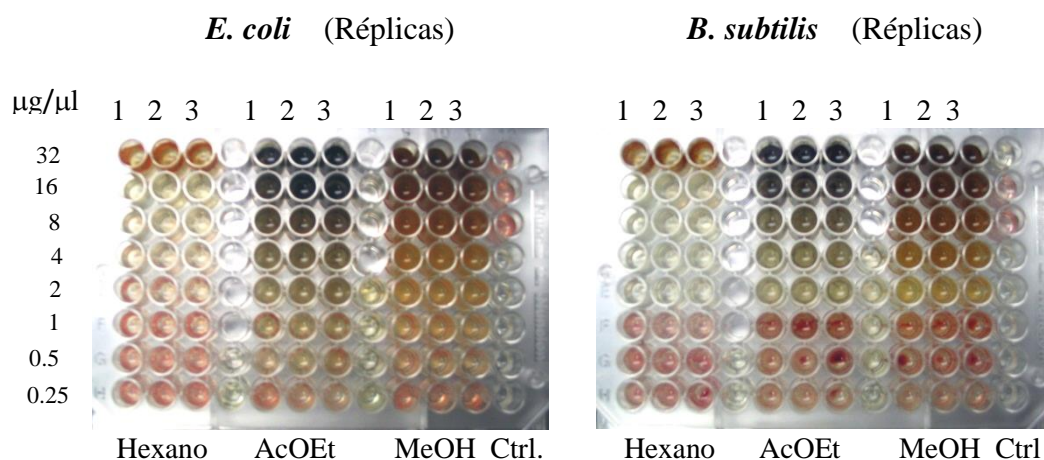


Fig. 6. Microdilución en placa de 96 pozos para determinar la concentración mínima inhibitoria de los diferentes extractos de *Blennothrix*. En el último carril, se muestran los tres primeros pozos como controles positivos del crecimiento bacteriano, los cinco restantes corresponden a las cinco concentraciones de ampicilina.

Muestras	<i>Escherichia coli</i>	<i>Bacillus subtilis</i>
	$\frac{\mu\text{g}}{\mu\text{L}}$	$\frac{\mu\text{g}}{\mu\text{L}}$
Hexano	4	2
Acetato de etilo	2	2
Metanol	4	2
Control (Ampicilina)	0.1	0.05

Tabla 8. MIC de los extractos de *Blennothrix*, obtenidos con hexano, acetato de etilo y metanol, frente a *Escherichia coli* y *Bacillus subtilis*.

5.5.3. Actividad citotóxica

En este estudio se evaluó el efecto citotóxico del extracto de clorofila *a* de *Blennothrix* sobre *Artemia salina*. En las tablas 9 y 10 se muestra el efecto citotóxico sobre *A. salina* después de 24 y 48 horas.

La LC₅₀ estimada fue de 44,19 mg/ml la cual se encuentra en el rango de valores reportados en la literatura para ensayos agudos en invertebrados acuáticos, (0,067-59,9 mg/L). La toxicidad aguda es la habilidad de un químico de provocar efectos adversos relativamente pronto. "Relativamente pronto" se define usualmente como un período de minutos, horas (hasta 24) o días (hasta cerca de dos semanas) pero rara vez más allá de ese tiempo (ILO-UNEP-WHO 1988).

Concentración (μ l)	175	125	75	40	20	Control
Réplica 1	8	7	3	3	0	1
Réplica 2	9	8	1	2	0	0
Réplica 3	10	6	3	2	0	0
% de muertes	90	70	23.3	23.3	0	3.3

Tabla 9. Relación entre la concentración del extracto y las muertes de *Artemia salina* después de 24 horas.

Concentración (μ l)	175	125	75	40	20	Control
Réplica 1	10	6	3	3	0	2
Réplica 2	8	10	1	2	1	2
Réplica 3	9	7	5	2	0	3
% de muertes	90	76.6	30	23.3	3.3	23.3

Tabla 10. Relación entre la concentración del extracto y las muertes de *Artemia salina* después de 48 horas.

5.5.4. Actividad antiinflamatoria

Las pruebas de actividad antiinflamatoria realizadas en ratones muestran que los extractos de *Blennothrix* realizados con diferentes solventes tienen un bajo porcentaje de inhibición (promedio=11.4-15.6) en comparación con el porcentaje obtenido en los ensayos con ratones tratados con indometacina (antiinflamatorio) (Tabla 11).

Muestra	Dosis (mg/oreja)	Edema (mg)	Inhibición (%)
Control	0.4	15.53±0.13	---
Blennothrix_M	0.4	13.30±1.11	14.38
Blennothrix_H	0.4	12.83±0.46	11.49
Blennothrix_AE	0.4	12.23±0.88	15.63
Indometacina ^a	0.4	2.27	86.02

Tabla 11. Porcentaje de inhibición obtenido a partir de las pruebas de actividad antiinflamatoria realizadas en ratones. Vehículos: H, hexano; AE, acetato de etilo y M, metanol. ^a n=6 animales.

5.5.5. Actividad disuasoria

Este último estudio fue realizado en poblaciones pertenecientes a dos localidades distintas (Manantiales y Micos) con el fin de determinar si ambas presentan actividad disuasoria frente a las larvas de *Spodoptera frugiperda*.

No fueron encontradas diferencias significativas entre las distintas concentraciones de los discos impregnados con los extractos de metanol y acetato de etilo. Mientras que con el extracto de hexano, se observó que a mayores concentraciones del mismo, mayor es el consumo por parte de las larvas (Fig. 6).

Los índices de actividad disuasoria de los extractos elaborados con hexano, acetato de etilo y metanol ponen de manifiesto la existencia de compuestos en *Blennothrix* que afectan significativamente el comportamiento de alimentación de las larvas de *S. frugiperda* (Tabla 12).

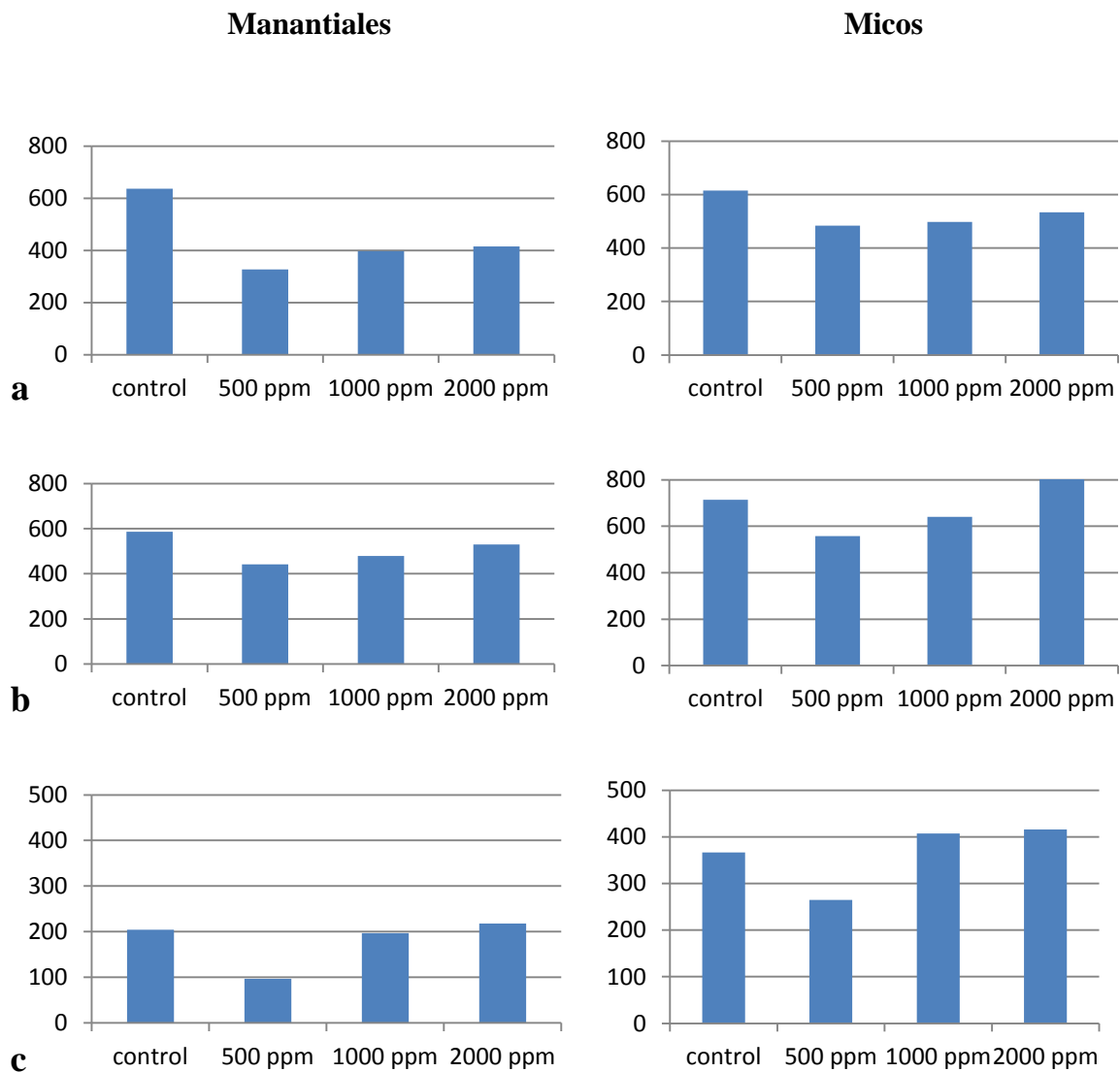


Fig. 7. Promedio y error estándar de los discos foliares impregnados con los diferentes extractos [(a) hexano, (b) acetato de etilo y (c) metanol]; correspondientes a las poblaciones de Manantiales y Micos.

Concentración	Manantiales			Micos		
	hexano	acetato de etilo	metanol	Hexano	acetato de etilo	metanol
500 ppm	49	25	52	21	22	28
1000 ppm	38	18	3	19	10	-11
2000 ppm	35	10	-7	13	-14	-14

Tabla 12. Índice anti apetitivo $[(Dc-Dt)/Dc] \times 100\% \pm$ error estándar (n = 10) de las larvas de *S. frugiperda* de las poblaciones de Los Manantiales y Micos.

5.6. DISCUSIÓN

5.6.1. Determinación de la presencia de los principales grupos de metabolitos secundarios

La presencia de compuestos de origen terpénico y flavonoide sugiere un análisis exhaustivo a fin de determinar las diferencias entre las poblaciones y posteriormente realizar un estudio biodirigido.

Tanto la determinación de los metabolitos secundarios por medio de reacciones coloridas como los perfiles cromatográficos coinciden en la presencia de terpenos y flavonoides en los extractos de *Blennothrix*.

5.6.2. Actividad bactericida

Los resultados obtenidos en este estudio indican diferencias en la actividad bactericida dependiendo del extracto de *Blennothrix* utilizado. Esta actividad fue más pronunciada frente a *B. subtilis* (bacteria Gram-positiva) que frente a *E. coli* (bacteria Gram-negativa). De acuerdo con Nostro *et al.* (2000) la sensibilidad entre bacterias Gram-positivas y Gram-negativas puede explicarse a las diferencias morfológicas entre estos microorganismos, en donde las bacterias Gram-negativas poseen una membrana fosfolipídica externa que soporta los componentes estructurales lipopolisacáridos. Esto hace que la pared celular sea impermeable a los solutos lipofílicos, mientras que las porinas constituyen una barrera selectiva a los solutos hidrofílicos con un límite de exclusión de aproximadamente 600 Da. Por tanto, las bacterias Gram-positivas podrían ser más susceptibles a los extractos puesto que éstas cuentan solamente con una pared externa de peptidoglicano, la cual no es una barrera permeable tan efectiva.

La información obtenida mediante la prueba de actividad bactericida coincide con los estudios previos realizados con *Blennothrix ganeshii*, en donde se observó que la cepa de *Escherichia coli* ATCC 25922 presentó una inhibición en su crecimiento con el extracto de hexano, a las siguientes concentraciones: 10, 16 y 32 µg/ml (Martínez-Flores 2007).

5.6.3. Actividad citotóxica

La actividad citotóxica del extracto de clorofila se estudió mediante un bioensayo en *Artemia salina*. El extracto de clorofila *a* mostró efectos citotóxicos desde una concentración de 40 µl y fue aumentando hasta alcanzar un porcentaje de muertes del 90%

a una concentración de 175 µl. En esta prueba solo fue posible hacer uso de los resultados del primer día (24 horas) ya que el porcentaje de muertes en el control después de 48 horas fue mayor del 10%, por lo que los resultados son inválidos.

Con los resultados obtenidos se corrobora la sensibilidad de los invertebrados acuáticos (*Artemia salina*) frente al extracto de clorofila *a* de *Blennothrix*. Las muertes de *A. salina* en los pocillos control posiblemente se deban a que dichos organismos no contaban con los nutrientes o el oxígeno suficiente que requiere su metabolismo y por lo tanto la utilización de modelos para la evaluación citotóxica cobra importancia en futuros trabajos.

5.6.4. Actividad antiinflamatoria

Se evaluó la actividad antiinflamatoria de extractos obtenidos a partir de muestra liofilizada de *Blennothrix* con un método extensamente utilizado para evaluar sustancias antiinflamatorias, el edema auricular inducido por TPA. El proceso inflamatorio desencadenado por la aplicación tópica del TPA se debe a la activación de la proteína cinasa C (PKC) dérmica, la cual inicia la respuesta antiinflamatoria. Los extractos de *B. ganeshii* no mostraron propiedades antiinflamatorias importantes, de tal manera que no se presenta una inhibición significativa del edema auricular agudo inducido por TPA. Esto puede corroborarse con la inhibición presentada por la indometacina en la misma dosis (promedio=86). No obstante, la evaluación de dicha actividad debe considerar etapas de recolecta distintas.

5.6.5. Actividad disuasoria

Fue evaluada la actividad disuasoria mediante un ensayo de no preferencia, el cual permite determinar el potencial de los compuestos para suprimir la actividad alimenticia de un organismo en situaciones de no elección. Cada población mostró una actividad disuasoria distinta. Los tres extractos de la población de Los Manantiales presentaron actividad disuasoria a una concentración de 500 ppm. El extracto hexánico perteneciente a la misma población, fue el único en presentar actividad disuasoria con las tres concentraciones del mismo, lo que sugiere el análisis de dicho extracto a fin de determinar el tipo de compuesto responsable de la actividad que se encuentra dentro del tipo de compuestos terpénicos. Además, puede observarse que el índice anti-apetitivo disminuye conforme aumenta la concentración de los extractos, llegando en la mayoría de los casos a ser considerados como extractos no activos o bien fagoestimulantes. Esta situación puede deberse a que frecuentemente los metabolitos secundarios se encuentran asociados con glucósidos, los cuales favorecen su consumo. Por tal motivo resulta importante el realizar diversas pruebas que nos permitan conocer: a) si a pesar de que las larvas comen los discos foliares impregnados con los extractos, éstos no les afectan morfológica y/o reproductivamente. Para lo cual se requiere de incorporar los extractos en la dieta y revisar periódicamente si las larvas presentan alguna modificación en el desarrollo y comportamiento; b) si los metabolitos presentes en *Blennothrix* se encuentran asociados a glucósidos y si es de esta manera, separar la aglicona (región sin glucosa) de los glucósidos y volver a realizar pruebas anti apetitivas con el extracto de aglicona; c) el tipo de metabolitos secundarios presentes en los crecimientos, por medio de una separación cromatográfica. Mientras que el extracto metanólico de la población de Micos fue el único en presentar una actividad disuasoria a una concentración de 500 ppm.

6. CARACTERIZACIÓN MORFOLÓGICA, MORFOMÉTRICA, GENOTÍPICA Y ULTRA-ESTRUCTURAL

6.1. INTRODUCCIÓN

En años recientes se han desarrollado un gran número de técnicas bioquímicas y moleculares con fines taxonómicos (Komárek 2006, 2010). Las nuevas tecnologías de ácidos nucleicos, especialmente la reacción en cadena de la polimerasa (PCR, por sus siglas en inglés, *Polimerase Chain Reaction*) ha avanzado a tal grado que ahora es posible amplificar y secuenciar genes y otras regiones conservativas a partir de una sola célula (Palinska *et al.* 1996). El esquema más reconocido para representar a la filogenia de Cyanoprokaryota consiste en la comparación de secuencias de 16S RNA ribosomal (Giovanni *et al.* 1988, Wilmotte 1994, Wilmotte *et al.* 1994 en Palinska *et al.* 1996, Gutell *et al.* 1994, Olsen *et al.* 1991 y Woese 1987 en Vandamme *et al.* 1996, Rudi *et al.* 1997) ya que éste se encuentra presente en todas las bacterias, es funcionalmente constante y altamente conservativo (Vandamme *et al.* 1996).

De acuerdo con Komárek y Anagnostidis (2005) los árboles evolutivos obtenidos a partir de la secuenciación del 16S rRNA, muestran una gran coincidencia con los taxa de Cyanoprokaryota a nivel genérico, particularmente si los caracteres morfológicos han sido reevaluados y se ha incluido la caracterización de los rasgos ultra-estructurales. Sin embargo, las secuencias del gen 16S no muestran una separación considerable en relaciones filogenéticas muy cercanas, como por ejemplo, especies del mismo género.

Los estudios ultra-estructurales estuvieron enfocados en los patrones de perforación en la pared de peptidoglicano, los cuales bajo la influencia de los factores ambientales no presentan cambio en la estructura tipo (Palinska y Krumbein 2000, Palinska *et al.* 1998). Asimismo fue evaluado el sistema tilacoidal el cual ha sido utilizado como un carácter con potencial taxonómico debido a que está acorde con los clados filogenéticos (Komárek 2010, 2011).

El presente estudio busca evaluar si la identificación de la especie realizada por medio de caracteres fenotípicos, en realidad corresponde a organismos con el mismo genotipo y características ultra-estructurales.

6.2. HIPÓTESIS

Frecuentemente, poblaciones que han sido identificadas como la misma especie a partir de su evaluación fenotípica, presentan el mismo genotipo. Con base en lo anterior, se espera que las cinco poblaciones de *Blennothrix* evaluadas en el presente estudio pertenezcan a una sola especie y no se encuentre cripticidad.

6.3. OBJETIVOS

- i. Determinar si las poblaciones pertenecientes a distintas zonas de estudio corresponden a una sola especie, por medio de la comparación de su morfología, morfometría y secuencias de 16S RNA ribosomal.
- ii. Evaluar la importancia de los rasgos ultra-estructurales a partir de la caracterización de los patrones de perforación en la pared de peptidoglicano y la disposición de los tilacoides.

6.4. MATERIAL Y MÉTODO

6.4.1. Colecta y aislamiento

Fueron colectadas un total de cinco poblaciones (Manantiales, Tambaque, Micos, Puente de Dios, Tzindejéh) pertenecientes al género *Blennothrix*, distribuidas en la región central de México. Los crecimientos se trasladaron al laboratorio en bolsas con agua de la localidad, a temperatura ambiente. Se realizaron lavados por agitación para eliminar cualquier resto de sedimento u otro objeto de los filamentos y posteriormente, se introdujeron durante una hora en una solución de dióxido de germanio para eliminar las diatomeas epífitas a su vaina. Se realizaron varios aislamientos del material por medio de resiembras, para obtener cultivos unialgales, los cuales fueron mantenidos en tubos de cultivo con medio líquido BG-11 (Stanier *et al.* 1971) bajo condiciones controladas (Temperatura: 25°C, radiación fotosintéticamente activa (PAR): 5 $\mu\text{mol fotones m}^{-2} \text{ s}^{-1}$, fotoperiodo: 16h luz: 8h oscuridad).

6.4.2. Identificación y caracterización morfológica y morfométrica

Todas las poblaciones fueron sometidas a análisis microscópico para llevar a cabo la identificación y caracterización morfológica antes de la extracción de ADN y la elaboración de análisis filogenéticos. Esta información aseguró la uniformidad fenotípica del material.

Los estudios de microscopía de luz incluyeron la evaluación de los siguientes caracteres: diámetro del filamento, longitud, forma de las células y grado de constricciones en las uniones de las células. La medición de las características morfométricas se llevó a cabo con el análisis de imágenes fotográficas y en réplicas de 20; mismas que nos permitieron tener una documentación gráfica de los crecimientos. Los estudios de microscopía de luz fueron llevados a cabo con un microscopio Olympus BX51 equipado con un sistema fotomicrográfico SC35.

6.4.3. Análisis molecular

El análisis molecular se enfocó en la secuenciación de nucleótidos en regiones conservativas del 16S RNA ribosomal. Este método ha sido aplicado con éxito en cultivos puros de Cyanoprokaryota.

Extracción de ADN

El análisis se enfocó en la secuenciación de nucleótidos en regiones conservativas de la subunidad 16S rARN. Muestras de Cyanoprokaryota (2 g) fueron suspendidas en 800 µl de TESC (100 mM Tris, 100 mM EDTA, 100 mM NaCl, 2% bromuro de cetiltrimetilamonio

(CTAB), pH 8.0). Para asegurar el rompimiento de las células, las muestras fueron sometidas a cinco ciclos de congelamiento (-195 °C) y descongelamiento (65 °C). Después de la adición de proteinasa K [20 µg/µl], las muestras fueron incubadas a 50 °C durante toda la noche. Los tubos fueron centrifugados a 10,000 r.p.m. por cinco minutos y los sobrenadantes se extrajeron con fenol (900 µl), fenol/cloroformo (450 µl/450 µl) y cloroformo (900 µl). El ADN “concentrado” fue precipitado de la fase acuosa con 0.6 volúmenes de isopropanol, lavado con etanol al 70%, secado en el desecador, y almacenado con 100 µl de buffer TE (10 mM Tris, 1mM EDTA, pH 8.0). Se elaboró una “muestra diluida” a partir de la dilución de 1 µl del ADN “concentrado” en 99 µl de agua destilada estéril.

Amplificación y análisis de secuencias

La amplificación del gen 16S rARN se llevó a cabo en una termocicladora Express Hybaid mediante el siguiente procedimiento: después de un paso de desnaturalización inicial (5 min a 94 °C), siguieron 10 ciclos de incubación, cada uno consistente de 45 seg a 94 °C, 1 min a 55 °C y 2 min a 68 °C, 25 ciclos que consistieron de 45 seg a 92 °C, 1 min a 55 °C y 2 min a 68 °C y un ciclo de 9 min a 86 °C. La presencia de productos del PCR fue detectada por medio de la electroforesis en geles de agarosa (1.5%). Los productos obtenidos a partir de la amplificación fueron purificados con el kit de purificación para PCR (QIAGEN GMBH Dusseldorf, Alemania), siguiendo las indicaciones del fabricante. Las secuencias de los primers utilizados para la amplificación se muestran en la Tabla 13 (Forward: 01Wilmotte, CYA106F, 322, 359F; Reverse: PLG2.1, CYA781R, 373, 1494R).

Primer	Secuencia (5'-3')	Región secuenciada	Referencias
<i>Forward</i>			
01Wilmotte	AGA GTT TGA TCC TGG CTC AG	16S rARN	Wilmotte <i>et al.</i> (1993)
CYA106F	CGG ACG GGT GAG TAA CGC GTG A	16S rARN	Nübel <i>et al.</i> (1997), Li <i>et al.</i> (2001)
322	TGTACACACCGCCCGTC	16S rARN	Iteman <i>et al.</i> (2000)
359F	GGG GAA TYT TCC GCA ATG GG	16S rARN	Nübel <i>et al.</i> (1997)
<i>Reverse</i>			
PLG2.1	CTTCTGCAGGCGAGTTGCAGC	16S rARN	Nadeau <i>et al.</i> (2001)
CYA781R	GAC TAC TGG GGT ATC TAA TCC CAT T	16S rARN	Nübel <i>et al.</i> (1997)
373	CTA ACC ACC TGA GCT AAT	16S rARN	Wilmotte <i>et al.</i> (1993)
1494R	GGY TAC CTT GTT ACG ACT T	16S rARN	Pomati <i>et al.</i> (2004)

Tabla 13. Primers utilizados para la amplificación y secuenciación de las subunidades 16S rARN.

Los productos de la amplificación fueron purificados con un Kit GeneClean III (Bio 101 Systems, La Jolla, CA, USA) y posteriormente un total de 54 muestras fueron secuenciadas bidireccionalmente por un laboratorio comercial. Los fragmentos fueron ensamblados utilizando el software Bioedit versión 7.0.9.0 (Hall 1999).

Los taxa utilizados en el análisis de las secuencias 16S rRNA incluyeron un total de 37 OTUs del GenBank, las cuales incluyen 5 secuencias del mismo género de la región central de México. En este análisis fue utilizado a *Gleobacter violaceus* como grupo externo. Las secuencias fueron alineadas utilizando el programa Clustal W (Higgins *et al.* 1994).

El árbol fue construido utilizando los análisis de parsimonia y máxima similitud en los programas TNT (Goloboff *et al.* 2008) y Mega versión 5 (Tamura *et al.* 2011). El análisis de Parsimonia fue desarrollado utilizando una búsqueda heurística combinando métodos sectoriales, ratchet, drift y fusión de árboles; todos los árboles generados fueron retenidos. Fue utilizado un bootstrap de 1000 réplicas. Los datos de las matrices no informativas fueron eliminados con WinClada (Nixon 2002).

Los mejores modelos para el análisis de máxima semejanza fueron encontrados con el programa Mega versión 5. Dicho análisis fue desarrollado utilizando el parámetro con distribución gamma y sitios evolutivamente invariables para el 16S rRNA –Kimura 2-.

6.4.4. Análisis ultra-estructural

Algunos especímenes pertenecientes a cada una de las poblaciones evaluadas fueron sujetos a estudios ultra-estructurales utilizando microscopia electrónica de transmisión (TEM, por sus siglas en inglés, *Transmission Electron Microscopy*) con el fin de evaluar el patrón de perforación en la pared de peptidoglicano y el sistema tilacoidal del género *Blennothrix*.

Las muestras para el análisis en el TEM fueron preparadas y embebidas de acuerdo al procedimiento de Surosz y Palinska (2004). Los cultivos se lavaron dos veces en tampón de fosfato de sodio (PB, por sus siglas en inglés, *Phosphate buffer*) 0,1 M (pH 7,5). La fijación se realizó con 3% de glutaraldehído en PB y posteriormente las células se fijaron con 2% de tetróxido de osmio en PB. La deshidratación se realizó a través de una serie de soluciones de etanol-agua empezando con 10% de etanol y terminando con dos lavados en

etanol puro, las células fueron embebidas finalmente en Epon (Spurr 1969). Las secciones cortadas con cuchillas de diamante fueron post-teñidos con sales de uranilo y examinados con un microscopio electrónico de transmisión Zeiss EM 109.

6.5. RESULTADOS

6.5.1. Caracterización morfológica y morfométrica

Las características morfológicas de las cinco poblaciones evaluadas pueden resumirse de la siguiente manera: matas macroscópicas de color azul-verde o violeta-café, compuestas de filamentos con crecimiento isopolar y ramificaciones falsas dispersas de tipo *Coleodesmium*. Los filamentos se observan, en ocasiones con longitudes superiores a 10 cm, con orientación más o menos paralela. Las células presentan un contenido granular homogéneo y las células apicales están achatadas y ligeramente redondeadas, en ocasiones con una pared celular un poco más gruesa que las demás, sin caliptra, pero ocasionalmente con remanentes de las paredes de las células necridiales. Las vainas son firmes, incoloras usualmente lameladas, ciertas zonas con lamelación transversal debido a la constricción del eje longitudinal, particularmente en el ápice de las vainas. La lamelación en la superficie externa de la vaina está caracterizada por varias capas paralelas que desprenden capas sencillas y acumulan pequeñas partículas de detritus. Las paredes de la vaina llegan a variar notablemente en cuanto a su grosor y, en ocasiones, presenta calcificación en la superficie. La formación de hormogonios se inicia con el desarrollo de una o varias células necridiales, en el extremo o a lo largo de todo el tricoma. Cada hormogonio forma su propia vaina

dentro de la vaina madre y crece paralelo al tricoma original, posteriormente se libera por uno de los extremos del filamento o bien se desarrollan formando ramificaciones falsas.

Con base en la revisión morfológica y morfométrica. Se observó que las poblaciones presentan dimensiones mayores a lo anteriormente descrito para esta especie, excepto la población ubicada en Tzindejéh la cual presentó las menores dimensiones en cuanto a anchura del tricoma, diámetro del filamento y anchura de la vaina (Tabla 14).

Población	Talo	Longitud del filamento (cm)	Anchura del tricoma	Color del tricoma	Número de tricomas en un filamento	Diámetro del filamento	Espesor de la vaina	Forma de la vaina	Longitud celular
<i>Especie tipo</i>									
<i>B. ganeshii</i> Nepal	Fasciculado	6.0	32-40	Azul-verde	1-4	46-100	-10(12)	Firme, delimitada	1.3-4.0
<i>Poblaciones mexicanas</i>									
1.BALE s/n Manantiales	Fasciculado y matas	2.0-15.0 5.3±2.7	38.0-46.4 42.0±2.5	Violeta-café	1-3	50.7-67.4 58.9±4.7	4.5-9.6 6.6±1.3	Firme, lamelada	2.5-4.3 3.4±0.4
2.PA3874 Tambaque	Fasciculado	1.5-7.5 4.1±1.6	37.5-47.0 40.6±2.5	Violeta-café	1-2	52.5-67.5 57.9±4.3	4.0-9.5 6.4±1.3	Firme, lamelada	3.0-6.7 4.1±0.8
3. PA3887 Micos	Fasciculado y matas	0.4-5.5 2.2±1.1	38.0-48.1 44.1±2.8	Violeta-café	1-2	53.2-68.4 59.1±4.1	3.8-8.1 5.7±1.2	Firme, lamelada	2.2-3.8 3.0±0.5
4.PA3780 Puente de Dios	Fasciculado y matas	1.0-7.5 3.3±1.5	36.2-45.7 42.1±2.7	Violeta-café	1-2	56.5-75.0 62.6±6.2	5.0-11.0 7.3±1.6	Firme, lamelada	2.7-5.0 3.6±0.5
5.PA4209 Tzindejéh	Fasciculado	0.4-3.0 1.9±0.8	22.3-43.9 35.1±4.9	Azul-verde	1-2	32.4-57.1 43.3±6.0	1.2-4.3 2.7±0.7	Firme, lamelada	2.4-4.8 3.6±0.9

Tabla 14. Características de las poblaciones de agua dulce del género *Blennothrix* de Nepal (Watanabe y Komárek 1989, Komárek 1998) y la región central de México. Las medidas están dadas en micrómetros (excepto donde se indica) y representan el intervalo, media y desviación estándar (n=20).

6.5.2. Análisis genotípico

El análisis de parsimonia usando las secuencias del 16S rRNA resultó en 45 árboles con una longitud de las ramas (L) de 1051, un índice de consistencia (Ci) de 52 y un índice de retención (Ri) de 72. El árbol consenso presentó los siguientes valores: L= 1066, Ci= 52 y Ri= 71. Las secuencias de las cinco poblaciones de *Blennothrix* pertenecientes a la región central de México se agruparon en dos clados bien soportados (81 y 56%) junto a dos clones del mismo género (97%) (Fig. 7).

El análisis de similitud revela que existe un 99% de identidad entre *Blennothrix* de la localidad de Los Manantiales y las poblaciones de Tambaque, Micos y Puente de Dios; y un 96% con la población de Tzindejéh. El resto de los taxa tuvieron un 95% de similitud o bien se encontraron por debajo de este porcentaje con respecto a las cinco poblaciones pertenecientes a la región central de México (Tabla 15).

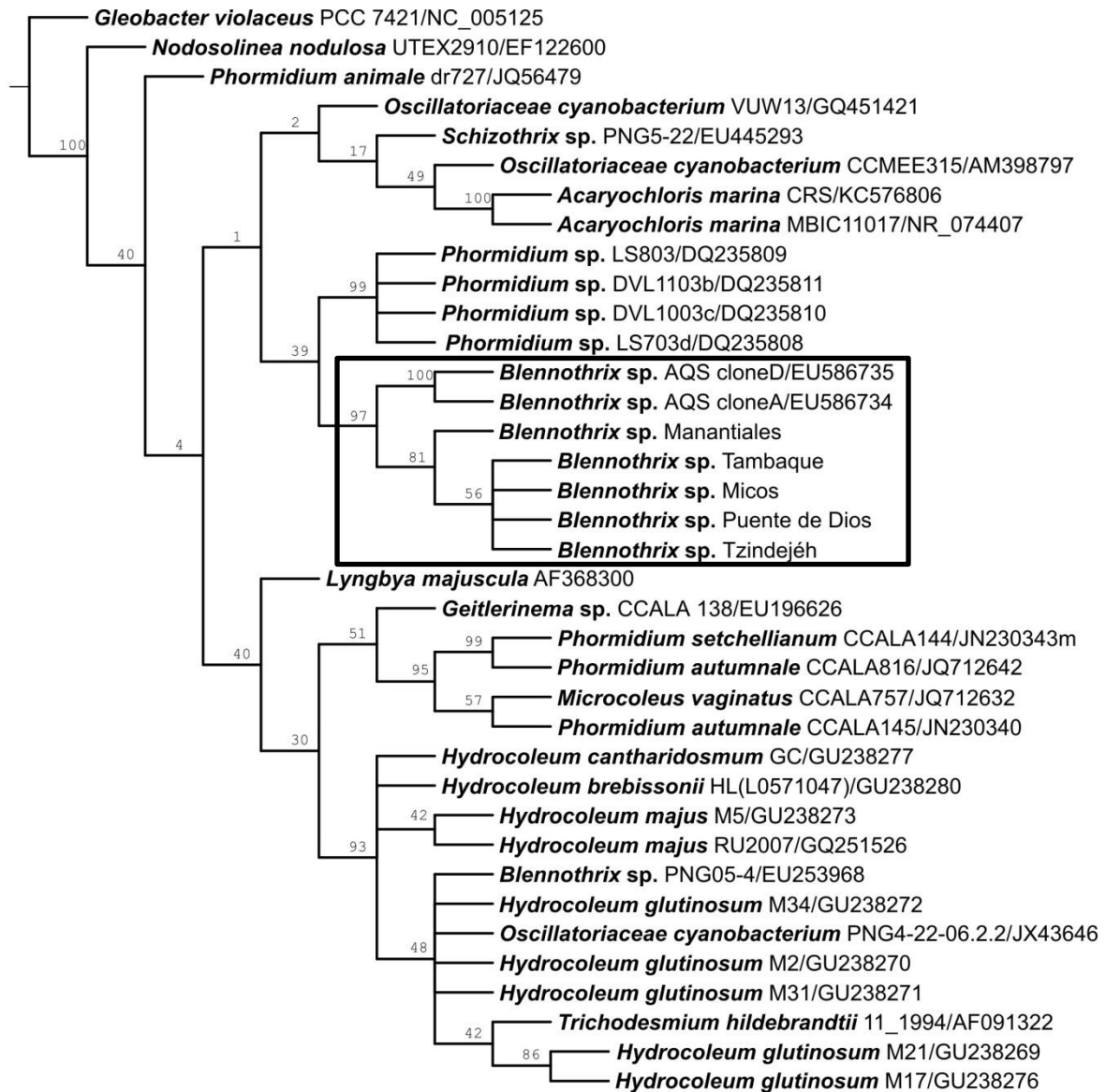


Fig. 8. Árbol filogenético que muestra las relaciones entre las poblaciones estudiadas del género *Blennothrix* y Cyanoprokaryota del mismo orden (Oscillatoriales), basado en el análisis de secuencias del gen 16S rRNA, con *Gleobacter violaceus* como grupo funcional externo.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15
1 <i>Blennothrix</i> sp. Manantiales	-														
2 <i>Blennothrix</i> sp. Tambaque	99	-													
3 <i>Blennothrix</i> sp. Micos	99	99	-												
4 <i>Blennothrix</i> sp. Puente de Dios	99	99	99	-											
5 <i>Blennothrix</i> sp. Tzindejéh	96	97	97	97	-										
6 <i>Blennothrix</i> sp. PNG05_4	90	90	90	90	90	-									
7 <i>Blennothrix</i> sp. AQS clone D	95	94	94	94	94	90	-								
8 <i>Blennothrix</i> sp.AQS Clone A	95	94	94	94	94	90	100	-							
9 <i>Hydrocoleum glutinosum</i> M2	91	91	91	91	91	97	90	90	-						
10 <i>Oscillatoriaceae cyanobacterium</i> VUW13	92	92	92	92	92	99	90	90	91	-					
11 <i>Schizothrix</i> sp. PNG5-22	91	90	90	90	90	91	89	89	91	91	-				
12 <i>Phormidium</i> sp. LS803	93	92	92	92	92	89	92	92	89	89	94	-			
13 <i>Phormidium</i> sp. DVL1103b	92	92	92	92	92	89	92	92	89	89	94	92	-		
14 <i>Phormidium</i> sp. DVL1003c	93	92	92	92	92	89	92	92	89	89	94	92	89	-	
15 <i>Phormidium</i> sp. LS703d	93	92	92	92	92	89	92	92	89	89	94	92	89	90	-
16 <i>Lyngbya majuscula</i>	91	91	91	90	90	91	91	91	89	89	91	91	90	91	90

Tabla 15. Matriz de similitud de 16 cepas de Cyanoprocaryota, comparando 37 secuencias parciales de nucleótidos del gen 16S rRNA [Número de acceso de las cepas: (1-5) No se encuentran en el Gen Bank, (6) EU253968, (7) EU586735, (8) EU586734, (9) GU238270, (10) GQ451421, (11) EU445293, (12) DQ235809, (13) DQ235811, (14) DQ235810, (15) DQ235808, (16) AF368300].

6.5.3. Análisis ultra-estructural

Las investigaciones realizadas muestran que los crecimientos del género *Blennothrix* pertenecientes a los cinco sitios de estudio presentan una regularidad en cuanto al patrón de perforación de las paredes de peptidoglicano y la orientación de las membranas tilacoidales.

La pared de peptidoglicano en todas las poblaciones evaluadas presenta dos perforaciones en un ángulo de 30° con respecto a la pared celular, justo en el septo que divide las células, en ambos extremos del filamento. Dichas perforaciones comienzan en el extremo externo de la célula y atraviesan por completo la pared de peptidoglicano. Asimismo, fueron observados patrones de perforación intracelulares, es decir, perforaciones que atraviesan la pared transversal de células adyacentes (Figs 8,9).

En la célula apical y en ocasiones las células adyacentes, los tilacoides se muestran arreglados en fascículos que corren paralelamente al eje longitudinal de las células. Sin embargo, en las células intermedias así como en los hormogonios, la orientación de las membranas tilacoidales se presenta en diferentes direcciones. En la mayoría de los casos el sistema tilacoidal se encuentra localizado parietalmente en las células intermedias, aunque en ocasiones los tilacoides solitarios o pequeños fascículos atraviesan el centro de la célula (Fig. 10a-e).

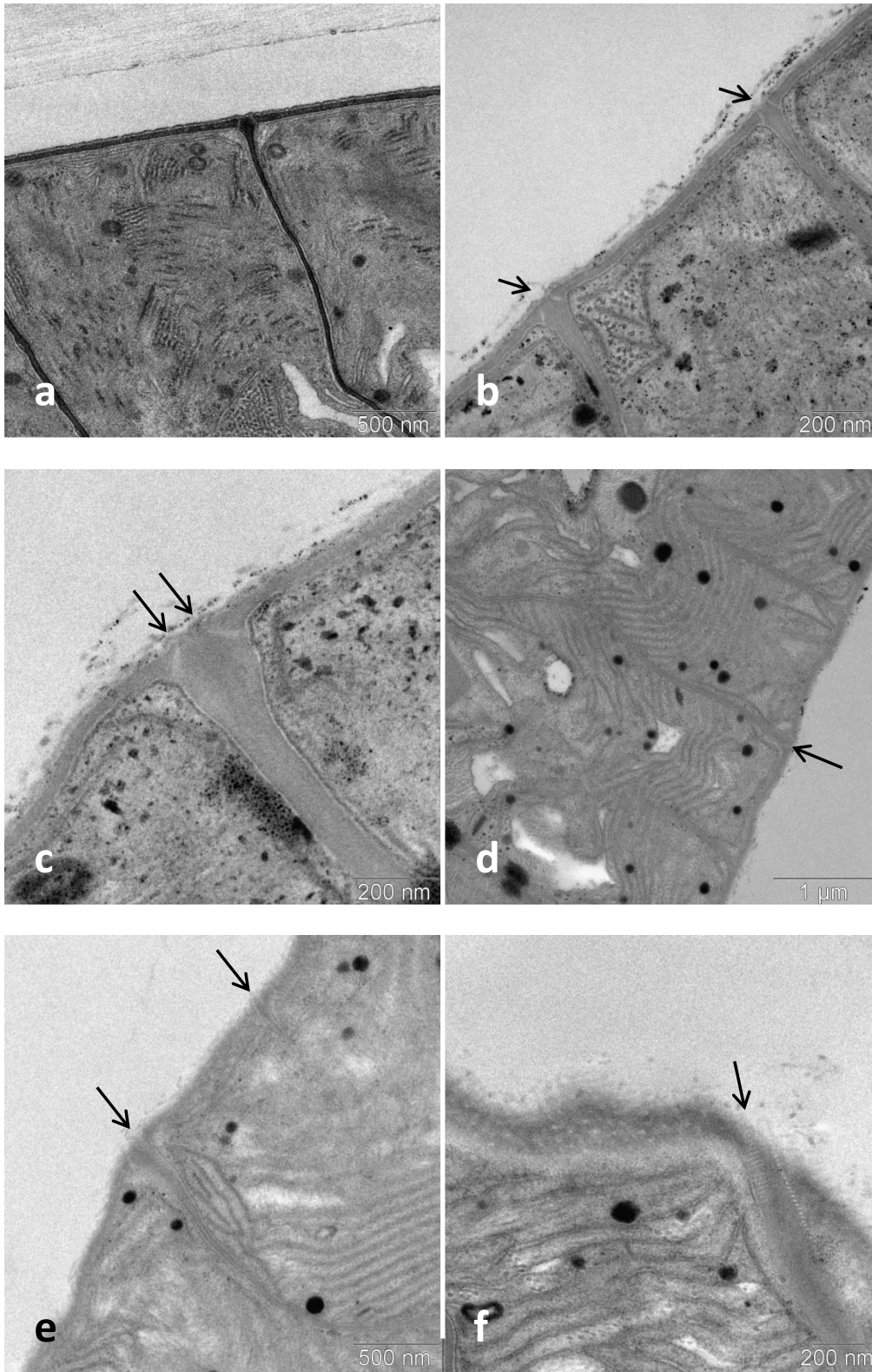


Fig. 9. Detalles ultraestructurales de los patrones de perforación en los crecimientos de *Blennothrix*. a) Manantiales, b) Tabaque, c -f) Micos.

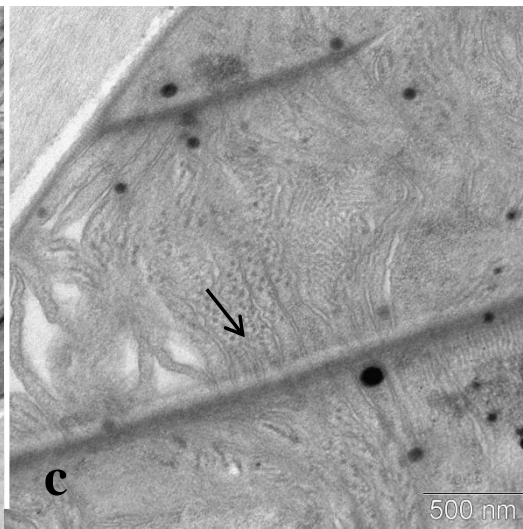
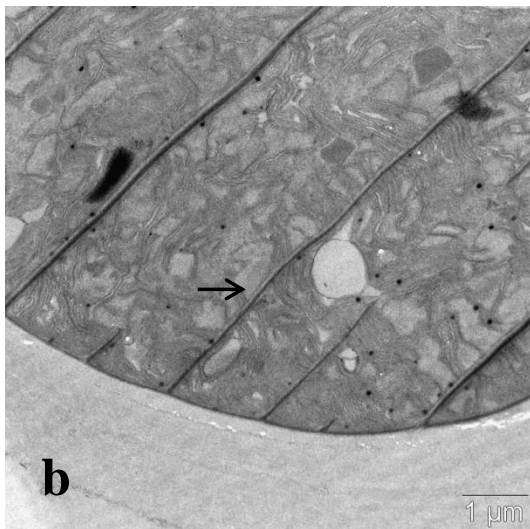
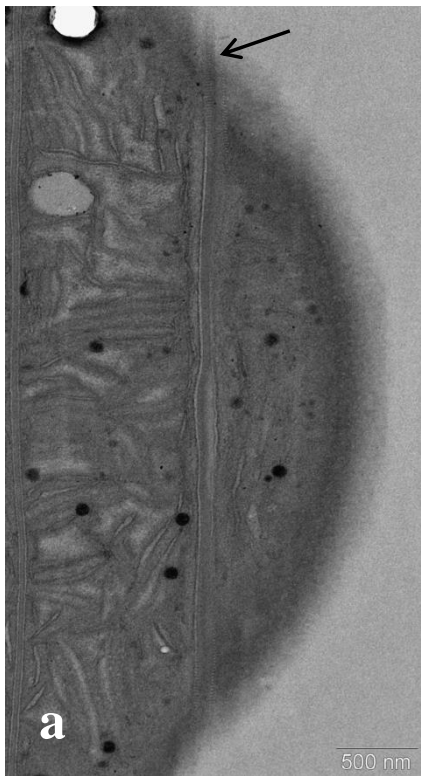


Fig. 10. Detalles ultraestructurales de los patrones de perforación en los crecimientos de *Blennothrix*. a) Puente de Dios, b-c) Tzindejéh.

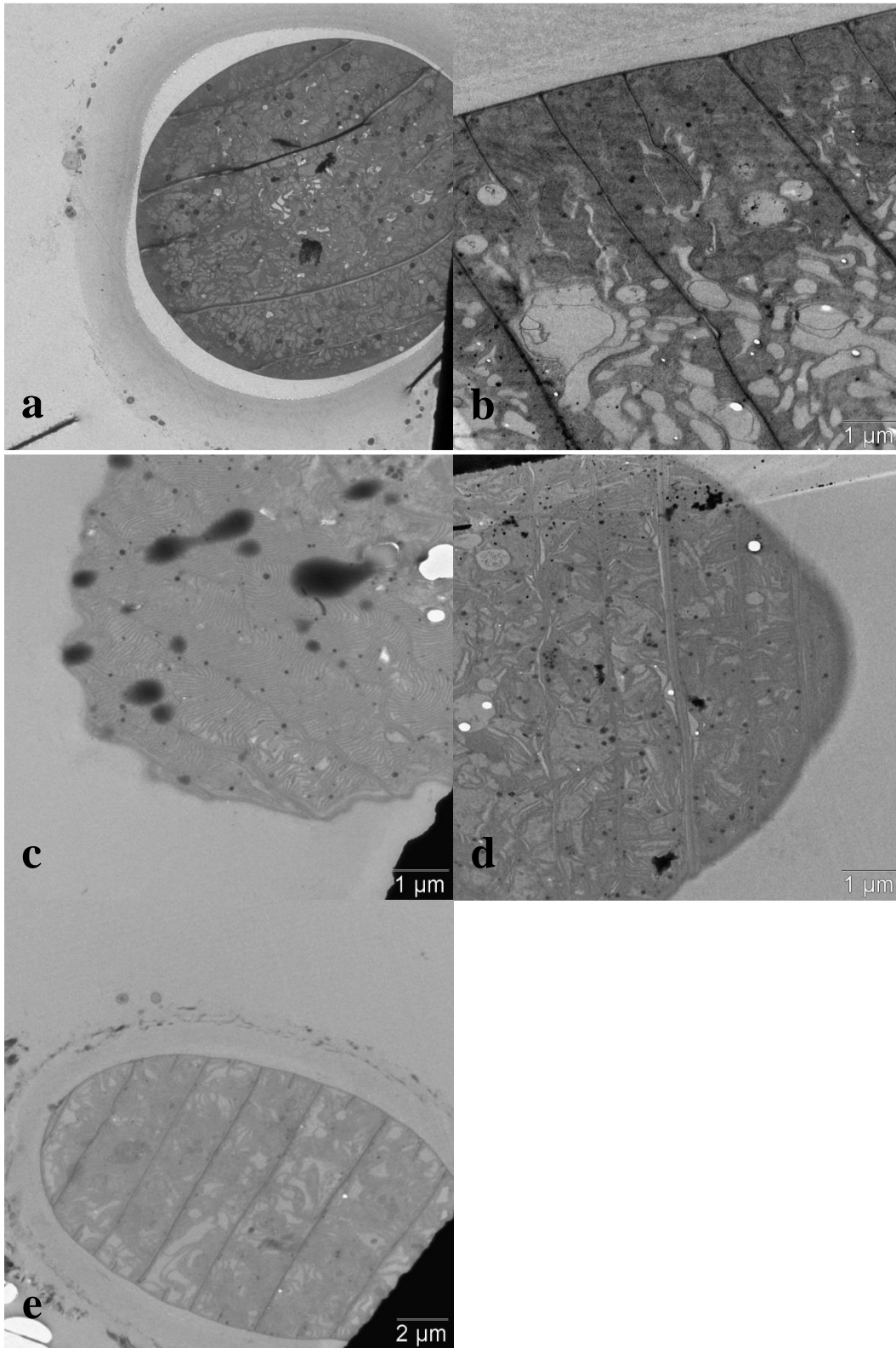


Fig. 11. Detalles ultraestructurales del patrón tilacoidal en los crecimientos de *Blennothrix*.

a) Manantiales, b) Tambaque, c) Micos, d) Puente de Dios, e) Tzindejéh.

6.6. DISCUSIÓN

Los crecimientos examinados en este estudio han sido identificados tradicionalmente como *Blennothrix ganeshii* con base en la revisión de sus características morfológicas, morfométricas y ecológicas (Watanabe y Komárek 1989, Komárek 1998, Carmona *et al.* 2005). No obstante, las siguientes características morfométricas extienden la diagnosis de la especie tipo: longitud del filamento (> 6 cm), anchura del tricoma (>40 μm), diámetro del filamento (<46 μm) y longitud celular (>4 μm). Estudios previos (Beltrán *et al.* 2005) han evidenciado que las variaciones en algunos rasgos morfométricos (longitud y diámetro de los filamentos, anchura del tricoma, espesor de la vaina y número de ramas falsas en un filamento) se deben a adaptaciones a distintas condiciones microambientales. El efecto de la velocidad de corriente en cuanto al largo y diámetro de los filamentos y la anchura del tricoma puede ser resumido de la siguiente manera: mayores dimensiones se presentan en bajas a medias velocidades de corriente (<31 cm s^{-1}) y dimensiones menores se presentan en altas velocidades de corriente (≥ 72 cm s^{-1}). Situaciones similares han sido observadas en varias poblaciones de algas filamentosas, tales como *Phormidium tenue* (Menghini) Gomont (Cyanoprokaryota), *P. retzii* Gomont (Cyanoprokaryota), *Schizothrix fasciculata* (Nägeli) Gomont (Cyanoprokaryota), *Batrachospermum delicatum* (Skuja) Necchi et Entwisle (Rhodophyceae) (Necchi 1997), *Stigeoclonium helveticum* Vischer (Chlorophyceae) (Branco y Necchi 1998), *Compsopogon coeruleus* (Rhodophyceae) (Necchi *et al.* 1999), *Nitella subglomerata* A.Braun (Chlorophyceae) (McIntire 1966, Rott y Pfister 1988, Branco *et al.* 2001, Vieira y Necchi 2002). Por otro lado, tradicionalmente la presencia de vainas ha sido utilizada como un carácter diacrítico en el sistema de clasificación de los géneros de Oscillatoriales. Sin embargo, la habilidad de formar vainas

el cual es un rasgo común en muchos géneros ha probado ser dependiente de las condiciones ambientales y de cultivo (Palinska *et al.* 1996, Rippka *et al.* 1979, Stal y Krumbein 1985). Beltrán *et al.* (2005) han encontrado que la vaina firme y mucilaginosa de *Blennothrix* puede reducir el flujo de corriente y el efecto de rompimiento en los filamentos, lo cual de acuerdo con Carmona *et al.* (2004) es muy similar al comportamiento ocurrido en los filamentos mucilaginosos de *Batrachospermaceae* (Rhodophyceae). Por tanto caracteres como la longitud y diámetro de los filamentos, anchura del tricoma y espesor de la vaina deben ser solo caracteres adicionales en conjunto con otros rasgos.

De acuerdo con Palińska y Krumbein (2000) es bien sabido que ciertos caracteres ultra-estructurales varían bajo la influencia de factores ambientales y cambios en el ciclo de vida. Sin embargo, en el caso de los patrones de perforación -número, tamaño y patrón de organización han sido estudiados en diferentes estados de desarrollo y bajo diferentes condiciones de laboratorio- y han demostrado que éstos son estables y similares. Los resultados obtenidos a partir de la revisión de las poblaciones de *Blennothrix* demuestran que todas tienen los mismos patrones de perforación (presencia de dos perforaciones en un ángulo de 30° con respecto a la pared celular y perforaciones intracelulares).

El arreglo tilacoidal mostró un patrón homogéneo en las cinco poblaciones estudiadas. La presencia de tilacoides que rodean la periferia de la célula fue muy frecuente, los cuales de acuerdo con Palinska y Marquardt (2008) son típicos de la mayoría de las Cyanoprokaryota. Los tilacoides se encontraron, en la mayoría de las poblaciones, formando agrupaciones con una orientación irregular en las células; no obstante fue observado que principalmente las células apicales presentaron una disposición distinta, en

donde los tilacoides corren paralelos al eje longitudinal de las células. Sin embargo, en ocasiones el arreglo tilacoidal no puede ser claramente identificado ya que se presentan transiciones entre ellos. La regularidad en cuanto al patrón de perforación de las paredes de peptidoglicano y la orientación de las membranas tilacoidales en las poblaciones de la región central de México muestra la estabilidad de los mismos lo cual hace posible su uso en la caracterización de taxa.

Prácticamente todas las secuencias del género *Blennothrix* que fueron evaluadas en este estudio se agruparon en un solo clado bien soportado (97%), lo cual muestra que este es un género filogenéticamente válido. La presencia de *Blennothrix* sp. (EU253968) en el clado de cepas de *Hydrocoleum* probablemente se debe a una mala identificación de la misma o a un problema con la secuenciación.

La clasificación basada en la morfología corresponde con lo anteriormente descrito para la especie *Blennothrix ganeshii*, mientras que la variación registrada en algunas características morfométricas podría suponer una sola especie plástica. Sin embargo, el análisis de las secuencias del gen 16S rRNA no es congruente con dicha identificación morfológica y morfométrica e indica que la población de Los Manantiales es genéticamente distinta del resto de las poblaciones estudiadas. Estos resultados destacan que las especies de *Blennothrix* no pueden ser claramente identificadas con base en su morfología y morfométría por sí sola. Las especies crípticas, o grupos de especies cuyas similitudes morfológicas enmascaran una variación genética significativa entre ellas, han sido identificadas en otros géneros de Cyanoprokaryota. Por ejemplo, Casamatta *et al.*(2003) demostró que *Phormidium retzii* representa varias especies crípticas y sugiere que la

especiación críptica es probable que sea común entre las Cyanoprokaryota. La homología de secuencias entre las cinco poblaciones estudiadas varió de 96 a 99%, lo que también podría implicar la presencia de especies crípticas dentro de este grupo de poblaciones.

7. CONCLUSIONES

En este estudio se han caracterizado cinco poblaciones pertenecientes a dos cuencas hidrológicas mediante el análisis de su morfología, morfometría, fisicoquímica del agua en donde habitan, tipo de calcificación, composición de metabolitos secundarios, secuencia genética del 16S rRNA y ultra-estructura (arreglo tilacoidal y patrones de perforación).

Todas las poblaciones estudiadas han sido identificadas como pertenecientes al género *Blennothrix* con base en los siguientes caracteres morfológicos (presencia obligatoria de vainas con uno a varios tricomas, abertura apical de la vaina, forma discoidal de las células, división centripeta y en secuencias rápidas, formación de hormogonios con la ayuda de células necridiales y filamentos con ramificaciones falsas dispersas de tipo *Coleodesmium*) y moleculares, en donde se observa un clado bien soportado con ninguna inclusión de otro género. La presente investigación evidencia además que las siguientes características son congruentes en todas las poblaciones evaluadas: fisicoquímica del agua, tipo de calcificación, composición de metabolitos secundarios y ultra-estructura. No obstante éstos no permiten llevar a cabo una identificación a nivel específico sino que deben de ser considerados con nivel jerárquico alto, posiblemente a nivel de familia.

En trabajos previos estas mismas poblaciones han sido consideradas como una sola especie conocida como *Blennothrix ganeshii*, con base en la presencia de uno a cuatro tricomas paralelos por filamento y vaina costreñida (Carmona *et al.* 2005, Beltrán-Magos *et*

al. 2005), a pesar de que algunas características morfométricas (longitud y diámetro del filamento, anchura del tricoma, espesor de la vaina, longitud celular y coloración) extienden la diagnosis de la especie tipo. De acuerdo con Palinska *et al.* (1996) la amplia diversidad morfológica observada en las Cyanoprokayota, tanto en la naturaleza como en cultivos, no necesariamente refleja diversidad genética; lo cual ha sido observado en varias Oscillatoriales que exhiben plasticidad en respuesta a parámetros ambientales tales como: la velocidad de corriente, radiación incidente, salinidad, turbidez y el contenido de nutrientes (Beltrán-Magos 2005 y Sharp 2009). No obstante el análisis de las secuencias genéticas del 16S rRNA indica que la población de Los Manantiales aparentemente pertenece a un taxón distinto a aquel formado por el resto de las poblaciones estudiadas. Esta información podría hablarnos de especies crípticas, las cuales de acuerdo con Casamatta (2003) son poblaciones morfológicamente similares pero distintas a nivel molecular. Posiblemente la divergencia genética hallada en el análisis filogenético se deba a la separación geográfica entre ambas cuencas, entre las cuales se presentan diferencias en los parámetros fisicoquímicos del agua, en particular temperatura, velocidad de corriente y contenido de iones. Estas diferencias también pueden verse reflejadas en cuanto a la flora registrada en cada una de las cuencas hidrológicas, puesto que especies con una gran distribución en la cuenca del río Pánuco (*Hyella cf. fontana* Huber et Jardin, *Phormidium* spp., *Homeothrix juliana* (Meneghini) Kirchner, *Hildenbrandia angolensis* West y West, *Compsopogon coeruleus* (C. Agardh) Montagne y *Thorea hispida* (Thore) Desvaux) no han sido registradas para la cuenca del río Balsas; y especies frecuentes en ésta última (*Chara canescens* Loiseleur-Deslongchamps y *Vaucheria* sp.) no se presentan en la cuenca del Pánuco (Montejano-Zurita *et al.* 2004, Beltrán-Magos *et al.* 2005). Entre las pocas especies

afines entre ambas cuencas se encuentran: *Chamaecalis swirenkoi* (Širšov) Komárek et Anagnostidis, *Terpsinoë musica* Ehrenberg, *Eunotia* sp. y *Gomphonema* sp.

La presente investigación representa un trabajo prospectivo realizado en un grupo reducido de poblaciones, el cual busca reconocer cuáles son los caracteres potenciales que permitan llevar a cabo una identificación certera de las especies del género *Blennothrix*. No obstante, podemos concluir que los caracteres evaluados en las cinco poblaciones del género *Blennothrix* pertenecientes a la región central de México no son los indicados para determinarlas a nivel específico. Debido a la amplia variación morfométrica registrada en las poblaciones estudiadas debe considerarse la necesidad de llevar a cabo estudios sobre la plasticidad fisiológica en *Blennothrix* así como análisis moleculares que indiquen su afinidad o divergencia genética a nivel específico, para lo cual debe llevarse a cabo el análisis de la región espaciadora localizada entre los genes 16S y 23S rARN (por sus siglas en inglés, ITS, Internal Transcribed Spacer region) ó la región *cpcBA*-IGS del gen de la ficocianina. Así mismo la identificación de metabolitos secundarios, y en particular el tipo de flavonoide, nos podría ayudar a definir poblaciones incluso a nivel específico, debido que éstos presentan una enorme variación estructural (Maridass y Ramesh 2010).

La necesidad de llevar a cabo una plena identificación a nivel específico no solo nos lleva a buscar nuevos caracteres sino también a seleccionar aquellos que son importantes taxonómicamente hablando y a considerar metodologías que sean factibles de realizar. La taxonomía de las Cyanoprokaryota debe ser reevaluada y es claro que sólo el enfoque

integrativo que combine aspectos ecofisiológicos, quimiotaxonómicos, moleculares, ultra-estructurales, etc. nos permitirá llevar a cabo la identificación de especies confusas.

8. LITERATURA CITADA

Beltrán-Magos Y., J. Carmona y G. Vilaclara. 2005. Microhabitat and morphological variation in freshwater *Blennothrix ganeshii* (Oscillatoriaceae, Cyanophyceae) populations in streams of central Mexico. *Algological Studies* (Cyanobacterial Research 6) 117:133-146.

Bentley M.D., D.E. Leonard, W.F. Stoddard y L.H. Zalkow. 1984. Pyrrolizidine alkaloids as larval feeding deterrents for spruce budworm *Choristoneura fumiferana* (Lepidoptera: Tortricidae). *Ann. Entomol. Soc. Am.*, 7: 393-397.

Branco L.H.Z. y O. Necchi Jr. 1998. Microhabitat and morphometric variation of two Chaetophoracean (Chaetophorales, Chlorophyta) species in tropical streams of southeastern Brazil. *Phycol. Res.* 46: 169-174.

Branco L.H.Z., O. Necchi Jr. y C.C.Z. Branco. 2001. Ecological distribution of Cyanophyceae in lotic ecosystems of São Paulo State. *Rev. Bras. Bot.* 24(1):99-108.

Carmona J., G. Montejano G. y E. Cantoral E. 2004. The distribution of Rhodophyta in streams of central Mexico. *Archiv. Hydrobiol./Algol. Stud.* 114:39-52.

Carmona-Jiménez J., M.A. Hernández-Muñoz y M. Ramírez-Vázquez. 2004. Algas...Glosario ilustrado. Las prensas de Ciencias, Facultad de Ciencias, UNAM, 82 p.

Carmona J., Y. Beltrán-Magos y L. Collado-Vides. 2005. Taxonomy and distribution of freshwater *Blennothrix ganeshii* Watanabe & Komárek (Oscillatoriaceae, Cyanophyceae) from central Mexico. *Nova Hedwigia* 80:323-333.

Cassamatta D.A., M.L. Vis y R.G. Sheath. 2003. Cryptic species in cyanobacterial systematics: a case study of *Phormidium retzii* (Oscillatoriales) using RAPD molecular markers and 16S rDNA sequence data. *Aquatic Botany* 77(4): 295-309.

Choi, H., A.R. Pereira y W.H. Gerwick. 2012. The chemistry of marine algae and cyanobacteria. In: Handbook of Marine Natural Products. E. Fattorusso, W.H. Gerwick, O. Tagliatalata-Scafati (eds.) Springer Science and Business Media B.V., p. 55-152.

Clark B.R., N. Engene, M.E. Teasdale, D.C. Rowley, T. Matainahos, F.A. Valeriote y W.H. Gerwick. 2008. Natural products chemistry and taxonomy of the marine cyanobacterium *Blennothrix cantharidosmum*. *Nat. Prod.* 71(9): 1530-1537.

Cortés-Altamirano, R y A. P. Sierra-Beltrán. 2008. Biotoxins from freshwater and marine harmful algal blooms occurring in Mexico. *Toxin Reviews*, 27:1, 27-77.

Domínguez, X. 1985. Métodos de investigación fitoquímica. Editorial Limusa. México. p. 281.

Fransworth, N. 1966. Biological and phytochemical screening of plants. *Jour. Phan. Sci.* 55(3): 225-276.

Giovannoni S.I., S. Turner, G.J. Olsen, S. Barns, D.J. Lane y N.R. Pace. 1988. Evolutionary relationship among cyanobacteria and green chloroplasts. *J. Bacteriol.* 170: 3584-3592.

Goloboff P.A., J.S. Farris y K.C. Nixon. 2008. TNT, a free program for phylogenetic analysis. *Cladistics* 24: 774-786.

Grewe C.B. y O. Pulz. 2012. The Biotechnology of Cyanobacteria. In: Ecology of Cyanobacteria II: Their Diversity in Space and Time. B.A. Whitton (ed.). Springer Science and Business Media B.V. 707-739.

Gross E.M. 2003. Allelopathy of aquatic autotrophs. *Crit. Rev. Plant Sci.* 22: 313-339.

Guevara, P. 1988. Estudio fitoquímico comparativo de hojas y látex de cuatro especies del género *Jatropha* (Euphorbiaceae). Tesis de licenciatura. Facultad de Ciencias, UNAM. México, 65 p.

Gutell R.R., B. Weiser, C.R. Woese y H.F. Noller. 1994. Lessons from an evolving rRNA: 16S and 23S rRNA structures from a comparative perspective. *Microbiological Reviews* 58: 10-26.

Hall T.A. 1999. Bioedit: a user friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucl. Acids Symp. Ser.* 41: 95-98.

Harborne, J. y B. Turner. 1984. Plant Chemosystematics. Academic Press. U.S.A.

Higgins D., J. Thompson, T. Gibson, JD. Thompson, DG Higgins y TJ Gibson. 1994. CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Res.* 22: 4673-4680.

ILO-UNEP-WHO. 1988. Major hazard control: A practical manual. ILO-UNEP-WHO International programme on chemical safety; Geneva, ILO, 296 p.

Iteman I., R. Rippka, N. Tandeau de Marsac y M. Herdman. 2000. Comparison of conserved structural and regulatory domains within divergent 16S-23S rRNA spacer sequences of cyanobacteria. *Microbiology* 146: 1275-1286.

Jeffrey S.W. y G.F. Humprey. 1975. New spectrophotometric equations for determining chlorophylls a, b, c1 and c2 in higher plants, algae and natural phytoplankton. *Biochemistry of Physiology Pflanzen (BPP)*, Bd. 167, S. 191-194.

Kaebnick M. y B.A. Enhilan. 2001. Ecological and molecular investigations of cyanotoxin production. *FEMS Microbiology Ecology* 35: 1-9.

Komárek J. 2006. Cyanobacterial taxonomy: Current problems and prospects for the integration of traditional and molecular approaches. *Algae* 21: 349-375.

Komárek J. 2010. Recent changes (2008) in cyanobacteria taxonomy based on a combination of molecular background with phenotype and ecological consequences (genus and species concept). *Hydrobiologia* 639: 245-259.

Komárek J. 2011. Introduction to the 18th IAC Symposium in České Budějovice 2010, Czech Republic. Some current problems of modern cyanobacterial taxonomy. *Fottea* 11: 1-7.

Komárek J. y K. Anagnostidis. 2005. Cyanoprokaryota -2. Teil/ 2nd Part: Oscillatoriales. En: Büdel B., L. Krienitz, G. Gartner y M. Schagerl (eds), Süßwasserflora von Mitteleuropa 19/2. -759 pp, Elsevier/Spektrum, Heidelberg.

Komárek, J. 1998. Validity of the genus *Blennothrix* Kütz. 1843 and its position in the Oscillatoriacean cyanoprokaryotes. En: Anais IV Congreso Latino-Americano, II Reuniao Ibero-Americana & VII Reunião Brasileira. Conservação da biodiversidade e Novas Tecnologías: Promesas e Perigos, p. 341-352.

Li R.H., H.J. Debella y W.W. Carmichael. 2001. Isolates identifiable as *Arthrospira* máxima and *Arthrospira* fusiformis (Oscillatoriales, Cyanobacteria) appear identical on the basis of a morphological study in culture and 16S rRNA gene sequences. *Phycologia* 40: 367-371.

Martínez-Flores A. 2007. Tesis de maestría “Propiedades antibióticas de microalgas de ambientes extremos”. División de Ciencias Biológicas y de la Salud. Universidad Autónoma Metropolitana, 65 p.

McIntire C.D. 1966. Some effects of current velocity on periphyton communities in laboratory streams. *Hydrobiologia* 27: 559-570.

Nadeau T-L, EC Milbrandt y RW Castenholz. 2001. Evolutionary relationships of cultivated Antarctic ocillatorians (cyanobacteria). *J. Phycol.* 40:148-158.

Necchi Jr. O. 1997. Microhabitat and plant structure of *Batrachospermum* (Batrachospermales, Rhodophyta) populations in four streams of São Paulo State, southeastern Brazil. *Phycol. Res.* 45: 39-45.

Necchi Jr.O., C.C.Z. Branco y R.R.V. Gomes. 1999. Microhabitat and plant structure of *Compsopogon coeruleus* (Compsopogonaceae, Rhodophyta) populations in streams from Sao Paulo State, southeastern Brazil. *Cryptogamie, Algologie* 20(2): 75-87.

Nixon K.C. 2002. Winclada Ver. 1.00.08, Published by the author, Ithaca, NY.

Nostro A., M.P. Germano, V.D'Angelo, A. Marino y M.A. Cannatelli. 2000. Extraction methods and bioautography for evaluation of medicinal plant antimicrobial activity. *Letters in Applied Microbiology* 30: 379-384.

Nübel U., F. García-Pichel y G. Muyzer. 1997. PCR primers to amplify 16S rRNA genes from cyanobacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* 63: 3327-3332.

Palińska K. A., W.E. Krumbein y U. SchlemminGer. 1998. Ultramorphological studies on *Spirulina* sp. *Bot. Mar.* 41:349–355.

Palińska K. y J. Marquardt. 2008. Genotypic and phenotypic analysis of strains assigned to the widespread cyanobacterial morphospecies *Phormidium autumnale* (Oscillatoriales). *Arch. Microbiol.* 189: 325-335.

Palińska K.A. y W.E. Krumbein. 2000. Perforation patterns in filamentous cyanobacteria. *Journal of Phycology* 36: 139-145.

Palińska KA, W. Liesack, E. Rhiel y W.E. Krumbein. 1996. Phenotype variability of identical genotypes: the need for a combined cyanobacterial taxonomy demonstrated on *Merismopedia*-like isolates. *Arch. Microbiol.* 166: 224-233.

Payá M., M.C. Terencio, M.L. Ferrándiz y M.J. Alcaraz. 1996. Involvement of secretory phospholipase A₂ activity in the zymosan rat air pouch model of inflammation. *Br. J. Pharmacol.*, **117**: 1773–1779.

Pérez R.M. y R. Vargas. 2007. Cardioactive effects from freshwater algae *Oscillatoria limnetica*, *Hydrodictyon reticulatum*, and *Microcoleus lacustris*. *Pharmacognosy Magazine* 3(11): 159-162.

Pérez-Gutiérrez R.M., R. Vargas, J.M. Mota Flores y S. Hernández Garrido. 2008. Hypoglycemic Activity of Aqueous Extract of Aqueous Extract of *Oscillatoria limnetica*,

Blennothrix ganeshii, *Hydrodictyon reticulatum* and *Microcoleus lacustris* in Normal and Alloxan Induced Diabetic Mice. *Journal of complementary and Integrative Medicine* 5(1).

Pomati et al. 2004 en Kaebernick M. y B.A. Neilan. 2001. Ecological and molecular investigations of cyanotoxin production. *FEMS Microbiology Ecology* 13: 1-9.

Rao T.S., J.L. Currie, A.F. Shaffer y P.C. Isakson. 1993. Comparative evaluation of arachidonic acid (AA) – and tetradecanoylphorbol acetate (TPA)-induced dermal inflammation. 17(6): 723-741.

Rippka R., J. Deruelles, J.B. Waterbury, M. Herdman y R.Y. Staine. 1979. Generic assignments, strain histories and properties of pure culture of cyanobacteria. *J. Gen. Microbiol.* 111: 1-61.

Rott E. y P. Pfister. 1988. Natural epilithic algal communities in fast-flowing mountain streams and rivers and some man-induced changes. *Verh. Internat. Verein. Limnol.* 23: 1320-1324.

Rudi, K., O.M. Skulberg, F. Larsen y K.S. Jakobsen. 1997. Strain characterization and classification of oxyphotobacteria in clone cultures on the basis of 16S rRNA sequences from the variable regions V6, V7 and V8. *Applied and Environmental Microbiology* 63: 2593-2599. Schlegel I., N.T. Doan, N. de Chazal y G.D. Smith. 1999. Antibiotic activity of new cyanobacterial isolates from Australia and Asia against green algae and cyanobacteria. *Journal of Applied Phycology* 10: 471-479.

Shimizu Y. 1996. Microalgal metabolites: A new perspective. *Annu. Rev. Microbiol.* 50: 431-465.

Shweta Y., R.P. Sinha, M.B. Tyagi y A. Kumar. 2011. Cyanobacterial Secondary Metabolites. *International Journal of Pharma and Bio Sciences* 2(2): 144-167.

Skulberg O.M. 2000. Microalgae as a source of bioactive molecules – experience from cyanophyte research. *Journal of Applied Phycology*, 12: 341-348.

Smith P.M. 1976. The chemotaxonomy of plants. United Kingdom, Edward Arnold (Publishers) Ltd.

Spurr A.R. 1969. A low-viscosity epoxy resin embedding medium for electron-microscopy. *J. Ultrastruct. Res.* 26: 31-43.

Stal L.J. y W.E. Krumbein. 1985. Isolation and characterization of cyanobacteria from a marine microbial mat. *Botanica Marina* 28: 351-365.

Stanier R.Y., M.M. Kunisawa y G. Cohen-Bazir. 1971. Purification and properties of unicellular blue-green algae (order Chlorococcales). *Bacteriol Rev.* 35: 171-201.

Surosz W. y K.A. Palińska. 2004. Effects of heavy metals stress on cyanobacterium *Anabaena flosaquae*. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 48: 40-48.

Tamura K., D. Peterson, N. Peterson, G. Stecher, M. Nei y S. Kumar. 2011. MEGA5: Molecular Evolutionary Genetics Analysis using Maximum Likelihood, Evolutionary Distance and Maximum Parsimony Methods. *Mol. Biol. Evol.* 28: 2731-2739.

Vandamme P., B. Pot, M. Gillis, P. De Vos, K. Kersters y J. Swings. 1996. *Polyphasic taxonomy, a consensus approach to bacterial systematics.* *Microbiol Rev* 60: 407-438.

Vieira Jr. J. y O. Jr. Necchi. 2002. Microhabitat and plant structure of Characeae (Chlorophyta) populations in streams from São Paulo State, southeastern Brazil. *Cryptogamie, Algol.* 23(1):51-63.

Watanabe M. y J. Komárek. 1989. New *Blennothrix*-species (Cyanophyceae/Cyanobacteria) from Nepal. *Bull. Natl. Sci. Mus. Ser. B.*, 15(3): 67-79.

Whitton B.A. y M. Potts. 2000. The Ecology of Cyanobacteria. Their diversity in time and space. Kluwer Academic Publishers, The Netherlands, 669 p.

Wilmotte A. 1994. Molecular evolution and taxonomy of the cyanobacteria. In The Molecular Biology of Cyanobacteria, pp. 487-493. Boone D.R. y R.W. Castenholz (eds). New York: Springer.

Wilmotte A., G. Van Der Auwera y R. De Wachter. 1993. Structure of the 16S ribosomal RNA of the thermophilic cyanobacterium *Chlorogloeopsis* HTF (*Mastigocladus laminosus* HTF) strain PCC7518, and phylogenetic analysis, *FEBS Lett* 317: 96-100.

Wyman M. y P. Fay. 1986. Underwater light climate and the growth and pigmentation of planktonic blue-green algae (Cyanobacteria) I. The influence of light quantity. *Proceedings of the Royal Society of London. B* 227: 367-380.

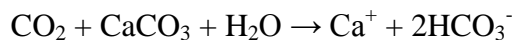
9. GLOSARIO

Adaptación cromática complementaria.- es una estrategia para maximizar la eficiencia en la captación de luz en ambientes donde existe fluctuación de la misma, a través de antenas captadoras de luz conocidas como ficobilisomas, las cuales son capaces de capturar longitudes de onda que son pobremente absorbidas por las clorofilas.

Aglicona.- Es el compuesto sin azúcares que queda tras reemplazar por un átomo de hidrógeno el grupo glicosil de un glucósido.

Agua dura.- es aquella que contiene un alto nivel de minerales, en particular sales de magnesio y calcio. A veces se da como límite para denominar a un agua como dura una dureza superior a 120 mg CaCO₃/L.

Alcalinidad total.- la alcalinidad del agua se puede definir como una medida de su capacidad para neutralizar ácidos. En general, en las aguas naturales, los compuestos que más contribuyen a la alcalinidad son los bicarbonatos, puesto que se forman fácilmente por la acción del dióxido de carbono atmosférico sobre los materiales constitutivos de los suelos en presencia de agua, a través de la siguiente reacción:



Es decir que las aguas adquieren su alcalinidad por medio de la disolución de minerales básicos carbonatados, los que además aportan al medio sus cationes mayoritarios, como Ca²⁺, Mg²⁺, Na⁺ y K⁺.

Anoxia.- es la falta casi total del oxígeno en un tejido. Es un estado en que la necesidad de oxígeno de las células del organismo no es satisfecha.

Aragonito.- El aragonito o aragonita es una de las formas cristalinas del carbonato de calcio (CaCO₃), junto con la calcita. Puede encontrarse en forma de estalactitas, y también en la concha de casi todos los moluscos y en el esqueleto de los corales.

Artemia salina.- es una especie de crustáceo branquiópodo del orden Anostraca propia de aguas salobres continentales, de distribución cosmopolita.

Bootstrap.- en estadística, bootstrapping es un método que permite la asignación de medidas de precisión (definida en términos de sesgo, varianza, intervalos de confianza, error de predicción o alguna otra medida de este tipo) a la muestra.

Calcificación.- recubrimiento de carbonato de calcio (calcita o aragonita).

Calcita.- Es el mineral más estable que existe de carbonato de calcio, frente a los otros dos polimorfos con la misma fórmula química aunque distinta estructura cristalina:

el aragonito y la vaterita. Se usa como sinónimo de caliza, aunque es incorrecto pues ésta es una roca más que un mineral.

Caliptra.- engrosamiento de la pared celular en la cual quedan restos de la pared parental a manera de anillos.

Caliza.- es una roca sedimentaria compuesta mayoritariamente por carbonato de calcio (CaCO_3), generalmente calcita, aunque frecuentemente presenta trazas de magnesita (MgCO_3) y otros carbonatos.

Célula apical.- relativo al ápice, que se halla en él.

Célula necridial.- zonas de un tricoma donde hay muerte celular.

Cianotoxinas.- son toxinas producidas por Cyanopokaryotas. Las floraciones de Cyanorpokaryota pueden producir cianotoxinas en tales concentraciones que pueden ser venenosas e incluso mortales para animales y humanos. Las cianotoxinas se pueden acumular también en pescados y mariscos, causando intoxicaciones por su ingesta. Las diferentes toxinas incluyen potentes neurotoxinas, hepatotoxinas, citotoxinas y endotoxinas.

Clado.- es un grupo formado por un ancestro y todos sus descendientes, una sola "rama" en el "árbol de la vida". El ancestro puede ser un individuo, una población o una especie (extinta o existente).

Cladograma.- es un diagrama que esquematiza la filogenia, o historia evolutiva, más probable de un grupo de taxones terminales (los nodos terminales del cladograma). El cladograma hace algunos supuestos previos de la historia evolutiva del grupo, como que cada rama de nodo a nodo es una especie (independientemente de la cantidad de cambios evolutivos que ocurrieron en ese linaje), que la ramificación es únicamente dicotómica, que una especie ancestral al ramificarse en dos da siempre dos especies derivadas y ninguna de las ramas mantiene los caracteres de la especie ancestral, y que no hay anastomosis de ramas.

Concentración media letal (LC50).- Medida estándar de la toxicidad del medio circundante que matará a la mitad de la población de la muestra de una prueba específica en animales, en un período determinado.

Desnitrificación.- es un proceso metabólico que usa el nitrato como aceptor terminal de electrones en condiciones anóxicas (ausencia de oxígeno) principalmente. El proceso de reducción de nitratos hasta nitrógeno gaseoso ocurre en etapas sucesivas, catalizadas por sistemas enzimáticos diferentes, apareciendo como productos intermedios nitritos, óxido nítrico y óxido nitroso. La realizan exclusivamente ciertos microorganismos.

Detritus.- material orgánico particulado, no vivo. Por lo general incluye los cuerpos o fragmentos de los organismos muertos, así como material fecal.

Diagnosis.- es la identificación de la naturaleza y la causa de un determinado fenómeno.

Diagrama de Maucha.- símbolo que resume los iones mayores presentes en el agua de una manera que permita la comparación rápida entre dos muestras de agua. El símbolo en forma de estrella de ocho picos presenta las concentraciones aniónicas a la izquierda y los cationes a la derecha. Las concentraciones son convertidas a miliequivalentes por litro, por lo que el equilibrio de cationes y aniones puede observarse a simple vista. El círculo del fondo muestra la forma teórica de una muestra perfectamente equilibrada, en donde cada ion se encuentra en la misma concentración.

Disuasorio.- disuasivo, que convence a uno con razones para cambiar de propósito.

Dolomita.- es un mineral compuesto de carbonato de calcio y magnesio $[\text{CaMg}(\text{CO}_3)_2]$. Se produce una sustitución por intercambio iónico del calcio por magnesio en la roca caliza (CaCO_3).

Dureza total.- La dureza del agua se expresa normalmente como cantidad equivalente de carbonato de calcio y se calcula, genéricamente, a partir de la suma de las concentraciones de calcio y magnesio existentes (miligramos) por cada litro de agua; que puede expresarse en concentración de CaCO_3 .

Edema.- es la acumulación de líquido en el espacio intercelular o intersticial, además de las cavidades del organismo. El edema se considera un signo clínico.

Electroforesis.- es una técnica para la separación de moléculas según la movilidad de éstas en un campo eléctrico. Dependiendo de la técnica que se use, la separación obedece en distinta medida a la carga eléctrica de las moléculas y a su masa.

Especie críptica.- especie o grupos de especies cuyas similitudes morfológicas enmascaran una variación genética significativa entre ellas.

Especie plástica.- especie que presenta características morfológicas y morfométricas inestables y variables, en la cual podría verse reflejado el efecto del cambio en ciertos factores ambientales.

Especie tipo.- en taxonomía, el tipo nomenclatural o, simplemente, tipo es un ejemplar de una especie dada sobre el que se ha realizado la descripción de la misma y que, de ese modo, valida la publicación de un nombre científico para dicha especie.

Fagoestimulante.- la sustancia natural de una planta que induce la alimentación de un insecto.

Fascículo.- reunido en haces. Conjunto de elementos.

Fenotipo.- es cualquier característica o rasgo observable de un organismo, como su morfología, desarrollo, propiedades bioquímicas, fisiología y comportamiento.

Filamento.- organismo con células arregladas en hilera. Este nivel de organización presenta gran diversidad en cuanto a su arreglo ya que pueden agruparse en cenobios o formar pseudoparénquimas.

Filogenia.- es la historia del desarrollo evolutivo de un grupo de organismos.

Flavonoides.- es el término genérico con que se identifica a una serie de metabolitos secundarios. Cumplen funciones metabólicas importantes en las plantas, algunas funciones son comunes y otras son específicas de algunos taxones. Como ejemplo de funciones universales, los flavonoides son responsables de la resistencia a la fotooxidación de la luz ultravioleta del sol, intervienen en el transporte de la hormona auxina, y se cree que funcionan como defensa ante el herbivorismo. Una función importante cumplida en muchas plantas es la atracción de los animales polinizadores, a través del color o el olor que dan a la planta o a sus flores.

GenBank.- colección de todas las secuencias de nucleótidos de acceso público y su traducción en proteínas.

Genotipo.- se refiere a la información genética que posee un organismo en particular, en forma de ADN.

Glucósidos.- son moléculas compuestas por un glúcido (generalmente monosacáridos) y un compuesto no glucídico. Los glucósidos desempeñan numerosos papeles importantes en los organismos vivos. Muchas plantas almacenan los productos químicos importantes en forma de glucósidos inactivos; si estos productos químicos son necesarios, se hidrolizan en presencia de agua y una enzima, generando azúcares importantes en el metabolismo de la planta. Muchos glucósidos de origen vegetal se utilizan como medicamentos.

Grupo externo.- organismos que no se consideran parte del grupo en cuestión.

Heurístico.- se refiere a la experiencia basada en las técnicas para la resolución de problemas, el aprendizaje y el descubrimiento que le da una solución que no se garantiza que sea óptima.

Homología.- la relación que existe entre dos partes orgánicas diferentes cuando sus determinantes genéticos tienen el mismo origen evolutivo.

Homoplasia.- es el cambio evolutivo paralelo que hace que dos organismos presenten un mismo carácter adquirido independientemente

Hormogonio.- segmento de un tricoma flanqueado en ambos lados por discos de separación o necridios. Es un mecanismo de propagación cuando se separa del filamento que lo contiene.

Índice de consistencia (Ci).- mide la cantidad de homoplasia en un cladograma. Se calcula contando el mínimo número de cambios en un conjunto de datos y dividiéndolo entre el número actual de cambios necesarios para el cladograma.

Índice de retención (Ri).- es una medida de la cantidad de homoplasia pero también mide qué tan bien las sinapomorfias explican el árbol. Se calcula tomando el producto del número máximo de cambios de un árbol y el número de cambios en el árbol dividido por el producto del número máximo de cambios en el árbol y el número mínimo de cambios en el conjunto de datos.

Lamelada.- tipo de vaina que presenta más de una capa homogénea de cubiertas mucilaginosas.

Liofilización.- es un proceso en el que se congela el producto y posteriormente se introduce en una cámara de vacío para realizar la separación del agua por sublimación. De esta manera se elimina el agua desde el estado sólido al gaseoso del ambiente sin pasar por el estado líquido. Para acelerar el proceso se utilizan ciclos de congelación-sublimación con los que se consigue eliminar prácticamente la totalidad del agua libre contenida en el producto original, pero preservando la estructura molecular de la sustancia liofilizada.

Máxima parsimonia.- parsimonia normalmente se busca en la construcción de árboles filogenéticos, y en la explicación científica en general.

Metabolismo secundario.- son aquellos compuestos químicos sintetizados por las Cyanoprokaryota que cumplen funciones no esenciales en ellas, de forma que su ausencia no es fatal para las mismas, ya que no intervienen en su metabolismo primario. Los metabolitos secundarios intervienen en las interacciones ecológicas entre las Cyanoprokaryota y su ambiente.

Micrómetro.- el micrómetro o micra es una unidad de longitud equivalente a una millonésima parte de un metro. Su símbolo científico es μm .

Morfología.- es una rama de la biología que trata del estudio de la forma y estructura de los organismos y sus características estructurales específicas.

Morfometría.- en general, los datos morfométricos tradicionales son mediciones de tamaño.

Mucílago.- es una sustancia espesa y pegajosa, puede ser de textura viscosa, gomosa o parecida a una gelatina líquida. Procede de la degradación de la celulosa y diversas sustancias pécticas.

Nauplios.- es la primera larva característica de los crustáceos.

Nucleación.- precipitación de minerales que comienza en o dentro de la vaina compuesta de polisacáridos.

Nucleótidos.- son moléculas orgánicas que sirven como los monómeros o subunidades de ADN y ARN, están formadas por la unión covalente de un monosacárido de cinco carbonos (pentosa), una base nitrogenada y un grupo fosfato.

Número de acceso.- se refiere al número único asignado a cada nueva adquisición, ya que está inscrito en el catálogo del Banco de genes.

OTU.- en filogenia una unidad taxonómica operacional es una definición operativa de una especie o grupo de especies frecuentemente utilizada cuando sólo se tienen disponibles datos de la secuencia de ADN.

Peptidoglicano.- también conocido como mureína, es un polímero que consiste en azúcares y aminoácidos que forman una capa similar a una malla fuera de la membrana plasmática de las bacterias. La capa de peptidoglicano es sustancialmente más gruesa en bacterias Gram-positivas que en las bacterias Gram-negativas.

Procarionte.- en biología y taxonomía, es el imperio o dominio que incluye los microorganismos constituidos por células procariotas, es decir, células que presentan un ADN libre en el citoplasma, ya que no hay núcleo celular.

Quimiotaxonomía.- estudio que incorpora a la taxonomía los principios y procedimientos implicados en la elaboración de datos químicos. Básicamente estudia la variabilidad de los compuestos químicos, en particular de los metabolitos secundarios (terpenos, flavonoides, glicósidos, alcaloides, etcétera), con el fin de que puedan ser ubicados como una herramienta más en la clasificación. Esta ciencia es una fuente de caracteres confiables para el estudio de la filogenia de los grupos de plantas en cuestión.

Radiación fotosintéticamente activa (PAR).- la radiación fotosintéticamente activa designa el rango espectral (longitud de onda) de radiación solar, 400 a 700 nanómetros, que los organismos fotosintéticos son capaces de utilizar en el proceso de fotosíntesis.

Ramificación falsa.- sólo hay desviación del crecimiento de los filamentos, no hay cambio en el eje de división celular.

Reacción en cadena de la polimerasa (PCR).- es una metodología en la cual se amplifica una sola o unas pocas copias de un trozo de ADN, lo que genera miles de millones de copias de una secuencia particular.

Rutas metabólicas.- en bioquímica, es una sucesión de reacciones químicas que conducen de un sustrato inicial a uno o varios productos finales, a través de una serie de metabolitos intermediarios.

Secuenciación.- la secuenciación de ADN consiste en el proceso que permite determinar el orden de nucleótidos de un fragmento de ADN dado.

Septo.- pared o membrana que divide a una cavidad o estructura en dos o más partes.

Simbiosis.- es una forma de interacción biológica que hace referencia a la relación estrecha y persistente entre organismos de distintas especies.

Spodoptera frugiperda.- también conocida como cogollero del maíz, es una especie de lepidóptero muy conocida en el ámbito agrícola por ser una plaga bastante importante atacando distintos cultivos de importancia económica.

Taxa.- en biología, un taxón (plural: taxa) es un grupo de una o más poblaciones de organismos que forman una unidad. Por lo general, a un taxón se le da un nombre y un rango, aunque no es un requisito. Definir lo que pertenece o no pertenece a ese grupo taxonómico es realizado por un taxónomo.

Taxonomía.- es la ciencia que define a los grupos de organismos biológicos sobre la base de características comunes y da nombres a estos grupos.

Tilacoides.- son sacos aplanados que forman parte de la estructura de la membrana interna del cloroplasto, sitio de las reacciones captadoras de luz de la fotosíntesis y de la fotofosforilación; las pilas de tilacoides forman colectivamente las granas.

Tricoma.- hilera de células vegetativas o reproductoras sin vaina. La vaina más el tricoma forman el filamento de las Cyanoprokaryota.

Tubos micríticos.- calcificación y crecimiento de cristales sobre la vaina resultando en la formación de tubos por medio de la incrustación de minerales presentes en el agua.

Ultra-estructura.- es la estructura detallada de un espécimen biológico, tal como una célula, tejido u órgano, que se pueden observar por microscopía electrónica. Se refiere en general al estudio de las estructuras celulares que son demasiado pequeñas para ser vistas con un microscopio óptico.

Vaina.- cubierta mucilagínosa que recubre los filamentos de Cyanoprokaryota. Su consistencia y grosor varía dependiendo del hábitat. Mantiene la humedad de las células.

Yeso.- en estado natural la piedra de yeso o yeso crudo, contiene 79,07% de sulfato de calcio anhidro y 20,93% de agua ($\text{CaSO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) y es considerado una roca sedimentaria, incolora o blanca en estado puro, sin embargo, generalmente presenta impurezas que le confieren variadas coloraciones, entre las que encontramos la arcilla, óxido de hierro, sílice, caliza, vermiculita, etc.

10. APÉNDICE II

Calcification of the filamentous cyanobacterium *Blennothrix ganeshii* in calcareous tropical streams of central Mexico region

Calcificación de la cianobacteria *Blennothrix ganeshii* en ríos calcáreos tropicales de la región central de México

Yenny Beltrán-Magos,¹ Javier Carmona,² Gloria Vilaclara³ and Miriam Bojorge-García²

¹ Posgrado en Ciencias Biológicas, Universidad Nacional Autónoma de México, Coyoacán, Ciudad de México, D.F., 04510. México

² Facultad de Ciencias, Departamento de Ecología y Recursos Naturales, Universidad Nacional Autónoma de México, Circuito exterior, Ciudad Universitaria, Coyoacán, D.F., 04510. México

³ FES-Iztacala, Universidad Nacional Autónoma de México, Estado de México, México
e-mail: jcj@fciencias.unam.mx

Beltrán-Magos, Y, J. Carmona, G. Vilaclara and M. Bojorge-García. 2013. Calcification of the filamentous cyanobacterium *Blennothrix ganeshii* in calcareous tropical streams of central Mexico region. *Hidrobiológica* 23 (1): XXX-XXX.

ABSTRACT

Geochemical, mineralogical and microbiological data from four freshwater streams in central region of Mexico indicate the importance of *Blennothrix ganeshii* mats (Cyanobacteria, Oscillatoriales) in promoting the formation of calcium carbonate crystals. The streams were characterized by alkaline waters and relative physicochemical stability during three seasons (cold dry, warm dry and warm rainy). Calcification took the form of a thick, dense layer of calcium carbonate crystals surrounding the extracellular polymeric substances produced by *B. ganeshii* filaments, giving an appearance of micritic tubes (structures formed by crystallization in the spaces between filaments) along the sheath surfaces. The precipitate was analyzed using X-ray diffraction and energy dispersal X-ray spectrometry, and the calcite crystal habit was determined. The photosynthetic activity of cyanobacterial growth and the presence of abundant extracellular polymeric substances and epiphytic species promote the absorption of ions and mineral nucleation on the surface of the sediment and contribute to the formation of travertine in tropical regions.

Key words: *Blennothrix ganeshii*, calcification, cyanobacteria, micritic tubes, tropical streams.

RESUMEN

Los datos geoquímicos, mineralógicos y microbiológicos en cuatro ríos de agua dulce de la región central de México, ponen de manifiesto la importancia de las matas de *Blennothrix ganeshii* (Cianobacteria, Oscillatoriales) como promotoras de la formación de cristales de carbonato de calcio. Los ríos se caracterizaron por presentar aguas alcalinas y una relativa estabilidad fisicoquímica durante tres estaciones del año (seca fría, seca templada y lluviosa templada). La calcificación estuvo caracterizada como una densa y gruesa capa de cristales de carbonato de calcio que rodean el mucílago extracelular producido por los filamentos de *B. ganeshii*, dando la apariencia de tubos micríticos (estructuras formadas por un material cristalizado en las hendiduras existentes entre filamentos) a lo largo de la superficie de la vaina. El precipitado fue identificado como calcita por su hábito cristalino típico y por análisis de difracción de rayos-X y espectrometría de dispersión de energía de rayos X. La actividad fotosintética de los crecimientos de la cianobacteria y la presencia de abundantes sustancias poliméricas extracelulares y especies epífitas promueven la absorción de iones y nucleación de minerales en la superficie del sedimento y contribuyen a la construcción de travertino en corrientes de regiones tropicales.

Key words: *Blennothrix ganeshii*, calcificación, cianobacteria, tubos micríticos, ríos tropicales.

INTRODUCTION

The deposition of calcium salts, generally called calcification, is a common phenomenon associated with many freshwater bacteria (particularly cyanobacteria), small algae, fungi and bryophytes that contribute to the growth of microbial biofilms and mats (Riding, 2000; Pentecost, 2005; Turner & Jones, 2005). Microbial carbonates are most common in the geologic record in seas and lakes but at present they are also important in spring, cave and soil environments. Minerals originated through biologically induced mineralization (BIM) generally nucleate and grow both extracellularly and intercellularly as a result of various metabolic processes, such as photosynthetic uptake of CO_2 and/or HCO_3^- by cyanobacteria, and ammonification, denitrification and sulfate reduction by other bacteria (Riding, 2000; Couradeau *et al.*, 2012). Extracellular polymeric substances (EPS), widely produced by microbes, are important in providing nucleation sites and facilitating sediment trapping (Riding, 2000). These exopolymers have diverse compositions, depending on the biology of the individual organisms and environmental conditions, but are commonly dominated by negatively charged polysaccharides (Decho, 1990; Turner & Jones, 2005). Although many cyanobacteria have metabolic processes that stimulate calcium carbonate formation, favorable environmental conditions generally appear to be necessary for precipitation to occur (Merz-Preiß & Riding, 1999). This facultative and environmentally dependent calcification reflects the saturation state of the ambient water as well as the metabolic activities of the cyanobacteria.

Blennothrix ganeshii Kützing ex Anagnostidis et Komárek is often a major component of attached lotic communities in submerged (littoral and benthic) habitats and occurs in calcareous regions of Mexico (Montejano *et al.*, 2000; Beltrán-Magos *et al.*, 2005). This perennial cyanobacterium grows in large mats and is an important biotic component in its microhabitat (Carmona *et al.*, 2005). Studies of *B. ganeshii* have concerned taxonomic and ecological information (Anagnostidis & Komárek, 1988; Valadez-Cruz *et al.*, 1996; Komárek, 1998; Watanabe & Komárek, 1989; Montejano *et al.*, 2000; Cantoral & Aboal, 2001; Beltrán-Magos *et al.*, 2005; Carmona *et al.*, 2005) but studies of calcification processes are sparse. The purpose of this study is to evaluate the mechanisms as well as environmental and biological factors involved in *B. ganeshii* calcification in four tropical streams in central Mexico.

MATERIALS AND METHODS

Differences in water chemistry of four freshwater streams with *B. ganeshii* populations (Manantiales, Tambaque, Micos and Puente de Dios) were evaluated by sampling three times over a period of ten months, from January to November 2004 (Fig. 1). The climatic conditions include an intense summer rainy season (García, 2004). The study period covers three main seasons during the year in Mexico for regions below 800 m.s.n.m at latitudes of 18-22° N:

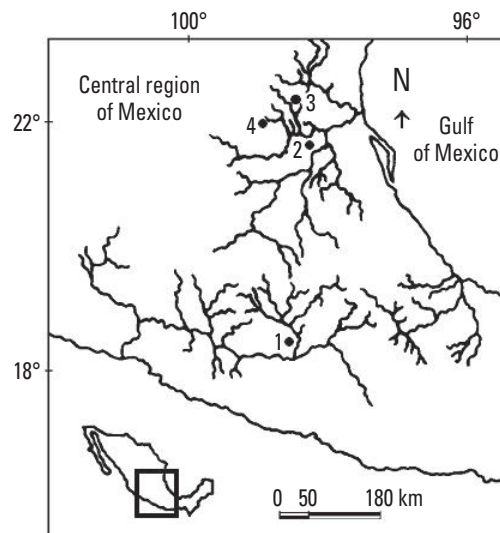


Figure 1. Sampling sites of *B. ganeshii* populations in central Mexico. Site 1: Manantiales, Site 2: Tambaque, Site 3: Micos and Site 4: Puente de Dios.

the cold dry (February), warm dry (May) and warm rainy season (November). Various physical and chemical parameters were recorded *in situ* at each site. Water temperature, pH and specific conductivity (standardized to 25 °C, K_{25}) were measured with a PC-18 conductivity meter (Conductronic, Puebla, Mexico); dissolved oxygen was measured with an oxygen meter YSI-85 (YSI Incorporated, Ohio, USA); and current velocity and photosynthetically active radiation (PAR) were measured as close as possible to the algal growth using a 2100 current velocity meter (Swoffer Instruments, Washington, USA) and a LI-1000 quantum meter (LI-COR Biosciences, Nebraska, USA) with a flat subaquatic PAR sensor. Depth and type of substrate were also recorded for each site. Oxygen saturation percentage was calculated from dissolved oxygen data, taking into account altitude and water temperature (Wetzel & Likens, 1991).

Water samples for nutrient determination were collected in duplicate. Each sample replicate was filtered *in situ* with 0.22 μm pore size membranes (Millipore, Massachusetts, USA), preserved with a few drops of chloroform and frozen for subsequent laboratory analysis with a San plus segmented-flow analyzer (Skalar Inc., Georgia, USA), following standard titration. Soluble reactive phosphorous (theoretically, the majority being orthophosphates, P-PO_4^{3-}), N-NO_2^- , N-NO_3^- and N-NH_4^+ were analyzed following the techniques described by ASTM (1989) and APHA (1995). Water samples for determination of anions (HCO_3^- , CO_3^{2-} , Cl^- , SO_4^{2-}), total dissolved solids (TDS) and pH were frozen (-20°C) and preserved in dark conditions, whereas samples for cations (Ca^{2+} , Mg^{2+} , Na^+ , K^+) were preserved with 40% nitric acid (down to pH 2-3). Determination of carbonates was carried out using the titration method, chlorides using the selective electrode method,

sulfates using the turbidimetric method and Na^+ and K^+ using the spectrophotometric atomic absorption method (APHA, 1995).

Saturation of stream water with respect to calcite was calculated according to the saturation index (SI), $\text{SI} = \text{pH} - \text{pH}_s$, where pH is the registered pH and pH_s is the calculated pH in equilibrium with CaCO_3 at the existing concentrations of Ca^{2+} and HCO_3^- (ASTM, 1989). Populations of *B. ganeshii* were collected for calcification analysis. Maximum differences in carbonate precipitates on cyanobacteria were observed and analyzed at the end of the dry season (May) and at the end of the rainy season (November). Carbonate content of samples was evaluated using the loss-on-ignition method (550 °C for 4 h; Heiri *et al.*, 2001; Boyle, 2004). Calcification morphology and mineral composition was determined using a BX51 light microscope (Olympus Corporation, Tokyo, Japan), a JSM-6380LV scanning electron microscope (SEM; Jeol, Tokio, Japan) and by INCAx-sight energy-dispersive X-ray spectroscopy (EDXS; Oxford instruments, Oxfordshire, UK). Mineralogy was confirmed by X-ray diffraction (XRD) using a powder diffraction meter Broker D8-advance (CuK radiation, graphite monochromator; Bruker AXS, Wisconsin, USA). Samples were oven dried (105 °C for 24 h; Heiri *et al.*, 2001; Boyle, 2004) and ground to a fine powder; analysis was based on the Diffplus Bs software and the International Centre for Diffraction Data (ICDD) database. Significant differences ($p < 0.05$) in chemical composition between sites and seasons were assessed using one-way analysis of variance (ANOVA), followed by a Scheffé test. Relationships between calcification and physicochemical parameters were evaluated with redundancy analysis (RDA). Statistical analyses were performed with the programs SPSS ver.12 (Levesque, 2006) and XLSTAT ver. 7.5 (XLSTAT, 2004).

RESULTS

Water conditions. *Blennothrix ganeshii* populations from central Mexico are present under particular chemical and physical conditions: alkaline waters (2.7-4.8 eq l^{-1}) dominated by $\text{SO}_4^{2-}/\text{HCO}_3^-$ and $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$, warm temperature (23-29 °C), shallow depth (3-28 cm), moderate current velocity (13-27 cm s^{-1}), high percentage of oxygen saturation (96-107%) and different types of substrata (lime, sand, clay, gravel, boulder or rock). Stream segments were shaded or partly shaded (11-85 $\mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$; Tables 1 and 2).

Seasonal variations in temperature, pH, total alkalinities and concentration of Ca^{2+} are shown in Figs. 2A-D. The highest temperatures were recorded at site 1 throughout the sampling period. The pH of stream water varied over a small range of values (7.0-7.9), generally with a slight increase during the warm dry season, except for site 1. Total alkalinities showed no differences during the seasons at site 1. At sites 2, 3 and 4, lower values were detected during the warm season. Variations in Ca^{2+} and ionic concentration between sampling dates were noted at sites 2, 3 and 4,

with higher concentrations during dry seasons and lower during rainy seasons, showing a seasonal dilution process. Virtually no variation in Ca^{2+} ions was detected at site 1 during the sampling period.

ANOVA showed significant differences in chemical composition between sites ($F = 5.8$, $p = 0.001-0.02$). Scheffé test results indicated the presence of two groups ($p < 0.05$): one containing sites 1, 2 and 4, and the other containing site 3. No significant differences ($p < 0.05$) were found in chemical composition among seasons from different sampling years at all sites.

Saturation of stream water with respect to calcite. Seasonal changes in the saturation index of calcite (SI) are presented in Fig. 2E. Stream water was generally supersaturated with respect to calcite ($\text{SI} > 0$). SI values at site 3 were negative in the warm rainy season when sampling took place soon after heavy rains. Average annual supersaturation index values of calcite were between 0.25 and 0.85.

Calcification. All studied populations were characterized by calcium carbonate precipitation around the sheaths and were found in shallow water conditions, even when substantial parts of the mat were outside the water column, facilitating evaporation processes and cementation of minerals. Variability in precipitation was found between populations at different sites. Samples from sites 1 and 4 had the highest mean carbonate precipitation regardless of sampling season (31 and 36%, respectively), whereas populations from sites 2 and 3 showed the lowest precipitation (13 and 16%, respectively). The eigenvalues of the first two RDA axes were high (RDA1, 0.66 and RDA2, 0.33) when compared with subsequent axes, and they accounted for 99% of the variance in carbonate precipitation (Fig. 3). Both axes accounted for 99% of the variance in the relationship between carbonate precipitation at the four sites and environmental variables. The results of the permutation tests revealed the statistical significance ($p \leq 0.05$) of the effects of current velocity and N-NO_2^- at sites 2 and 3; total alkalinity, K_{25} , SO_4^{2-} , Ca^{2+} , Mg^{2+} , temperature, P-PO_4^{3-} and SI at site 1, and pH and SI at site 4. No differences in total alkalinity among the seasons at site 1 were associated with the direction of the distribution pattern of carbonate precipitation.

Calcification occurred as dense, thick encrustation around the sheaths, creating micritic (metabolically induced, but environmentally dependent) tubes typically 10-25 μm thick enclosing *B. ganeshii* filaments (Figs. 4A, C). The calcareous tubes around the filaments were separate from each other. Distal ends of the filaments remained uncalcified, and allowing trichomes to be visible (Fig. 4E). Calcite crystals displayed a rhombohedral form with triangular surfaces and irregular disposition (Figs. 4C-D), forming the "gothic arch crystals" described by Rainey and Jones (2009). Scanning-electron-microscopic examination of the initial precipitate nucleation indicates the presence of calcium carbonate par-

Table 1. Chemical composition measured at the study sites of the rivers of the portion central of Mexico. Values expressed in mg l⁻¹, unless otherwise stated. Values represent minimum, maximum, and average + standard deviation (*n* = 5 for each site).

	Site 1	Site 2	Site 3	Site 4
pH	7.2-7.8 7.5+0.2	7.3-7.7 7.5+0.1	7.0-7.9 7.3+0.4	7.4-7.8 7.7+0.2
K ₂₅ ^a [μS cm ⁻¹]	1703-1778 1740+31	674-2360 1423+643	701-948 810+109	571-3000 1562+937
TDS	1512-1635 1594+48	464-1647 1139+492	493-770 621+127	508-2320 1289+739
Total alkalinity [meq l ⁻¹]	4.7-5 4.8+0.1	3.6-4.4 3.8+0.4	2.4-3.3 2.7+0.4	1.9-3.7 3+0.9
HCO ₃ ⁻	225-305 269+37	197-245 229+21	148-286 196+57	118-286 207+64
CO ₃ ²⁻	0-32 11+15	0-14 5+7	0-11 3+5	0-20 9+9
Cl ⁻	12-28 16+7	4-6 4+1	5-10 7+2	5-47 25+18
SO ₄ ²⁻	735-907 859+70	223-806 471+234	196-361 294+67	270-829 588+269
Ca ²⁺	309-330 322+8	121-335 231+79	123-186 148+26	155-313 237+69
Mg ²⁺	65-73 68+3	20-61 36+17	22-33 26+4	28-85 58+25
Na ⁺	35-53 47+7	4-15 11+4	9-19 13+4	22-55 41+14
K ⁺	6-7 6+0.4	0.6-2 1+0.4	1-2 2+0.2	2-5 4+1
P-PO ₄ ³⁻ ^a	0.01-0.03 0.02+0.008	0.007-0.02 0.01+0.003	0.005-0.01 0.01+0.003	0.007-0.02 0.01+0.005
N-NO ₃ ⁻	0.03-237 174+98	69-344 178+107	73-196 143+49	104-195 151+35
N-NO ₂ ⁻	0.001-0.006 0.004+0.002	0-0.02 0.005+0.008	0.001-0.02 0.007+0.01	0.0005-0.007 0.003+0.003
N-NH ₄ ⁺	0.03-0.5 0.1+0.2	0.02-0.04 0.03+0.01	0.02-0.06 0.04+0.01	0.01-0.04 0.02+0.008
IC [meq l ⁻¹]	46-49 48+1	17-44 30+10	18-23 20+2	23-59 36+15
Ionic dominance	SO ₄ ²⁻ > HCO ₃ ⁻ > Cl ⁻ > CO ₃ ²⁻ Ca ²⁺ > Mg ²⁺ > Na ⁺ > K ⁺	SO ₄ ²⁻ > HCO ₃ ⁻ > CO ₃ ²⁻ > Cl ⁻ Ca ²⁺ > Mg ²⁺ > Na ⁺ > K ⁺	SO ₄ ²⁻ > HCO ₃ ⁻ > CO ₃ ²⁻ > Cl ⁻ Ca ²⁺ > Mg ²⁺ > Na ⁺ > K ⁺	SO ₄ ²⁻ > HCO ₃ ⁻ > CO ₃ ²⁻ > Cl ⁻ Ca ²⁺ > Mg ²⁺ > Na ⁺ > K ⁺
SI	0.55-1.11 0.85+0.2	0.45-0.71 0.62+0.1	-0.28-0.74 0.25+0.4	0.08-1.0 0.73+0.4

^aAbbreviations: K₂₅ = specific conductance standardized at 25 °C, TDS = Total Dissolved Solids, IC = Ionic concentration, P-PO₄³⁻ = Soluble Reactive Phosphorus, SI = Calcium Saturation Index.

ticles with diameters that range from several tenths of a micrometer to as much as 1 micrometer on the polysaccharide sheath (Fig. 4B). EDXS of these precipitates showed they contained a lower Ca²⁺ percentage than the fully formed calcite crystals (Fig. 5A-B). Inclusions contained Ca²⁺ as a major element. Around the

sheaths, the calcite coating was enlarged (up to five times the diameter of the trichome) mainly by the addition of calcite crystals, which grouped themselves in cylindrical tubes (Fig. 4F).

X-ray diffraction showed a high number of minerals (carbonates, silicates and oxides) deposited on *B. ganeshii* sheaths

Table 2. Climatic and physical factors at the study sites on central Mexico. Values represent minimum, maximum, and average + standard deviation; n = 5 at each site.

Site and location	Altitude [m a.s.l.] ^a	Climate ^b	Water temperature [°C]	Depth [cm]	Current velocity [cm s ⁻¹]	PAR ^c [$\mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$]	Substrate ^d	Dissolved Oxygen [mg l ⁻¹]	Oxygen Saturation [%]
Site 1 Manantiales 18° 55' N 96° 00' W	800	A w ₀ (w)	26-29 29+1	5-10 6+2	14-26 20+4	18-276 85+108	L, S, C	7.2-7.8 7.5+0.4	107
Site 2 Tambaque 21° 41' N 99° 02' W	150	(A)C(m)(w)	23-24 23+1	11-60 28+19	11-41 27+12	13-69 34+25	S, G, B, R	7.6-8.4 8.1+0.4	96
Site 3 Micos 22° 05' N 99° 09' W	120	(A)C(m)(w)	20-27 23+2	7-13 10+3	3-43 21+16	3-14 11+5	L, S, G, B, R	8.1-8.8 8.4+0.3	100
Site 4 Puente de Dios 21° 55' N 99° 24' W	450	(A)C(m)(w)	23-27 25+2	2-7 3+2	0-30 13+14	4-245 73+116	L, S, C, G, B, R	7-8.2 7.8+0.7	104

^a Meters above sea level

^b Climate: (A)C(m)(w), Semicalid humid with abundant spring rains, mean annual precipitation 1500 mm; Aw₀(w), Calid humid with summer rains, mean annual precipitation 800-1000 mm; Bs₁kw, Semicalid dry with summer rains, mean annual precipitation 503 mm (INEGI, 1985, 1992; SPP, 1981).

^c Photosynthetically active radiation

^d Substrate: B = boulder, C = clay, G = gravel, L = lime, R = rock, S = sand.

(Table 3). XRD analyses indicated that calcite was the only phase of CaCO₃ present in readily detectable amounts at all sites. Sites 1, 3 and 4 had the highest proportion of calcite (average = 95, 81 and 88%, respectively). A temporal variation in precipitate minerals around the sheaths was recorded in all sampling sites. A comparison among seasons showed that major calcification occurred in the dry season, when higher SI values were found, except in site 3, which had a negative SI value.

DISCUSSION

The formation of travertine in tropical streams of the central region of Mexico evidently is stimulated by calcite supersaturation in the water. In particular, *B. ganeshii* populations occurred under conditions of alkaline water and the presence of abundant EPS and ephyphitic species that promote the absorption of ions and mineral nucleation.

High SO₄²⁻ concentrations occurred in the water at all sampling sites, resulting from solution of underlying gypsum deposits (Consejo de Recursos Minerales 1992, 1993, 2000). According to Carmona *et al.* (2005) sulfates are an essential component of *B. ganeshii* sheaths as well as of several other cyanobacteria. Our analysis shows that Ca²⁺, HCO₃⁻ and Mg²⁺ are the prevailing ions in the studied streams, as would be expected for water in con-

tact with limestone and dolomite (Consejo de Recursos Minerales 1992, 1993, 2000; Ferrusquía-Villafranca, 1998). Na⁺, K⁺ and Cl⁻ are present in low concentrations at the studied localities. Similar water composition has been described in thermal carbonate spring deposits in Canada and Mexican maar-crater lakes (Vilacarla *et al.*, 1993; Armienta *et al.*, 2008; Rainey & Jones, 2009). The most abundant nutrient in water from all sampling sites is nitrogen as nitrate. Phosphate concentrations at all sites are low due to the presence of high concentrations of Ca²⁺. This condition has been observed in similar karstic systems elsewhere (Reddy, 1988) due to the co-precipitation of phosphates with calcium carbonate (Kleiner, 1990).

Mineral formation in *B. ganeshii* could be explained by the reduction of CO₂ in the water due to photosynthetic activity. As the water in which these cyanobacteria live is supersaturated with respect to calcium carbonate, CO₂ reduction induces mineralization and increases in pH values, alkalinity and CO₃²⁻ ion concentration, thus principally promoting calcite precipitation. EPS excreted by cyanobacterial cells favor calcium carbonate encrustation by providing an ideal surface for the adsorption of ions and mineral nucleation (Emeis *et al.*, 1987; Braissant *et al.*, 2003; Dittrich & Sibling, 2010). EPS possess the ability to concentrate Ca²⁺ cations from solution due to the net-negative surface charge that occurs on several cyanobacteria, including *Pleurocapsa* sp.,

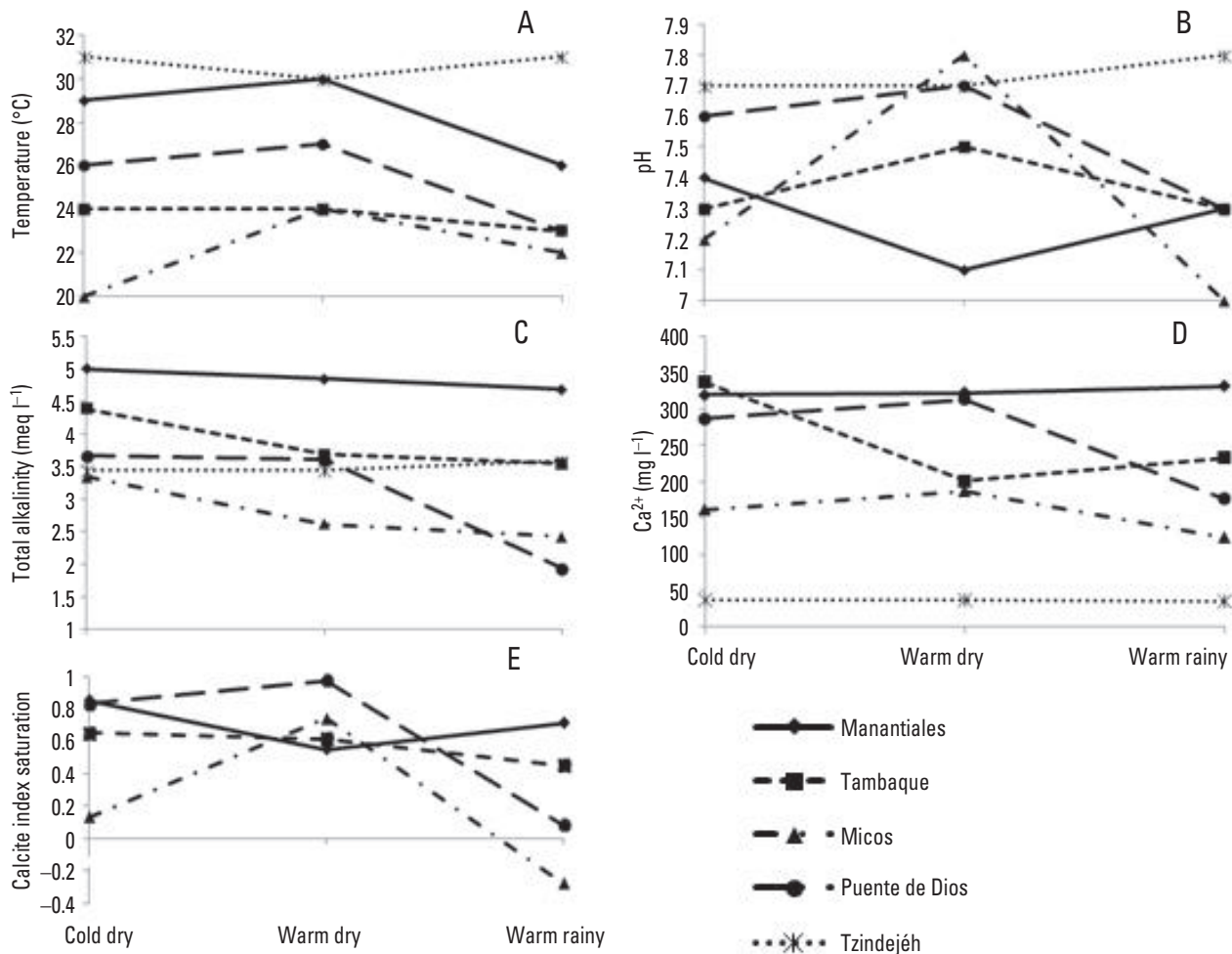


Figure 2A-E. Seasonal changes in temperature (A), pH (B), total alkalinity (C), Ca²⁺ concentrations (D) and saturation index of calcite (E) in the sampled streams in central Mexico.

Plectonema sp. and *Scytonema* sp. (Golubić, 1973; Merz-Preiß & Riding, 1999; Riding, 2000; Frankel & Bazylinski, 2003; Pentecost, 2005); possibly the same phenomenon occurs in *B. ganeshii*. Pentecost (1978) and Konhauser (2007) proposed that cyanobacterial species that produce sheaths or EPS generally precipitate more calcium carbonate than those species without such structures.

Merz-Preiß and Riding (1999) report that calcium carbonate precipitation in freshwater streams becomes conspicuous where average annual supersaturation index values exceed 0.75. However, all *B. ganeshii* populations showed extracellular mineral formation, although relatively lower values were measured in several seasons, particularly in the warm rainy season. Nucleation can be disadvantaged by the mechanical removal of minerals related to high flow velocity.

The evaporation processes occurring on exposed surfaces of benthic mats could explain the plentiful calcification. According to Schneider and Le Campion-Alsumard (1999), boundary lay-

ers are the most important environments for cyanobacterial activity during the formation of carbonates.

The *Blennothrix ganeshii* calcification process involves two main phases: first, the formation of a solid nucleus from dissolved ions and second, the addition of ions to the nucleus to form crystals of calcium carbonate. During the first phase, ions are positioned over the sheath or epiphytic species and resist rapid dissolution with a posterior crystalline phase. According to Merz-Preiß and Riding (1999), Schneider and Le Campion-Alsumard (1999), Pedley (2009), Pedley *et al.* (2009) and Rainey and Jones (2009) microbes do not contribute to the establishment of elevated supersaturation states but passively serve as substrates upon which calcite precipitates. Filaments of *B. ganeshii* were used as substrate by several cyanobacteria, diatoms and epiphytic species of red algae present throughout the entire study, including *Chamaesiphon confervicola* A. Braun, *Chamaecalyx swirenkoi* (Sirsov) Komárek et Anagnostidis, *Stichosiphon sansibaricus* (Hieronymus) Drouet

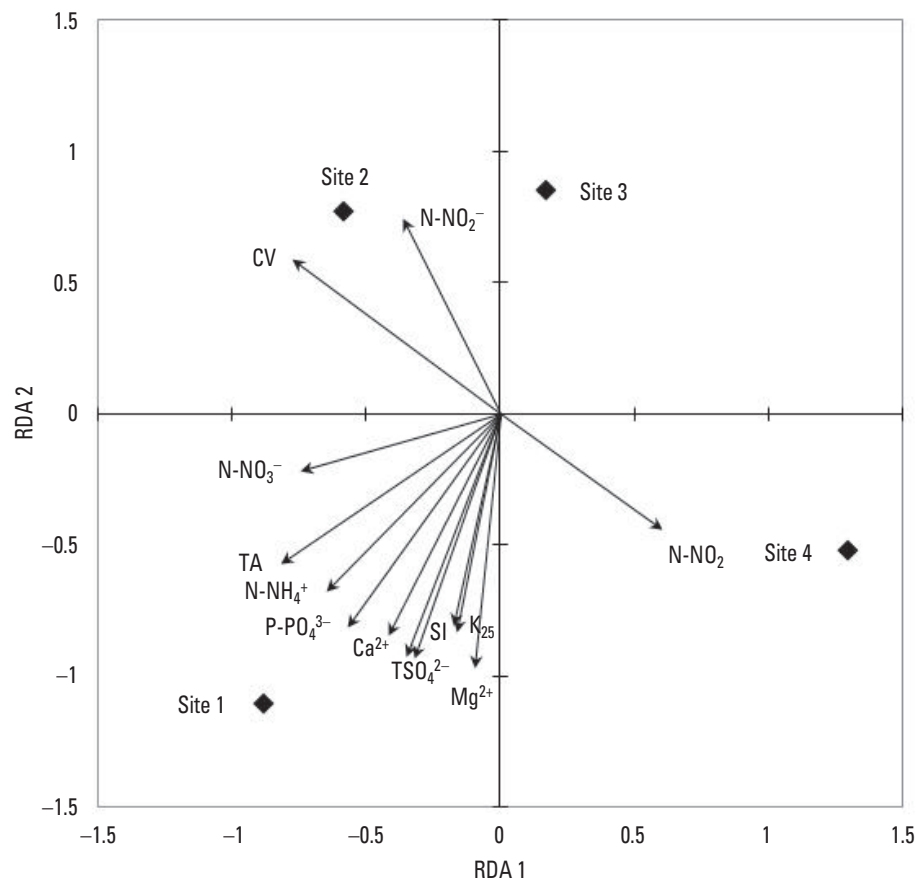


Figure 3. Redundancy analysis (RDA) biplot of the carbonate precipitation and physicochemical parameters of four sites on rivers in central Mexico.

et Daily, *Xenococcus bicudo* Montejano, Gold et Komárek, *X. willei* Gardner, *Cocconeis placentula* Ehrenberg var. *placentula*, *Gomphonema gracile* Ehrenberg, *Surirella linearis* W. Smith, *Synedra ulna* (Nitzsch) Ehrenberg var. *ulna*, *Terpsinoë musica* Ehrenberg, *Audouinella meiospora* (Skuja) Garbary and *Compsopogon coeruleus* (C. Agardh) Montagne. Several of them have been reported in similar tropical and alkaline environments (Golubic, 1973; Prins & Elzenga, 1989; Freytet & Verrecchia, 1998; Merz-Preiß & Riding, 1999; Beltrán-Magos *et al.*, 2005). According to Emeis *et al.* (1987), epiphytic diatoms excrete mucilage enriched in aspartic acid as a response to high Ca^{2+} concentrations. The mucilage traps micrite particles that are suspended in the water, which then act as crystal seeds for inorganic calcite precipitation. The second phase includes the precipitation mainly of calcium carbonate ions and the formation of micritic tubes of calcite minerals that enclose sheaths. Pentecost (1978), Tavera and Komárek (1996), Freytet and Verrecchia (1998), Schneider and Le Campion-Alsumard (1999) and Pentecost (2005) reported this type of calcification is the most common on travertine surfaces, and similar trends have been observed in several filamentous cyanobacteria: *Tapinothrix janthina* (Bornet et Flahault) Bohunická et Johansen

(*H. janthina* Bornet et Flahault), *Lyngbya aerugineo-caerulea* Gomont, *Microcoleus vaginatus* Gomont ex Gomont, *Phormidium incrustatum* (Nägeli) Gomont ex Gomont, *Plectonema gloeophilus* Borzi, *P. gracillimum* Zopf ex Hansgirg, *P. phormidioides* Hansgirg ex Forti, *Rivularia haematites* (De Candolle) Agardh ex Bornet et Flahault, *R. varians* Obenlünenschloss, *Schizothrix calcicola* Gomont and *Scytonema myochrous* (Dillwyn) C.A. Agardh ex Bornet et Flahault. The extracellular biomineralization reported in these species and the intracellular calcification in a cyanobacterium belonging to Gloeobacterales confirm the importance of cellular control and physicochemical parameters on the formation and morphology of different types of travertine (Tavera & Komárek, 1996; Couradeau *et al.*, 2012).

Cyanobacterial mats of *B. ganeshii* in the central region of Mexico create ideal conditions for biologically induced mineralization of calcite and have presumably played a significant role in the development of these natural calcium carbonate environments. This facultative but environmentally dependent calcification reflects the saturation state of the water, as well as the oxic sediment role of *B. ganeshii* sheaths. The present investigation also highlights the significance of the study of physical and

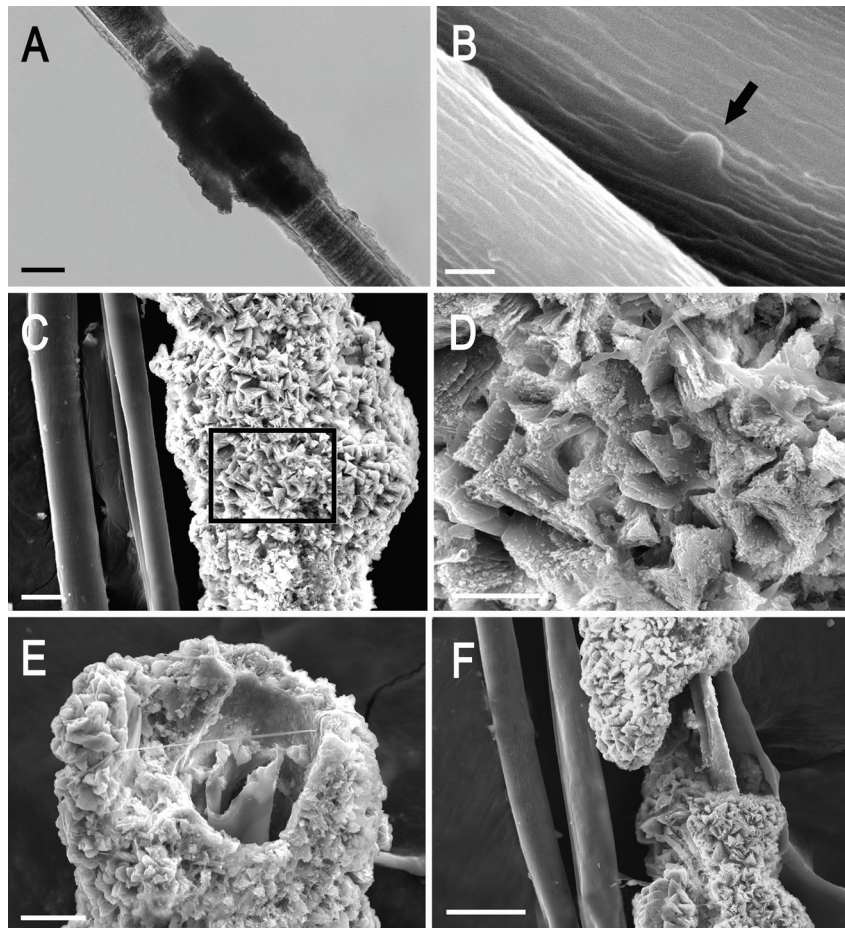


Figure 4A-F. Calcification in *B. ganeshii*. (A) Light-microscopy view of an encrusted filament segment; the scale bar represents 30 μm . (B) SEM view of nucleation of spherical particles of amorphous calcium carbonate (arrow); the scale bar represents 1 μm . (C) SEM views of without encrustation (left side) and a cluster of calcite triangles on a heavily encrusted filament (right side). The rectangular area is enlarged in (D). The scale bar represents 20 μm . (D) SEM view of lamellar triangular plan view of calcite crystals; the scale bar represents 10 μm . (E) SEM view of cross-section of a heavily encrusted filament with calcite crystals; the scale bar represents 20 μm . (F) SEM view of broken encrustation showing the trichome in the interior; the scale bar represents 50 μm .

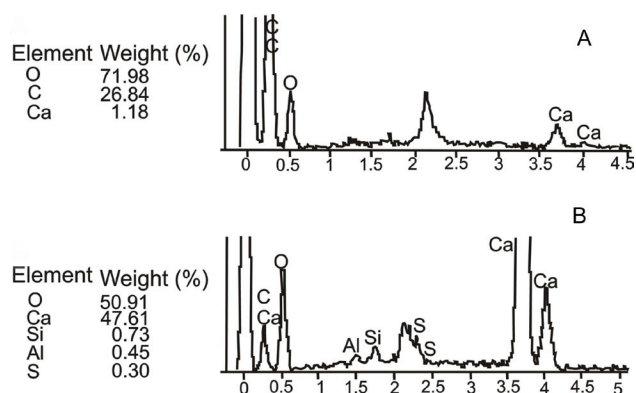


Figure 5A-B. Electron dispersive X-ray spectroscopy of *B. ganeshii* filaments: (A) nucleation and (B) calcite crystals.

chemical seasonal variations in freshwater alkaline streams and the calcification processes of cyanobacteria so as to understand their functioning and prevalence in tropical streams.

ACKNOWLEDGMENTS

The authors are indebted to H. Sergio Castillo Sandoval (ICMyL-UNAM) for nutrient analysis; to Q. F. B. Nora Elia Cenicerros B., I. Q. Alejandra Aguayo Ríos and Q. F. B. Olivia Cruz R. (IGeof-UNAM) for carrying out mayor ion analysis; to M. C. Leticia Baños López (IIM-UNAM) for X-ray diffraction analysis and to Dr. Rafael Quintanar (FES Iztacala-UNAM) for SEM and EDXS. Special thanks are given to Posgrado en Ciencias Biológicas, Universidad Nacional Autónoma de México. This paper constitutes a partial fulfillment of the Graduate Program in Biological Sciences of the National

Table 3. Minerals deposited on *B. ganeshii* sheaths from sites 1 through 4 of rivers of the central portion of Mexico. Values are expressed as percentage of total minerals present.

Class	Group	Mineral	Site 1		Site 2		Site 3		Site 4	
			28.v.04 ^a	18.xi.04	15.v.04	5.xi.04	15.v.04	6.xi.04	14.v.04	7.xi.04
carbonates	calcite	calcite	97	93	49	18	71	90	90	86
silicates	clays	palygorskite		2						
silicates	clays	clinochlore		2						
silicates	clays	halloysite				25				
silicates	clays	montmorillonite			16		15			
silicates	feldspars	albite		2				5		
silicates	feldspars	anorthite							3	
silicates	feldspars	microcline				8			2	
silicates	quartz	quartz		1	27	23	11	2	5	8
silicates	quartz	tridymite	1							
silicates	quartz	crystalite	1							
silicates	micas	muscovite			8		3	3		6
silicates	micas	eastonite				8				
silicates	amphibole	richterite				12				
silicates	zeolites	laumontite				6				
oxides	hematite	hematite	1							

^a Sampling dates.

Autonomous University of México (UNAM). Y. P. Beltrán-Magos acknowledges the scholarship and financial support provided by the National Council of Science and Technology (CONACyT) (175787), and UNAM.

J. Carmona received financial support from research grant AECI (A/010529/07 and A/016417/08).

REFERENCES

- ANAGNOSTIDIS, K. & J. KOMÁREK. 1988. Modern approach to the classification system of cyanophytes. 1. Introduction. *Archiv für Hydrobiologie Supplement 71 (Algological Studies 38-39)*: 291-302.
- APHA (AMERICAN PUBLIC HEALTH ASSOCIATION). 1995. *Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater*. 19th ed., USA, New York. 1100 p.
- ARMIENTA, M. A., G. VILA CLARA, S. DE LA CRUZ-REINA, S. RAMOS, N. CENICEROS, O. CRUZ, A. AGUAYO & F. ARCEGA-CABRERA. 2008. Water chemistry of lakes related to active and inactive Mexican volcanoes. *Journal of Volcanology and Geothermal Research* 178: 249-258.
- ASTM (AMERICAN SOCIETY FOR TESTING AND MATERIALS). 1989. *Annual book of ASTM standards*. U.S.A. Philadelphia. 4100 p.
- BELTRÁN-MAGOS, Y., J. CARMONA & G. VILA CLARA. 2005. Microhabitat and morphological variation in freshwater *Blennothrix ganeshii* (Oscillatoriaceae, Cyanophyceae) populations in streams of central Mexico. *Archiv für Hydrobiologie Supplement 159 (Algological Studies 117)*: 133-146.
- BOYLE, J. 2004. A comparison of two methods for estimating the organic matter content of sediments. *Journal of Paleolimnology* 31: 125-127.
- BRAISSANT, O., G. CAILLEAU, C. DUPRAZ & E. P. VERRECCHIA. 2003. Bacterially Induced Mineralization of Calcium Carbonate in Terrestrial Environments: The Role of Exopolysaccharides and Amino Acids. *Journal of Sedimentary Research* 73: 485-490.
- CANTORAL, U. E. & S. M. ABOAL. 2001. El marjal Pego-Oliva: Evolución temporal de la flora de microalgas. *Limnetica* 20 (1): 159-171.
- CARMONA, J., Y. BELTRÁN-MAGOS & L. COLLADO-VIDES. 2005. Taxonomy and distribution of freshwater *Blennothrix ganeshii* Watanabe & Komárek (Oscillatoriaceae, Cyanophyceae) from central Mexico. *Nova Hedwigia* 80: 323-333.
- CONSEJO DE RECURSOS MINERALES. 1992. *Monografía geológico-mineras del estado de Hidalgo*. Secretaría de energía, minas e industria paraestatal, Subsecretaría de minas e industria básica, México, D.F. 95 p.
- CONSEJO DE RECURSOS MINERALES. 1993. *Monografía geológico-mineras del estado de San Luis Potosí*. Secretaría de energía, minas e industria paraestatal, Subsecretaría de minas e industria básica, México, D.F. 217 p.

- CONSEJO DE RECURSOS MINERALES. 2000. *Monografía geológico-mineras del estado de Morelos*. Secretaría de Comercio y Fomento Industrial. Coordinación General de Minería, México, D.F. 209 p.
- COURADEAU, E., K. BENZERARA, E. GÉRARD, D. MOREIRA, S. BERNARD, G. E. BROWN JR. & P. LÓPEZ-GARCÍA. 2012. An early-branching microbialite cyanobacterium forms intracellular carbonates. *Science* 336: 459-462.
- DECHO, A. W. 1990. Microbial exopolymer secretions in ocean environments: their role(s) in food webs and marine processes. *Oceanography and Marine Biology, Annual Review* 29: 73-153.
- DITTRICH, M. & S. SIBLER. 2010. Calcium carbonate precipitation by cyanobacterial polysaccharides. *Geological Society* 336: 51-63.
- EMEIS, K.C., H. H. RICHNOW & S. KEMPE. 1987. Travertine formation of Plitvice National Park, Yugoslavia: chemical versus biological control. *Sedimentology* 34: 595-609.
- FERRUSQUÍA-VILLAFRANCA, I. 1998. Geología de México: Una sinopsis. In: Ramamoorthy, T. P., R. Bye, A. Lot & J. Fa (Eds.). *Diversidad biológica de México: orígenes y distribución*. Instituto de Biología, Universidad Nacional Autónoma de México, México, D.F., pp. 3-108.
- FRANKEL, R. B. & D. A. BAZYLINSKI. 2003. Biologically Induced Mineralization by Bacteria. In: Dove, P. M., S. Weiner & J. J. De Yoreo (Eds.). *Biomineralization*. Mineralogical Society of America, Washington, D.C., pp. 95-114.
- FREYET, P. & E. P. VERRECCHIA. 1998. Freshwater organisms that build stromatolites: a synopsis of biocrystallization by prokaryotic and eukaryotic algae. *Sedimentology* 45: 535-563.
- GARCÍA, E. 2004. *Modificaciones al sistema de clasificación climática de Köppen*. Instituto de Geografía, Universidad Nacional Autónoma de México, México, D.F. 90 p.
- GOLUBIC, S. 1973. The relationship between blue-green algae and carbonate deposits. In: Carr, N. G. & B. A. Whitton (Eds.). *The Biology of Blue-Green Algae* Botanical Monographs, Vol. 9. University of California Press, Great Britain, pp. 434-472.
- HEIRI, O., A. F. LOTTER & G. LEMCKE. 2001. Loss on ignition as a method for estimating organic and carbonate content in sediments: reproductibility and comparability of results. *Journal of Paleolimnology* 25: 101-110.
- INEGI (INSTITUTO NACIONAL DE ESTADÍSTICA, GEOGRAFÍA E INFORMÁTICA). 1985. *Síntesis Geográfica del estado de San Luis Potosí*. Instituto Nacional de Estadística, Geografía e Informática, México. D.F. 186 p.
- INEGI (INSTITUTO NACIONAL DE ESTADÍSTICA, GEOGRAFÍA E INFORMÁTICA). 1992. *Síntesis Geográfica del estado de Hidalgo*. Instituto Nacional de Estadística, Geografía e Informática, México. D.F. 134 p.
- KLEINER, J. 1990. Calcite precipitation-regulating mechanisms in hardwaters lakes. *Verhandlungen Internationale Vereinigung für Theoretische und Angewandte Limnologie* 24: 136-139.
- KOMÁREK, J. 1998. Validity of the genus *Blennothrix* Kütz. 1843, and its position in the oscillatoriacean cyanoprokaryotes. Anais IV Congreso Latino-Americano, II Reunião Ibero-Americana y VII Reunião Brasileira. *Conservação da biodiversidade e Novas Tecnologías. Promesas e Perigos 1*: 341-352.
- KONHAUSER, K. 2007. *Introduction to Geo Microbiology*. Willey-Blackwell Publishing. U.S.A., New Jersey. 425 p.
- LEVESQUE, R. 2006. *SPSS Programming and Data Management*, 3rd Edition. Chicago, IL. 388 p.
- MERZ-PREISS, M. & R. RIDING. 1999. Cyanobacteria tufa calcification in two freshwater streams: ambient environment, chemical thresholds and biological processes. *Sedimentary Geology* 126: 103-124.
- MONTEJANO, G., J. CARMONA & E. CANTORAL. 2000. Algal communities from calcareous springs and streams in La Huasteca, central Mexico: A synthesis. In: Munawar, M., S. G. Lawrence, I. F. Munawar & D. F. Malley (Eds.). *Aquatic Ecosystems of Mexico: Status and Scope*. Ecovision World Monograph Series. Backhuys Publishers, The Netherlands, Leiden, pp. 135-149.
- PEDLEY, M. 2009. Tufas and travertines of the Mediterranean region: a testing ground for freshwater carbonate concepts and developments. *Sedimentology* 56: 221-246.
- PEDLEY, M., M. ROGERSON & R. MIDDLETON. 2009. Freshwater calcite precipitates from *in vitro* mesocosm flume experiments: a case for bioremediation of tufas. *Sedimentology* 56: 511-527.
- PENTECOST, A. 1978. Blue-green algae and freshwater carbonate deposits. *Proceedings of the Royal Society of London* 200: 43-61.
- Pentecost, A. 2005. *Travertine*. Springer. U.S.A. New York. 445 p.
- PRINS, H. B. A. & J. T. M. ELZENGA. 1989. Bicarbonate utilization: Function and mechanism. *Aquatic Botany* 34: 59-83.
- RAINEY, D. K. & B. JONES. 2009. Abiotic versus biotic controls on the development of the Fairmont Hot Springs carbonate deposit, British Columbia, Canada. *Sedimentology* 56: 1832-1857.
- REDDY, M. M. 1988. Physical-chemical mechanisms that affect regulation of crystallization. In: Sikes, C. S. & A. P. Wheeler (Eds.). *Chemical aspects of regulation of mineralization*. University of South Alabama Publication Services, Alabama, pp. 3-8.
- RIDING, R. 2000. Microbial carbonates: the geological record of calcified bacterial-algal mats and biofilms. *Sedimentology* 47: 179-214.
- SCHNEIDER, J. & T. LE CAMPION-ALSUMARD. 1999. Construction and destruction of carbonates by marine and freshwater cyanobacteria. *European Journal of Phycology* 34: 417-426.
- SPP (SECRETARÍA DE PROGRAMACIÓN Y PRESUPUESTO). 1981. *Síntesis Geográfica del Estado de Morelos*. Secretaría de Programación y Presupuesto. México. D. F. 110 p.
- TAVERA, R. & J. KOMÁREK. 1996. Cyanoprokaryotes in the volcanic lake of Alchichica, Puebla State, Mexico. *Archiv für Hydrobiologie Supplement* 117 (*Algological Studies* 83): 511-538.

- TURNER, E. C. & B. JONES. 2005. Microscopic calcite dendrites in cold-water tufa: implications for nucleation of micrite and cement. *Sedimentology* 52: 1043-1066.
- VALADEZ-CRUZ, F., J. CARMONA & E. CANTORAL-URIZA. 1996. Algas de ambientes lóticos en el estado de Morelos, México. *Anales del Instituto de Biología, Universidad Nacional Autónoma de México, Serie Botánica* 67 (2): 227-282.
- VILA CLARA, G., M. CHÁVEZ, A. LUGO, H. GONZÁLEZ & M. GAYTAN. 1993. Comparative description of crater-lakes. Basic Chemistry in Puebla State, Mexico. *Verhandlungen Internationale Vereinigung für Theoretische und Angewandte Limnologie* 25: 435-440.
- WATANABE, M. & J. KOMÁREK. 1989. New *Blennothrix*-species (Cyanophyceae/ Cyanobacteria) from Nepal. *Bulletin of the National Science Museum* 15(3): 67-79.
- WETZEL, R. G. & G. E. LIKENS. 1991. *Limnological Analyses*. Springer-Verlag, U.S.A., New York. 391 p.
- XLSTAT. 2004. *XLSTAT-Pro. User's Manual*. Addinsoft, Paris, France. 230 p.
- Recibido:* 22 de abril del 2012.
- Aceptado:* 4 de octubre del 2012.