



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE  
MÉXICO

---

---

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES IZTACALA

“Caracterización morfológica y molecular de cianobacterias  
provenientes de distintos cuerpos de agua  
de la Ciudad de México”

T E S I S  
QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:  
BIÓLOGA  
P R E S E N T A  
MÓNICA NUNUTSI CAMACHO GALVÁN

DIRECTORA DE TESIS:  
DRA. ROCIO JETZABEL ALCÁNTARA HERNÁNDEZ



Los Reyes Iztacala, Estado de México, 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.



Los Reyes Iztacala a 29 de abril de 2014

**DRA. PATRICIA D. DAVILA ARANDA**  
**DIRECTORA DE LA FES IZTACALA**  
**Presente**

Atención: Lic. Eloy González Fernández  
Jefe de la Unidad de Administración Escolar

Los abajo firmantes, miembros de la Comisión Dictaminadora del trabajo de: **TESIS DE INVESTIGACION**  
Titulado "**Caracterización morfológica y molecular de cianobacterias provenientes de distintos cuerpos de agua de la Ciudad de México**"

Que presenta el (la) pasante de Biología **MONICA NUNUTSI CAMACHO GALVAN** número de cuenta: **30711275-0** Para obtener el título de Biólogo.

Informan que después de haber revisado cuidadosamente el trabajo, consideramos que reúne las características de calidad académica que se requieren para aspirar a la obtención del título citado, razón por la cual otorgamos nuestros **votos aprobatorios** para la presentación del examen profesional correspondiente.

GRADO	NOMBRE	FIRMA	CARGO
DR.	HUGO VIRGILIO PERALES VELA		Presidente
M. EN C.	MARIA GUADALUPE OLIVA MARTINEZ		Vocal
DRA.	ROCÍO JETZABEL ALCANTARA HERNANDEZ		Secretario
DR.	MIROSLAV MACEK		Suplente
DRA.	LUISA ISaura FALCON ALVAREZ		Suplente

Con base en lo anterior solicito su autorización para que los profesores que otorgan los votos aprobatorios funjan como sinodales del examen profesional en el cargo anotado, y a la Administración Escolar otorgue la fecha para la Réplica Oral del trabajo presentado.

**Atentamente**  
**"POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU"**

JEFA DE CARRERA

**DRA. CLAUDIA TZASNA HERNANDEZ DELGADO**

JEFATURA DE  
BIOLOGÍA

Vo. Bo.

**Dra. Patricia D. Dávila Aranda**  
**Directora**



Esta tesis de licenciatura se realizó en el laboratorio de Ecología Molecular y Epigenética del Instituto de Ecología de la Universidad Nacional Autónoma de México bajo la dirección de la Dra. Rocío Jetzabel Alcántara Hernández. Se recibió asesoría y apoyo técnico y académico por parte de la M. en C. Osiris Gaona Pineda y del Biol. Antonio Cruz Peralta. Los apoyos económicos para la adquisición de materiales y reactivos provienen del proyecto del CONACyT registrado con el nombre “Diversidad filogenética y función de comunidades bacterianas” número 151796.

Cada uno da lo que recibe  
y luego recibe lo que da,  
nada es más simple,  
no hay otra norma:  
nada se pierde,  
todo se transforma.

Jorge Drexler,  
inspirado en Antoine Lavoisier.

# ÍNDICE

ÍNDICE DE TABLAS .....	i
ÍNDICE DE FIGURAS .....	ii
ABREVIATURAS .....	iv
RESUMEN.....	v
ABSTRACT .....	v
<b>1. INTRODUCCIÓN .....</b>	<b>1</b>
1.1 CIANOBACTERIA .....	1
1.1.1 Ecología .....	1
1.1.2 Rasgos morfológicos y fisiológicos característicos .....	2
1.1.3 Taxonomía .....	2
1.1.3.1 Aproximaciones botánicas y bacteriológicas .....	2
1.1.3.2 Aproximaciones moleculares.....	3
1.2 COMUNIDADES BACTERIANAS .....	5
1.2.1 Aproximaciones para el estudio dependientes de cultivo .....	5
1.2.2 Aproximaciones para el estudio independientes de cultivo .....	6
1.2.2.1 Electroforesis en geles con gradiente desnaturalizante .....	6
<b>2. ANTECEDENTES .....</b>	<b>8</b>
<b>3. OBJETIVOS .....</b>	<b>9</b>
3.1 OBJETIVO GENERAL .....	9
3.2 OBJETIVOS PARTICULARES .....	9
<b>4. MATERIAL Y MÉTODOS.....</b>	<b>10</b>
4.1 DESCRIPCIÓN DE LOS SITIOS DE ESTUDIO .....	10
4.1.1 Lago del Bosque de Chapultepec.....	11
4.1.2 Pista Olímpica de Remo y Canotaje “Virgilio Uribe”, Cuemanco .....	11
4.1.3 Río Magdalena, Parque Nacional Los Dinamos .....	11
4.1.4 Lago del Parque Tezozómoc.....	11
4.1.5 Laguna de los Reyes Aztecas, Delegación Tláhuac .....	12
4.2 TOMA DE LAS MUESTRAS Y TRABAJO DE CAMPO .....	13
4.3 DETERMINACIÓN DE PARÁMETROS FISICOQUÍMICOS .....	16

4.4 ESTABLECIMIENTO DE CULTIVOS EN EL LABORATORIO .....	16
4.5 CARACTERIZACIÓN MORFOLÓGICA.....	17
4.6 CARACTERIZACIÓN MOLECULAR.....	17
4.6.1 Extracción de DNA .....	17
4.6.2 PCR.....	18
4.6.3 DGGE .....	18
4.6.4 Secuenciación .....	19
4.6.5 Análisis filogenético .....	19
<b>5. RESULTADOS .....</b>	<b>21</b>
5.1 CARACTERIZACIÓN FISICOQUÍMICA DE LOS SITIOS DE ESTUDIO .....	21
5.2 CARACTERIZACIÓN MORFOLÓGICA.....	23
5.3 CARACTERIZACIÓN MOLECULAR.....	28
5.3.1 Huella genética de las comunidades a partir del DGGE.....	29
5.3.2 Análisis filogenético .....	31
<b>6. DISCUSIÓN .....</b>	<b>35</b>
6.1 CARACTERIZACIÓN FISICOQUÍMICA DE LOS SITIOS DE ESTUDIO .....	35
6.2 CARACTERIZACIÓN MORFOLÓGICA DE CIANOBACTERIAS .....	37
6.3 CARACTERIZACIÓN MOLECULAR DE CIANOBACTERIAS .....	40
<b>7. CONCLUSIONES.....</b>	<b>42</b>
<b>8. REFERENCIAS.....</b>	<b>44</b>
<b>9. ANEXOS.....</b>	<b>53</b>
ANEXO I. MEDIO DE CULTIVO BG11 .....	53
ANEXO II. MICROGRAFÍAS DE LOS GÉNEROS ENCONTRADOS.....	54
ANEXO III. GELES DE DGGE OBTENIDOS .....	55

## ÍNDICE DE TABLAS

<b>Tabla 1.</b> Primers específicos para Cianobacterias. Empleados para amplificar y secuenciar fragmentos 16S rDNA.....	18
<b>Tabla 2.</b> Características fisicoquímicas de los sitios de estudio.....	22
<b>Tabla 3.</b> Géneros encontrados mediante la caracterización morfológica.....	23
<b>Tabla 4.</b> Géneros encontrados en cada sitio y muestra, y número de filotipos por sitio.....	28
<b>Tabla 5.</b> Caracterización molecular de los sitios de estudio.....	33



## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Árbol de las relaciones filogenéticas de algunos géneros de cianobacterias, comparado con sus características morfológicas.....	4
<b>Figura 2.</b> Sitios de estudio en el la Ciudad de México .....	10
<b>Figura 3.</b> Fotografías de los sitios de estudio .....	12
<b>Figura 4.</b> Mapa del Lago de Chapultepec y puntos de muestreo.....	13
<b>Figura 5.</b> Mapa de La pista Olímpica de Remo y Canotaje, Cuemanco. ....	14
<b>Figura 6.</b> Mapa del río Magdalena, Parque Nacional Los Dínamos .....	14
<b>Figura 7.</b> Mapa del lago del Parque Tezozómoc.....	15
<b>Figura 8.</b> Mapa de la Laguna de los Reyes Aztecas, Tláhuac .....	15
<b>Figura 9.</b> Medios de cultivo BG11 para cianobacterias en una cámara con ambiente controlado.....	17
<b>Figura 10.</b> Asociaciones entre los sitios mediante análisis de agrupamiento. ....	22
<b>Figura 11.</b> ACP de las variables fisicoquímicas de los sitios de estudio. ....	23
<b>Figura 12.</b> Microfotografías de los géneros encontrados.1. <i>Anabaena</i> sp. 2. <i>Aphanothece</i> sp. 3. <i>Calothrix</i> sp. 4. <i>Chroococcus</i> sp. 5. <i>Cyanothece</i> sp 6. <i>Gloeothece</i> sp. ....	25
<b>Figura 13.</b> Microfotografías de los géneros encontrados. 1. <i>Hapalosiphon</i> sp. 2. <i>Leptolyngbya</i> sp. 3. <i>Limnothrix</i> sp. 4. <i>Lyngbya</i> sp. 5. <i>Microchaete</i> sp. 6. <i>Microcystis</i> sp. ....	26
<b>Figura 14.</b> Microfotografías de los géneros encontrados 1. <i>Oscillatoria</i> sp. 2. <i>Plectonema</i> sp. 3. <i>Pseudanabaena</i> sp. 4. <i>Synechococcus</i> sp. 5. <i>Synechocystis</i> sp. 6. <i>Tolypothrix</i> sp. ....	27
<b>Figura 15.</b> Secciones de los geles de DGGE correspondientes a los sitios de Chapultepec y Los Dínamos .....	30
<b>Figura 16.</b> Secciones de los geles de DGGE correspondientes a Cuemanco .....	30

**Figura 17.** Secciones de los geles de DGGE correspondientes a los sitios de Tezozómoc y Tláhuac.....31

**Figura 18.** Árbol filogenético construido mediante Máxima Verosimilitud a partir de secuencias de fragmento del gen 16S rRNA (231 pb).....34

## ABREVIATURAS

BSA	Albúmina de Suero Bovino (por sus siglas en inglés <i>Bovine Serum Albumin</i> )
CaCl <sub>2</sub>	Cloruro de Calcio
Co(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>	Nitrato de Cobalto (III)
DGGE	Electroforesis en gel con gradiente desnaturalizante ( <i>Denaturing Gradient Gel Electrophoresis</i> )
DMSO	Dimetil Sulfóxido
DNA	Ácido desoxirribonucleico
EDTA	Ácido etilendiaminotetraacético
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	Fosfato de potasio di-básico
MgCl <sub>2</sub>	Cloruro de Magnesio
MgSO <sub>4</sub>	Sulfato de Magnesio
ML	Máxima Verosimilitud ( <i>Maximum Likelihood</i> )
MnCl <sub>2</sub>	Cloruro de Manganeso (II)
msnm	Metros sobre el nivel del mar
Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub>	Molibdato de Sodio
NaCl	Cloruro de Sodio
Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>	Carbonato de Sodio
NaNO <sub>3</sub>	Nitrato de Sodio
NJ	Neighbor-Joining
pb	Pares de Bases
PCR	Reacción en Cadena de la Polimerasa
pH	Potencial de Hidrógeno
RFLPs	Polimorfismos de Longitud de Fragmentos de Restricción ( <i>Restriction Fragment Length Polymorphism</i> )
rRNA	Ácido ribonucleico ribosomal
Tris-HCl	Tris(hidroximetil)aminometano hidrocioruro
ZnSO <sub>4</sub>	Sulfato de Zinc
μl	microlitros
μm	micrometros
μM	micromolar
ml	mililitros
mm	milímetros
mM	milimolar

## RESUMEN

Las cianobacterias son bacterias fotosintéticas muy importantes para el desarrollo de la vida en la Tierra desde hace millones de años. Habitan todos los ecosistemas y dentro de sus funciones están la fijación de CO<sub>2</sub> y N<sub>2</sub>, así como la producción de O<sub>2</sub>. Su estudio en los cuerpos de agua urbanos es esencial por formar parte del fitoplancton y sostener las redes alimenticias en estos ambientes, además de sus implicaciones en la salud pública por su producción de compuestos tóxicos o cianotoxinas. Los estudios de caracterización empleando enfoques polifásicos ayudan a obtener mayor información sobre la comunidad de estudio y establecer una taxonomía que refleje las relaciones evolutivas de los grupos de organismos.

Se realizó la caracterización morfológica y molecular (utilizando el fragmento del gen 16S rRNA) de cianobacterias de los cuerpos de agua del lago del Bosque de Chapultepec 1ra sección; de la Pista Olímpica de Remo y Canotaje “Virgilio Uribe”, Cuemanco; del río Magdalena en el Parque Nacional Los Dínamos; del lago del Parque Tezozómoc y de la laguna de los Reyes Aztecas, Delegación Tláhuac, durante la estación seca del año. Para ello, se determinaron los parámetros fisicoquímicos de los sitios y se obtuvieron muestras ambientales y cultivadas para su estudio. Las cianobacterias se caracterizaron por rasgos morfológicos, empleando claves para la asignación a nivel de género; mientras que para la caracterización molecular, se usó la técnica de electroforesis en geles con gradiente desnaturante para determinar la huella genética y separar los filotipos dominantes. Posteriormente, se secuenciaron e identificaron comparando contra los datos reportados en las bases de datos públicas para obtener secuencias de referencia y construir un árbol filogenético.

Se registraron un total de 18 géneros en los sitios de estudio, con cianobacterias pertenecientes a los órdenes Nostocales, Chroococcales, Stigonematales y Oscillatoriales. La mayor riqueza de géneros identificados por morfología se encontró en Cuemanco, con nueve géneros diferentes y la menor en Chapultepec con solo tres. La mayoría de los puntos de colecta mostraron al nitrógeno como elemento limitante para el crecimiento del fitoplancton. Además se reportaron para Tláhuac los primeros datos sobre la composición de cianobacterias.

Al usar las técnicas moleculares se puede observar en general una alta variabilidad espacial en los sitios y el sesgo que existe al cultivar en el laboratorio. También se pudieron identificar las cianobacterias provenientes de muestras ambientales y en cultivos de los cuerpos de agua muestreados con base en las secuencias 16S rRNA obtenidas. La topología del árbol filogenético mostró dos grupos principales en los cuales el orden Nostocales se mantuvo en uno y las secuencias se agruparon siguiendo su clasificación taxonómica en los grupos más internos.

## ABSTRACT

Cyanobacteria are bacteria capable of oxygenic photosynthesis that have played an important role in life's evolution on Earth since millions of years ago. They exist in every ecosystem and among other biogeochemical functions, they can fix CO<sub>2</sub> and N<sub>2</sub>. The study of cyanobacteria in urban water bodies is essential since these microorganisms are part of the phytoplankton and support the trophic chains in these environments, while having also an impact on public health. Polyphasic approaches to study the environmental diversity of bacteria are useful to obtain more information about the community and to establish a more reliable taxonomy that reflect the evolutionary relationships among these groups of organisms.

Molecular and morphological characterization (using the 16S rRNA gene fragment) of cyanobacteria in urban water bodies was made at the 1<sup>st</sup> section of the Lake of Chapultepec; Olympic Rowing and Canoeing Track "Virgilio Uribe" (Cuemanco); Magdalena river at the Parque Nacional Los Dinamos; Tezozomoc Park lake; Los Reyes Aztecas lagoon (Tláhuac); during the dry season of the year. Physicochemical parameters of the mentioned sites were determined and environmental and enriched samples were obtained. Cyanobacteria were identified based on morphological traits at a genus level using previously reported manuals. 16S rDNA fragments were also amplified and analysed by a fingerprinting technique (DGGE). The obtained phylotypes were sequenced and identified using public databases to obtain reference sequences and construct a phylogenetic tree.

The presence of Nostocales, Chroococcales, Stigonematales and Oscillatoriales were found on the sampled sites. Cuemanco was the place with the highest richness of identified genus by morphology, with nine different genus both, Chapultepec and Cuemanco sites, showed a similar physicochemical condition that reflects their eutrophic state. In addition, the lowest diversity in phylotypes found by molecular techniques was associated to these sites.

# 1. INTRODUCCIÓN

## 1.1 CIANOBACTERIA

Las cianobacterias son procariontes fotosintéticos capaces de emplear moléculas de agua ( $H_2O$ ) como donador electrónico para generar energía, proceso en el cual liberan oxígeno ( $O_2$ ) al ambiente, y como característica emplean clorofila *a* (Whitton y Potts, 2000).

Hace 3,500 millones de años existían ya microorganismos muy parecidos a las cianobacterias. Sus microfósiles quedaron registrados en los estromatolitos de la Formación de Warrawoona, Australia; aunque pudieron haber aparecido antes sobre la Tierra (Schopf, 1993; Lazcano y Miller, 1994). Debido a que las cianobacterias fueron los primeros microorganismos capaces de realizar fotosíntesis oxigénica, se consideran las responsables de la acumulación de oxígeno en la atmósfera terrestre hace aproximadamente 2,300 millones de años, lo cual fue un requerimiento para la evolución de formas de vida con un metabolismo aerobio (Dismukes *et al.* 2001; Bekker *et al.* 2004).

### 1.1.1 Ecología

Gracias a sus capacidades de adaptación a intensidades muy variables de luz, a su efectiva absorción de nutrientes presentes a bajas concentraciones y a su tolerancia a la desecación y a la radiación ultravioleta, las cianobacterias pueden encontrarse en todo tipo de ecosistemas e incluso en ambientes extremos como manantiales termales, ambientes hipersalinos y desiertos (Montejano, 1998; Whitton y Potts, 2000).

Sus funciones ambientales son la fijación de dióxido de carbono ( $CO_2$ ) y nitrógeno atmosférico ( $N_2$ ), los cuales son aprovechables para otros organismos que asimilan las formas orgánicas de estos compuestos y los integran a su metabolismo y biomasa. En los sistemas acuáticos, son unas de las principales aportadoras de nitrógeno. Y debido sus capacidades de obtener nutrientes y sostener las cadenas tróficas en una serie de ambientes, principalmente acuáticos, las cianobacterias son importantes no sólo para los microorganismos quimiotróficos que dependen de su actividad metabólica, sino también para los organismos en interacciones simbióticas como plantas, animales y hongos (Atlas y Bartha, 2002).

Sin embargo, los crecimientos masivos de estos organismos (“blooms”), generan serios problemas en los ambiente acuáticos. En la ecología de los ecosistemas, los procesos de eutrofización conllevan a la desestabilización de las cadenas tróficas. Desde un punto de vista antropogénico, estos crecimientos masivos son

importantes en la salud pública, ya que muchas especies de cianobacterias pueden producir toxinas y alterar la calidad del agua (Whitton y Potts, 2000).

### 1.1.2 Rasgos morfológicos y fisiológicos característicos

Estos organismos muestran una amplia diversidad morfológica, pueden ser unicelulares o filamentosas, presentarse aisladas o agrupadas en colonias, y con estructuras como acinetos, baeocitos, heterocistos, hormogonios o vacuolas de gas (Whitton y Potts, 2000; Ramírez *et al.*, 2004). Su tamaño celular varía entre 2 y 20  $\mu\text{m}$ , presentan una coloración azul-verdosa debido a los pigmentos fotosintéticos como la ficocianina y la ficoeritrina, aunque pueden ser también color marrón; son organismos Gram-negativos y algunas especies poseen una vaina formada por mucilago (Montejano, 1998; Bellinger y Sigee, 2010).

### 1.1.3 Taxonomía

#### 1.1.3.1 Aproximaciones botánicas y bacteriológicas

Inicialmente, la asignación taxonómica de las cianobacterias fue objeto de estudio de botánicos y ficólogos ya que eran tratadas como algas, por lo que su taxonomía se basaba en características morfológicas y su nomenclatura se encontraba en el Código Internacional de Nomenclatura Botánica, donde cada especie nueva debía tener un ejemplar de herbario como referencia (Wilmotte, 2004). La clasificación que sigue este esquema es la propuesta por Gleiter (1932); con base en él se describieron muchas especies a partir de organismos colectados. Pero Drouet en 1968, redujo drásticamente el número de especies basándose en su idea sobre la existencia de “ecofenos”, que son organismos que comparten el mismo genotipo pero expresan distintas morfologías bajo la influencia de factores ambientales. La última modificación de este esquema fue la de Komárek y Anagnostidis (Anagnostidis y Komárek, 1985, 1988, 1990; Komárek y Anagnostidis, 1986, 1989) quienes usan características morfológicas, ultraestructurales y fisiológicas entre otras para distinguir a los grupos principales.

Fue con técnicas como la microscopía electrónica y los análisis bioquímicos que se pudo demostrar que las cianobacterias eran bacterias (Wilmotte, 2004), entonces se empezó a usar la nomenclatura del Código Internacional de Nomenclatura de Bacterias y la referencia para cada especie debía ser un cultivo puro en lugar de un espécimen de herbario. La base de la taxonomía bacteriana de las cianobacterias fue publicada por Rippka *et al.* (1979) y es la que sigue el Manual de Bergey de Sistemática Bacteriológica, dividiendo al grupo en cinco órdenes: Chroococcales, Pleurocapsales, Oscillatoriales, Nostocales y Stigonematales (Castenholz, 2001).

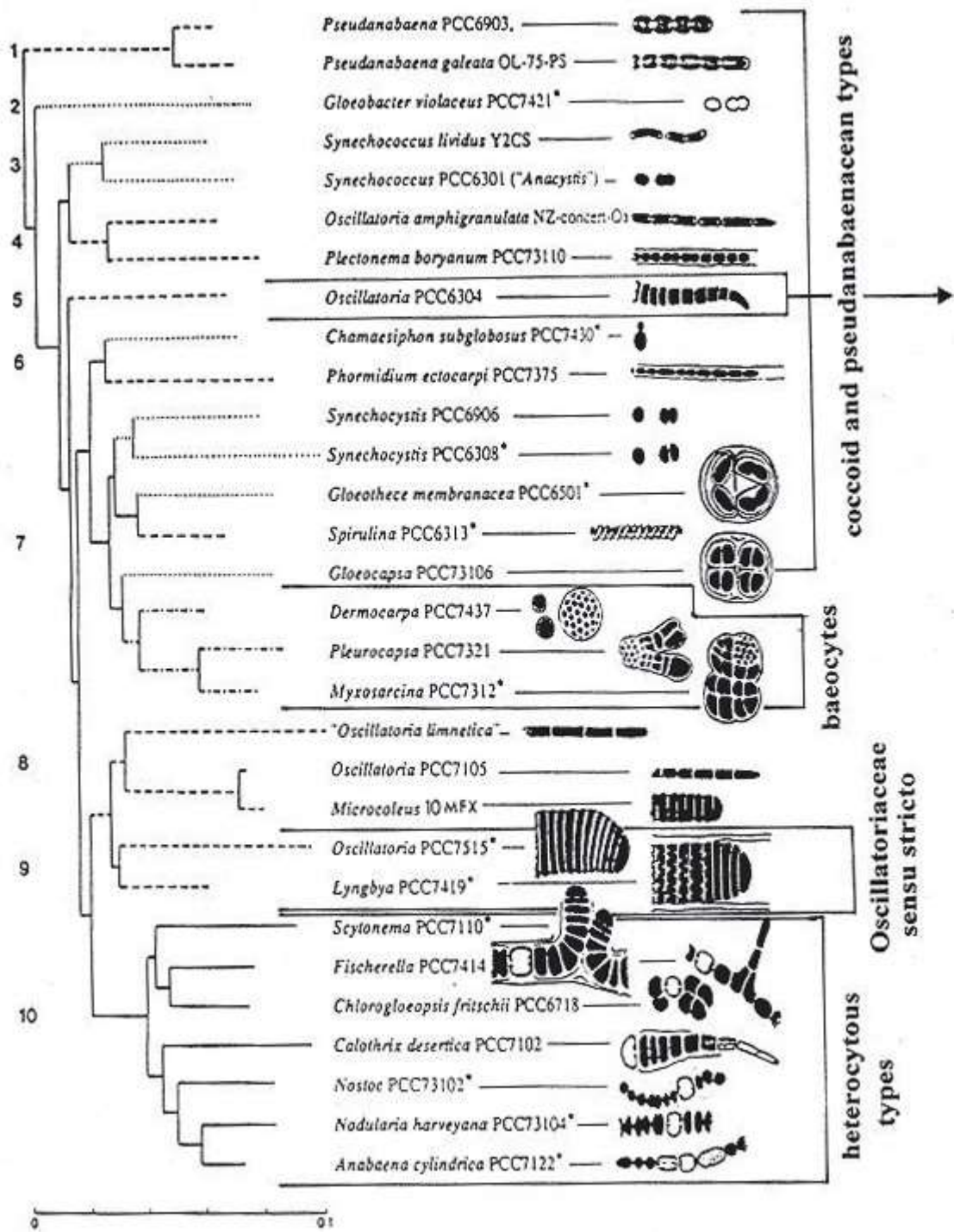
### 1.1.3.2 Aproximaciones moleculares

Recientemente se busca en la taxonomía un enfoque que refleje las relaciones evolutivas de los grupos de organismos. Y las mejores herramientas de inferencia filogenética son los ácidos nucleicos y proteínas, ya que son copias o traducciones de la información genética. Distintos métodos se han utilizado para definir estas relaciones en las cianobacterias, por ejemplo patrones de proteínas en geles de electroforesis, estudios inmunológicos, RFLPs (Polimorfismos de Longitud de Fragmentos de Restricción), composición nucleotídica de DNA e hibridaciones de DNA (Herdman *et al.* 1979; Stam, 1980; Holton, 1981; Ladha y Watanabe, 1982; Douglas y Carr, 1988). Pero la molécula más ampliamente usada para el estudio de la taxonomía con un enfoque evolutivo ha sido el 16S rRNA (Woese, 1987).

La molécula 16S rRNA tiene las siguientes propiedades: i) es universal y evolucionó en una etapa muy temprana del origen de la vida, ii) su función en la síntesis de proteínas es esencial para la vida celular, iii) posee regiones variables y regiones conservadas y iv) en teoría no hay evidencia de transferencia horizontal para este carácter. Para las eubacterias, los análisis de las secuencias del 16S rRNA son usados para determinar un amplio intervalo de relaciones, desde filo hasta especie (Wilmotte, 2004). Se han diseñado “primers” (oligonucleótidos iniciadores de PCR) específicos para cianobacterias (Nübel *et al.* 1997), lo cual permite la amplificación selectiva de sus secuencias, inclusive a partir de un cultivo mixto, contaminado o de muestras ambientales. Además, se han construido modelos de estructura secundaria de esta molécula para análisis comparativos con base en técnicas químicas y enzimáticas (De Rijk *et al.* 1992).

Wilmotte (2004) expone un análisis molecular de los géneros del filo Cyanobacteria, mostrando ocho grupos principales de cianobacterias y describiendo la morfología característica de cada grupo (Fig. 1). Allí, se muestran a las cianobacterias que poseen heterocistos como un grupo definido. Estudios recientes muestran que el arreglo principal de tilacoides (parietal contra radial o irregular) es muy estable para diferentes grupos genéticos caracterizados por 16S rRNA (Komárek, 2006).





**Figura 1.** Árbol de las relaciones filogenéticas de algunos géneros de cianobacterias, comparado con sus características morfológicas. Basado en los datos de secuencias de RNA de Giovannoni et al. (1988). Tomado de Komárek, 2006.

## 1.2 COMUNIDADES BACTERIANAS

Las comunidades bacterianas son parte fundamental de los ecosistemas ya que constituyen una importante fracción de la actividad metabólica en los procesos ecológicos globales (Atlas y Bartha, 2002). Son parte substancial de la biomasa terrestre y se encuentran en cualquier parte del planeta, inclusive bajo las condiciones más extremas (Withman *et al.*, 1998).

Para estudiar a las comunidades microbianas, como en cualquier comunidad, se requiere conocer el conjunto de especies que coexisten en un lugar y tiempo (Begon *et al.* 1986). Aunque, en los organismos procariontes el concepto de especie sigue en discusión, éste se puede describir como “un grupo monofilético y genómicamente coherente de organismos individuales que muestran un alto grado de similitud total en muchas características independientes” (Roselló-Mora y Amann, 2001).

### 1.2.1 Aproximaciones para el estudio dependientes de cultivo

A finales del siglo XIX se desarrolló un enfoque del estudio de la estructura de las comunidades bacterianas en distintos ambientes basado en las técnicas dependientes de cultivo (Al-Awadhi *et al.* 2013). Ya que la morfología de los microorganismos es simple, no permite de una clasificación profunda ni una identificación fiable basándose en estos caracteres. Por eso la identificación microbiana requería el aislamiento de cultivos puros seguidos por múltiples pruebas de caracterización fisiológica y bioquímica (Amann *et al.* 1995; Pace, 1997).

Técnicas muy utilizadas eran el conteo de “unidades formadoras de colonias” y el “número más probable” para la cuantificación de microorganismos activos en muestras ambientales. Sin embargo, estas técnicas tienen serias limitaciones debido a la selectividad de los medios de cultivo. Y en muchas ocasiones, los conteos microscópicos directos excedían el conteo de células viables por muchos órdenes de magnitud. De esta manera, no eran evidentes las especies conocidas en condiciones no óptimas o que habían entrado en un estado incultivable y especies desconocidas que nunca habían sido cultivadas antes por falta de métodos apropiados (Amann *et al.* 1995)

Esta estrategia condujo a muchos avances en la microbiología, a pesar de sus limitaciones. Actualmente, la mayor ventaja de este tipo de técnicas en las aproximaciones moleculares es proveer al investigador con material que puede utilizar en estudios más extensos (Al-Awadhi, 2013).

## 1.2.2 Aproximaciones para el estudio independientes de cultivo

En 1986, investigadores como Olsen *et al.* emplearon técnicas moleculares para identificar a los microorganismos directamente de las muestras ambientales, sin el sesgo de los cultivos de laboratorio (Pace *et al.* 1986). Estas técnicas se basaron en la variabilidad genética entre cada especie de microorganismo y se enfocaron en el RNA ribosomal (rRNA); permitiendo la clasificación rápida de grupos de cepas. Sin embargo, el valor práctico de las figuras generadas mediante estas técnicas (árboles filogenéticos) depende de determinar caracteres fenotípicos que puedan ser usados para describir la similitud de DNA de los grupos, así como señalar las características fenotípicas que pueden ser usadas para identificar nuevas cepas fácil, rápida y confiablemente. Por lo tanto, no se pueden dejar de lado los estudios tradicionales de fisiología y morfología aunados a la caracterización molecular de los microorganismos (Roselló-Mora y Amann, 2001).

Existen distintas técnicas independientes de cultivo para el estudio de las comunidades bacterianas. Algunas de ellas son los polimorfismos de conformación de cadena simple (SSCP), los polimorfismos de longitud de fragmentos de restricción (RFLP), los polimorfismos de longitud de fragmentos de restricción (T-RFPL) y la reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real o cuantitativa (qPCR). Pero el más ampliamente usado es la electroforesis en gel con gradiente desnaturizante/de temperatura. Aunque, no todos los estudios que usan simultáneamente los métodos tradicionales dependientes de cultivo junto con técnicas moleculares obtienen los mismos resultados (Al-Awadhi, 2013).

Actualmente se desarrollan nuevos campos de investigación como la metagenómica, metatranscriptómica y la metaproteómica con la ayuda de métodos de secuenciación de nueva generación. Lo cual ha permitido un gran avance en los campos de la ecología microbiana y la microbiología ambiental (Su *et al.* 2013).

### 1.2.2.1 Electroforesis en geles congradiante desnaturizante

La electroforesis en gel con gradiente desnaturizante o DGGE por sus siglas en inglés es uno de los métodos de identificación de comunidades bacterianas mediante “huellas genéticas” (fingerprinting methods). Fue aplicado por primera vez por Muyzer *et al.* en 1993, con la ventaja de ser un método independiente de cultivo que tenía el potencial de estudiar la microbiota rápidamente (Muyzer *et al.* 1993).

Este tipo de métodos proveen una visión general de la comunidad bacteriana, de su diversidad y del tipo de procesos metabólicos que ocurren en dicha comunidad. Además, tienen aplicaciones potenciales en monitoreos ambientales e

identificando microorganismos potencialmente relacionados a compuestos químicos provenientes de actividades industriales o energéticas. También son usados para evaluar el desempeño de una estrategia de biorremediación por ejemplo (ITRC, 2011).

El DGGE es una técnica que se basa en ácidos nucleicos (DNA o RNA) para generar una huella genética de la comunidad microbiana e identificar microorganismos dominantes. Los perfiles de DGGE son muy comúnmente usados para comparar diferencias o cambios en la diversidad y estructura de la comunidad microbiana entre muestras de diferentes tiempos o espacios o en respuesta a un tratamiento. Usualmente se compone de cuatro pasos: 1) extracción de DNA o RNA, 2) amplificación por PCR (genera múltiples copias de una región dentro de un gen seleccionado), 3) separación y visualización y 4) identificación de secuencias. En la PCR, una región variable de un gen es seleccionada. De este modo, es diferente en cada tipo de bacteria, generando una mezcla de fragmentos de genes que representan a las especies presentes en las muestras originales. Una vez que se obtienen las bandas en el gel, éstas son cortadas, reamplificadas y su secuencia es determinada y comparada con las bases de datos para identificar a que población microbiana corresponde cada banda. Los datos generados son usados para saber qué microorganismos están presentes y cómo están relacionados con las condiciones ambientales (Muyzer *et al.* 1993; Muyzer y Smalla, 1998).

## 2. ANTECEDENTES

Estudios previos en lagos urbanos han estado mayormente enfocados a la identificación de toxinas producidas por “blooms” de cianobacterias, pero pocos describen la comunidad de cianobacterias que se puede encontrar en estos ambientes (Arzate, 2006; Pineda, 2009; Arzate *et al.* 2010; Vasconcelos *et al.* 2010). Paralelamente, el aislamiento de estas cepas, puede ayudar a entender mejor su fisiología y cómo impactan en los sistemas acuáticos de los que provienen.

Alcocer *et al.* (1988) estudiaron el efecto del drenado en el estado trófico de del Lago de Chapultepec y en la caracterización de las cianobacterias presentes reportó *Microcystis aeruginosa*, *Anabaena cf. elenkinii* y *Oscillatoria cf. rubescens* (Alcocer *et al.* 1988). Cantoral *et al.* (1999) realizaron un estudio de algas indicadores de la calidad de agua en el Río Magdalena (Los Dínamos) encontrando siete géneros: *Chamaesiphon sp.*, *Lyngbya sp.*, *Mantellum sp.*, *Myxosarcina sp.*, *Nostoc sp.*, *Oscillatoria sp.* y *Phormidium sp.*

Komárek y Komárkova en 2002 hicieron un estudio sobre las cianobacterias de la región central de México encontrando las especies *Aphanocapsa incerta*, *Microcystis aeruginosa*, *M. panniformis*, *M. novacekii*, *M. cf. protocystis*, *Synechocystis endophytica*, *Planktothrix agardhii*, *Pseudanabaena mucicola*, *Anabaena fallax* y *A. tanganyikae* para el lago de Chapultepec.

Para el Lago de Tezozómoc, uno de los primeros estudios reportados en el área fue el de Oliva *et al.* (2008). En éste, se hizo un estudio de la composición y dinámica anual del fitoplancton del Lago de Tezozómoc durante 2003 y 2004, encontrando al menos cuatro géneros de cianobacterias: *Merismopedia*, *Microcystis*, *Anabaena* y *Spirulina*. Un estudio más enfocado a la detección de *Microcystis sp.* verificó la presencia de este género en el Lago de Chapultepec, en la Pista Olímpica de Remo y Canotaje (PORC) “Virgilio Uribe”, en Alameda Oriente y en el Lago del Bosque de Aragón (Arzate-Cárdenas *et al.* 2010).

Pineda-Mendoza *et al.* (2011) exploró la diversidad de las cianobacterias cultivables en medio BG-11 para encontrar otros géneros además de *Microcystis*. En muestras de la PORC “Virgilio Uribe” (Cuemanco) se aislaron *Planktothrix agardhii*, *Limnothrix sp.* y una cianobacteria perteneciente al género *Pseudanabaena sp.*, cuya secuencia del fragmento del gen 16S rRNA tenía un 95% identidad a *Spirulina laxissima*. En el lago de Chapultepec (1ª sección) se encontraron los géneros *Leptolyngbya sp.* y *Geitlerinema sp.* por métodos morfológicos y a las especies *Leptolyngbya tenerrima*, *L. boryana* y *Geitlerinema carotinosum* mediante métodos moleculares.

### **3. OBJETIVOS**

#### **3.1 OBJETIVO GENERAL**

Caracterizar a las cianobacterias presentes en distintos cuerpos de agua de la Ciudad de México mediante métodos moleculares y morfológicos durante la estación seca del año.

#### **3.2 OBJETIVOS PARTICULARES**

Determinar la diversidad de cianobacterias en diferentes cuerpos de agua urbanos de la Ciudad de México con base en el fragmento del gen 16S rRNA.

Comparar la diversidad e identidad cianobacteriana ambiental con cianobacterias aisladas de los cuerpos de agua muestreados.

Determinar las relaciones filogenéticas de las cianobacterias encontradas en las muestras ambientales y las muestras aisladas.

## 4. MATERIAL Y MÉTODOS

### 4.1 DESCRIPCIÓN DE LOS SITIOS DE ESTUDIO

Para el presente estudio, cinco cuerpos de agua fueron muestreados (Figs. 2 y 3) en la Ciudad de México ( $19^{\circ}25'10''$  N,  $99^{\circ}8'44''$  O). Esta ciudad se encuentra a una altura de 2,240 msnm en promedio y se caracteriza por tener un clima variado siendo templado en la parte centro y sur (temperaturas entre  $10^{\circ}$  y  $22^{\circ}$  °C y precipitaciones de 600 a 1000 mm en promedio durante el año), y seco de tipo estepa en la parte norte y oriente (precipitaciones de 300 a 600 mm anuales, temperaturas promedio de entre  $18^{\circ}$  y  $26^{\circ}$  °C) (Jáuregui, 2000).

Los sitios de muestreo seleccionados fueron:

1. El lago del Bosque de Chapultepec 1<sup>ra</sup> sección (Ch).
2. La Pista Olímpica de Remo y Canotaje “Virgilio Uribe”, en Cuemanco (Cu).
3. El río Magdalena, en el Parque Nacional Los Dínamos (Di).
4. El lago del Parque Tezozómoc (Te).
5. La laguna de los Reyes Aztecas, Delegación Tláhuac (Tla).



**Figura 2.** Sitios de estudio en el la Ciudad de México. 1. Lago de Chapultepec (Ch), 2. Pista Olímpica de Remo y Canotaje, Cuemanco (Cu), 3. Los Dínamos (Di), 4. Lago del Parque Tezozómoc (Te), 5. Laguna de los Reyes Aztecas, Tláhuac (Tla).

#### **4.1.1 Lago del Bosque de Chapultepec**

Este lago se ubica en la primera sección del Bosque de Chapultepec, al noroeste de la Ciudad de México (19°25'15"N, 99°11'05"O). Es un cuerpo de agua artificial creado a principios del siglo XX y remodelado en el 2006 (FPC, 2012). Su principal uso es el paseo recreativo en lancha. La superficie total que abarca es de 60,240 m<sup>2</sup> y contiene aproximadamente 49,500 m<sup>3</sup> de agua, con una profundidad media de 1 m y con una máxima de 1.8 m (Alcocer *et al.*, 1988). La alimentación del lago proviene principalmente de una planta de tratamiento de aguas residuales de Chapultepec, de agua pluvial y del agua cruda proveniente de los locales comerciales asentados en la periferia (Alcocer *et al.*, 1988).

#### **4.1.2 Pista Olímpica de Remo y Canotaje “Virgilio Uribe”, Cuernavaca**

Se sitúa al sur de la Ciudad de México en la delegación Xochimilco, en las coordenadas 19°16'58"N y 99°06'15"O. El uso de este cuerpo de agua es para prácticas deportivas y pesca recreativa. Su construcción finalizó en julio de 1968, está totalmente recubierta con arcilla y los márgenes están tapizados con grava. Cuenta con una superficie de 600,000 m<sup>2</sup>; el canal principal mide 2,200 m de longitud, 125 m de ancho y 3 m de profundidad. Su influente son aguas tratadas y pluviales (FMC, 2013; Pineda, 2009).

#### **4.1.3 Río Magdalena, Parque Nacional Los Dínamos**

El Río Magdalena es un afluente permanente que se encuentra en el Parque Nacional de Los Dínamos; se localiza en la Delegación Magdalena Contreras, D.F., en las coordenadas 19°16'00"N y 99°18'22"O. Con altitudes que varían de los 2,800 a los 3,170 msnm (INEGI, 1995). Su cauce corre a través de la Sierra del Ajusco en el cual se encuentran asentadas construcciones que en algún momento funcionaron como dínamos (Cantoral *et al.* 2013). Su uso además del abastecimiento de agua potable, es para realizar paseos ecoturísticos y pesca recreativa. En general el suelo de esta zona está compuesto de andosoles derivados de cenizas (Espinosa y Sarukhán, 1997 en Cantoral *et al.* 1999).

#### **4.1.4 Lago del Parque Tezozómoc**

El lago se localiza en el parque Tezozómoc en la delegación Azcapotzalco, D.F. (19°29'58"N y 99°12'36"O). Es un lago artificial que fue inaugurado en 1982 y su uso actual es el paseo recreativo en lancha. La profundidad mínima es de 0.5 m y la máxima de 2.40 m (Arzate, 2008). El agua que lo abastece proviene de la planta de tratamiento de aguas residuales “El Rosario”, operada por la Dirección General de Operación Hidráulica (Pineda, 2009).



#### 4.1.5 Laguna de los Reyes Aztecas, Delegación Tláhuac

Ubicada en el centro de la delegación Tláhuac, al oriente de la ciudad. Forma parte de la red de canales que llegan hasta Xochimilco y se encuentra en las coordenadas  $19^{\circ}15'58''\text{N}$  y  $99^{\circ}00'25''\text{O}$ . Tiene un área de aproximadamente 1.9 hectáreas, siendo uno de los más extensos de la delegación. Su uso es el paseo recreativo en trajinera (lancha) y el abastecimiento de canales para riego (Correa-Basurto *et al.*, 2007; SECTUR, 2013). A partir de 1968, después de haberse secado casi por completo, se puso en marcha un proyecto para alimentar los canales secos con aguas tratadas, traídas de la planta de tratamiento del Cerro de la Estrella (Garcés, 2012).



**Figura 3.** Fotografías de los sitios de estudio. 1. Lago de Chapultepec (Ch), 2. Pista Olímpica de Remo y Canotaje, Cuernavaca (Cu), 3. Los Dinamos (Di), 4. Lago del Parque Tezozómoc (Te), 5 y 6. Laguna de los Reyes Aztecas, Tláhuac (Tla).

## 4.2 TOMA DE LAS MUESTRAS Y TRABAJO DE CAMPO

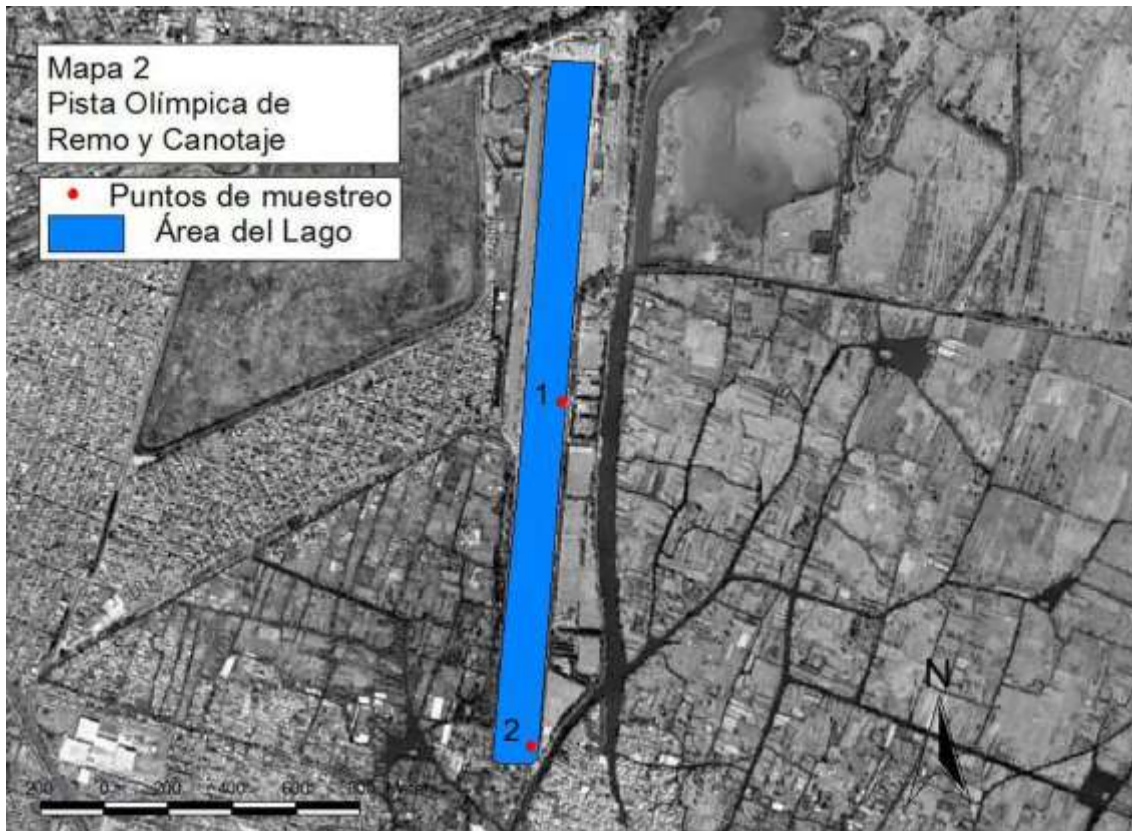
Dos muestreos fueron realizados en los cuerpos de agua. El primero tuvo como objetivo aislar cianobacterias en medio de cultivo BG11 (realizado por Antonio Cruz-Peralta\* en Abril y Mayo del 2012) y un segundo muestreo para caracterizar la comunidad cianobacteriana total por técnicas independientes de cultivo (Mayo 2013). En todos los sitios se tomaron muestras directas del agua superficial de los cuerpos de agua, a excepción de Los Dínamos en donde se hizo un raspado de las rocas del río.

El muestreo directo de agua superficial consistió en tomar dos muestras de 50 ml, en tubos estériles. Mientras que en el muestreo por raspado, se escogieron algunas rocas de río que presentaran crecimiento de cianobacterias, se rasparon con una espátula estéril y el material biológico se depositó en tubos falcón de 50 ml que contenían aprox. 30 ml de agua circundante a las piedras muestreadas. Los puntos exactos de muestreo se muestran en los mapas (Figs. 4-8). Las muestras fueron trasladadas el mismo día al laboratorio en una hielera a 4° C, donde fueron colocadas en medio de cultivo o congeladas a -20° C hasta el momento de extracción de DNA, según fuera el caso.

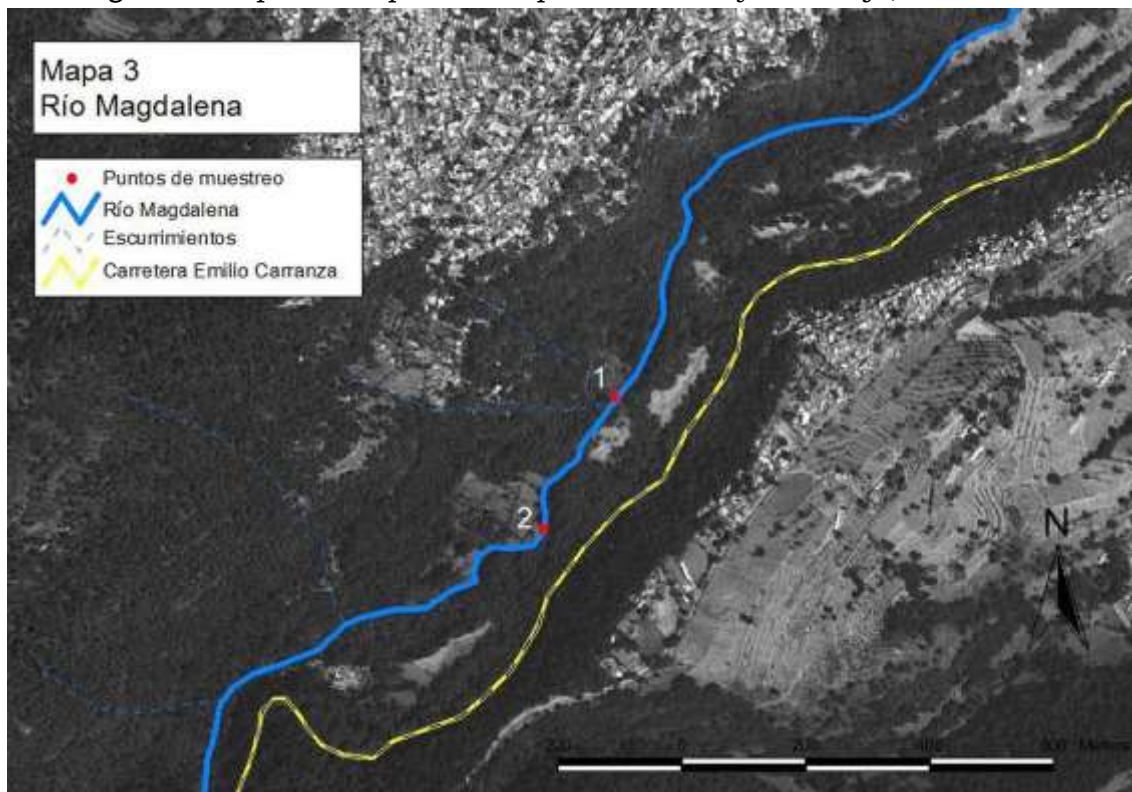


**Figura 4.** Mapa del Lago de Chapultepec y puntos de muestreo.

\* Laboratorio de Ecología Molecular y Epigenética del Instituto de Ecología, UNAM.



**Figura 5.** Mapa de La pista Olímpica de Remo y Canotaje, Cuemanco.



**Figura 6.** Mapa del río Magdalena, Parque Nacional Los Dínamos.

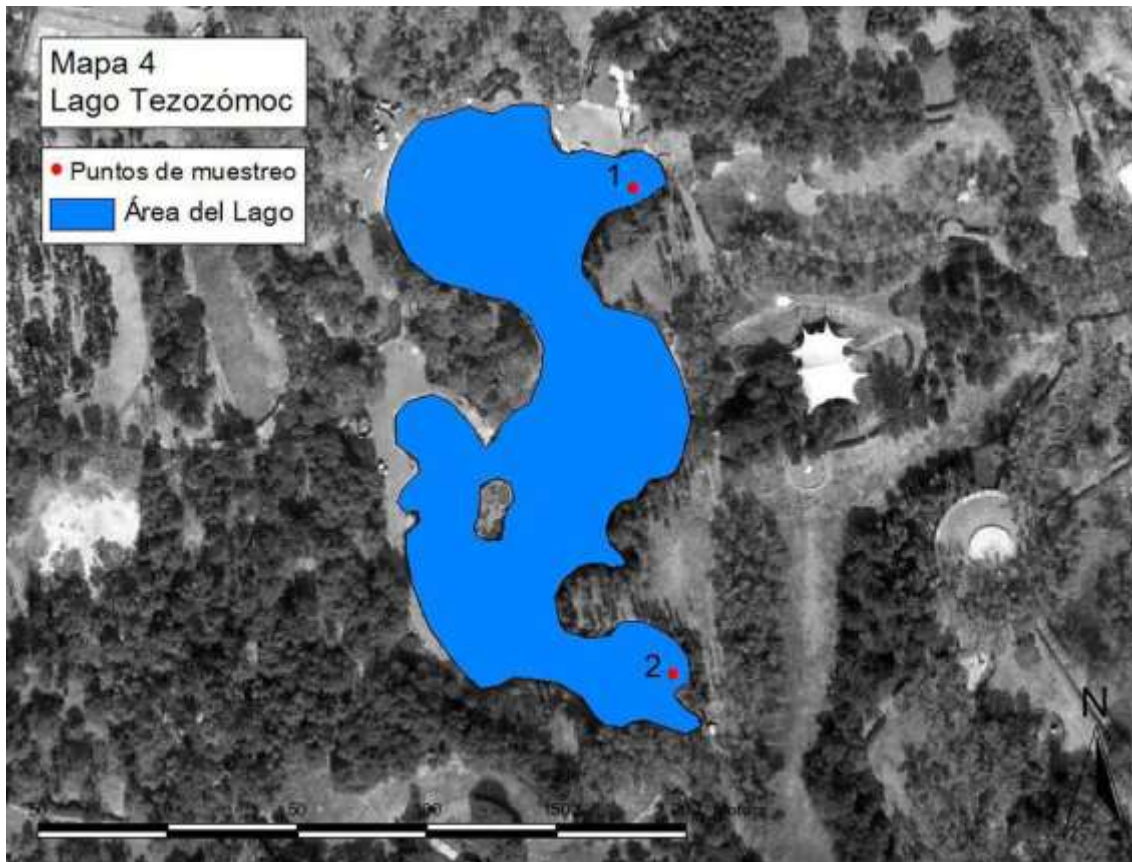


Figura 7. Mapa del lago del Parque Tezozómoc.



Figura 8. Mapa de la Laguna de los Reyes Aztecas, Tláhuac.

Para la caracterización fisicoquímica de los sitios de estudio se midió la temperatura *in situ* con un termómetro de mercurio y se tomaron tres tipos de muestras de agua circundante: i) una muestra de 50 ml para determinar pH, ii) una muestra de 50 ml para nutrientes totales y iii) una muestra de 50 ml para determinar los nutrientes disueltos, para lo cual se filtró secuencialmente con membranas de 0.45  $\mu\text{m}$  y 0.22  $\mu\text{m}$  y se agregó una gota de cloroformo. Las muestras fueron trasladadas al laboratorio en una hielera a 4° C y se congelaron a -20° C hasta su análisis.

#### 4.3 DETERMINACIÓN DE PARÁMETROS FISICOQUÍMICOS

El pH de las muestras se determinó en el laboratorio con un potenciómetro 6231 pH/mV/Temp METER (Jenco Instruments). Los nutrientes totales y disueltos fueron determinados en el laboratorio de Biogeoquímica Acuática del Instituto de Ciencias del Mar y Limnología (UNAM) a cargo del Dr. Martín Merino Ibarra. La concentración de las especies químicas fue determinada por espectrofotometría con un equipo autoanizador Skalar SANplus Segmented Flow (Países Bajos) usando los métodos estándar adaptados por Grasshoff *et al.* (1983) y los circuitos sugeridos por Kirkwood (1994).

Para observar la similitud entre los sitios, se realizó un análisis de disimilitud calculando las distancias euclidianas. Con la matriz de disimilitud se realizó un agrupamiento utilizando la ordenación “Ward” con el programa R versión 3.1.0 (R Core Team, 2012). También se realizó un análisis de componentes principales (ACP) para analizar simultáneamente las distintas variables de los análisis fisicoquímicos y los sitios de estudio. Los vectores (las variables) que quedaron cerca de los sitios significan una relación positiva entre ellos. Para reducir el efecto de la variabilidad por las unidades de cada análisis, se hizo una estandarización (media = 0 y varianza = 1) de los datos previo a hacer el ACP. El ACP fue hecho usando el paquete ‘ade4’ Dray *et al.* (2007) en el programa R version 3.1.0 (R Core Team, 2012). Para la interpretación del PCA se hizo un biplot con los dos principales eigenvector, en los que se almacenó la mayor varianza.

#### 4.4 ESTABLECIMIENTO DE CULTIVOS EN EL LABORATORIO

Varios cultivos se establecieron por Cruz-Peralta bajo condiciones controladas en medio BG11 sólido y líquido para aislar cianobacterias (ver Anexo I). Brevemente, cada muestra ambiental se depositó en un matraz erlenmeyer de 150 ml estéril y se agregó medio BG11 líquido. De allí, submuestras fueron tomadas y plaqueadas en medio sólido BG11. Varios replaqueos se han hecho continuamente de cada

muestra para ir logrando cultivos axénicos en lo posible. Las cepas se mantienen a 29°C, con un ciclo de 12 horas luz-obscuridad y se mantiene la humedad en las cajas Petri agregando el mismo tipo de medio en líquido (Fig. 9).



**Figura 9.** Medios de cultivo BG11 para cianobacterias en una cámara con ambiente controlado.

#### 4.5 CARACTERIZACIÓN MORFOLÓGICA

Se realizaron preparaciones en fresco de las muestras ambientales y de las aisladas. Las preparaciones fueron observadas en campo claro con un microscopio Primo Start Zeiss (Carl Zeiss), del cual además se realizó un registro fotográfico. Paralelamente, se realizaron preparaciones con tinta china para observar el mucilago circundante. Se caracterizaron los organismos hasta el nivel de género empleando las claves de Prescott (1970) y Baker *et al.* (2012), confirmando los registros con la base de datos CyanoDB.cz (Komárek & Hauer, 2013). Las observaciones también se realizaron en un fotomicroscopio Olympus modelo ProvisAX70 con la ayuda de la Biol. Ana Isabel Bieler Antolín (Laboratorio de Microcine, Facultad de Ciencias, UNAM) y la M. en C. María Guadalupe Oliva Martínez (Unidad de Morfología y Función, FES Iztacala, UNAM).

#### 4.6 CARACTERIZACIÓN MOLECULAR

##### 4.6.1 Extracción de DNA

Para caracterizar molecularmente las cianobacterias presentes en muestras ambientales o en muestras aisladas, se extrajo DNA de cada muestra, para lo cual se siguió el protocolo de Centeno *et al.* (2012) con ligeras modificaciones.

Aproximadamente 0.2 g de biomasa fresca se resuspendió en 150 µl de buffer de extracción (100 mM Tris-HCl, 20 mM NaCl, 100 mM EDTA pH 8) y se procedió a una serie de lisis enzimáticas y mecánicas siguiendo el protocolo anteriormente mencionado. Las pastillas de DNA obtenidas se resuspendieron en 30 µl de agua grado molecular y se mantuvieron a -20° C hasta su empleo. Se realizaron una serie de diluciones de trabajo que se ajustaran a la concentración adecuada de DNA versus inhibidores de la PCR (reacción en cadena de la polimerasa).

#### 4.6.2 PCR

Para la caracterización molecular, se obtuvieron fragmentos del gen 16S rRNA a partir de la reacción en cadena de la polimerasa. Para ello se emplearon oligonucleótidos iniciadores (“primers”) específicos para esta región en cianobacterias (Tabla 1). Se realizaron reacciones de 25 µl con 2.5 µl de PCR Buffer A (10x, Vivantis), 1 µl de MgCl<sub>2</sub> (50 mM), 1.25µl de BSA (10 mg ml<sup>-1</sup>), 1.25 µl de dimetil sulfóxido (DMSO), 1 µl de cada primer (12.5 µM), 1µl de la mezcla de deoxinucleótidos trifosfato (200 µM), 0.25 µl de Taq polimerasa (5 U µl<sup>-1</sup>, Vivantis) y 10-100 ng del templado de DNA. Las condiciones del PCR fueron: un ciclo inicial de desnaturalización a 94°C por 2 min, seguido de 35 ciclos de: desnaturalización a 94°C por 1 min, alineamiento a 60°C por 1 min y extensión a 72°C por 1 min; y un ciclo de extensión final a 72°C durante 30 min. Para la verificación de la obtención del producto deseado, los fragmentos obtenidos se analizaron por electroforesis en geles de agarosa (1.5%), teñidos con bromuro de etidio.

**Tabla 1.** Primers específicos para cianobacterias. Empleados para amplificar y secuenciar fragmentos de 16S rDNA.

Primer	Secuencia	Referencia
CYA359F	5' GGG GAA TYT TCC GCA ATG GG 3'	Nübel et al., 1997
CYA781R	5' GAC TAC AGG GGT ATC TAA TCC CTT T 3'	Nübel et al., 1997

#### 4.6.3 DGGE

Para obtener un perfil global o “huella” de las comunidades analizadas de cada sitio, los fragmentos obtenidos por PCR (450 pb) fueron separados de acuerdo a su composición empleando la técnica de DGGE (Denaturing Gradient Gel Electrophoresis) en un sistema de DGGE-2001 (CBS Scientific Company, Inc, USA). Los geles poliacrilamida de 15 cm x 20 cm x 1mm fueron hechos con acrilamida-bisacrilamida 7.0 % (37.5:1), TAE 1x (40 mM Tris-Acetate, 1 mM EDTA, pH 8) y con un gradiente 40-60% de agente desnaturalizante,

considerando una mezcla de urea 7M y 40% formamida como 100% desnaturizante. Los geles fueron vertidos con un gradientador de gravedad (GM-40, CBS Scientific Company), y una vez gelificados y cargados con las muestras, se corrieron en cámaras con TAE 0.5x durante 7 h a 200 V (60° C). Los patrones de migración los geles fueron visualizados mediante una tención con SYBR Green 1 Nucleic Acid Gel stain 1:10,000 (v/v) (Sigma-Aldrich, Co.) y digitalizados con un fotodocumentador MiniBIS Pro gel documentation system (DNR Bio-Imaging Systems).

#### 4.6.4 Secuenciación

Tras la electroforesis en geles con gradiente desnaturizante, no solamente se obtuvo el perfil global de cada muestra sino que además se separaron por composición los diferentes ribotipos de cada una de ellas, las cuales se visualizaron como bandas individuales y definidas. Las bandas de DNA de interés fueron cortadas de los geles de DGGE en condiciones asépticas y eluidas en 40 µl de agua grado molecular durante 7 días a 4° C. Las bandas eluidas fueron reamplificadas bajo las condiciones de PCR anteriormente descritas y empleando como templado de la reacción 4 µl de la solución de elución. Los productos de PCR fueron secuenciados en un ABI 3730xl DNA analyser (Applied Biosystems) empleando el primer CYA359F (Tabla 1) por el método de Sanger en la Universidad de Washington (High-Throughput Genomics Center).

#### 4.6.5 Análisis filogenético

Una vez obtenidos los electroferogramas de las secuencias, éstos fueron analizados con el programa FinchTV v.1.4.0. (Geospiza Research Team) y se conservaron las secuencias de buena calidad (i.e. que demostraban picos definidos y sin rasgos de ser de doble naturaleza). Éstas se compararon con la base de datos de nucleótidos GenBank del NCBI (National Center for Biotechnology Information; <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) mediante la herramienta BLAST (Basic Local Alignment Search, Standard Nucleotide BLAST, BLASTN 2.2.27, Zhang *et al.* 2000) y el Ribosomal Database Project (<http://rdp.cme.msu.edu/>). Se seleccionaron las secuencias ambientales y de cepas aisladas más cercanas a las obtenidas y se empelaron para la construcción del árbol.

Posteriormente, se alinearon en total 77 secuencias de 347 pb con el programa SeaView 4.4.2 y MUSCLE (Gouy *et al.*, 2010; Edgar, 2004). Para la filogenia final se usó el método de Máxima Verosimilitud con el modelo de sustitución nucleotídica elegido de acuerdo al criterio de Akaike (Akaike, 1974) y empleando



el programa jModeltest 0.1.1 (Posada, 2008), GTR+G fue el mejor, donde  $\Gamma = 0.5450$  (distribución gamma). El análisis se realizó en la plataforma PhyML 3.0 (Guindon *et al.*, 2010) ATGC South of France bioinformatics plataform (<http://www.atgc-montpellier.fr/phyml/>) con bootstrap de 1000 réplicas. La topología fue confirmada por el método de Neighbor-Joining.

## 5. RESULTADOS

### 5.1 CARACTERIZACIÓN FÍSICOQUÍMICA DE LOS SITIOS DE ESTUDIO

Las características fisicoquímicas obtenidas en este estudio fueron: temperatura, pH, amonio, nitratos, nitritos, nitrógeno total, PRS (fósforo reactivo soluble), fósforo total y sílice de cada punto de muestreo, los datos se muestran en la tabla 2. La temperatura en casi todos los sitios osciló entre los 19°C y los 23°C, a excepción de Los Dínamos en donde fue de 11°C. Se encontró un pH alcalino en la mayoría de los sitios, con excepción también de Los Dínamos en donde fue casi neutro (7.51). Chapultepec y Tezozómoc presentaron los más altos niveles de las formas oxidadas de N, (N-NO<sub>3</sub><sup>-</sup> y N-NO<sub>2</sub><sup>-</sup>) y N-NH<sub>4</sub><sup>+</sup>. Sin embargo, la muestra dos de Tláhuac mostró la mayor cantidad de nitrógeno total (1094.6 µM). Tezozómoc 1 y Tláhuac 1 mostraron altas concentraciones de P-PO<sub>4</sub><sup>3-</sup>, aunque la mayor concentración de fósforo total se presentó en Chapultepec 2. Mientras que Los Dínamos fue el sitio con menor concentración de PRS y N-NH<sub>4</sub><sup>+</sup>, y con valores de N oxidado ligeramente superior a 1 µM. Los valores de sílice variaron entre 663 y 133 µM.

El análisis de agrupamientos dividió los datos en dos grandes grupos: un grupo formado por los sitios Chapultepec-2, Tezozomoc-1, Chapultepec-1 y Tezozomoc-2, siendo estos dos últimos fuertemente relacionados entre sí; y el otro grupo formado por los sitios Tlahuac-1, Cuemanco-1 y Cuemanco-2, siendo estos dos últimos fuertemente relacionados y Tlahuac-2 y Dinamos-2 los cuales también estuvieron fuertemente relacionados (Fig. 10).

El biplot fue realizado con los dos primeros eigenvectores, los cuales acumularon el 50 y el 20 % en el eje 'x' y 'y' respectivamente (Fig. 11). El ACP siguió una relación muy semejante al análisis de clúster. Las variables NT:PT y NT:NID se relacionaron fuertemente entre ellas y se encontraron con los valores más altos en los Dinamos-2 y Tlahuac-2. La variable pH no se relacionó con ninguna variable y sus mayores valores se encontraron en los sitios Cuemanco-1, Tlahuac-1 y Cuemanco-2. Las variables PT:PRS y NT se relacionaron fuertemente entre ellas y se encontraron con los valores más altos en Chapultepec-2. Finalmente, el resto de las variables, que incluye todos los nutrientes inorgánicos, nitrito, nitrato, fósforo, se relacionaron principalmente con los sitios Tezozomoc-1, Tezozomoc-2 y Chapultepec-1.

Tabla 2. Características fisicoquímicas de los sitios de estudio

Sitio	Chapultepec 1	Chapultepec 2	Cuemanco 1	Cuemanco 2	Dinamos 2	Tezozómoc 1	Tezozómoc 2	Tláhuac 1	Tláhuac 2
Temperatura	22°C	20°C	23°C	23°C	11°C	19°C	19°C	23°C	23°C
pH	9.92	8.02	10.56	10.41	7.51	9.41	9.50	9.38	9.40
N-NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> (μM)	73.3	145.2	8.6	7.8	4.2	84.4	75.4	30.9	2.7
N-NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> (μM)	38.9	63.1	12.1	18.6	1.5	104.2	37.8	0.7	1.2
N-NO <sub>2</sub> <sup>-</sup> (μM)	31.3	23.9	1.4	4.2	1.2	72.8	61.9	0.9	1.0
NID	143.5	232.2	22.1	30.5	6.9	261.4	175.1	32.5	5.0
NT (μM)	622.1	710.2	220.9	129.2	435.5	843.9	649.7	355.0	1094.6
PRS (μM)	32.7	16.8	7.4	9.4	5.5	44.1	33.8	41.8	23.1
PT (μM)	92.4	142.5	36.0	24.2	31.5	117.9	117.6	68.8	92.0
Si-SiO <sub>2</sub> (μM)	522	662	366	362	479	663	597	133	186
N:P	4.4	13.8	3.0	3.2	1.2	5.9	5.2	0.8	0.2
NT:PT	6.7	5.0	6.1	5.3	13.8	7.2	5.5	5.2	11.9
NT:NID	4.3	3.1	10.0	4.2	63.5	3.2	3.7	10.9	221.1
PT:PRS	2.8	8.5	4.9	2.6	5.7	2.7	3.5	1.6	4.0

NID=Nitrógeno Inorgánico Disuelto, NT= Nitrógeno total, PRS=Fósforo Reactivo Soluble, PT= Fósforo total.

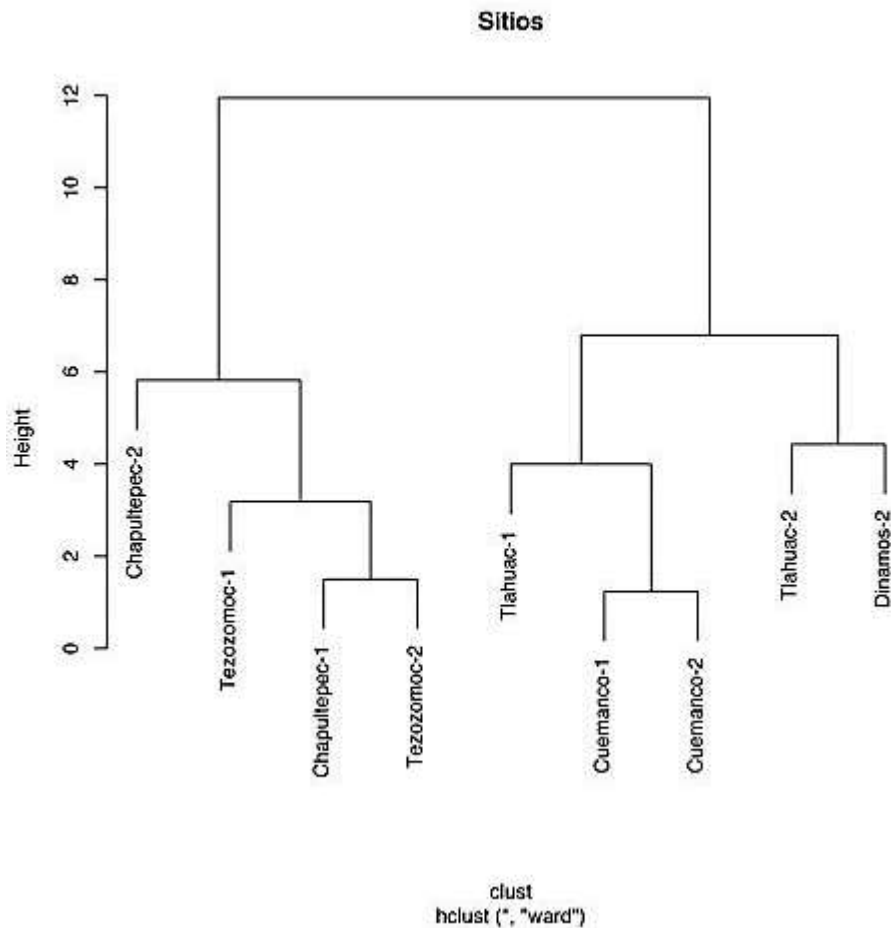


Figura 10. Asociaciones entre los sitios mediante análisis de agrupamiento.

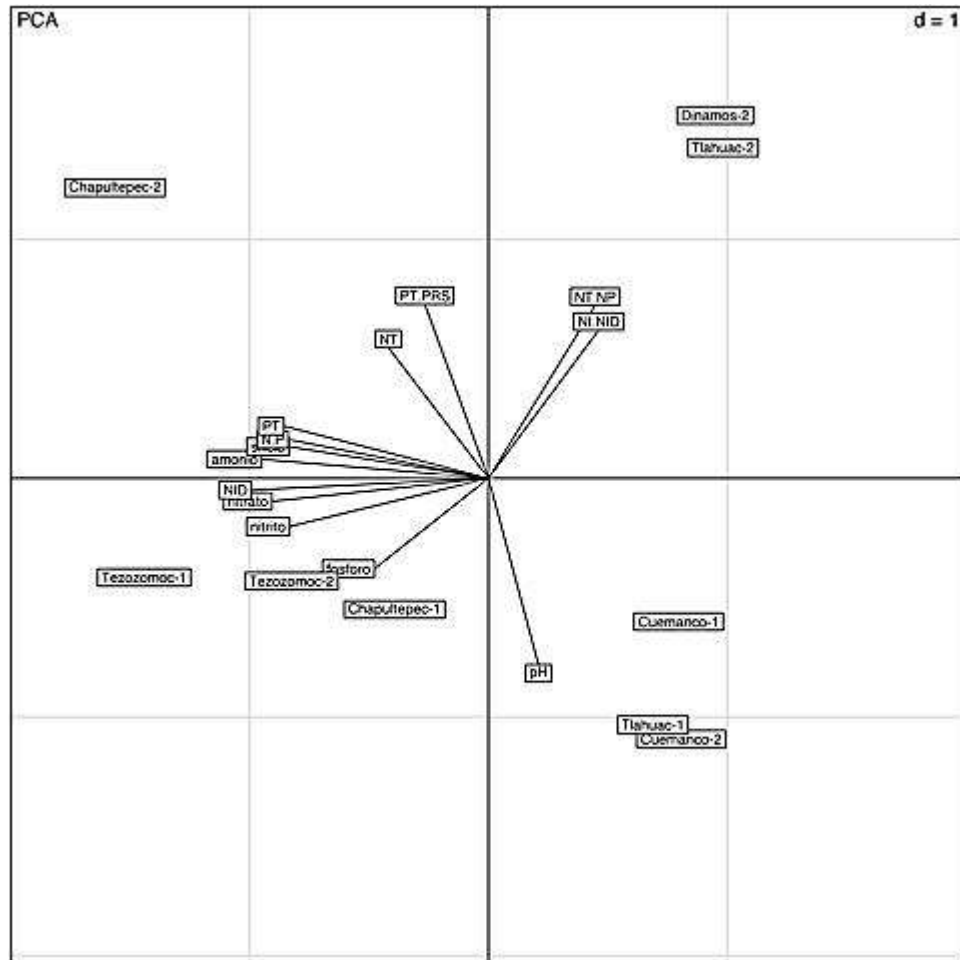


Figura 11. ACP de las variables fisicoquímicas de los sitios de estudio.

## 5.2 CARACTERIZACIÓN MORFOLÓGICA

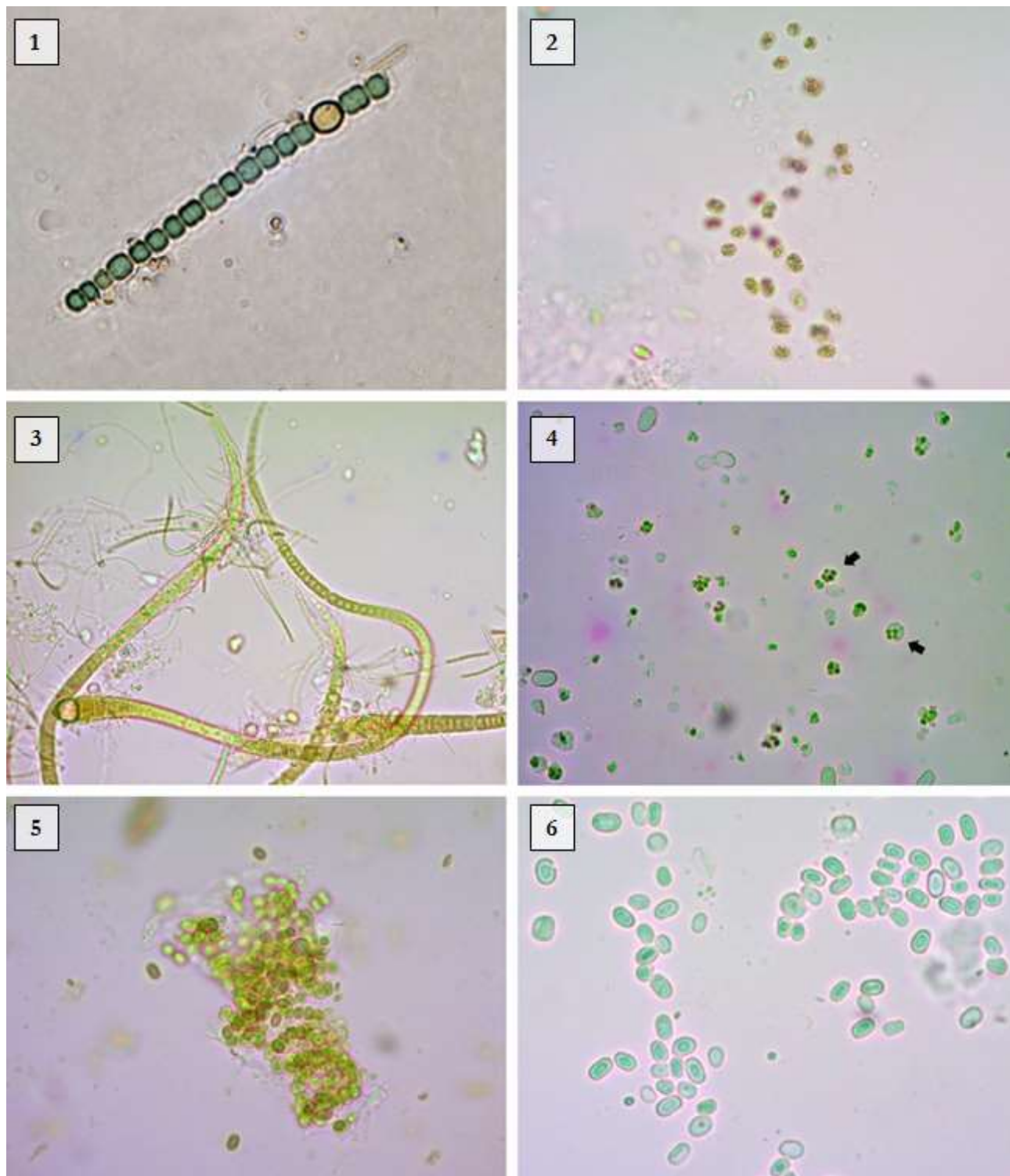
Se realizó la caracterización morfológica de las muestras ambientales y en cultivos de cada sitio. Se encontraron en total 18 géneros distribuidos en cuatro órdenes: Nostocales, Chroococcales, Stigonematales y Oscillatoriales. En la tabla 3 se enlistan todos los géneros encontrados en el estudio junto con una descripción general de su morfología. Las figuras 12, 13 y 14 muestran estos géneros en microscopía de campo claro. Algunos géneros presentaron más de un tipo de morfología (ver Anexo II). La tabla 4 contiene los géneros encontrados en cada muestra o cultivo y el total de géneros por sitio. Estos datos muestran una mayor riqueza en Cuemanco, con nueve géneros diferentes y la menor en Chapultepec con solo tres. *Synechococcus* sp. fue el género con la mayor distribución, encontrándose en los cinco sitios. *Anabaena* sp., *Gloeothece* sp., *Leptolyngbya* sp. y *Pseudanabaena* sp. se encontraron en tres sitios. La abundancia y frecuencia de cada género no se determinó debido a que no se utilizaron técnicas cuantitativas,

aunque por las observaciones microscópicas y de campo se infiere una menor abundancia en los Dínamos.

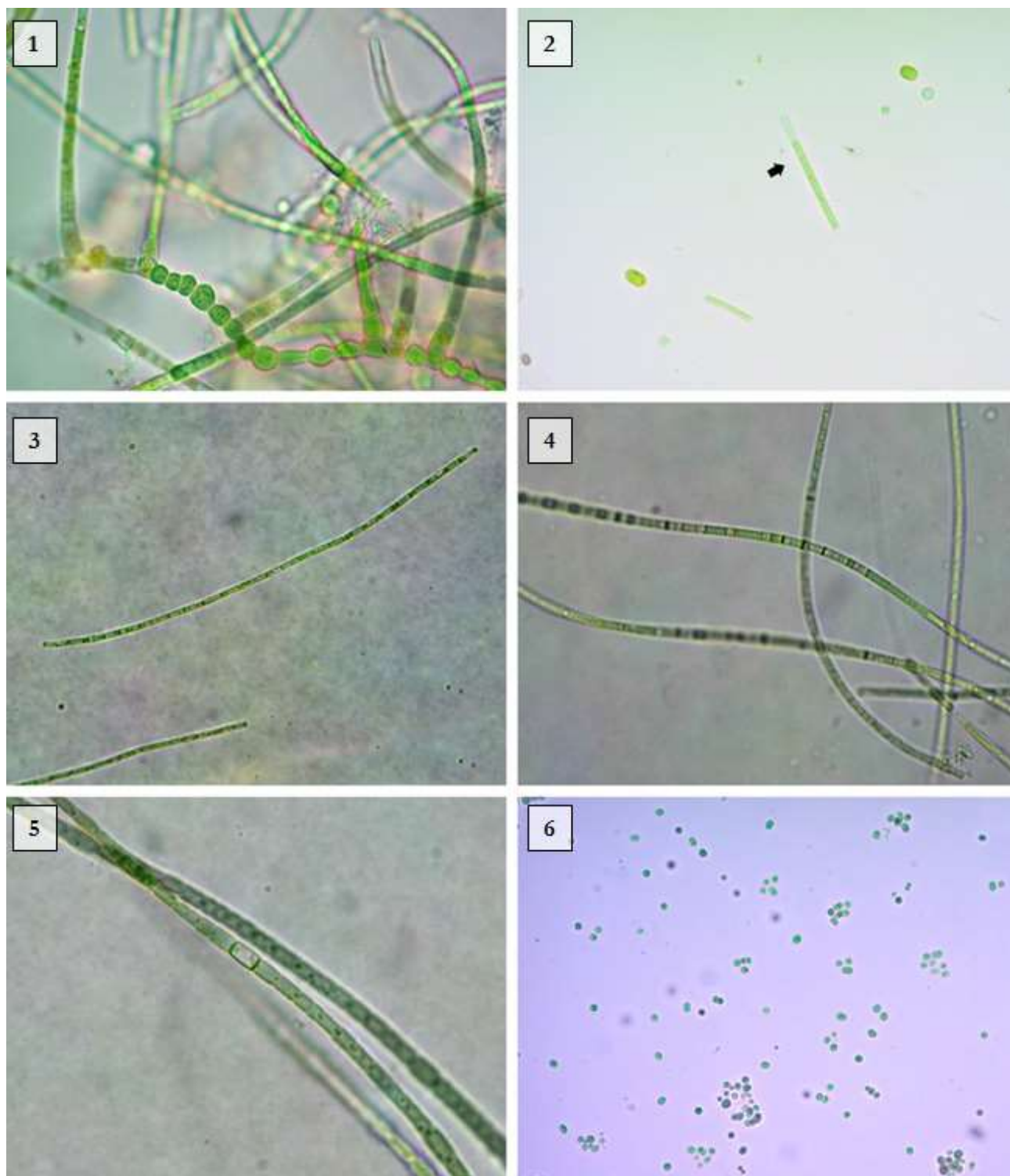
Tabla 3. Géneros encontrados mediante la caracterización morfológica.

Orden / Género	Agregación	Forma de las células	Tamaño*	Vaina	Observaciones
<b>NOSTOCALES</b>					
<i>Anabaena</i> sp.	Filamentos agrupados	Esféricas y en forma de barril.	2 - 10 µm de diámetro en células vegetativas	No presenta	Filamentos enrollados o dispuestos en paralelo, con heterocistos intercalares y acinetos.
<i>Calothrix</i> sp.	Filamentos formando tapetes.	Cilíndricas, más anchas que largas.	5 - 7 µm de largo, 5 - 12.5 µm de ancho en la base del tricoma	Presente, firme y muy visible.	Heterocistos terminales, seguidos de acinetos. Filamentos más estrechos hacia un extremo.
<i>Microchaete</i> sp.	Filamentos solitarios o en grupos pequeños.	Cilíndricas, con bordes redondeados.	—	Presente, muy delgada.	Heterocistos intercalares.
<i>Tolypothrix</i> sp.	Filamentos con ramificaciones falsas.	En forma de disco, más anchas que largas. Contenido granuloso.	—	Presente, engrosada.	Heterocistos presentes en la base de las ramificaciones.
<b>CHROOCOCCALES</b>					
<i>Aphanothece</i> sp.	Colonial	Cilíndricas con bordes redondeados	3 - 30 µm de diámetro	No presenta	Las colonias están envueltas en mucilago, dentro se observan las células separadas.
<i>Chroococcus</i> sp.	Unicelulares o en grupos hasta de 8 células.	Esféricas	6 - 12 µm	Presente, envuelve a los grupos de células.	Se encuentran dispersas, junto con otros tipos de cianobacterias.
<i>Cyanothece</i> sp.	Colonias amorfas	Cilíndricas con bordes redondeados y esféricas.	2 - 5.2 µm de diámetro	No presenta	Están rodeadas por mucilago muy fino que solo se observa con tinción.
<i>Gloeothece</i> sp.	Unicelular o agregada en pequeños grupos.	Cilíndricas con bordes redondeados.	2 - 5 µm de diámetro	Presente, engrosada y envuelve a cada célula.	Se encuentran dispersas, junto con otros tipos de cianobacterias.
<i>Microcystis</i> sp.	Unicelular	Esféricas	3 - 4 µm de diámetro	No presenta	Se encontró en una segunda revisión de la muestra.
<i>Synechococcus</i> sp.	Células solitarias y a veces agregadas o dispuestas en filamentos cortos.	Cilíndricas, con bordes redondeados.	1.5 - <20 µm de largo, 0.4 - 11 µm de ancho.	No presenta	Se observa una delgada envoltura de mucilago con preparaciones de tinta china en las células agrupadas.
<i>Synechocystis</i> sp.	Células solitarias	Esféricas	2 µm de diámetro	No presenta	Se encuentran dispersas, a veces en pares.
<b>STIGONEMATALES</b>					
<i>Hapalosiphon</i> sp.	Filamentos uniseriados con ramificaciones verdaderas.	En forma de barril	—	Presente, delgada y solo se observa en los extremos.	Heterocistos intercalares en el talo y en las ramificaciones.
<b>OSCILLATORIALES</b>					
<i>Leptolyngbya</i> sp.	Filamentos formando tapetes y algunos solitarios.	Cilíndricas, más largas que anchas. Con células apicales redondeadas.	0.5 - 3.2 µm de ancho	Presente, delgada e incolora. Abierta en los extremos.	Se observan fragmentaciones en el tricoma, dentro de la vaina.
<i>Limnothrix</i> sp.	Filamentos solitarios, cortos.	Isodiamétricas, sin bordes atenuados.	1 - 6 µm de ancho	No presenta	Similar a <i>Pseudanabaena</i> sp.
<i>Lynngbya</i> sp.	Filamentos solitarios y formando tapetes.	Cilíndricas, más anchas que largas.	5.5 - 60 µm de ancho	Presente, delgada.	Presenta hormogonios.
<i>Oscillatoria</i> sp.	Filamentos formando tapetes poco densos.	En forma de disco, más anchas que largas.	2 - 20 µm de ancho, 0.1 - 10 µm de largo	No presenta	Filamentos rectos con divisiones visibles entre cada célula.
<i>Plectonema</i> sp.	Filamentos con ramificaciones falsas.	Cilíndricas, más anchas que largas.	8 - 25 µm de ancho	Presente, firme.	No presenta células especializadas.
<i>Pseudanabaena</i> sp.	Filamentos solitarios y agregados en tapetes.	Cilíndricas, más largas que anchas.	0.8 - 3 µm de ancho	No presenta	La célula terminal es atenuada (cónica). Algunos filamentos son cortos.

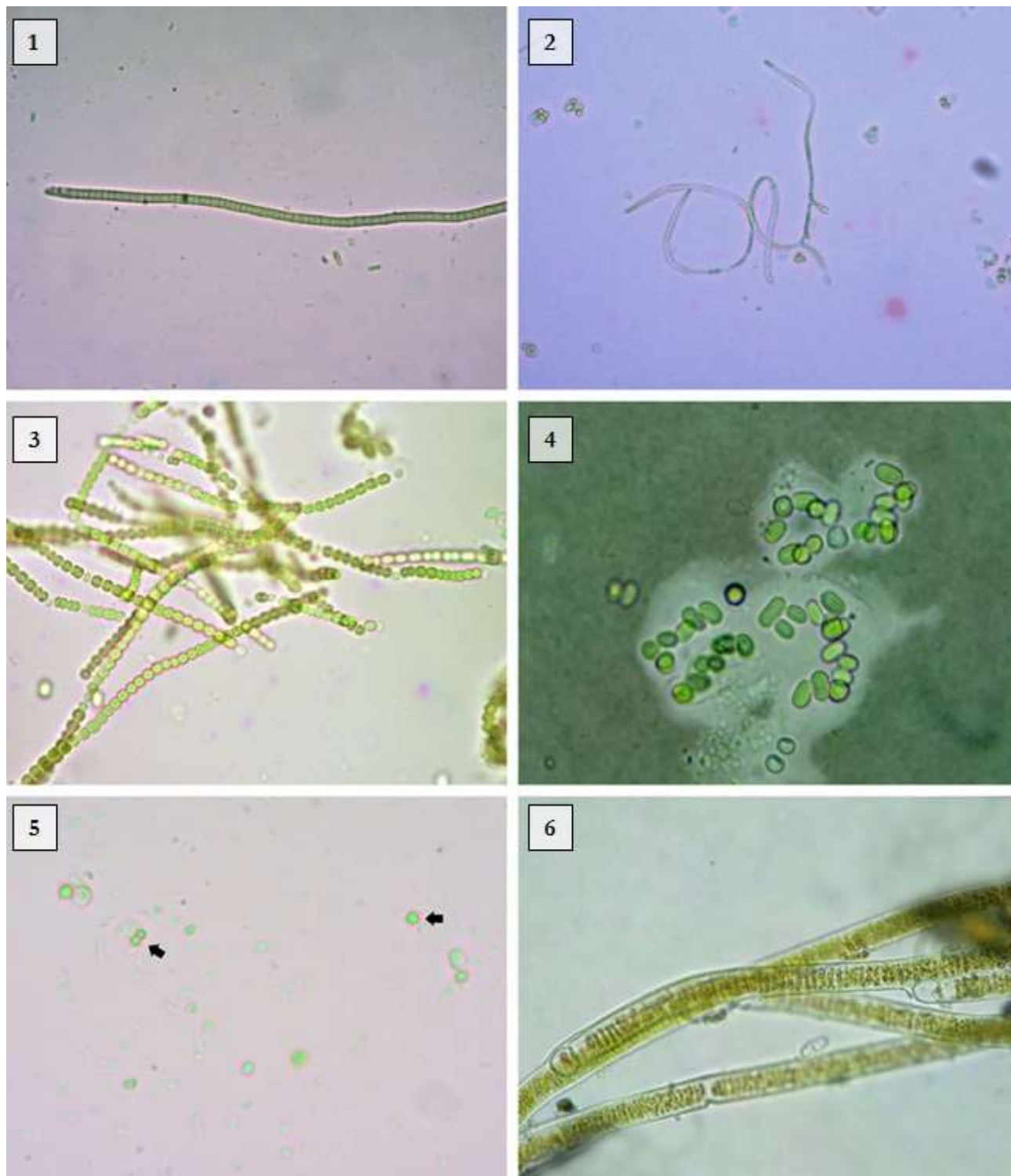
\*A partir de la bibliografía (Komárek y Hauer, 2013).



**Figura 12.** Microfotografías de los géneros encontrados. 1. *Anabaena* sp. de una muestra ambiental de Los Dínamos. 2. *Aphanothece* sp. de Tezozómoc ambiental. 3. *Calothrix* sp. de un cultivo de Tláhuac. 4. *Chroococcus* sp. de cultivo de Los Dínamos. 5. *Cyanothece* sp. de cultivo de Cuemanco. 6. *Gloeothece* sp. de cultivo de Los Dínamos.



**Figura 13.** Microfotografías de los géneros encontrados. 1. *Hapalosiphon* sp. de cultivo de Cuemanco. 2. *Leptolyngbya* sp. de cultivo de Tezozómoc. 3. *Limnothrix* sp. de muestra ambiental de Tláhuac. 4. *Lyngbya* sp. de muestra ambiental de Cuemanco. 5. *Microchaete* sp. de muestra ambiental de Cuemanco. 6. *Microcystis* sp. de muestra ambiental de Chapultepec.



**Figura 14.** Microfotografías de los géneros encontrados. 1. *Oscillatoria* sp. de muestra ambiental de Tláhuac. 2. *Plectonema* sp. de cultivo de Los Dínamos. 3. *Pseudanabaena* sp. de cultivo de Cuemanco. 4. *Synechococcus* sp. de muestra ambiental de Los Dínamos. 5. *Synechocystis* sp. de cultivo de Tláhuac. 6. *Tolypothrix* sp. de muestra ambiental de Los Dínamos.



Tabla 4. Géneros encontrados en cada sitio y muestra, y número de filotipos por sitio.

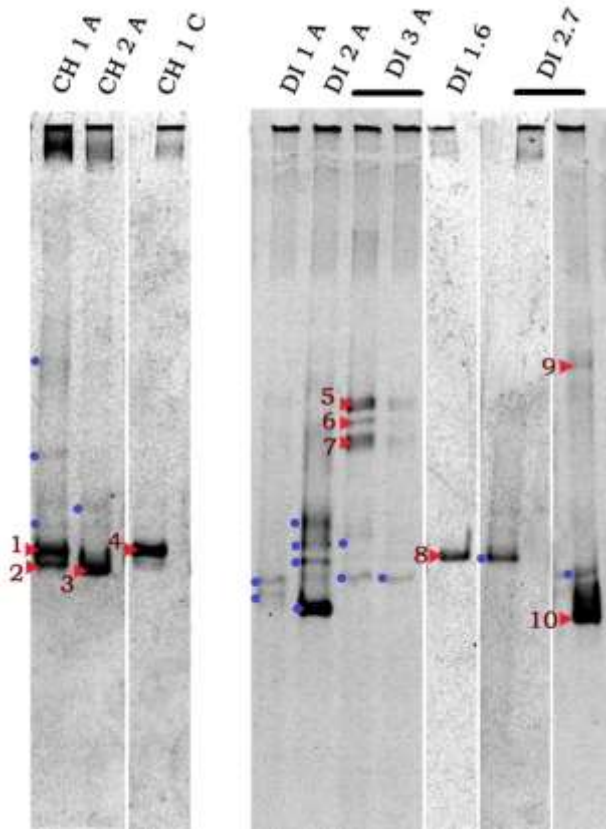
Sitio Taxón	Chapultepec			Cuernavaca						Dinamos					Tezozómoc					Tláhuac									
	CH 1 A	CH 2 A	CH 1 C	CU 1 A	CU 2 A	CU 3 A	CU 1 9	CU 1 12	CU 2 10	CU 2 13	CU 3 11	CU 3 15	CU 15 27	DI 1 A	DI 2 A	DI 3 A	DI 1 6	DI 2 7	TE 1 A	TE 2 A	TE 3 A	TE 2 C	TE 3 C	TLA 1 A	TLA 2 A	TLA 3 A	TLA 1 C		
<b>NOSTOCALES</b>																													
<i>Anabaena</i> sp.	□	□	□	□	□	□	□	□	□	□	□	□	□	□	□	□	□	□	□	□	□	□	□	□	□	□	□	□	□
<i>Calothrix</i> sp.	□	□	□	□	■	□	□	□	□	□	□	□	□	□	□	□	□	□	□	□	□	□	□	□	■	□	□	□	□
<i>Microchaete</i> sp.	□	□	□	□	□	□	□	□	□	□	□	□	□	□	□	□	□	□	□	□	□	□	□	□	□	□	□	□	□
<i>Tolythrix</i> sp.	□	□	□	□	□	□	□	□	□	□	□	□	□	□	□	□	□	□	□	□	□	□	□	□	□	□	□	□	□
<b>CHROOCOCCALES</b>																													
<i>Aphanothece</i> sp.	□	□	□	□	□	□	□	□	□	□	□	□	□	□	□	□	□	□	□	□	□	□	□	□	□	□	□	□	□
<i>Chroococcus</i> sp.	□	□	□	□	□	□	□	□	□	□	□	□	□	□	□	□	□	□	□	□	□	□	□	□	□	□	□	□	□
<i>Cyanothece</i> sp.	□	□	□	□	□	□	□	□	□	□	□	□	□	□	□	□	□	□	□	□	□	□	□	□	□	□	□	□	□
<i>Gleothoece</i> sp.	□	□	□	□	□	□	□	□	□	□	□	□	□	□	□	□	□	□	□	□	□	□	□	□	□	□	□	□	□
<i>Microcystis</i> sp.	□	□	□	□	□	□	□	□	□	□	□	□	□	□	□	□	□	□	□	□	□	□	□	□	□	□	□	□	□
<i>Synechococcus</i> sp.	□	□	□	□	□	□	□	□	□	□	□	□	□	□	□	□	□	□	□	□	□	□	□	□	□	□	□	□	□
<i>Synechocystis</i> sp.	□	□	□	□	□	□	□	□	□	□	□	□	□	□	□	□	□	□	□	□	□	□	□	□	□	□	□	□	□
<b>STIGONEMATALES</b>																													
<i>Hapalosiphon</i> sp.	□	□	□	□	□	□	□	□	□	□	□	□	□	□	□	□	□	□	□	□	□	□	□	□	□	□	□	□	□
<b>OSCILLATORIALES</b>																													
<i>Leptolyngbya</i> sp.	□	□	□	□	□	□	□	□	□	□	□	□	□	□	□	□	□	□	□	□	□	□	□	□	□	□	□	□	□
<i>Limnithrix</i> sp.	□	□	□	□	□	□	□	□	□	□	□	□	□	□	□	□	□	□	□	□	□	□	□	□	□	□	□	□	□
<i>Lyngbya</i> sp.	□	□	□	□	□	□	□	□	□	□	□	□	□	□	□	□	□	□	□	□	□	□	□	□	□	□	□	□	□
<i>Oscillatoria</i> sp.	□	□	□	□	□	□	□	□	□	□	□	□	□	□	□	□	□	□	□	□	□	□	□	□	□	□	□	□	□
<i>Plectonema</i> sp.	□	□	□	□	□	□	□	□	□	□	□	□	□	□	□	□	□	□	□	□	□	□	□	□	□	□	□	□	□
<i>Pseudanabaena</i> sp.	□	□	□	□	□	□	□	□	□	□	□	□	□	□	□	□	□	□	□	□	□	□	□	□	□	□	□	□	□
Número de géneros por sitio	3						9																						
Número de filotipos por sitio	7						9																						

## 5.3 CARACTERIZACIÓN MOLECULAR

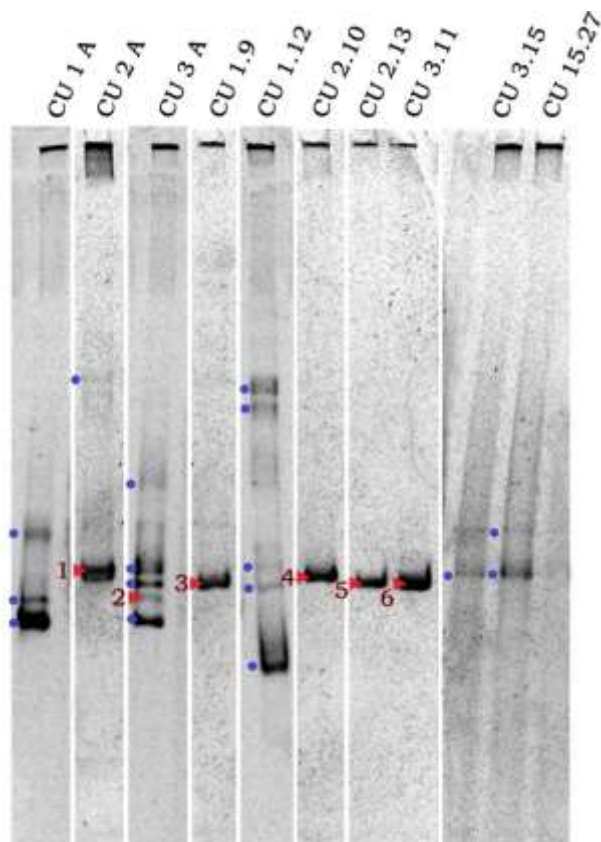
### 5.3.1 Huella genética de las comunidades a partir del DGGE

Se obtuvieron dos geles que muestran la huella genética de la comunidad de cianobacterias de los sitios mediante un patrón de bandas (filotipos) para cada muestra (ver Anexo III). Las bandas cortadas y de las que se obtuvieron secuencias limpias están indicadas. Se puede observar en general una alta variabilidad espacial en los sitios y el sesgo que existe al cultivar en el laboratorio.

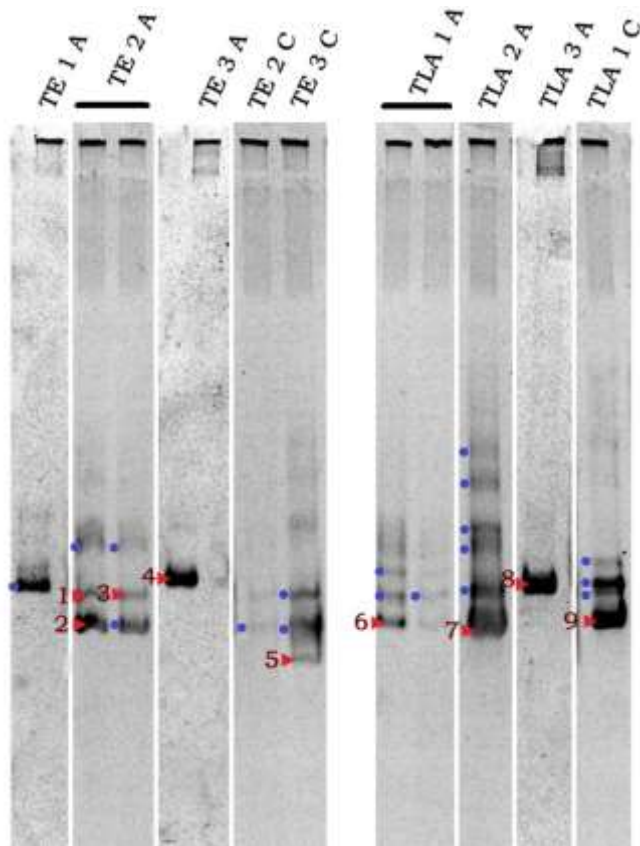
Las muestras de Chapultepec muestran una composición diferente de la comunidad en cada punto de muestreo; se logró en cultivo la especie más abundante del punto 1 (Fig. 15). En Cuernavaca se muestran en total 9 filotipos distintos (Fig. 16). Se obtuvieron dos secuencias ambientales, de las cuales ninguna se recuperó en cultivo. Los cultivos Cu 1.9 y Cu 2.3 presentan la misma composición, la cual es diferente en los demás cultivos del mismo sitio (Fig. 16). En las muestras de Los Dínamos no se logró ninguna secuencia ambiental de cianobacterias, sin embargo, en el cultivo Di 2.7 de este sitio se observa un consorcio y en el Di 1.6 hay solo una especie predominante (Fig. 15). Las muestras ambientales de Tezozómoc muestran variabilidad dependiendo del punto en donde se tomó la muestra: en TE 1 A y TE 3 A se observa sólo un filotipo, mientras que en TE 2 A se tienen tres diferentes. En cultivo se observan también tres diferentes filotipos (Fig. 16). En Tláhuac se observan en total nueve filotipos distintos. El punto uno en Tláhuac (TLA 1 A) tiene menor diversidad que el dos (TLA 2 A), tres filotipos en el primero y seis en el segundo, compartiendo sólo uno. La única muestra cultivada de Tláhuac es consorcio y se observaron 4 filotipos de los cuales se pudo secuenciar el más abundante (Fig. 17).



**Figura 15.** Secciones de los gels de DGGE correspondientes a los sitios de Chapultepec y Los Dínamos. 1. CH1\_A4, 2. CH1\_A5, 3. CH2\_A2, 4. CH1\_C1\_1, 5. DI3\_A1, 6. DI3\_A2, 7. DI3\_A3, 8. DI1\_C1\_6, 9. DI2\_C1\_7, 10. DI2\_C3\_7. Con puntos azules se indican las bandas que fueron cortadas del gel y en triángulos rojos las bandas cortadas y de las que se obtuvo una secuencia limpia



**Figura 16.** Secciones de los gels de DGGE correspondientes a Cuemanco. 1. CU2\_A2, 2. CU3\_A4, 3. CU1\_C1\_9, 4. CU2\_C1\_10, 5. CU2\_C1\_13, 6. CU3\_C1\_11.



**Figura 17.** Secciones de los geles de DGGE correspondientes a los sitios de Tezozómoc y Tláhuac. 1. TE2\_A2, 2. TE2\_A3, 3. TE2\_A2\_r, 4. TE3\_A1, 5. TE3\_C3\_1, 6. TLA1\_A3, 7. TLA2\_A6, 8. TLA3\_A1, 9. TLA1\_C4\_1.

### 5.3.2 Análisis filogenético

Se obtuvieron un total de 25 secuencias limpias de las cuales cuatro son de Chapultepec, seis de Cuernavaca, seis de Los Dínamos, cinco de Tezozómoc y cuatro de Tláhuac. En la Tabla 5 se muestran las secuencias más parecidas al compararlas con la base de datos del GenBank. Los porcentajes de identidad obtenidos fueron en su mayoría arriba del 96% y variaron entre 93 y 100%.

Se emplearon dos diferentes aproximaciones para establecer la topología del árbol filogenético, Máxima Verosimilitud (ML) y Neighbor-Joining (NJ), las cuales resultaron muy similares (datos no mostrados). En la Figura 18 se observa la topología obtenida por ML. En ésta se distinguen dos grupos principales, el primero (1, Fig. 18) presenta dos subgrupos de Nostocales: (a) con tres secuencias de Tezozómoc (TE2\_A3, TE2\_A2\_r, TE2\_A2) asociadas en 95% con *Calothrix* sp. que forman un agrupamiento aparte, que es muy distinto de las secuencias reportadas previamente. Nostocales (b): en donde se unen a *Calothrix* sp. los géneros *Nodularia* y *Anabaenopsis*.

También hay dos subgrupos de Chroococcales dentro del primer grupo grande. Chroococcales (a) con una secuencia de Chapultepec (CH1\_A5) casi idéntica a *Aphanothece sacrum* y Chroococcales (b) con una secuencia de Tláhuac

(TLA1\_C4\_1) muy cercana a *Synechocystis* sp. y una de Los Dínamos (DI1\_C1\_6) que no tiene una secuencia más similar que una cepa no identificada aislada del lago de Alchichica (Puebla, Méx.).

Las Oscillatoriales se dividen en tres subgrupos: Oscillatoriales (a) con una secuencia de Tezozómoc (TE3\_A1) dentro del grupo del género *Leptolyngbya*, Oscillatoriales (b) con una de Cuemanco (CU2\_A2) dentro de un grupo que asocia a *Leptolyngbya* sp. y *Limnothrix* sp.; y Oscillatoriales (c) con dos secuencias de Chapultepec (CH1\_C1\_1 y CH1\_A4) que son parecidas a cianobacterias de la familia Pseudanabaenaceae, una secuencia de Cuemanco (CU2\_C1\_10) y una de Tláhuac (TLA2\_A6) asociadas a *Leptolyngbya* sp.

El segundo grupo principal (Grupo 2, Fig.18) no presenta Nostocales y se subdivide en 2 grupos de Chroococcales: Chroococcales (c) incluye una secuencia de Cuemanco (CU3\_C1\_11) que corresponde a *Synechococcus* sp., una de Tláhuac (TLA3\_A1) y Tezozómoc (TE3\_C3\_1) idénticas a *Cyanobium* sp. Y Chroococcales (d) que incluye dos secuencias de los Dínamos (DI2\_C1\_7, DI2\_C3\_7) idénticas a *Acaryochloris* sp. y una de Chapultepec (CH2\_A2) parecida a *Cyanothece* sp. Finalmente en esta parte hay un grupo de Oscillatoriales (Oscillatoriales (d), Fig. 18), donde hay tres secuencias de Cuemanco: CU3\_A4 muy similar a *Limnothrix planktonica* y dos idénticas a cianobacterias de Alchichica (CU1\_C1\_9 y CU2\_C1\_13) y una de Tláhuac (TLA1\_A3) que no se parece a ninguna secuencia encontrada en las bases de datos.

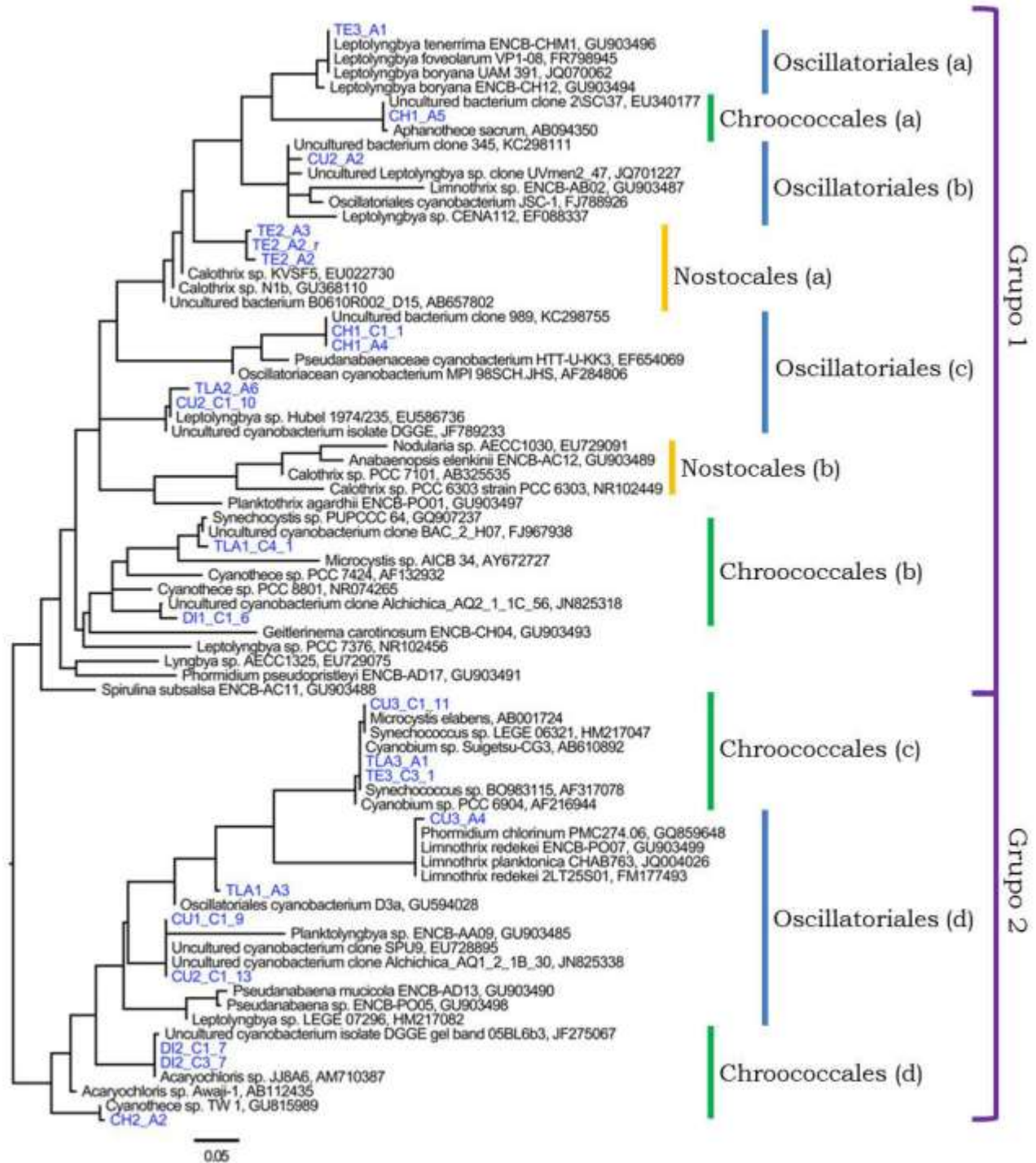
En general las secuencias se agrupan siguiendo su clasificación taxonómica en los grupos más internos y no se observa una relación de las secuencias debido a los sitios de estudio.

Tabla 5. Caracterización molecular de los sitios de estudio

Sitio*	Tipo de muestra*	Id de la secuencia	Secuencia más cercana	Número de acceso	Porcentaje de identidad
Ch	A	CH1_A4	Pseudanabaenaceae cyanobacterium HTT U KK3	EF654069	93
		CH1_A5	<i>Aphanothece sacrum</i>	AB094350	99
		CH2_A2	<i>Cyanothece</i> sp TW 1	GU815989	93
Ch	C	CH1_C1_1	Pseudanabaenaceae cyanobacterium HTT U KK3	EF654069	93
Cu	A	CU_2_A	<i>Leptolyngbya</i> sp CENA112	EF088337	94
		CU3_A4	<i>Limnothrix planktonica</i> CHAB763	JQ004026	99
		CU1_C1_9	Uncultured cyanobacterium clone Alchichica AQ1 2 1B 30 (Oscillatoriales)	JN825338	100
	C	CU2_C1_10	<i>Leptolyngbya</i> sp Hubel 1974/235	EU586736	100
		CU2_C1_13	Uncultured cyanobacterium clone Alchichica AQ1 2 1B 30 (Oscillatoriales)	JN825338	100
		CU3_C1_11	<i>Synechococcus</i> sp LEGE06321	HM217082	100
Di	A	DI3_A1	Proteobacteria		
		DI3_A2	Proteobacteria		
		DI3_A3	Proteobacteria		
	C	DI1_C1_6	Uncultured cyanobacterium clone Alchichica AQ2 1 1C 56 (Chroococcales)	JN825318	98
		DI2_C1_7	<i>Acaryochloris</i> sp JJ8A6	AM710387	100
DI2_C3_7	<i>Acaryochloris</i> sp JJ8A6	AM710387	100		
Te	A	TE2_A2	<i>Calothrix</i> sp KVSF5	EU022730	94
		TE2_A3	<i>Calothrix</i> sp KVSF5	EU022730	95
		TE2_A2_r	<i>Calothrix</i> sp KVSF5	EU022730	95
	C	TE3_A1	<i>Leptolyngbya tenerrima</i> ENCB-CHM1	GU903496	99
		TE3_C3_1	<i>Cyanobium</i> sp. Suigetsu-GC3	AD610892	100
Tla	A	TLA1_A3	Oscillatoriales cyanobacterium D3a	GU594028	96
		TLA2_A6	<i>Leptolyngbya</i> sp Hubel 1974/235	EU586736	99
		TLA3_A1	<i>Cyanobium</i> sp Suigetsu CG3	AB610892	100
	C	TLA1_C4_1	<i>Synechocystis</i> sp PUPCCC 64	GQ907237	98

+ Ch=Chapultepec, Cu=Cuemanco, Di=Dinamos, Te=Tezozómoc, Tla=Tiáhuac

\* A=Ambiental, C=Cultivo



**Figura 18.** Árbol filogenético construido mediante Máxima Verosimilitud a partir de secuencias del fragmento del gen 16S rRNA (231 pb). Los valores de bootstrap fueron determinados por 1000 réplicas. Las secuencias generadas en este estudio se muestran en color azul.

## 6. DISCUSIÓN

En las grandes ciudades, como la Ciudad de México, la presencia de cuerpos de agua impacta benéficamente el ambiente urbano, ya que además de proveer espacios de recreación, éstos ofrecen servicios ambientales clave como la regulación del microclima y la recarga de los mantos freáticos. Nuestros sitios de estudio son mayormente usados con fines recreativos y al menos tres de ellos aportan directamente agua al subsuelo, debido a que no tienen un fondo completamente impermeable. El ciclaje de nutrientes en estos sistemas es de vital importancia para mantener su equilibrio y óptimo funcionamiento. La fijación de CO<sub>2</sub> y de N<sub>2</sub> así como la producción de O<sub>2</sub> son procesos importantes en los sistemas acuáticos y todos son llevados a cabo por organismos del fitoplancton como las cianobacterias (Martínez-Arroyo y Jáuregui, 2000). Todos los sitios muestrados contaron con la presencia de cianobacterias, lo que indica que se llevan a cabo procesos de intercambio gaseoso. Martínez-Arroyo y Jáuregui (2000) sugieren que este intercambio gaseoso se ve inclinado hacia la producción de oxígeno por actividad fotosintética, especialmente en cuerpos de agua someros como Chapultepec, ya que las microalgas y las cianobacterias se desarrollan bien en éstos por poseer un ciclo de vida corto y una gran capacidad de adaptarse a ambientes adversos.

### 6.1 CARACTERIZACIÓN FÍSICOQUÍMICA DE LOS SITIOS DE ESTUDIO

La temperatura y pH registrados en nuestro estudio fueron similares a los trabajos reportados con anterioridad en los mismos sitios (Alcocer *et al.* 1988; Cantoral *et al.* 1999; Oliva *et al.*, 2008; Arzate-Cárdenas *et al.* 2010; Pineda-Mendoza *et al.* 2011). La temperatura varió entre 19 y 23 °C a excepción de Los Dínamos en donde se reportaron 11 °C, posiblemente a que se encuentra a mayor altitud que los demás sitios de estudio, además de ser un lugar con características de bosque de pino-encino. Los valores alcalinos de pH en la mayoría de los sitios pueden ser provocados por la fijación de CO<sub>2</sub> como consecuencia de la actividad fotosintética (Fuentes y Massol-Deyá, 2002). Como ejemplo, en Chapultepec se ha registrado un pH alcalino junto con una alta concentración de oxígeno disuelto, lo que sugiere que durante el día, los procesos de fotosíntesis predominan sobre los de respiración en la columna de agua (Martínez-Arroyo y Jáuregui, 2000). Además, Oliva *et al.* (2008) notaron que el efecto de la temperatura influye en cambio del tipo de especies dominantes y el aumento de la concentración de clorofila *a*, sin dejar de lado las condiciones particulares del lago (clima local y ubicación geográfica). Las condiciones de pH y temperatura encontradas en nuestros sitios de estudio favorecen la proliferación de cianobacterias, ya que la temperatura óptima de crecimiento de las



cianobacterias es de 20-25 °C, siempre y cuando se cuenten con los nutrientes necesarios para su desarrollo (Kim *et al.* 2006). Paralelamente, los ambientes alcalinos permiten la presencia de carbono utilizable por los microorganismos como bicarbonatos,  $\text{HCO}_3^-$  (Giraldez-Ruiz *et al.*, 1999; Jöhnk *et al.*, 2008).

El principal aporte de nutrientes como nitrógeno (N) y fósforo (P) para los microorganismos acuáticos proviene directamente de la descarga de aguas residuales domésticas y residuos industriales. Las aguas residuales llegan a las plantas de tratamiento donde no son eliminados totalmente y pasan a los cuerpos de agua que se abastecen de ellas (Kim *et al.* 2006). En los sistemas acuáticos, el N es determinante para el crecimiento de los microorganismos, y las cianobacterias juegan un papel importante como fijadoras de este elemento a partir de moléculas de la atmósfera ( $\text{N}_2$ ). Las plantas asimilan N en forma de nitratos o amonio y por procesos de desnitrificación regresa a la atmósfera en su forma molecular (Welch, 1980; Fuentes y Massol-Deyá, 2002). En nuestro estudio, la concentración de amonio ( $\text{NH}_4^+$ ) y nitratos ( $\text{NO}_3^-$ ) superó por más del doble la concentración reportada por Alcocer *et al.* (1988) en Chapultepec. Mientras que la concentración de  $\text{NO}_3^-$  en Los Dínamos fue mucho más baja que la reportada por Cantoral *et al.* (1999), esto puede ser debido a que se han llevado a cabo programas de recuperación integral de este parque, que incluye el saneamiento del río (Colín *et al.* 2002). En Tezozómoc el N- $\text{NO}_3^-$  sobrepasó lo reportado por Oliva *et al.* (2008), aunque la concentración de  $\text{NH}_4^+$  fue parecida en ambos estudios (Tabla 2).

Para Tláhuac, específicamente para la Laguna de los Reyes Aztecas, no hay antecedentes que reporten los parámetros fisicoquímicos de este lago. Por ello, se compararon los datos con un estudio de Xochimilco en canales que se abastecen con agua de la misma planta de tratamiento y poseen un ambiente similar en cuanto a clima, sustrato y usos humanos (Tavera y Díez, 2009). En él, se reportan valores de temperatura y pH parecidos a los de Tláhuac. Sin embargo, las concentraciones de  $\text{NH}_4^+$ ,  $\text{NO}_3^-$  y fósforo total fueron mucho más altas que los encontrados en este estudio.

Se ha considerado al fósforo como un factor limitante del crecimiento microbiano en sistemas acuáticos, debido a la escasa cantidad de fósforo inorgánico disponible por lixiviación y a la reducción de su concentración por demanda del sistema biológico. Sin embargo, las fuentes antropogénicas aportan grandes cantidades de este nutriente a los cuerpos de agua continentales (Fuentes y Massol-Deyá, 2002). Los fosfatos (PRS) y el fósforo total en Chapultepec fueron casi el doble de lo reportado por Alcocer *et al.* (1988). Mientras que en Cuemanco, representaron la mitad de lo reportado por Pineda *et al.* (2011).

La relación nitrógeno/fósforo (N:P) nos habla sobre un factor limitante en el sistema con respecto a la demanda metabólica del fitoplancton. Redfield (1958) considera que cuando N:P es mayor a 16, cabe esperarse que el fósforo sea el factor limitante, cuando N:P es igual a 16 ninguno de los nutrientes es limitante y cuando N/P es menor a 16 el nutriente limitante debería ser el nitrógeno. Considerando esto, todos los sitios de este estudio están limitados por nitrógeno. Por otra parte, Vollenweider (1983) propuso que para los lagos tropicales, la relación nitrógeno total a fósforo total (NT:PT) para el fitoplancton es de 9:1. De esta manera las muestras de Tláhuac 2 y Dínamos 2 estarían limitadas por fósforo y las demás sitios por nitrógeno. En el análisis de componentes principales mostró que este parámetro fue importante para separar estos dos sitios de los demás, lo cual se observa también en la figura 10.

Estas relaciones nos muestran que la entrada de fósforo a un ecosistema acuático provoca que el nitrógeno se convierta en nutriente limitante, aún cuando su concentración inicial supere a la del fósforo. Con respecto a las cianobacterias, la entrada de nitrógeno y fósforo provoca un aumento en la tasa fotosintética sin cambios aparentes en la composición de especies. Sin embargo, la entrada de fósforo solamente provoca la sobreproducción de cianobacterias que fijan nitrógeno, disminuyendo la diversidad y aumentando la abundancia (Fuentes y Massol-Deyá, 2002; Bruger *et al.*, 2007). Este pudiera ser el caso de Tláhuac, en donde la entrada de fósforo en el sistema (altas concentraciones de fósforo reactivo soluble) ha ido seleccionando cianobacterias fijadoras de nitrógeno, viéndose reflejado en la mayor concentración de nitrógeno total en todos los sitios (Tabla 2).

Una característica común a los sitios de muestreo, sin incluir a Los Dínamos, es su eutrofización. Este fenómeno produce de manera general un aumento de la biomasa y un empobrecimiento de la diversidad. Oliva *et al.* (2008) señalan a Tezozómoc como lago hipertrófico y Alcocer *et al.* (1988) mencionan que Chapultepec tiene algunas características de hipertrofia. Nuestros análisis estadísticos de los nutrientes en los sitios de estudio confirman que Tezozómoc y Chapultepec tiene características similares, compartiendo su condición hipertrófica (Fig. 10). Además esto también concuerda con la diversidad encontrada en Chapultepec mediante morfología, siendo esta la más baja.

## 6.2 CARACTERIZACIÓN MORFOLÓGICA DE CIANOBACTERIAS

En todos los sitios estudiados ha sido reportada anteriormente la presencia de cianobacterias (Cantoral *et al.* 1999; Komárek y Komárková-Legnerová, 2002; Oliva *et al.*, 2008; Arzate-Cárdenas *et al.*, 2010; Pineda *et al.*, 2011), con

excepción de Tláhuac, en donde no se han hecho estudios previos sobre la composición de cianobacterias, aunque existen algunos estudios en ambientes muy similares (Tavera y Díez, 2009).

Nuestros datos mostraron una mayor riqueza de cianobacterias en Cuemanco, con nueve géneros diferentes (Tabla 4), de los cuales destacan *Pseudanabaena* sp. y *Hapalosiphon* sp. El primero fue también encontrado por Pineda *et al.* (2011) en este sitio y es un género ampliamente distribuido en la parte central de México (Komárek y Komarkova, 2002). Muchas especies de *Pseudanabaena* no son identificadas fácilmente, por lo que hacen falta estudios sobre su variación morfológica y ecológica (Komárek y Komarkova, 2002). Por otra parte, *Hapalosiphon* sp. sólo se encontró en Cuemanco durante esta investigación. Este género también se ha registrado en las localidades de Los Manantiales y el río Amacuzac, ambas en el estado de Morelos, México (Valadez *et al.* 1996; Trujillo, 2002).

La menor riqueza de especies se encontró en Chapultepec con solo tres géneros obtenidos, de los cuales, *Microcystis* fue también encontrado por Alcocer *et al.* (1988) y por Komárek y Komárkova (2002). Este es un género distribuido a lo largo de todo el mundo y es importante por la producción de compuestos tóxicos llamados microcistinas que afectan la salud humana (Vasconcelos, 2010). Es importante recalcar que este género se encontró únicamente en muestras de cultivo y como células solitarias (Tabla 3). Los análisis realizados por Alcocer *et al.* (1988) y Pineda *et al.* (2011), al igual que este estudio, encontraron sólo tres taxa para este sitio. Mediante los análisis moleculares se detectaron siete filotipos en este sitio, esta fue la mayor diferencia al comparar los dos enfoques de estudio.

En Los Dinamos se encontraron siete géneros, incluidos *Tolypothrix* sp. y *Chroococcus* sp. que fueron registrados únicamente en este lugar. *Tolypothrix* es un género bien caracterizado, registrado tanto en el plancton como unido a la vegetación en cuerpos de agua dulce (Komárek y Hauer, 2013). Cantoral *et al.* (1999) encontraron el mismo número de géneros en Los Dínamos, sin embargo, ninguno coincide con los de este estudio.

En Tezozómoc, Oliva *et al.* (2008) encontraron cuatro géneros, incluyendo *Anabaena*. En nuestro estudio se encontró también *Anabaena* sp. y en total se registraron ocho géneros (Tabla 4). *Aphanothece* sp. se encontró solo en este sitio mediante caracterización morfológica, pero también aparece en la identificación molecular de una secuencia de Chapultepec (CH1\_A5) con un 99% de identidad (Tabla 5). Su morfología se parece mucho a *Synechococcus* sp., a excepción de que las células se encuentran agrupadas (Tabla 3).

En Tláhuac se encontraron ocho géneros mediante morfología. *Limnothrix* sp. sólo se encontró en este sitio por microscopía y se registró también en Cuemanco (CU3\_A4) mediante caracterización molecular (Tabla 5). Se han registrado más especies de este género en zonas templadas y ha sido usado en las industrias biotecnológicas como alimento para organismos cultivados o como fuente de metabolitos de interés industrial. Su toxicidad debe ser un aspecto a tomarse en cuenta, ya que las aguas de este sitio se usan para el riego de cultivos (Humpage *et al.* 2012; Lemus *et al.* 2013).

*Synechococcus* sp. fue el género con la mayor distribución, encontrándose en los cinco sitios. Este género habita en ambientes marinos y de agua dulce, y ha sido registrado tanto en zonas templadas como tropicales. Muchas especies crecen en tapetes, en colonias de algas o en finas colonias en sustratos húmedos (Komárek, 1992). *Anabaena* sp., *Gloeothece* sp., *Leptolyngbya* sp. y *Pseudanabaena* sp. se encontraron en tres sitios.

Los géneros *Microcystis*, *Pseudanabaena* y *Leptolyngbya* se registraron al menos en un sitio de estudio a excepción de Tláhuac. Estos géneros son productores de microcistinas, por lo que podrían representar un riesgo de salud. Al tener contacto estos compuestos con la piel pueden causar alergias y en casos graves intoxicaciones (De León y Yunes, 2001). Es importante tomar en cuenta la presencia de estos géneros porque en los cuerpos de agua muestreados se realizan actividades humanas.

La morfología en las cianobacterias es muy diversa y aún se mantienen los problemas de taxonomía que surgieron con las primeras clasificaciones (Komárek, 2006). En este estudio se muestran los géneros que se pudieron identificar mediante microscopía de campo claro y se mencionan también los datos moleculares de cada muestra. Para determinar la especie a la que pertenece cada organismo es necesario realizar análisis ultraestructurales (microscopía electrónica) y fisiológicos. Es importante mostrar las morfologías para tener un punto de comparación con trabajos similares, ya que muchas veces no hay datos morfológicos asociados a las secuencias de las bases de datos.

En algunas muestras de cultivos comparadas con las muestras ambientales se encontraron nuevos morfotipos (Tabla 4). Esto es, primordialmente, porque los cultivos se obtuvieron a partir de muestras de distinto tiempo a las muestras ambientales, pero también debido a que diferentes especies tienen distintas demandas ecológicas y adaptaciones a su localidad de origen y, por ende, tendrán diferentes respuestas en la transferencia a condiciones estandarizadas de cultivo (Komárek, 2006).

En pocos casos se pudieron obtener cultivos puros. El aislamiento de una sola especie bacteriana en medios de cultivo es difícil ya que muchas de ellas forman consorcios que tienen una estructura y función muy particulares (Stal, 1995).

### 6.3 CARACTERIZACIÓN MOLECULAR DE CIANOBACTERIAS

En todos los sitios de estudio se encontraron números similares de filotipos y morfotipos, con excepción de Chapultepec, donde los primeros fueron más del doble que los segundos (Tabla 4). En la mayoría de los casos se encontraron más filotipos que morfotipos, lo cual concuerda con la teoría de que existe mayor diversidad microbiana, en este caso de cianobacterias, de la que se puede cultivar. Por ello, la importancia de que los estudios de diversidad de cianobacterias adquieran un enfoque molecular, sin dejar de lado las aproximaciones morfológicas complementarias, ya que los datos moleculares por sí solos tienen una capacidad limitada para reconocer la importancia ecológica de diferentes genotipos, la variabilidad morfológica *in situ*, los procesos de adaptación y los nuevos morfotipos y ecotipos de cianobacterias (Komárek, 2006).

El porcentaje de identidad de las secuencias del fragmento del gen 16S rRNA obtenidas con aquellas reportadas en el GenBank fue de entre 93-100%. Esto cual indica que la identificación fue a distintos niveles. Se ha propuesto que con un porcentaje de identidad igual o mayor al 95%, las secuencias corresponden al mismo género y del 97 al 100% pertenecen a la misma especie (Moore *et al.* 1987; Roselló-Mora y Amann, 2001).

En la identificación molecular no se observó una correspondencia estricta con los géneros identificados mediante morfología (Tabla 5). Estas discrepancias muchas veces son causadas por asignaciones taxonómicas erróneas en bases de datos públicas e incluso por las cepas de referencia que no son identificadas correctamente con información actualizada. Otros autores se han encontrado con este problema. Por ejemplo, Pineda *et al.* (2011) en un estudio polifásico obtuvieron 95% de similitud con secuencias de un género distinto al que pudieron identificar por morfología. Otros ejemplos se encuentran en los trabajos de Tavera (2009), Lokmer (2007), Jing *et al.* (2005), Teneva *et al.* (2005) y Marquardt y Palinska (2007). Muchos trabajos han adoptado un enfoque polifásico para el estudio de las comunidades de cianobacterias, pero una evaluación cuidadosa de los fenotipos no es parte del entrenamiento de los científicos jóvenes, además de requerir tiempo y experiencia considerable (Komárek, 2006); por lo que se hace un énfasis en tomar en cuenta este aspecto.

La topología del árbol de este trabajo mostró dos grupos principales (Fig. 18). En el primero se encontraron las cianobacterias del orden Nostocales. Mientras que Oscillatoriales y Chroococcales se distribuyeron en distintos clados del árbol. La taxonomía de cianobacterias basada en el 16S rRNA en principio mostró ocho grupos (Giovannoni, 1988), pero la topología del árbol filogenético hecho por Wilmotte y Herdman (2001) con un mayor número de secuencias de 16S rRNA tiene forma de abanico y nada se puede decir de las relaciones entre muchos grupos. A pesar de esto, se han hecho muchos avances, como la propuesta de que las cianobacterias productoras de heterocistos son un grupo monofilético y los grupos de los órdenes Chroococcales y Oscillatoriales son polifiléticos (Giovannoni *et al.* 1988; Wilmotte y Golubic, 1991), aunque recientemente se ha demostrado con base en las secuencias de 16S rRNA y genes *nif* que el grupo del orden Stigonematales también es polifilético a pesar de ser productor de heterocistos (Zehr *et al.* 1997; Gugger y Hoffmann 2004).

## 7. CONCLUSIONES

Se logró la caracterización de las cianobacterias presentes en los cuerpos de agua del lago del Bosque de Chapultepec 1<sup>ra</sup> sección; del río Magdalena en el Parque Nacional Los Dínamos; del lago del Parque Tezozómoc; y de la laguna de los Reyes Aztecas, Delegación Tláhuac mediante métodos moleculares y morfológicos durante la estación seca del año.

Los sitios de muestreo de Chapultepec y Tezozómoc presentaron condiciones similares en cuanto a sus parámetros fisicoquímicos y pueden ser relacionados a cuerpos de agua eutróficos. Asociado a esto, el menor número de morfotipos se encontró en Chapultepec, es decir, la menor riqueza encontrada mediante caracterización morfológica se registró en uno de los lugares más eutrofizados.

Considerando la relación que propone Vollenweider (1983) de nitrógeno total y fósforo total para el crecimiento del fitoplancton, los sitios de muestreo de Tláhuac 2 y Dínamos 2 están limitados por fósforo, mientras que los demás por nitrógeno.

Se encontraron un total de 18 géneros en los sitios de estudio, con cianobacterias pertenecientes a los órdenes Nostocales, Chroococcales, Stigonematales y Oscillatoriales. La mayor riqueza de géneros identificados por morfología se encontró en Cuemanco, con nueve géneros diferentes y la menor en Chapultepec con sólo tres. El crecimiento de cianobacterias es propicio en todos los sitios, aunque en los Dínamos se infiere una menor abundancia mediante observaciones de campo y microscópicas. Se reportaron para Tláhuac los primeros datos sobre la composición de cianobacterias, ya que no había registros previos para este sitio. Todos estos géneros son especialistas en fijación de N<sub>2</sub>.

*Synechococcus* sp. fue el género con la mayor distribución, encontrándose en los cinco sitios. *Anabaena* sp., *Gloeothece* sp., *Leptolyngbya* sp. y *Pseudanabaena* sp. le siguen en los géneros mayormente distribuidos al encontrarse en tres sitios. Los géneros productores de compuestos tóxicos: *Microcystis*, *Pseudanabaena* y *Leptolyngbya* se registraron al menos en un sitio de estudio a excepción de Tláhuac. Es importante tomar en cuenta la presencia de estos géneros porque en los cuerpos de agua muestreados se realizan actividades humanas.

En los geles de DGGE se puede observar en general una alta variabilidad espacial en los sitios y el sesgo que existe al cultivar en el laboratorio. En todos los sitios de estudio se encontraron números similares de filotipos y morfotipos, con excepción de Chapultepec.

Con base en las secuencias 16S rRNA obtenidas, se reconoció que las cianobacterias encontradas en muestras ambientales y en cultivos de los cuerpos de agua muestreados, pertenecieron a especies con secuencias no reportadas previamente en las bases de datos utilizadas, así como a cepas identificadas, mostrando entre el 93 y el 100% de similitud con secuencias de cepas aisladas reportadas en las bases de datos. La topología del árbol filogenético mostró dos grupos principales en los cuales el orden Nostocales se mantuvo en uno y las secuencias se agruparon siguiendo su clasificación taxonómica en los grupos más internos.

Es necesario hacer estudios sobre la capacidad de fijación de CO<sub>2</sub> y N<sub>2</sub> de los sistemas acuáticos estudiados. Este estudio indica el potencial biológico que tienen estos sistemas para el ciclaje de C y N, falta ahora medir estos procesos, para poder entender la relevancia ecosistémica de estos sistemas al funcionamiento de la cuenca del Valle de México.



## 8. REFERENCIAS

- Akaike H (1974) A new look at the statistical model identification. *Automatic Control, IEEE Transactions* 19 (6):716-723.
- Al-Awadhi H, Dashti N, Khanafer M, Al-Mailem D, Ali N y Radwan S (2013). Bias problems in culture-independent analysis of environmental bacterial communities: a representative study on hydrocarbonoclastic bacteria. *Springer Plus* 2 (1):1-11.
- Alcocer J, Kato E, Robles E, y Vilaclara G (1988) Estudio preliminar del efecto del dragado sobre el estado trófico del Lago Viejo de Chapultepec. *Revista Internacional de Contaminación Ambiental* 4 (1):43-56.
- Amann R, Ludwig W y Schleifer K (1995) Phylogenetic identification and in situ detection of individual microbial cells without cultivation. *Microbiological Reviews* 59 (1):143-169.
- Anagnostidis K y Komárek J (1985) Modern approach to the classification system of cyanophytes. 1-Introduction. *Algological Studies/Archiv für Hydrobiologie, Supplement Volumes* 38:291-302.
- Anagnostidis K y Komárek J (1988) Modern approach to the classification system of cyanophytes 3-Oscillatoriales. *Algological Studies/Archiv für Hydrobiologie. Supplement Volumes* 80 50/53: 327-472.
- Anagnostidis K y Komárek J (1990) Modern approach to the classification system of cyanophytes. 5-Stigonematales. *Algological Studies/Archiv für Hydrobiologie, Supplement Volumes* 59:1-73.
- Arzate M (2008) Detección de cianobacterias toxigénicas pertenecientes al género *Microcystis* mediante marcadores moleculares y ensayos biológicos. Tesis de maestría. Escuela Nacional de Ciencias Biológicas. Instituto Politécnico Nacional, pp 69.
- Arzate-Cárdenaz M, Olvera-Ramírez R y Martínez-Jerónimo F (2010) *Microcystis* toxigenic strains in urban lakes: a case of study in Mexico City. *Ecotoxicology* 19:1157-1165.
- Atlas R y Bartha R (2002) *Ecología microbiana y microbiología ambiental*. Pearson Educación. Madrid, pp 696.

- Baker AL (2012) Phycokey -- an image based key to Algae (PS Protista), Cyanobacteria, and other aquatic objects. University of New Hampshire Center for Freshwater Biology. <http://cfb.unh.edu/phycokey/phycokey.htm>
- Begon M, Harper JL y Townsend CR (1986) Ecology. Individuals, populations and communities. John Wiley y Sons, pp 876.
- Bekker A, Holland HD, Wang PL, Rumble DI, Stein HJ, Hannah JL y Beukes NJ (2004) Dating the rise of atmospheric oxygen. *Nature* 427 (6970):117-120.
- Bellinger EG, y Sigeo DC (2010) Introduction to Freshwater Algae. Freshwater Algae: Identification and Use as Bioindicators. John Wiley y Sons, 284 pp.
- Bruger DF, Hamilton DP, Hall JA y Ryan EF (2007) Phytoplankton nutrient limitation in a polymictic eutrophic lake: community versus species-specific responses. *Archiv für Hydrobiologie; Fundamental and Applied Limnology* 169 (1): 57–68.
- Cantoral-Uriza E, Carmona J, González G y Montejano G (1999) Algas indicadoras de la calidad del agua en el río la Magdalena, Delegación Magdalena Contreras, Distrito Federal, México, 299-332. En: Ponce-N. D. y MV Alegre-G (Eds). Consejo de Estudios para la Restauración y Valoración Ambiental (Aire-Agua), Tomo I. Gobierno del Distrito Federal, México.
- Castenholz RW (2001) The Cyanobacteria En: Boone DR, Castenholz RW, Garrity GM (eds). *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, 2nd Edn, Vol. 1. The Archaea and the Deeply Branching and Phototrophic Bacteria Springer-Verlag: NY, pp 473–597.
- Centeno CM, Legendre P, Beltrán Y, Alcántara-Hernández RJ, Lidström UE, Ashby MN y Falcón LI (2012) Microbialite genetic diversity and composition relate to environmental variables. *FEMS Microbiol Ecol* 82:724-735.
- Colín JS, Flores MA, y Hernández LC (2002) La importancia de rescatar, preservar, mantener y cuidar la micro cuenca del Río Magdalena, Distrito Federal. *Revista del Centro de Investigación. Universidad La Salle*. 5 (19):5-11.
- Correa-Basurto A, Núñez-Cardona MT y Peña-Betancourt SD (2007) Bacterias heterótrofas aisladas del lago de los Reyes Aztecas (Tlahuac) y su resistencia a diferentes antibióticos. *Latinoamericana de Recursos Naturales* 3 (1):84-89.

- De Leon L y Yunes JS (2001) First report of a microcystin-containing bloom of the cyanobacterium *Microcystis aeruginosa* in the La Plata River, South America. *Environmental toxicology* 16 (1):110-112.
- De Rijk P, Neefs JM, Van de Peer Y y De Wachter R (1992) Compilation of small ribosomal subunit RNA sequences. *Nucleic acids research* 20(suppl):2075-2089.
- Dismukes GC, Klimov VV, Baranov SV, Kozlov YN, DasGupta Jy Tyryshkin A (2001) The origin of atmospheric oxygen on Earth: the innovation of oxygenic photosynthesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 98 (5):2170-2175.
- Douglas S y Carr N (1988) Examination of genetic relatedness of marine *Synechococcus* spp. by using restriction fragment length polymorphisms. *Applied and Environmental Microbiology* 54 (12):3071-3078.
- Drouet F (1968) Revision of the Classification of the Oscillatoriaceae. *Academy of Natural Sciences*, 370 pp.
- Edgar RC (2004) MUSCLE: multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput. *Nucleic Acids Research* 32 (5):1792-1797.
- FMC. Federación Mexicana de Canotaje. (2013). <http://fmcanotaje.org/acerca-de/pista-olimpica>
- FPC Fideicomiso Probosque de Chapultepec. (2013) [http://www.chapultepec.org.mx/web2010/chapultepec/1secc/1secc\\_sitios/lago\\_mayor.php](http://www.chapultepec.org.mx/web2010/chapultepec/1secc/1secc_sitios/lago_mayor.php)
- Fuentes F y Massol-Deyá A (2002) Manual de laboratorios: ecología de microorganismos. Universidad de Puerto Rico, 92 pp..
- Garcés Jiménez M (2012) Presidente del Consejo de la Crónica de Milpa Alta <http://www.cronistasdf.org.mx/10143/98874.html>
- Geitler L (1932) Cyanophyceae. Rabenhorst's Kryptogamenflora von Deutschland, Österreich und der Schweiz 14:1-1196.
- Giovannoni SJ, Turner S, Olsen GJ, Barns S, Lane D y Pace NR (1988) Evolutionary relationships among cyanobacteria and green chloroplasts. *Journal of Bacteriology* 170 (8):3584-3592.

- Gouy M, Guindon S y Gascuel O (2010) SeaView version 4: a multiplatform graphical user interface for sequence alignment and phylogenetic tree building. *Molecular Biology and Evolution* 27 (2):221-224.
- Grasshoff K, Kremling K y Ehrhardt M (1983) *Methods of Seawater Analysis*. Verlag Chemie, Weinheim. Amsterdam, pp 632.
- Gugger MF y Hoffmann L (2004) Polyphyly of true branching cyanobacteria (Stigonematales). *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 54 (2):349-357.
- Guindon S, Dufayard JF, Lefort V, Anisimova M, Hordijk W y Gascuel O (2010) New algorithms and methods to estimate maximum-likelihood phylogenies: assessing the performance of PhyML 3.0. *Systematic Biology* 59 (3):307-321.
- Herdman M, Janvier M, Waterbury JB, Rippka R, Stainer RY y Mandel M (1979) Deoxyribonucleic acid base composition of cyanobacteria. *Journal of General Microbiology* 111 (1):63-71.
- Holton RW (1981) Some possible chemotaxonomic approaches to understanding cyanobacterial taxonomy and phylogeny. *Annals of the New York Academy of Sciences* 361 (1):397-408.
- Humpage A, Falconer I, Bernard C, Froscio S y Fabbro L (2012) Toxicity of the cyanobacterium *Limnothrix* AC0243 to male Balb/c mice. *Water Research* 46 (5):1576-1583.
- Jáuregui E, Otero D y Pavón M (2000) *El clima de la Ciudad de México* Instituto de Geografía, UNAM. Plaza y Valdés, S.A. de C.V, pp 139.
- Jing H, Aitchison JC, Lacap DC, Peerapornpisal Y, Sompong U, Pointing SB (2005) Community phylogenetic analysis of moderately thermophilic cyanobacterial mats from China. The Philippines and Thailand *Extremophiles* 9:325-332.
- Kim SG, Rhee SK, Ahn CY, Ko SR, Choi GG, Bae JW, Park YH, Oh HM (2006) Determination of cyanobacterial diversity during algal blooms in Daechung Reservoir, Korea, on the basis of *cpcBA* intergenic spacer region analysis. *Applied and Environmental Microbiology* 72 (5):3252-3258.

- Kirkwood D (1994) Sanplus segmented flow analyzer and its applications. Seawater Analysis. Verlag Chemie, Weinheim. Amsterdam, pp 632.
- Komárek J, Komárková-Legnerová J (2002) Contribution to the knowledge of planktic cyanoprokaryotes from Central Mexico. *Preslia Praha* 74:207–233
- Komárek J y Hauer T (2013) CyanoDB.cz - On-line database of cyanobacterial genera. - Word-wide electronic publication, Univ. of South Bohemia y Inst. of Botany AS CR, <http://www.cyanodb.cz>
- Komárek J (2006) Cyanobacterial taxonomy: current problems and prospects for the integration of traditional and molecular approaches. *Algae* 21 (4):349-375.
- Komárek J y Anagnostidis K (1986) Modern approach to the classification system of Cyanophytes. 2-Chroococcales. *Algological Studies/Archiv für Hydrobiologie Supplement Volumes* 43:157-226.
- Komárek J y Anagnostidis K (1989) Modern approach to the classification system of Cyanophytes 4-Nostocales. *Algological Studies/Archiv für Hydrobiologie Supplement Volumes* 56:247-345.
- Ladha JK y Watanabe I (1982) Antigenic similarity among *Anabaena azollae* separated from different species of *Azolla*. *Biochemical and biophysical Research Communications* 109 (3):675-682.
- Lazcano A y Miller SL (1994) How long did it take for life to begin and evolve to cyanobacteria? *Journal of Molecular Evolution* 39 (6):546-554.
- Lemus N, Guevara M, Lodeiros C, Vásquez A, Freites L y Licet B (2013) Crecimiento y composición bioquímica de *Limnothrix* sp. a diferentes salinidades y concentraciones de nitrato. *Revista Colombiana de Biotecnología* 15 (1):159-166.
- Lokmer, A (2007) Polyphasic approach to the taxonomy of the selected oscillatorian strains (Cyanobacteria). Master Thesis. Faculty of Biological Sciences University of South Bohemia. Department of Botany.
- Marquardt J y Palinska KA (2007) Genotypic and phenotypic diversity of cyanobacteria assigned to the genus *Phormidium* (Oscillatoriales) from different habitats and geographical sites. *Archives of Microbiology* 187 (5): 397-413.

- Martínez-Arroyo A y Jáuregui E (2000) On the environmental role of urban lakes in Mexico City. *Urban Ecosystems* 4 (2):145-166.
- Montejano G (1998) Taxonomía de cyanoprokaryota (cyanophyta/cyanobacteria) epífitos del orden de Chroococcales de la región central de México. Tesis de doctorado. Facultad de Ciencias. Universidad Nacional Autónoma de México, pp 68.
- Moore L, Moore E, Murray R, Stackebrandt E y Starr M (1987) Report of the ad hoc committee on reconciliation of approaches to bacterial systematics. *International Journal of Systematic Bacteriology* 463-464.
- Muyzer G y Smalla K (1998) Application of denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) and temperature gradient gel electrophoresis (TGGE) in microbial ecology. *Antonie van Leeuwenhoek* 73 (1):127-141.
- Muyzer G, De Waal E C y Uitterlinden AG (1993) Profiling of complex microbial populations by denaturing gradient gel electrophoresis analysis of polymerase chain reaction-amplified genes coding for 16S rRNA. *Applied and Environmental Microbiology* 59 (3):695-700.
- Nübel U, Garcia-Pichel F y Muyzer G (1997) PCR primers to amplify 16S rRNA genes from cyanobacteria. *Applied and Environmental Microbiology* 63 (8):3327-3332.
- Oliva M, Rodríguez A, Lugo, A y Sánchez M (2008) Composición y dinámica del fitoplancton en un lago urbano hipertrófico. *Hidrobiológica* 18 (1):1-13.
- Pace NR (1997) A molecular view of microbial diversity and the biosphere. *Science* 276 (5313):734-740.
- Pace NR, Stahl DA, Lane DJ y Olsen GJ (1986) The analysis of natural microbial populations by ribosomal RNA sequences. *Advances in microbial ecology* 9:1-55.
- Pineda R (2009) Determinación de cianobacterias toxigénicas productoras de microcistinas por métodos moleculares y bioensayos. Tesis de maestría. Escuela Nacional de Ciencias Biológicas. Instituto Politécnico Nacional, pp 101.
- Pineda-Mendoza R, Martínez F, Garduño G y Olvera R (2011) Caracterización morfológica y molecular de cianobacterias filamentosas aisladas de

florecimientos de tres lagos urbanos eutróficos de la Ciudad de México. *Polibotánica* 31:31-50.

Posada D (2008) jModelTest: Phylogenetic Model Averaging. *Mol Biol Evol* 25 (7):1253-1256.

Prescott G W (1970) *Algae of the western Great Lakes area* 4th ed. WC Brown Company, pp 977.

R Development Core Team (2012) *R: a language and environment for statistical computing*. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. ISBN 3-900051-07-0. <http://www.R-project.org/>

Ramírez P, Martínez E, Martínez MD y Eslava C (2004) Cianobacterias, microorganismos del fitoplancton y su relación con la salud humana en Rosas I, Cravioto A y Ezcurra E (2004) *Microbiología ambiental*. México, pp 134.

Redfield AC (1958) The biological control of chemical factors in the environment. *Am Sci* 46:206-221.

Rippka R, Deruelles J, Waterbury JB, Herdman M y Stainer RY (1979) Generic Assignments, strain histories, and properties of pure cultures of cyanobacteria. *J Gen Microbiol* 111:1-61.

Rosselló-Mora R y Amann R (2001) The species concept for prokaryotes. *FEMS Microbiology Reviews* 25 (1):39-67.

Schopf JW (1993) Microfossils of the early Archean apex chert: new evidence of the antiquity of life. *Science* 260:640-646 en: Lazcano A y Miller S L (1994) How long did it take for life to begin and evolve to cyanobacteria? *Journal of Molecular Evolution* 39 (6):546-554.

SECTUR, Secretaría de Turismo. Ciudad de México. 2013 [http://www.mexicocity.gob.mx/detalle.php?id\\_pat=4389](http://www.mexicocity.gob.mx/detalle.php?id_pat=4389)

Stal LJ (1995) Physiological ecology of cyanobacteria in microbial mats and other communities. *New Phytologist* 131 (1):1-32.

Stam WT (1980) Relationships between a number of filamentous blue-green algal strains (Cyanophyceae) revealed by DNA-DNA hybridization. *Algological Studies/Archiv für Hydrobiologie Supplement Volumes*, 25:351-374.

- Su C, Lei L, Duan Y, Zhang KQ y Yang J (2012) Culture-independent methods for studying environmental microorganisms: methods, application, and perspective. *Applied Microbiology and Biotechnology* 93 (3):993-1003.
- Tavera R y Díez B (2009) Multifaceted approach for the analysis of the phototrophic microbial community in a freshwater recreational area of Xochimilco, México. *Hydrobiologia* 636 (1):353-368.
- Teneva I, Dzhambazov B, Mladenov R y Schirmer K (2005) Molecular and phylogenetic characterization of *Phormidium* species (cyanoprokaryota) using the *cpcb-igs-cpca* locus1. *Journal of Phycology* 41 (1):188-194.
- Trujillo-Jiménez P (2002) Biodiversidad acuática del río Amacuzac, Morelos, México. Universidad Autónoma del Estado de Morelos. Centro de Investigaciones Biológicas. Informe final SNIB-CONABIO. Proyecto No. S150. México, D.F.
- Valadez-Cruz F, Carmona-Jiménez J y Cantoral-Uriza EA (1996) Algas de ambientes lóticos en el estado de Morelos, México. *Anales del Instituto de Biología serie Botánica* 67 (002):1-56.
- Vasconcelos V, Martins A, Vale M, Antunes A, Azevedo J, Welker M y Montejano G (2010) First report on the occurrence of microcystins in planktonic cyanobacteria from Central Mexico. *Toxicon* 56 (3):425-431.
- Vollenweider RA (1983) Eutrophication. Notes distributed during the II Meeting of the Regional Project on the Eutrophication of Tropical Lakes.
- Welch EB (1980) *Ecological effects of waste water*: Cambridge, Cambridge University Press, pp 87.
- Whitton B y Potts M (2000) *The Ecology of Cyanobacteria The diversity in time and space*. Kluwer Academic Publishers. Países Bajos, pp 669.
- Wilmotte A (2004) Molecular evolution and taxonomy of the cyanobacteria. In *The molecular biology of cyanobacteria*. Springer. Países bajos, pp 1-25.
- Wilmotte A y Golubic S (1991) Morphological and genetic criteria in the taxonomy of cyanophyta cyanobacteria. *Archiv für Hydrobiologie*, pp 92.
- Wilmotte A y Herdman M (2001) Phylogenetic relationships among the cyanobacteria based on 16S rRNA sequences. *Bergey's Manual of*



Systematic Bacteriology. Volume One: The Archaea and the Deeply Branching and Phototrophic Bacteria.

Woese C R (1987) Bacterial evolution. *Microbiological Reviews* 51 (2):221.

Zehr JP, Mellon MT y Hiorns WD (1997) Phylogeny of cyanobacterial *nifH* genes: evolutionary implications and potential applications to natural assemblages. *Microbiology* 143 (4):1443-1450.

Zhang Z, Schwartz S, Frazer K A, Smit A, Riemer C, Bouck J, y Miller W (2000) PipMaker—a web server for aligning two genomic DNA sequences. *Genome Research* 10 (4), 577-586.

## 9. ANEXOS

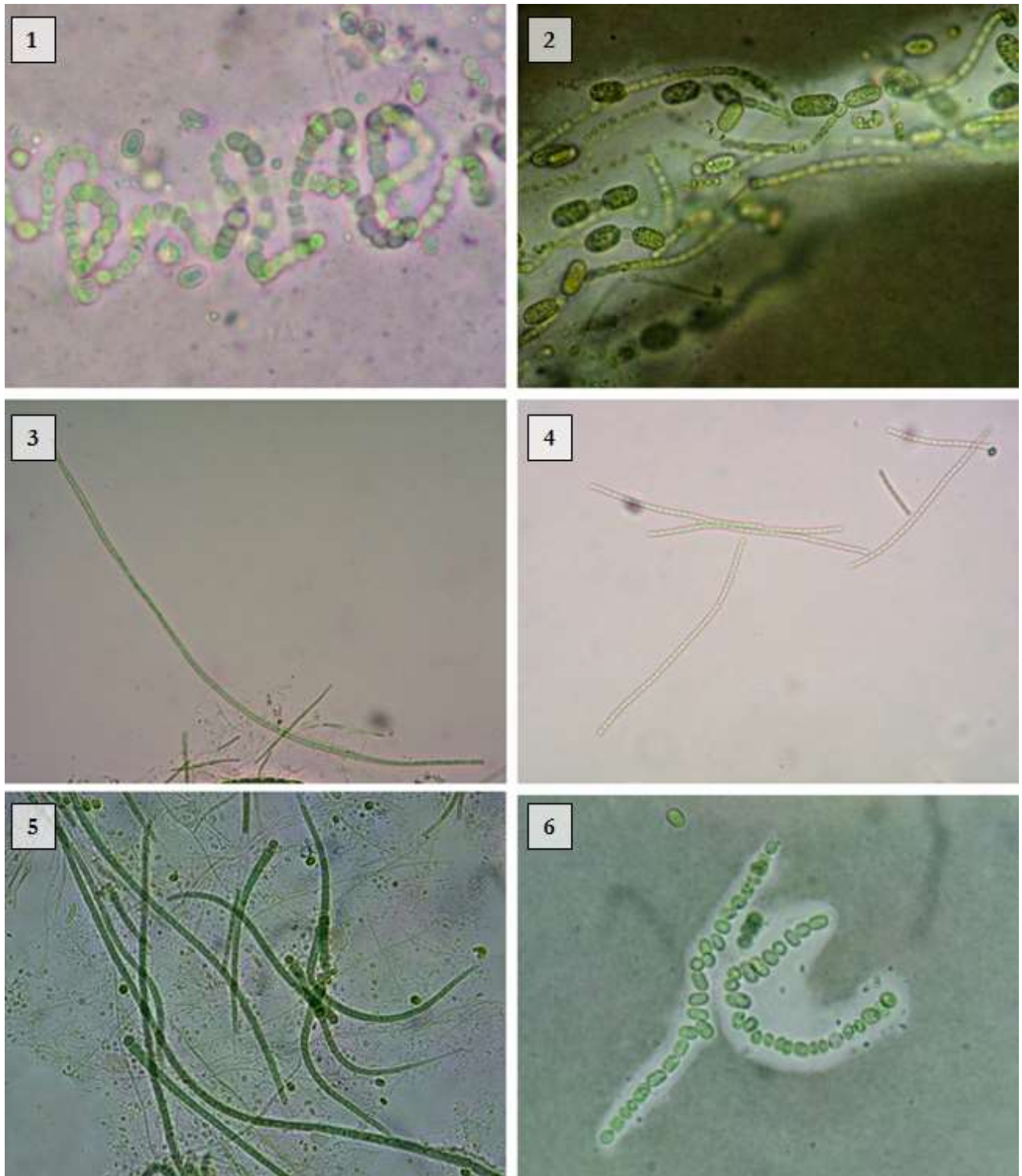
### ANEXO I. MEDIO DE CULTIVO BG11

<b>Ingrediente</b>	<b>Concentración</b>
NaNO <sub>3</sub>	17.67 mM
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> · 3 H <sub>2</sub> O	0.18 mM
MgSO <sub>4</sub> · 7 H <sub>2</sub> O	0.30 mM
CaCl <sub>2</sub> · 2 H <sub>2</sub> O	0.25 mM
Ácido cítrico	0.029 mM
Citrato férrico amoniacal	0.030 mM
EDTA	0.0024
Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> H <sub>2</sub> O	0.38
Metales traza	500 µl de la solución*
pH=7.4	

### SOLUCIÓN DE METALES TRAZA

<b>Ingrediente</b>	<b>Concentración g·l<sup>-1</sup></b>
MnCl <sub>2</sub> · 4 H <sub>2</sub> O	1.81
ZnSO <sub>4</sub> · 7 H <sub>2</sub> O	0.22
Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> · 2 H <sub>2</sub> O	0.39
Co(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> · 6 H <sub>2</sub> O	0.049

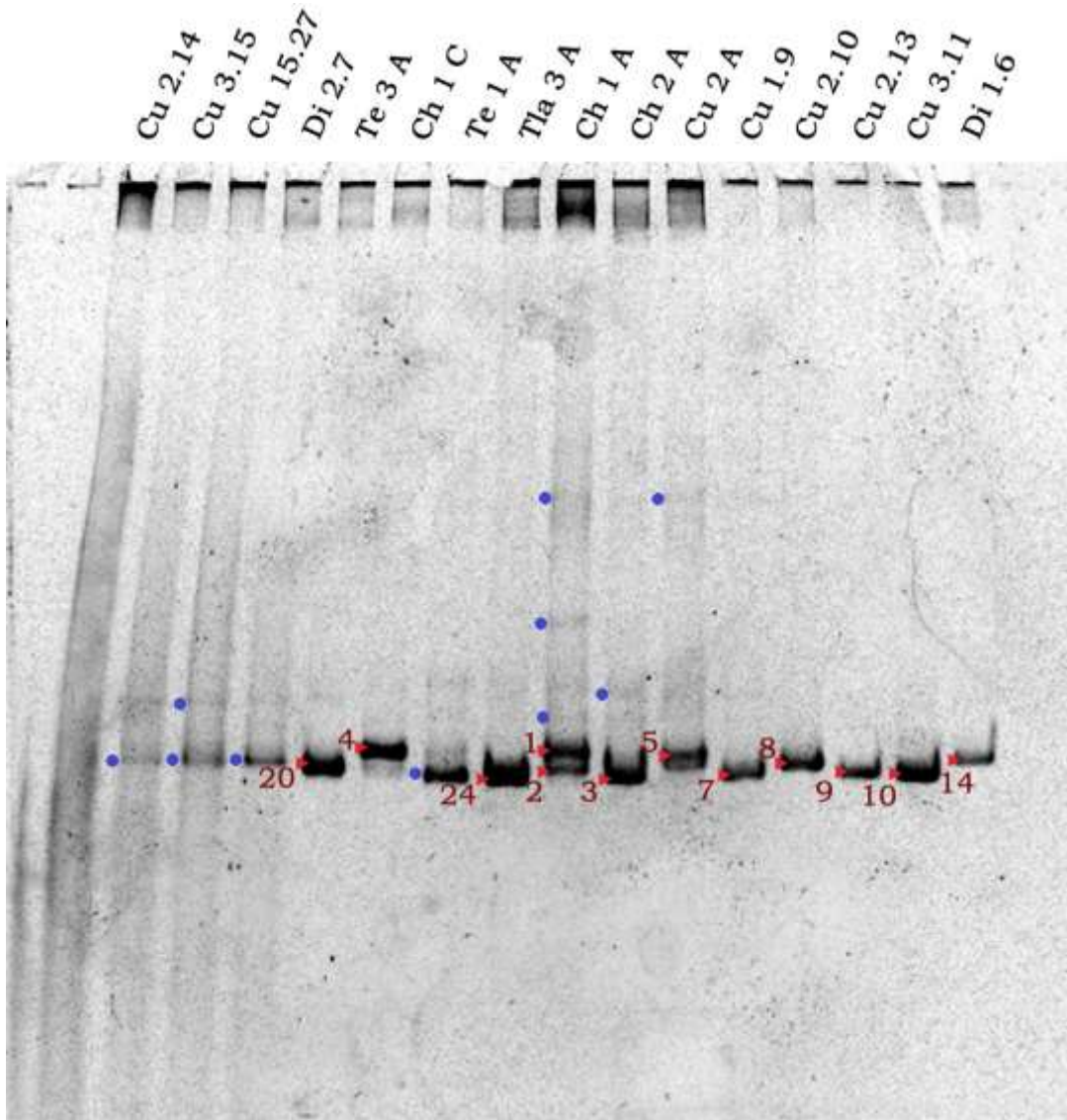
ANEXO II. MICROGRAFÍAS DE LOS GÉNEROS ENCONTRADOS.



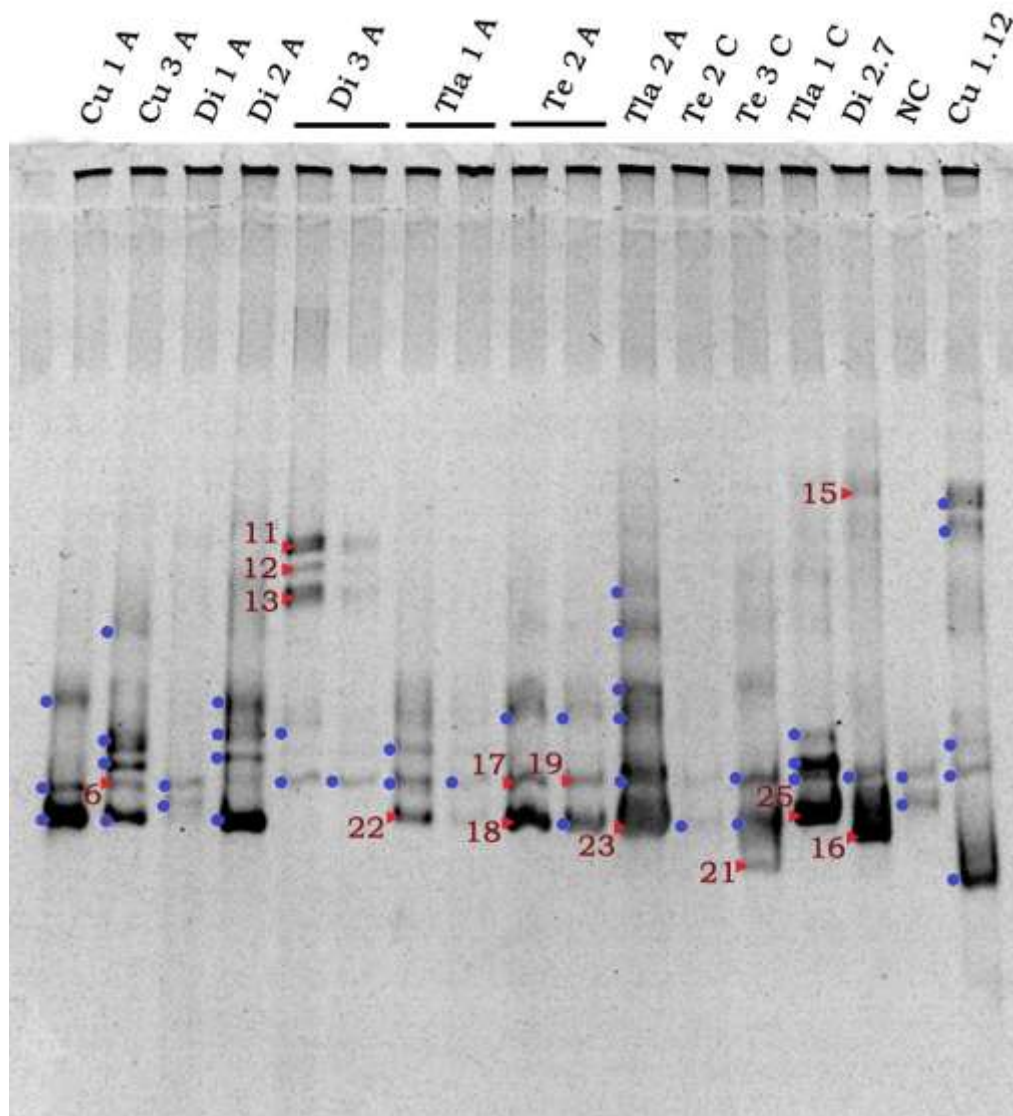
**Figura Anexo II.** Microfotografías de los géneros encontrados con diferente morfología. 1. *Anabaena* sp. de un cultivo de Cuemanco 2. *Anabaena* sp. de Los

Dínamos ambiental. 3. *Pseudanabaena* sp. de un cultivo de Cuemanco. 4. *Pseudanabaena* sp. de un cultivo de los Dínamos. 5. *Calothrix* sp. de una muestra ambiental de Cuemanco. 6. *Synechococcus* sp. de una muestra ambiental de Los Dínamos.

ANEXO III. GELES DE DGGE OBTENIDOS



**Figura Anexo IIIa.** Fotografía del gel de DGGE. Con puntos azules se indican las bandas que fueron cortadas del gel y en triángulos rojos las bandas cortadas y de las que se obtuvo una secuencia limpia. 1. CH1\_A4, 2. CH1\_A5, 3. CH2\_A2, 4. CH1\_C1\_1, 5. CU2\_A2, 7. CU1\_C1\_9, 8. CU2\_C1\_10, 9. CU2\_C1\_13, 10. CU3\_C1\_11, 14. DI1\_C1\_6, 20. TE3\_A1, 24. TLA3\_A1.



**Figura AnexoIIIb.** Fotografía del gel de DGGE. Con puntos azules se indican las bandas que fueron cortadas del gel y en triángulos rojos las bandas cortadas y de las que se obtuvo una secuencia limpia. 6. CU3\_A4, 11. DI3\_A1, 12. DI3\_A2, 13. DI3\_A3, 15. DI2\_C1\_7, 16. DI2\_C3\_7, 17. TE2\_A2, 18. TE2\_A3, 19. TE2\_A2\_r, 21. TE3\_C3\_1, 22. TLA1\_A3, 23. TLA2\_A6, 25. TLA1\_C4\_1.

## 9. ANEXOS

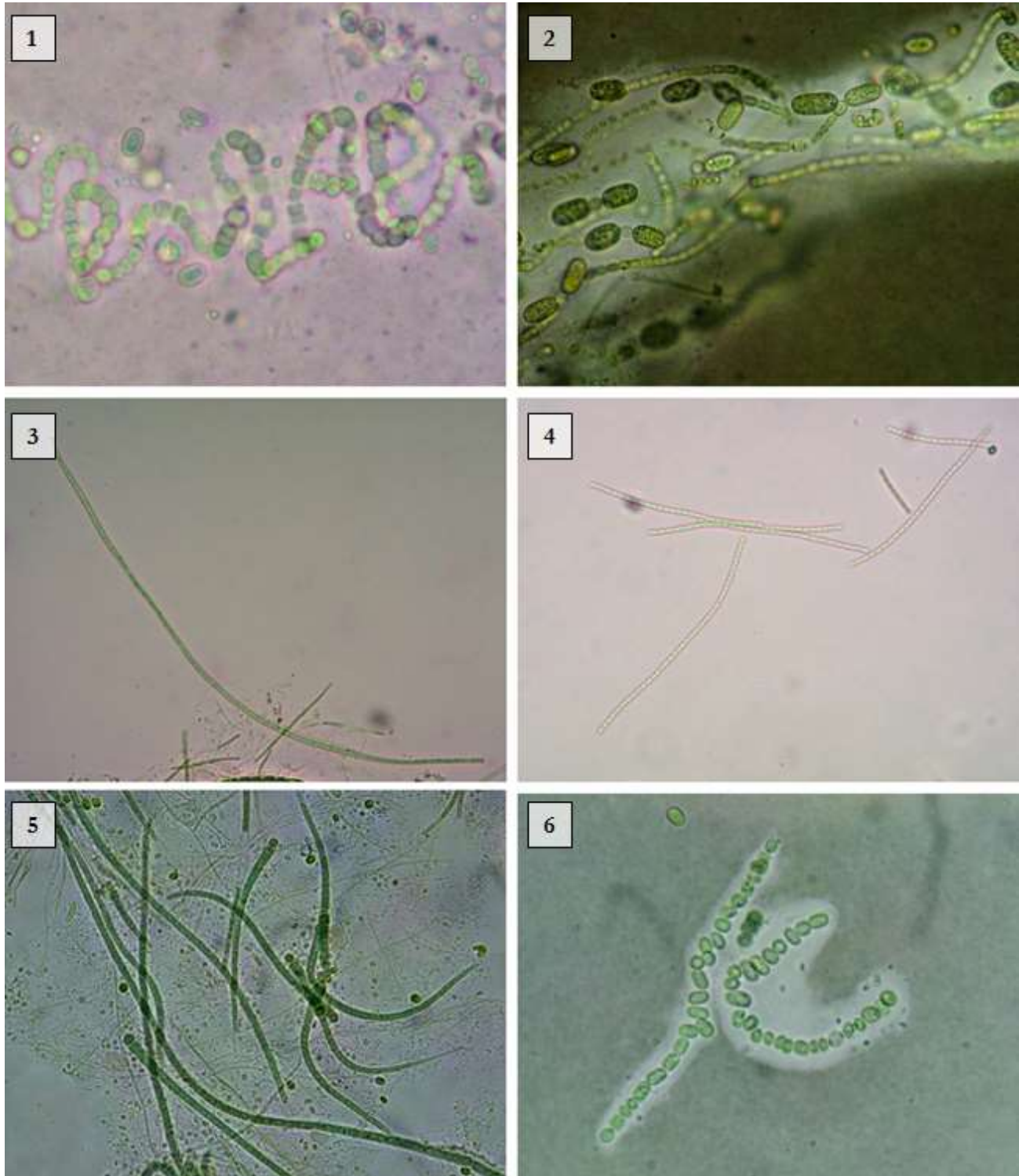
### ANEXO I. MEDIO DE CULTIVO BG11

<b>Ingrediente</b>	<b>Concentración</b>
NaNO <sub>3</sub>	17.67 mM
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> · 3 H <sub>2</sub> O	0.18 mM
MgSO <sub>4</sub> · 7 H <sub>2</sub> O	0.30 mM
CaCl <sub>2</sub> · 2 H <sub>2</sub> O	0.25 mM
Ácido cítrico	0.029 mM
Citrato férrico amoniacal	0.030 mM
EDTA	0.0024
Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> H <sub>2</sub> O	0.38
Metales traza pH=7.4	500 µl de la solución*

### SOLUCIÓN DE METALES TRAZA

<b>Ingrediente</b>	<b>Concentración g·l<sup>-1</sup></b>
MnCl <sub>2</sub> · 4 H <sub>2</sub> O	1.81
ZnSO <sub>4</sub> · 7 H <sub>2</sub> O	0.22
Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> · 2 H <sub>2</sub> O	0.39
Co(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> · 6 H <sub>2</sub> O	0.049

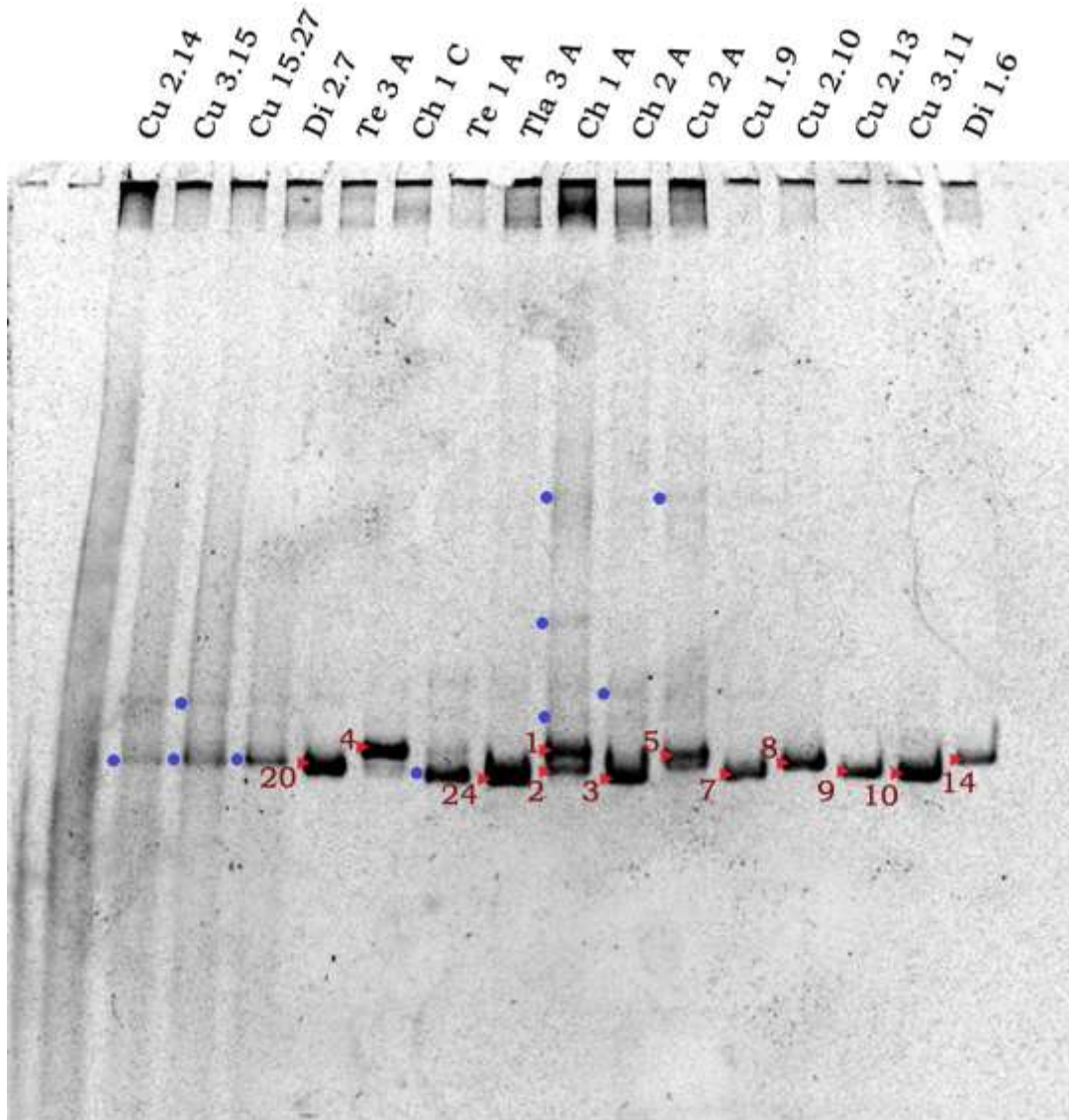
ANEXO II. MICROGRAFÍAS DE LOS GÉNEROS ENCONTRADOS.



**Figura Anexo II.** Microfotografías de los géneros encontrados con diferente morfología.  
1. *Anabaena* sp. de un cultivo de Cuemanco 2. *Anabaena* sp. de Los Dínamos

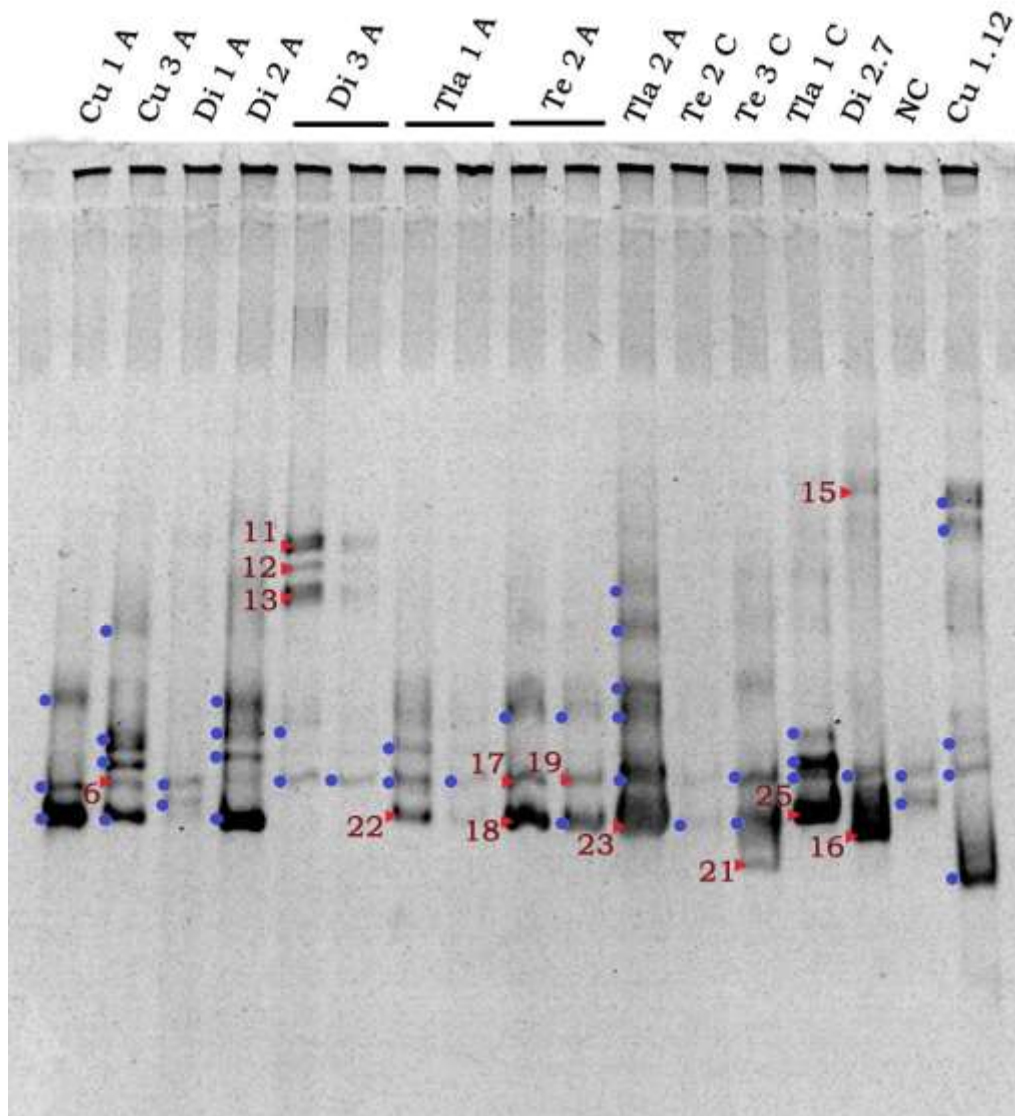
ambiental. 3. *Pseudanabaena* sp. de un cultivo de Cuemanco. 4. *Pseudanabaena* sp. de un cultivo de los Dínamos. 5. *Calothrix* sp. de una muestra ambiental de Cuemanco. 6. *Synechococcus* sp. de una muestra ambiental de Los Dínamos.

### ANEXO III. GELES DE DGGE OBTENIDOS



**Figura Anexo IIIa.** Fotografía del gel de DGGE. Con puntos azules se indican las bandas que fueron cortadas del gel y en triángulos rojos las bandas cortadas y de las que se obtuvo una secuencia limpia. 1. CH1\_A4, 2. CH1\_A5, 3. CH2\_A2, 4. CH1\_C1\_1, 5. CU2\_A2, 7. CU1\_C\_1\_9, 8. CU2\_C1\_10, 9. CU2\_C1\_13, 10. CU3\_C1\_11, 14. DI1\_C1\_6, 20. TE3\_A1, 24. TLA3\_A1.





**Figura AnexoIIIb.** Fotografía del gel de DGGE. Con puntos azules se indican las bandas que fueron cortadas del gel y en triángulos rojos las bandas cortadas y de las que se obtuvo una secuencia limpia. 6. CU3\_A4, 11. DI3\_A1, 12. DI3\_A2, 13. DI3\_A3, 15. DI2\_C1\_7, 16. DI2\_C3\_7, 17. TE2\_A2, 18. TE2\_A3, 19. TE2\_A2\_r, 21. TE3\_C3\_1, 22. TLA1\_A3, 23. TLA2\_A6, 25. TLA1\_C4\_1.