



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

POSGRADO EN CIENCIAS DEL MAR Y LIMNOLOGIA
(LIMNOLOGIA)

“Estudio morfológico y ecofisiológico de *Nostoc* sp (Nostocales, Cyanoprocarvota) en un río tropical de la Huasteca Potosina, México”

TESIS
QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:
MAESTRO EN CIENCIAS

PRESENTA:
LEONOR ARAOZ TELLEZ

TUTOR:
DR. JAVIER CARMONA JIMENEZ
FACULTAD DE CIENCIAS (UNAM)

COMITÉ TUTOR:
DR. GUSTAVO MONTEJANO ZURITA
FACULTAD DE CIENCIAS (UNAM)
DRA. HILDA PATRICIA LEON TEJERA
FACULTAD DE CIENCIAS (UNAM)
DRA. GLORIA VILA CLARA FATJÓ
FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES IZTACALA (UNAM)
DRA. PATRICIA BONILLA LEMUS
FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES IZTACALA (UNAM)

MÉXICO, D. F. JULIO 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.

AGRADECIMIENTOS.

A la Universidad Nacional Autónoma de México

Al posgrado en Ciencias del Mar y Limnología, UNAM.

Al proyecto de investigación PAPIIT -UNAM (IN-211712) por el apoyo otorgado para el trabajo de campo.

A los proyectos AECID-España (A/010529/07) y (A/016417/08) por el apoyo otorgado con el trabajo del capítulo de la actividad enzimática de las fosfatasa alcalinas y nitrogenasa junto con la preparación y toma de fotografías con el microscopio electrónico de barrido.

A mi tutor Dr. Javier Carmona Jiménez por su asesoría y apoyo en el desarrollo del proyecto de investigación.

A los miembros de mi comité tutor:

Dr. Gustavo Montejano Zurita

Dra. Hilda Patricia León

Dra. Gloria Vilaclara Fatjó

Dra. Patricia Bonilla Lemus

AGRADECIMIENTOS A TITULO PERSONAL

A Javier Carmona Jiménez por su paciencia, amistad y confianza depositada en mí para desarrollar y culminar este proyecto.

A la Dra. Gloria Vilaclara por compartir conmigo sus conocimientos y experiencias.
“Muchas gracias”.

Al Dr. Gustavo Mantejano Zurita por sus valiosos comentarios sobre el género *Nostoc* y sus muestras de cariño.

A la Dra. Hilda León y la Dra. Patricia Bonilla por formar parte de mi comité tutor.

A mi amiga Mariana Cartagena por las amenas horas de trabajo juntas.

A todos mis compañeros: Mariana, Itzel, Miriam, Mónica, Rogelio, Ángela, María Elena y Víctor por hacer del laboratorio Ficología un agradable lugar.

A mis padres Lorenzo y Concepción por poner los cimientos de la mujer que soy ahora.

A mi esposo Juan Hilario por su apoyo y comprensión incondicional.

A mis amados hijos Luis Alfonso y David Hernán por llenar mi vida de alegría.

A mis queridas hermanas Andrea y Miriam y mis adorables sobrinos Alberto, Sebastián y Connie.

Índice

Resumen	8
1. Introducción	9
1.1. Características generales del género <i>Nostoc</i>	10
1.2. Distribución y ecología	10
1.3. Metabolismo	11
El metabolismo del carbono	11
El metabolismo del nitrógeno	11
El metabolismo del fósforo	12
1.4. La organización celular	
Las células vegetativas	13
Las células especializadas	13
Gránulos de polifosfato	14
El crecimiento y la reproducción	14
La taxonomía	16
1.5. Justificación de estudio	18
1.6. Preguntas y premisas de investigación	19
1.7. Objetivos	20
1.8. Descripción del sitio	21

2. Material y métodos	
2.1. Caracterización ambiental y microambiental	21
2.2. Determinación de nutrientes en el laboratorio	21
2.3. Caracterización fisiológica	
Ensayos de fijación de N ₂ <i>in situ</i> nitrogenasa	24
Análisis cromatográfico de las muestras	25
Ensayo de asimilación de fósforo orgánico <i>in situ</i> enzimas fosfatasas	25
Preparación de los sustratos y solución de parada	26
Ensayos de actividad fosfatasa <i>in situ</i>	26
2.4. Caracterización morfológica y morfométrica	27
Tinción de gránulos de poli-P	28
Preparación de material para MET	28
Cultivos	29
Análisis estadístico	30
3. Resultados	
3.1. Análisis ambiental	30
3.2. Análisis microambiental	30
3.3. Análisis fisiológico actividad nitrogenasa	30
3.4. Análisis fisiológico actividad fosfatasa	31
3.5. Análisis morfológico y morfométrico	31
4. Discusión	47
5. Conclusiones	51
6. Literatura citada	52

Resumen

Estudios previos evidencian a *Nostoc* spp. como un género con una considerable variación morfológica y morfométrica, así como tolerancia a un amplio espectro de condiciones ambientales y microambientales, lo cual dificulta la delimitación de sus especies. El presente trabajo busca caracterizar la variación biológica de *Nostoc verrucosum* poner el nombre del último autor válido, con el año en el río “La Garita”, San Luis Potosí, mediante una aproximación morfológica, ecológica y fisiológica, considerando la revisión de muestras naturales y de cultivos en los medios CHUD₁₀ modificado y BG11₀. Las poblaciones de *Nostoc* se colectaron mediante el método de transecto; se registraron los parámetros fisicoquímicos de temperatura del agua, conductividad (K₂₅), pH, así como oxígeno disuelto y su % de saturación; los microambientales evaluados fueron profundidad, velocidad de corriente, tipo de substrato y radiación fotosintéticamente activa; se evaluó el nitrógeno inorgánico disuelto en forma de amonio, nitratos y nitritos, junto con el fósforo reactivo soluble. Los bioensayos de fijación de nitrógeno se realizaron *in situ* mediante la técnica de reducción del acetileno; la actividad *in situ* de las enzimas fosfatasas alcalinas se determinó con un método colorimétrico y el empleo de sustratos artificiales fosfoésteres (para-nitrofenilfosfato y bis para-nitrofenilfosfato). La capacidad de almacenamiento de fósforo intracelular se estimó con la tinción de gránulos de polifosfato con sulfuro de amonio y nitrato de plata.

Los resultados obtenidos sugieren que la morfología de las poblaciones estudiadas es afín a *N. verrucosum*, desarrollándose en ambientes de temperatura mayor a 20°C y aguas duras, con elevada velocidad de corriente y baja iluminación; además, se presenta con una marcada preferencia estacional, en post-lluvias. La variación en la actividad de las enzimas nitrogenasas y fosfatasas, así como la capacidad de almacenar fósforo en un solo gránulo de polifosfato por célula, se relacionaron con la disponibilidad de nutrientes; estas estrategias permiten que las poblaciones respondan a la disponibilidad de nutrientes y crezcan óptimamente en el periodo de fin de lluvias, presentando entonces una baja variación morfométrica. A pesar de la restringida variación morfológica natural, en cultivo se observó una mucha mayor variabilidad fenética, producto de que las condiciones *in vitro* se diseñaron para obtener condiciones más extremas.

Introducción

Las Cianoprocariontes se encuentran dentro de los organismos más fascinantes en la Tierra. Se originaron hace más de 3000 millones de años y transformaron las condiciones químicas y ecológicas de la tierra primitiva (Komárek, 2006). Su capacidad de adaptación morfológica y fisiológica les ha permitido colonizar una gran cantidad de ecosistemas acuáticos, terrestres y extremos, tales como manantiales termales y nieves perpetuas (Whitton & Potts, 2000; Komárek, 2006). Son organismos oxifotótrofos, capaces de fijar nitrógeno gaseoso con o sin células especializadas. Como resultado de su actividad metabólica, participan en la formación de estromatolitos, travertinos y forman parte sustancial de depósitos de piedra caliza. Asimismo, son capaces de producir toxinas que les permiten interactuar de manera competitiva dentro de los ecosistemas (Komárek, 2006).

Su permanencia en el planeta se debe principalmente al proceso de “evolución estática” que se basa en la transferencia horizontal del DNA entre cepas de una misma población, dando como resultado una aclimatación y adaptación rápida (Knoll & Golubic, 1992; Schopf, 1993 y 1996, Castenholz, 2001, en Komarek, 2006). Este tipo de evolución no incluye la reproducción sexual y proporciona un amplio intervalo de patrones genéticos, estructurales y metabólicos. De esta forma se explica su diversificación a largo plazo, así como la existencia, complejidad y desarrollo continuo de nuevos y numerosos genotipos y morfotipos ecológicamente especializados. Desde este punto de vista, la evolución de las Cyanoprokaryota y sus relaciones filogenéticas están reguladas por determinados procesos metabólicos y genéticos. La taxonomía moderna y la clasificación de la diversidad de las Cyanoprokaryota propone reunir el enfoque morfológico con técnicas moleculares y ecofisiológicas, creando un sistema filogenético que combine datos genéticos, variación morfológica y ecológica; así como caracteres ecofisiológicos y ultraestructurales (Komárek, 2006).

Los problemas de especiación, el concepto y la diversidad de especies dentro del género *Nostoc* son aspectos controversiales (Mollenhauer, 1988). El género *Nostoc* se utiliza como un modelo para la clasificación taxonómica y para la comprensión de la función de procariontes fotótrofos en el desarrollo biocenótico y ecológico. (Mollenhauer, 1988).

Características generales del género *Nostoc*

Nostoc es una Cyanoprocaryota filamentosa con un ciclo de vida heteromorfo (Mollenhauer, 1988), que forma colonias macro y microscópicas en una gran cantidad de ambientes terrestres y acuáticos (Dodds *et al.*, 1995). Una característica importante del género, para poder colonizar estos ambientes, está relacionada con la capacidad de soportar la desecación y recobrar su actividad metabólica horas o días después de la rehidratación con agua líquida (Dodds *et al.*, 1995).

Lo anterior puede explicarse de varias formas: i) Presentan vainas que protegen los tricomas, así como acinetos que les permiten adherirse a las diferentes superficies, adaptándose de este modo a ambientes muy heterogéneos (Margalef, 1983, Dodds *et al.*, 1995). ii) Puede soportar ciclos repetidos de congelación y descongelación, característica importante para habitar ambientes árticos y antárticos (Dodds *et al.*, 1995). iii) Tiene la habilidad de protegerse de la luz ultravioleta; un ejemplo es la presencia de scytonemina, entre otros pigmentos, donde la radiación solar es alta (Ramírez *et al.* 2011). iv) Mantiene la fertilidad de muchos ambientes terrestres y acuáticos gracias a su capacidad de fijar nitrógeno, asimilar y almacenar fósforo (Dodds *et al.*, 1995). v) Algunas especies pueden ser utilizadas como indicadores de contaminación en ambientes fluviales (Perona *et al.*, 1998)

Distribución y ecología

Las especies de *Nostoc* se pueden encontrar en un amplio intervalo de ecosistemas terrestres y acuáticos. Todas las especies requieren agua en forma líquida como elemento esencial para llevar a cabo su ciclo de vida. El vapor de agua no puede ser usado como fuente de agua para el protoplasma (Mollenhauer, 1988). Donde el agua es escasa o está ausente por periodos prolongados, algunas especies son capaces de sobrevivir presentando estadios criptobióticos, con o sin células de resistencia especializadas. Otras especies necesitan estar sumergidas permanentemente en el agua (Mollenhauer, 1988). Se pueden encontrar crecimientos de manera epipélica, epilítica o epifítica, aunque *Nostoc* no se ha encontrado en forma endolítica (Whitton & Potts, 2000). Sin embargo,

algunas crecen endofíticas, estableciendo interacciones simbióticas con hongos, musgos, hepáticas, helechos y plantas vasculares (Komarek & Anagnostidis, 1989).

Metabolismo

El metabolismo de carbono

Dependiendo del tipo de fuente de carbono que utilicen, las Cianoprokaryota pueden presentar los siguientes tipos de metabolismo: fotoautotrofismo, utilizando carbono inorgánico en la fotosíntesis oxigénica; fotoheterotrofismo, cuando la fotosíntesis proporciona energía en forma de ATP y necesita compuestos orgánicos como fuente de carbono, y quimioheterotrofismo, o capacidad de crecer en la oscuridad utilizando compuestos orgánicos como fuente de carbono y energía (Smith, 1982).

El metabolismo de nitrógeno.

Las Cyanoprokaryota son capaces de utilizar varias formas de nitrógeno para su crecimiento -nitritos (NO_2^-), nitratos (NO_3^-) y amonio (NH_4^+)-, aunque tienen preferencia por el amonio (Guerrero & Lara 1987). Son capaces de reducir el N_2 atmosférico mediante la acción enzimática nitrogenasa (NASA), localizada generalmente en los heterocitos, presentes en el orden Nostocales. Las Cyanoprokaryota sin heterocitos de los órdenes Oscillatoriales y Chroococales pueden llegar a fijar el N_2 atmosférico mediante la separación temporal y/o espacial del proceso fotosintético (Bergman *et al.*, 1997). Independientemente de su origen, el nitrógeno se incorpora a la materia orgánica en forma reducida como amonio (Stewart, 1980; Flores & Guerrero, 1994)

Tipos y estrategias de fijación de nitrógeno N₂

	Tipo	Fijación de N ₂	Estrategia	Ejemplos	
1	Filamentos no heterocitosos unicelular	No	No presenta	<i>Spirulina</i> <i>Microcoleus</i> <i>Microcystis</i> <i>Synechococcus</i>	
	2	Filamentos no heterocitosos unicelular	Sí anaerobio o microaerobio	Evasión	<i>Leptolyngbya</i> <i>Oscillatoria</i>
				Separación espacial de la fijación de nitrógeno y la fotosíntesis	<i>Anabaena</i> <i>Nostoc</i> <i>Fischerella</i> <i>Scytonema</i>
4	Filamentos no heterocitosos unicelular	Sí aerobio	Separación temporal de la fijación de nitrógeno y la fotosíntesis	<i>Lyngbya</i> <i>Crocospaera</i> <i>Cyanothece</i>	
			Combinación de la separación temporal y espacial	<i>Trichodesmium</i> <i>Symploca</i> <i>Gloeothece</i>	

ENCYCLOPEDIA OF LIFE SCIENCES 2008, John Wiley & Sons, Ltd. www.els.net en Stal (2008)

La eficiencia en la capacidad de fijación de N₂ varía dependiendo de la estrategia utilizada: la separación espacial (formación de heterocitos) tiene una eficiencia similar a la observada en la combinación de la separación temporal y espacial, y menor en las Cyanoprocaryota que solo presentan separación temporal (Berman, *et al.*, 2003)

El metabolismo de fósforo

Las Cyanoprokaryota captan el fósforo inorgánico disponible en su ambiente en forma de ortofosfatos, mediante uno o varios sistemas de transporte activo.

Cuando la concentración de fósforo es alta puede entrar en el interior de la célula por transporte pasivo, incorporándose después a las rutas metabólicas (Healey, 1982).

La capacidad de utilizar el fósforo orgánico es más restrictiva y es posible gracias a la presencia de enzimas fosfatasas (Grossman *et al.*, 1994). Las fosfatasas son enzimas con la capacidad de hidrolizar ésteres fosfóricos y liberar ortofosfatos, incrementando la disponibilidad del fosfato en el ambiente próximo y un residuo orgánico (Whitton & Hernández, 2000). La parte orgánica liberada de los compuestos fosfatados es captada normalmente por los propios organismos, pero también puede servir como sustrato adicional para suplir las necesidades (C, N) de las bacterias heterótrofas. En estudios previos, se ha demostrado que las fosfatasas son altamente específicas para los enlaces éster de fosfato (Perry, 1972).

La organización celular

Las células vegetativas

Las células vegetativas son básicas para todas las Cyanoprocaryota. Poseen una membrana plasmática, rica en sistemas enzimáticos y rodeada por una pared celular característica de bacterias gram (-), con pequeños poros (Castenholz, 1989^a). Presentan una envoltura exterior a la membrana externa denominada vaina, mucilago o cápsula, constituida principalmente por polisacáridos producidos dentro de las células y excretadas por ellas; esta es la principal ventaja adaptativa contra la desecación (Walsby, 1974) y contribuye favorablemente a la formación de agregados (Drews & Weckesser, 1982).

Las células especializadas

A partir de células vegetativas, *Nostoc* es capaz de diferenciar células especializadas, como heterocitos, acinetos y hormogonios. Los heterocitos son las células donde tiene lugar la fijación de N_2 por la enzima nitrogenasa en condiciones anaerobias (Wolk *et al.*, 1994). La diferenciación de los heterocitos a partir de células vegetativas es irreversible y se produce en condiciones de deficiencia de fuentes nitrogenadas (Whitton, 1992). Además, poseen una envoltura muy gruesa para impedir la difusión del oxígeno, que inhibe de manera irreversible la enzima y gránulos polares en cada sitio de unión con las células vegetativas, denominadas gránulos de cianoficina (Wolk *et al.*, 1994). La forma, número y colocación de los heterocitos en el tricoma es un carácter taxonómico empleado por el sistema tradicional de clasificación (Komárek & Anagnostidis, 1989).

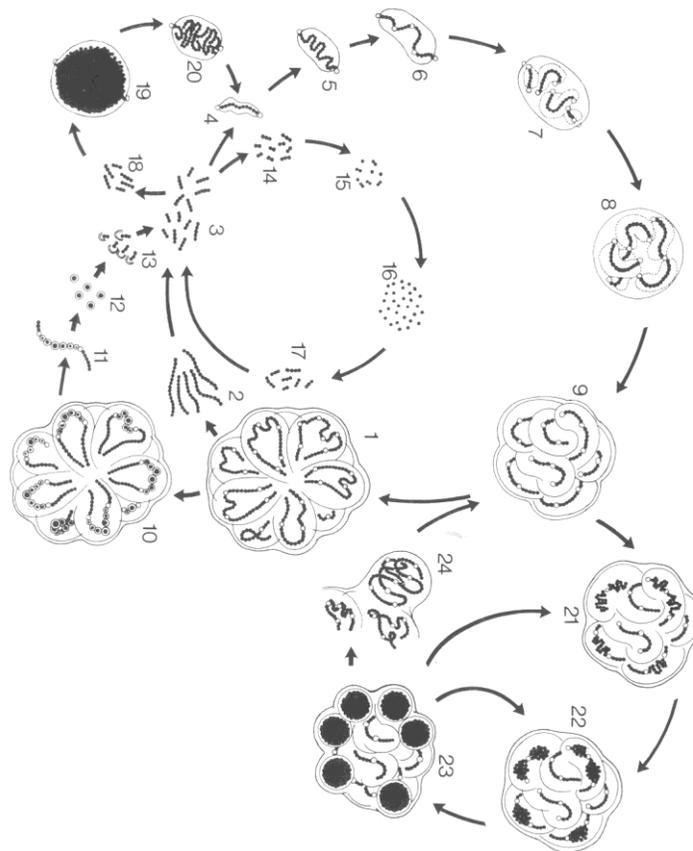
Los acinetos o formas celulares esporuladas se diferencian de las células vegetativas cuando las condiciones ambientales son desfavorables. Generalmente se inducen en condiciones limitantes de fósforo, por limitación de luz o en presencia de carbohidratos, como fuente de energía del metabolismo heterótrofo (Nichols & Adams, 1982). Los hormogonios son otra forma de especialización celular; su función principal es la reproducción y pueden tener movilidad (Whitton, 1992). Los hormogonios pueden ser pluricelulares o unicelulares, en cuyo caso se denominan gonidios (Geitler, 1932).

Gránulos de polifosfato

Los gránulos de polifosfato son acúmulos de polifosfato, polímeros lineales formados por decenas y centenas de residuos de ortofosfato unidos por enlaces fosfoanhídridos ricos en energía. Parece ser que la parte central de estos gránulos constituye un núcleo formado por lípidos y proteínas. En algunos casos pueden constituir una fuente de energía, en sustitución del ATP. (Mateo *et al.*, 2006)

El crecimiento y la reproducción

La reproducción de *Nostoc* puede realizarse de distinta manera: i) A partir de la fragmentación de la colonia y liberación de filamentos. ii) La formación de acinetos, los cuales son capaces de dispersarse cuando las condiciones se vuelven favorables. iii) Por la formación de hormogonios. iv) Mediante la proliferación de grandes colonias. (Dodds *et al.*, 1995). Las estructuras y fases del ciclo de vida se emplean para diferenciar las especies (Mollenhauer, 1988).



El ciclo de vida propuesto por Mollenhauer (1988) incluye las siguientes etapas:

1) talo maduro; 2) desintegración de tricomas y formación de hormogonios largos, estas fases son planctónicas libres; 3) pueden fragmentarse para formar hormogonios cortos, esto incrementa el número de propágulos; 4) cuando la movilidad se detiene, el hormogonio comienza a enquistarse; 5) las capas superiores de la envoltura celular se transforman en una vaina gelatinosa, y cuando esta toma agua se expande, solo las dos

células terminales están libres de la envoltura gelatinosa y se convierten en heterocitos; 6) la vaina es firme y dura en el comienzo y se resiste a la extensión longitudinal provocada por el crecimiento del tricoma. Esto resulta en pliegues del tricoma, causando que las paredes transversales se oblicuen. Cuando la inhibición procede y la vaina comienza a suavizarse, el tricoma se alisa y forma curvas en donde aparecen heterocitos intercalares; 7) algunas veces, los fragmentos de los tricomas dentro de la envoltura mucilaginosa forman su propia vaina; 8) cuando esta vaina aumenta más y más, alrededor de los tricomas se forma un sincenobio; 9) crece y se hace más grande. 10-24) Ciclos de otras especies de *Nostoc* 10) Forma acinetos, algunas especies solo pueden formarlos en talos maduros; 11) los acinetos aparecen primero entre dos heterocitos, el resto del tricoma se transforma progresivamente 12) cuando los acinetos se forman, el tricoma se desintegra; los acinetos actúan como propágulos y estructuras de resistencia al mismo tiempo; 13) los acinetos germinan y se desarrollan hormogonios cortos; 14-17) formación de células solas; algunas veces continúa la fragmentación de los hormogonios solos, formando células solas que son una forma especial de propágulo; después comienzan a dividirse y forman hormogonios cortos. 18-20) talo con células densamente empaquetadas; el arreglo del tricoma no es detectable; 19) los tricomas se enredan en un talo juvenil, las células se dividen y los paquetes se hacen más densos; pueden ser un estado de transición o un estado final; 20) los paquetes pueden soltarse posteriormente; 21-24) estado de proliferación; 21) el talo (9), en lugar de formar filamentos maduros o porciones de tricomas, se comporta como si hubiera pasado por una fase hormogonial y crece por pliegues u ondulaciones en la vaina madre; 22-24) esto resulta en excrecencias llamadas fases de proliferación; algunas especies se multiplican exclusivamente por separación de fases de proliferación del talo.

La taxonomía

El género *Nostoc* pertenece al Orden Nostocales y forma parte de las Cyanoprocaryota filamentosas con tricomas verdaderos (tricoma isopolar o heteropolar) y con falsa ramificación o no ramificado. En algunas especies se presentan heterocitos, acinetos, o bien son facultativos. La división celular es perpendicular, usando el tricoma como eje, en una sola dirección y se mantiene en

las subsiguientes generaciones. No presenta planocitos y los monocitos solo se reconocen en un género (*Coleodesmiopsis*). La reproducción se lleva a cabo principalmente por hormogonios u hormocitos (Geitler, 1932). En la última propuesta taxonómica del grupo (Komárek, 2010), se fusionan los órdenes Nostocales y Stigonematales en el orden Nostocales, basado en el origen filogenético de los heterocitos, la secuencia del gen 16S rDNA y el arreglo tilacoidal.

El orden agrupa 8 familias; dentro de ellas, la familia Nostocaceae se distingue por la presencia de tricomas y filamentos isopolares, que finalizan con una parte terminal redondeada o reducida, algunas veces con células elongadas, sin ramificaciones falsas o verdaderas. Las estructuras de reproducción reconocidas son hormogonios simétricos, heterocitos y acinetos de forma intercalar o terminal en el filamento (paraheterocito o apoheterocito). Todas las células son capaces de dividirse sin zonas meristemáticas (Komárek & Agnostidis, 1989).

El género *Nostoc* se caracteriza por un ciclo de vida heteromorfo, durante el cual presenta etapas especiales y características; las células se unen para formar un filamento uniseriado rodeado de una vaina (Mollenhauer, 1988, Komárek & Agnostidis, 1989); asimismo, por la presencia de talos micro o macroscópicos, de consistencia gelatinosa, amorfos, lobulados o esféricos, con superficie irregular, lisa o verrugosa. Presenta colonias filamentosas, formando planos gelatinosos, o parecidos al papel (cuando está seco). En el interior de la colonia, los filamentos se encuentran enroscados, libres o densamente aglomerados, en ocasiones reunidos densamente en la capa periférica. Los tricomas presentan vainas alrededor, sólo son visibles en la superficie de las colonias o en colonias jóvenes. El mucilago colonial puede ser amplio, fino, confluyente, algunas veces amarillento o café. El tricoma isopolar, de la misma anchura a lo largo de todo el filamento, las células apicales no están diferenciadas morfológicamente de otras células; las células pueden tener forma cilíndrica, de barril, o casi esféricas (formando

tricomas moniliformes). La variación en el tamaño de células llega a ser característica de especies (Komárek, 2005).

Las estrategias de reproducción incluyen células vegetativas capaces de dividirse en un solo plano perpendicular al eje longitudinal o polar; son de la misma anchura a lo largo de todo el filamento (Mollenhauer, 1988). Asimismo, se registra reproducción por hormogonios móviles, diferenciados de los tricomas por la desintegración de heterocitos, necridios, o por la formación de acinetos (Komárek, 1992). Los heterocitos pueden ser solitarios y se desarrollan de forma terminal o intercalar en el tricoma (su presencia o ausencia depende del metabolismo del nitrógeno). En general, presentan la misma forma que las células vegetativas, pero normalmente son más grandes que éstas. Se pueden desarrollar al final de los hormogonios o de manera intercalar a lo largo de todo el filamento; formado por la transformación de células vegetativas y siempre uno por uno. Cada heterocito produce sustancias inhibitorias a ambos lados a lo largo del filamento; la eficiencia de la inhibición disminuye gradualmente, lo que permite la formación de otro heterocito a esta distancia. A este proceso se le conoce como “distancia crítica” y es una característica diagnóstica a nivel de especie (Mollenhauer, 1988). Los acinetos se derivan de la transformación de células vegetativas y pueden reconocerse por la forma oval; son un poco más largos que las células vegetativas y surgen apoheterocíticamente (Komárek & Anagnostidis, 1989). De las más de 200 especies descritas en el mundo, hasta el momento sólo se reconocen 40, lo cual indica que existen marcadas controversias taxonómicas (Komárek & Anagnostidis, 1989).

Justificación de estudio

Estudios previos han evidenciado a *Nostoc* como un género de considerable variación morfológica y tolerancia a un amplio espectro de condiciones ambientales, lo que dificulta la delimitación de las especies (incluida la ausencia de humedad). Así mismo, es necesario estudiar poblaciones de regiones de latitudes tropicales que permitan complementar estudios previos realizados en otras latitudes. En México se han descrito numerosas

poblaciones de *Nostoc*, aunque en la mayoría de los estudios hay incertidumbre para asignarle un nombre taxonómico por la enorme variación biológica que presentan, aunado a pocos elementos que la expliquen o ayuden a establecer patrones de comparación. Por lo anterior, es importante incorporar análisis morfológicos, ecológicos y fisiológicos, que contribuyan a la caracterización de los intervalos y gradientes más importantes que definen a una población con crecimientos abundantes en un río tropical calcáreo.

Preguntas y premisas de investigación

Pregunta 1.- ¿Cuáles son los factores ambientales y microambientales que determinan la abundancia de la población de *Nostoc* sp en el río “La Garita” durante la época de colecta?

Premisa. La baja disponibilidad de nutrientes en el agua, la alta velocidad de corriente y la baja radiación incidente en el río estarán altamente correlacionados con la época de secas y lluvias, regulando la abundancia y el estado fisiológico de la población.

Pregunta 2.- ¿La actividad de las enzimas fosfatasas y nitrogenasa está relacionada con la disponibilidad de nitrógeno inorgánico disuelto y fósforo reactivo soluble en el agua?

Premisa. La asimilación de fósforo y fijación de nitrógeno se elevarán, si las concentraciones de nitrógeno disuelto y fósforo reactivo soluble son limitantes; por el contrario, la fijación disminuirá si hubiera un aporte importante de estos nutrientes.

Pregunta 3.- ¿De qué manera influyen los cambios físicos y químicos en el agua en la morfología y el estado reproductivo de *Nostoc* sp y la aproximación fenética puede contribuir para la identificación taxonómica de la especie?

Premisa. La caracterización de la variación morfológica y morfométrica a lo largo de las distintas épocas de colecta y en cultivos, permitirá reconocer distintas fases y/o etapas de crecimiento y aproximarnos a la identificación taxonómica de la especie; así como relacionarla con los cambios fisicoquímicos en el agua y la capacidad fisiológica de la población.

Objetivo general

Caracterizar los intervalos y gradientes más importantes que definen a una población de *Nostoc* sp. que forma crecimientos abundantes en un río tropical de ambientes calcáreos, mediante una aproximación ecológica, fisiológica y morfológica.

Objetivos particulares

Analizar la variación espacio-temporal de los parámetros fisicoquímicos y la abundancia de una población de *Nostoc* sp. en el periodo más favorable para su desarrollo (noviembre a febrero).

Determinar relaciones entre ambiente y factores asociados con el metabolismo de *Nostoc* sp. (e.g., fijación de nitrógeno y asimilación de fósforo)

Estimar posibles influencias que ejercen los cambios físicos y químicos del agua, en la morfología y estado reproductivo de *Nostoc* sp.

Descripción del sitio.

El río La Garita es de primer orden, ubicado en el estado de San Luis Potosí, en la región conocida como la Huasteca, dentro de la cuenca del río Pánuco (García, 1973). Desde el punto de vista geográfico, la Huasteca se encuentra en el límite norte de la región neotropical a 22°50 y 21°10 LN y a 101°20 y 98°30 LO. Fisiográficamente, forma parte de la provincia de la Sierra Madre Oriental y, en mayor proporción, de la provincia norteña de la Llanura Costera del Golfo, encontrándose la mayor parte del área dentro de la Subprovincia del Carso Huasteco. Es una región cárstica de las más extensas del país, en donde predominan las rocas calizas, por lo que se observa una gran cantidad de carbonatos y sulfatos disueltos en el río (INEGI, 1985). Al ser disueltas por el agua, dichas rocas forman sistemas cavernarios y copiosos manantiales con altos contenidos de carbonatos; por esta razón, es común encontrar que el sustrato predominante en muchas corrientes esté constituido por travertinos (INEGI 1985, Secretaría de Recursos Hidráulicos 1971). El clima de la región es cálido subhúmedo, con lluvias en verano; su temperatura ambiente media anual oscila entre los 27 a 29°C, con variaciones interanuales de 1 a 2°C. El río es permanente con una marcada disminución del caudal en la época de secas. (J. Carmona com. per.)

Material y métodos.

Caracterización ambiental y microambiental

El río La Garita fue colectado en las épocas en que la población estuvo presente y con mayor abundancia. Durante la época de post-lluvias cálidas (noviembre 2009, **PLL2009**; noviembre 2010; **PLL2010** y noviembre 2011, **PLL2011**) y secas frías (febrero 2010; **S2010**), la abundancia y el registro de los parámetros ambientales se estimaron con el método de transecto (Necchi *et al.*, 1995; Carmona *et al.*, 2006; Ramírez & Carmona, 2005), que consiste en muestrear segmentos a lo largo de 10 m de longitud sobre el cauce del río. El análisis se realizó sobre el sustrato natural (roca). En el transecto se localizaron 5 puntos separados dos metros entre sí; la ubicación de los puntos de muestreo se determinó aleatoriamente por la técnica de la “manecilla del reloj”, que señala la dirección en donde se debe de colectar. La unidad de muestreo consistió de un círculo de 7.5 cm de radio (área de 177 cm²), (Necchi *et al.*, 1995; Carmona *et al.*, 2006; Beltrán *et al.*, 2005;

Ramírez-Rodríguez *et al.*, 2006). En cada unidad de muestreo se midió la cobertura porcentual, la profundidad, el tipo de sustrato, la velocidad de corriente y la cantidad de radiación fotosintéticamente activa. Las dos últimas variables se estimaron con un medidor de corriente Swoffer 2100 (Washington, USA) y un sensor Quantum subacuático Li-Cor (Nebraska, USA) y el dataloger LI-1000 (Nebraska, USA) respectivamente. Los parámetros microambientales se registraron en el centro de cada unidad de muestreo, lo más cercano a los crecimientos algales. La caracterización ambiental se realizó *in situ*, a través del registro de la conductividad específica (K_{25}), el pH y la temperatura del agua con un potenciómetro marca Conductronic PC18 (Puebla, México) y el oxígeno disuelto con un medidor de oxígeno YSI-85 (Ohio, EUA). El análisis químico se realizó con 500 ml de agua del río, previamente filtrada (con filtros Millipore de 0.45 primero y 0.22 μm de apertura de poro después), una muestra por colecta; se preservó en frío y oscuridad para su análisis en el laboratorio un día posterior a la colecta. En el laboratorio se realizaron las pruebas con un espectrofotómetro Hach Mod. 2100 (Colorado, EUA). La medida de comparación entre épocas es el transecto y cada unidad de muestreo representa el número de réplicas

Determinación de nutrientes en el laboratorio.

El calcio se estimó volumétricamente con el indicador Cal Ver 2 (límite de detección, 10 mg l^{-1}) y titulado con EDTA 0.08 M en medio alcalino. La alcalinidad se determinó volumétricamente, usando fenolftaleína y naranja de metilo como indicador y titulado con H_2SO_4 0.02 N. El nitrógeno inorgánico disuelto (NID) fue calculado por la suma de las tres formas de nitrógeno (nitratos, nitritos y amonio). El nitrógeno como amonio $\text{NH}_3\text{-N}$ se estimó colorimétricamente utilizando el método Nessler (límite de detección 0.1 mg l^{-1}), a 425 nm de absorbancia; cuando los valores se acercaron al límite de detección, se utilizó el método del salicilato (límite de 0.01 mg l^{-1}), a 655nm. El nitrógeno como nitrato $\text{NO}_3^-\text{-N}$ se determinó colorimétricamente usando el método de reducción de cadmio modificado, con ácido cromotrópico en lugar de 1-naphthylamina (límite de detección, 0.5 mg l^{-1}) y se leyó a 500 nm de absorbancia. El método de bajo intervalo (menor a 0.5 mg l^{-1}) es una modificación del anterior y también emplea un ácido cromotrópico como indicador (límite de detección 0.05 mg l^{-1}), leído a la misma longitud de onda. El nitrógeno como nitritos $\text{NO}_2\text{-N}$, se determinó colorimétricamente, usando como indicador ácido cromotrópico y

ácido sulfanílico (límite de detección, 0.01 mg l^{-1}) a 500 nm de absorbancia. El $\text{PO}_3^{4-}\text{-P}$ fue estimado colorimétricamente con el método modificado de azul de molibdeno, PhosVer 3 (límite de detección, 0.01 mg l^{-1}), a 890 nm . Todas las determinaciones se realizaron por duplicado. Estos análisis son una adaptación de los laboratorios HACH a los métodos estándar para el examen de agua y aguas residuales (APHA, 1995)

Caracterización fisiológica.

Ensayos de fijación de nitrógeno *in situ*: actividad nitrogenasa (Nasa).

La incorporación de nitrógeno molecular en la población de *Nostoc* sp. se determinó mediante la reducción del acetileno a etileno, método (ARA) descrito por Stewart *et al.* (1968). Este método se basa en la capacidad de la nitrogenasa para transformar el acetileno (C_2H_2) en etileno (C_2H_4), simulando su función básica de reducir biológicamente el N_2 a NH_4^+ (Stewart *et al.*, 1968; Hernández, 2006; Falcón *et al.*, 2007; Berrendero, 2008; Marcarelli *et al.*, 2008). El material biológico se limpió con medio BG11₀ (Tabla1) para eliminar los restos de sedimento y organismos asociados; posteriormente se dividió en fracciones iguales para cuatro réplicas de los ensayos en luz y oscuridad. Todo el material utilizado para el ensayo se lavó previamente con HCl al 10% y se enjuagó 4 veces con agua destilada. La duración del ensayo fue de 4 horas para Cyanoprocaryota con heterocitos (orden Nostocales). Para el ensayo se utilizaron cuatro réplicas en condiciones de oscuridad y cuatro réplicas expuestas a la luz solar, un control en condiciones de luz y control para oscuridad sin material biológico. Para determinar la actividad nitrogenasa, las muestras se introdujeron en botellas de 25 cm² empleadas para cultivo de tejidos con 15 ml medio BG11₀. Las botellas fueron cerradas herméticamente con tapones de goma, se colocaron en planchas de metacrilato sumergidas en el río cerca de la orilla durante los 30 min que dura la preincubación. Finalizando el período de preincubación, se reemplazó el 10% de la atmósfera interna de las botellas por acetileno, preparado a partir de carburo de calcio.

Las muestras se incubaron durante 4 horas en las mismas condiciones descritas para la preincubación. Se tomaron 3 muestras de 0,5 ml de la atmósfera interna de cada vial al finalizar el período de incubación. La recuperación se realizó con un sistema de dobles agujas y tubos de vacío Vacutainer de 10 ml, para su posterior análisis por cromatografía de gases en el laboratorio. Los tubos Vacutainer se mantuvieron a temperatura ambiente hasta su análisis en un cromatógrafo de gases modelo Shimadzu GC-8A (Kioto, Japón), en el laboratorio de la Universidad Autónoma de Madrid. Las muestras biológicas se transfirieron a tubos

ependorf y se preservaron en frío durante su transporte al laboratorio, donde se procedió a la determinación de la biomasa mediante la cuantificación de clorofila *a* presente en la muestra. La extracción y cuantificación de la clorofila *a* fue realizada de acuerdo a la técnica propuesta por Wetzel & Likens (1991).

Análisis cromatográfico de las muestras.

La cantidad de etileno producido se determinó por cromatografía de gases mediante un cromatógrafo modelo Shimadzu GC-8^a, con detector de ionización de llama de hidrógeno en las siguientes condiciones: T °C inyector/detector 150°C, T °C columna 50°C, Presión gas portador (N₂) 1,2 kg/cm², Columna Porapak N 80/100 int 1m (1/8)" 55. Los datos se registraron usando un integrador SP 4290. Los cálculos se hicieron en base a la siguiente fórmula:

$$\text{nmol C}_2\text{H}_4 = \frac{M * 10 \text{ nmol (C}_2\text{H}_4 \text{ patrón)} * 15 \text{ ml (V final del experimento)}}{h P * 0.5 \text{ ml} * h}$$

Donde:

0,5 ml volumen de la muestra inyectada

M = altura del pico de etileno en la muestra.

P = altura del pico de etileno patrón.

h = tiempo de incubación en horas.

10 nmol = concentración del etileno patrón.

Las tasas de fijación del N₂ se expresaron en nmol C₂H₄ liberados mg⁻¹ Chl *a* h⁻¹.

Ensayo de la asimilación de fósforo orgánico *in situ*: enzimas fosfatasas (PASA).

La actividad *in situ* de las enzimas fosfatasas alcalinas en la población de *Nostoc* sp se llevó a cabo con un ensayo adaptado al método descrito por Whitton *et al.* (1999) para musgos y algas verdes en ríos; éste, a su vez, se basa en la metodología empleada por Grainger *et al.* (1989), para *Cyanoprocaryota*. El ensayo se realizó utilizando sustratos artificiales *para*-nitrofenil fosfato (*p*NPP), con el fin de evaluar la actividad de las fosfomonoesterasas y bis *para*-nitrofenil fosfato (bis-*p*NPP) para la determinación de las fosfodiesterasas. En ambas reacciones, la actividad de las enzimas se midió

colorimétricamente mediante la producción de para-nitrofenol (pNP) (Chróst & Krambeck, 1986). El material biológico recolectado se lavó con medio de ensayo CHUD₁₀ (Tabla 2) para eliminar los restos de sedimento y organismos asociados. Todo el material empleado en estos ensayos (tubos de ensayo, matraces aforados, vasos de precipitados, etc.) se lavó previamente en el laboratorio con HCl al 10% y enjuagado 4 veces con agua destilada, con el fin de eliminar cualquier resto de fósforo.

Tabla 2. Medio de cultivo CHUD₁₀ modificado sin fuente de nitrógeno y fosforo

solución	Componentes	Concentración g/l	Volumen añadido ml/l de medio	Concentración final en el medio (µM)
SOL I	KCl	4.28	1	57.49
SOL II	MgSO ₄ 7H ₂ O	25	1	101.5
SOL III	CaCl ₂ 6H ₂ O	54.75	1	250.1
SOL IV	NaHCO ₃	15.85	1	188.69
SOL V	FeCl ₃ 6H ₂ O	9.7		8.97
	Na ₂ -EDTA	13.35	0.25	11.06
SOL VI	Microelementos			
	H ₃ BO ₃	2.86		11.56
	MnCl ₂ 4H ₂ O	0.181		0.229
	ZnSO ₄ 7H ₂ O	0.222	0.25	0.193
	Na ₂ MoO ₄ 2H ₂ O	0.027		0.023
	CuSO ₄ 7H ₂ O	0.079		0.079
	CoSO ₄ 7H ₂ O	0.042		0.037
Tampón según convenga	HEPES (pH 7.6)	0.6		2.5mM
	BTP (p.8.5)	0.56		2.0mM

Preparación de los sustratos y solución de parada.

La actividad fosfatasa se determinó en viales con medio de cultivo CHUD₁₀ y *para*-nitrofenil fosfato (*p*NPP) y bis-*para*-nitrofenil fosfato (bis-*p*NPP) como sustratos análogos para las enzimas fosfomonoesterasa (PMEase) y fosfodiesterasa (PDEase), respectivamente. La solución de parada se utilizó para detener la actividad enzimática al elevar el pH de la mezcla de ensayo por encima de 11 y sin superar el valor de 12, pH a partir del cual se pudo producir la hidrólisis del sustrato bis-*p*NPP. La composición química de la solución de parada es la siguiente: NaOH 0,55 M, EDTA 27,5 mM y K₂HPO₄ 0,55 M (Christmas & Whitton, 1998). El medio de ensayo empleado es una modificación del medio CHU₁₀ (Chu, 1942), caracterizado por la ausencia de cualquier fuente de nitrógeno y de fósforo. El medio de ensayo se ajustó a pH 8,5 con tampón BTP 20 mM y su composición química se detalla en la tabla 4. El medio de cultivo se esterilizó en un autoclave automático HA240M/300M, Sulzer, S.A. (España), a 1.5 Kg/cm² de presión, durante 20 min a 121°C.

Ensayos de actividad fosfatasa *in situ*

Para determinar la actividad fosfatasa, las muestras se colocaron en botellas para el cultivo de tejidos de 25 cm² con 14,6 ml de medio de ensayo y pH de 8.5, similar al existente en el medio natural (Chróst & Krambeck, 1986). Todos los ensayos enzimáticos constaron de cuatro réplicas para cada muestra con medio de ensayo y sustrato, un control al que no se añadió sustrato y un blanco con sólo medio de ensayo y sustrato. El ensayo se inició al añadir 0,5 ml de sustrato hasta conseguir la concentración final adecuada en cada caso (Tabla 3).

El tiempo de incubación fue de 30 min. Para terminar el ensayo, se añadieron 1.64 ml de solución de parada a la mezcla de ensayo, de este modo el pH de la mezcla de reacción se incrementa causando la lisis de la enzima y facilitando el desarrollo del color de los productos. Esta solución se filtró a través de filtros de microfibra de vidrio GF/F Whatman de 25 mm de diámetro, antes de medir la absorbancia en el espectrofotómetro a 405 nm. Se restó la absorbancia de los blancos al de las

muestras para corregir la hidrólisis química de los sustratos (actividad abiótica), así como la absorbancia de los controles para eliminar la actividad fosfatasa basal. La absorbancia del pNP se mide con el espectrofotómetro de campo a la longitud de onda de 405 nm y su concentración se calcula en el laboratorio a partir de la recta de calibrado de pNP. Las muestras biológicas se retiraron de la mezcla de ensayo antes de añadir la solución de parada y se congelaron para determinar posteriormente su biomasa a partir de la extracción de clorofila a. La extracción y cuantificación de la clorofila a fue realizada de acuerdo a lo propuesto por Wetzel & Likens (1991). La actividad enzimática se expresó como $\mu\text{mol pNP liberados mg}^{-1}$ clorofila a h^{-1} .

Tabla 3. Contenido y volumen (ml) para cada vial en el ensayo *in situ* de fosfatasa

	Réplica 1	Réplica 2	Réplica 3	Réplica 4	Blanco	Control
CHUD₁₀	14,5	14,5	14,5	14,5	15	14,5
Sustrato [1,5mM]	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	NO
Muestra biológica	SI	SI	SI	SI	NO	SI
Terminador B	1.25	1.25	1.25	1.25	1.25	1.25

Caracterización morfológica y morfométrica.

Se colectaron crecimientos representativos (talos) y se mantuvieron vivos en frío y oscuridad para realizar la tinción de gránulos de polifosfato (poli-p), desarrollo de cultivos y preparación de la muestra para la observación en microscopio electrónico de transmisión (MET).

Los ejemplares de la población se observaron con el microscopio óptico a 80X y se tomaron fotografías de los caracteres morfológicos importantes (células vegetativas, heterocitos, hormogonios y acinetos), así como fases del ciclo de vida (fases globosas, fases aseriadas y fases ovales), también el número, posición y tamaño de los gránulos de polifosfato. Las medidas de las células (anchura y longitud), anchura y longitud del heterocito y diámetro del gránulo de poli-P y de los acinetos, se obtuvieron por medio del análisis de fotografías a 80X, con el programa Sigma Scan Pro. De los caracteres morfométricos se registraron promedio, valor máximo, valor mínimo y desviación estándar. Se analizaron las fotografías de MET para localizar estructuras y complementar la descripción del género. Los atributos taxonómicos registrados se determinaron de acuerdo a Mollenhauer (1988), Komárek & Anagnostidis (1989) y el esquema de clasificación propuesto por Komárek (2010).

Tinción de gránulos de polifosfato (poli-P)

Para resaltar la capacidad de almacenamiento de fósforo, se realizó la tinción de gránulos de polifosfato (poli-P). Las muestras fueron lavadas tres veces con 5ml de agua destilada sin fósforo, tratando de eliminar la mayor cantidad de agua después de cada centrifugación (3500 rpm durante 10 minutos). Después de la última centrifugación se retiró todo el sobrenadante y se bañó la muestra con nitrato de plomo al 10% (p/v) disuelto en ácido nítrico al 0.1 N. Las muestras se dejaron en esta solución por 15 minutos.

Posteriormente, las muestras se lavaron cinco veces con agua destilada, procurando extraer la mayor cantidad de agua posible en el último enjuague. Al final se añadió sulfuro de amonio al 10% hasta cubrir la muestra (Fuhs, 1973; Mateo *et al.*, 2006).

Preparación del material para la observación en el microscopio electrónico de transmisión (MET)

Para el estudio ultra estructural de células de *Nostoc* sp. por MET, las muestras se prepararon y tiñeron con citrato de plomo (Reynolds, 1963) fueron lavadas tres veces con amortiguador de fosfato de sodio 0.1 M a pH 7.2 (el mismo amortiguador utilizado en todo el procedimiento), y fijadas en amortiguador de glutaraldehído al 3.1% durante tres horas a 4°C. Las muestras se lavaron tres veces y se incluyeron en agar bacteriológico, en amortiguador al 4%. Después de la fijación se colocaron bloques de 1-2 mm en amortiguador de tetra óxido de osmio por dos horas a 4 °C. Las muestras se deshidrataron con etanol y fueron embebidas en resina Spurr (Spurr, 1969), seccionado en un Ultracut E Reichert-Jung Ultratome, teñidas con citrato de plomo (Reynolds, 1963) y visto bajo un MET marca Jeol 1010.

Cultivos

Para estudiar las etapas del ciclo de vida y confirmar el género, se realizaron cultivos en medio BG11₀, con una alta concentración de nutrientes y sin fuente de nitrógeno para favorecer la formación de heterocitos y en medio CHUD₁₀; el cual contiene una baja concentración de nutrientes sin fuente de nitrógeno y fósforo se utiliza para Cyanoprokaryota procedentes de sitios prístinos o muy oligotróficos (Gibson & Whitton, 1987). Los cultivos se mantuvieron en una cámara de ambiente controlado, marca Sanyo (Japón), a 20°C de temperatura, un fotoperiodo de 16:8 luz-obscuridad y en agitación constante, en un rotador marca *Multipurpose Thermo Scientific* (Massachusetts, EUA). La revisión de los cultivos se realizó cada 15 días, hasta observar cambios morfológicos o distintas fases del ciclo de vida.

Tabla 1. Medio de cultivo BG11₀. Sin fuente de nitrógeno para favorecer la formación de heterocitos.

solución	Componentes	Concentración g/l	Volumen añadido ml/l de medio	Conc final en el medio (mM)
SOL IA	MgSO ₄	7.5	10	0.3
SOL IB	CaCl ₂	3.6	10	0.25
SOL II	K ₂ HPO ₄ 3H ₂ O	4	10	0.18
	Na ₂ Mg	0.02		0.003
	EDTA(Triplex III)			
	Citrato amónico			
SOL III	férrico	0.6	10	0.02
	Ácido cítrico	0.66		0.029
SOL IV	Na ₂ CO ₃	2.0	10	0.188
	H ₃ BO ₃	10.28		46µM
	MnCl ₂ 4H ₂ O	10.184		9.1µM
	ZnSO ₄ 7H ₂ O	10.022		7.7µM
SOL V	Na ₂ MoO ₄ 2H ₂ O	0.039	1	1.6µM
	CuSO ₄ 5H ₂ O	0.008		0.32µM
	Co(NO ₃) ₂ 6H ₂ O	0.005		0.17µM
Tampón según convenga	HEPES (pH 7.8)			20mM

Análisis estadístico

Los datos numéricos se analizaron con las siguientes pruebas estadísticas: i) Para calcular la variación de los parámetros microambientales y morfométricos se calculó el coeficiente de variación (Margalef, 1983), así como el valor máximo y mínimo. ii) Para evaluar diferencias significativas entre las cuatro diferentes épocas de colecta de los parámetros microambientales (cobertura, profundidad, radiación incidente y velocidad de corriente) y morfométricos -anchura y longitud celular y de los heterocitos y diámetro de los gránulos de poli-P y acinetos- se utilizó la prueba de Mann-Whitney (Ramírez *et. al.* & Gotelli & Ellison, 2004). El resultado del análisis se expresó con la asignación de la misma letra para el grupo de datos parecidos y diferente letra a resultados estadísticamente diferentes. iii) Para determinar la correlación entre los parámetros microambientales y los morfométricos se utilizó el análisis de correlación no paramétrica de Spearman (Gotelli and Ellison, 2004); la prueba se realizó con el software SPSS 12 y GLIM 4.

Resultados

Análisis ambiental

Durante el estudio, el sitio se caracterizó por tener temperaturas entre 21 y 25°C, pHs de 6.6 a 7.6 y porcentaje de saturación de oxígeno entre 83-90% (Tabla 4). El agua presentó una conductividad específica estandarizada a 25°C, de 460 a 1486 $\mu\text{S cm}^{-1}$, así como una alcalinidad de 112-425 mg l^{-1} (Tabla 5). El nitrógeno en forma de amonio sólo fue detectado en **S2010**, con una concentración de 0.095 mg l^{-1} . La mayor concentración de NID se registró en **PLL2011** con un valor de 1.30 mg l^{-1} . El fósforo reactivo soluble se encontró en concentraciones similares en **PLL2009**, con 0.07 mg l^{-1} , **S2010** con 0.04 mg l^{-1} y un aumento en **PLL2010**, con una concentración de 0.10 mg l^{-1} y **PLL2011** con 0.18 mg l^{-1} . Es notorio un importante incremento en el NID y FRS en **PLL2011**.

Análisis microambiental

La mayor cobertura porcentual promedio registrada para la población de *Nostoc* sp se observó en **SF2010**, con 32%, y la menor cobertura promedio se observó en **PLL2011** con 13.3 %; la velocidad de corriente promedio fue similar para **PLL2009**, con 0.79 m s^{-1} , **S2010** con 0.96 m s^{-1} y **PLL2011** con 0.94 m s^{-1} ; fue significativamente menor en **PLL2010**, con 0.25 m s^{-1} ; la profundidad mayor se registró en **SF2010**, con 25 cm, y fue similar a **PLL2010** (20 cm) y la menor en **PLL2009** de 15cm y similar a **PLL2011** con 13cm. La radiación incidente mayor se registró en **PLL2011** con un valor de 732 [$\text{mol fotón m}^{-2} \text{s}^{-1}$] la menor en **PLL2010** con 135 [$\text{mol fotón m}^{-2} \text{s}^{-1}$]. El análisis de Mann-Whitney no mostró diferencias significativas para la cobertura en las cuatro épocas de colecta, y diferencias mínimas para la profundidad, velocidad de corriente y radiación incidente (Fig. 1)

Tabla 4. Épocas de colecta de las poblaciones de *Nostoc verrucosum* y características físicas, químicas y microambientales del río “La Garita”. Post lluvias: noviembre 2009 (PLL2009), noviembre 2010 (PLL2010) y noviembre 2011 (PLL2011). Secas: febrero 2010 (SF10).

Fechas de colecta	Temperatura [°C]	pH	K ₂₅ [μS cm ⁻¹]	porcentaje de saturación de Oxígeno [mg l ⁻¹]	Velocidad de corriente [m s ⁻¹] ¹	Radiación incidente [μmol fotón m ⁻² s ⁻¹] ¹	Substrato ^{2,3}	Profundidad ² (cm)	Cobertura porcentual ¹ (%)	Especies asociadas
06.xi.2009 PLL2009	23.0	7.0	460-515	80	0.79±0.65 0.10-1.77	122±100 16-349	R100%	9.2±4.5 5-15	18±13.5 5-40	Musgo
06.ii.2010 SF2010	23.5	6.6	1339	84	0.96±0.39 0.53-1.95	204±40 117-244	R100%	18.6±6.9 7-25	32±17.9 10-50	Musgo
23.xi.2010 PLL2010	21.4	-	1117	87	0.25±0.09 0.11-0.45	87±24 39-135	R100%	17±3.6 13-20	22±13 10-40	Musgo
30.xi.2011 PLL2011	25.0	7.6	1430-1486	83	0.94±0.31 0.55-1.36	266±246 21-732	R100%	11±2.6 8-13	13.3±5.8 10-20	Musgo
Coeficiente de variación ³ (%)	6	7	43	3.6	43	48	0	33	37	

¹: n= 10; ²: n= 5; ³:R = roca calcárea emergente, -: no medido; ⁴:*sensu* Margalef (1983)

Tabla 5. Épocas de colecta de las poblaciones de *Nostoc verrucosum* y nutrientes del río La Garita. NID= Nitrógeno Inorgánico Disuelto, FRS= Fósforo Reactivo Soluble. Post-lluvias: noviembre 2009 (**PLL2009**), noviembre 2010 (**PLL2010**) y noviembre 2011(**PLL2011**). Secas: febrero 2010 (**S2010**).

Fechas de colecta	Amonio NH ₃ -N [mg l ⁻¹]	Nitratos NO ₃ ⁻ -N [mg l ⁻¹]	Nitrito NO ₂ ⁻ -N [mg l ⁻¹]	NID total [mg l ⁻¹]	FRS PO ₄ ³⁺ -P [mg l ⁻¹]	Sulfatos SO ₄ ²⁻ [mg l ⁻¹]	Alcalinidad [mg l ⁻¹ CaCO ₃]	Calcio Ca ²⁺ [mg l ⁻¹]
06.xi.2009 PLL2009	<0.01	0.40	0.0020	0.40	0.07	130	112	209
06.ii.2010 SF2010	0.0950	0.17	0.0045	0.27	0.04	>75	425	70.5
23.xi.2010 PLL2010	<0.01	0.50	0.0030	0.50	0.10	-	139	-
30.xi.2011 PLL2011	<0.01	1.30	0.0050	1.30	0.18	-	148	-
Coeficiente de variación ¹ (%)	133	83	43	75	79		71	

-,no medido; ¹sensu Margalef (1983)

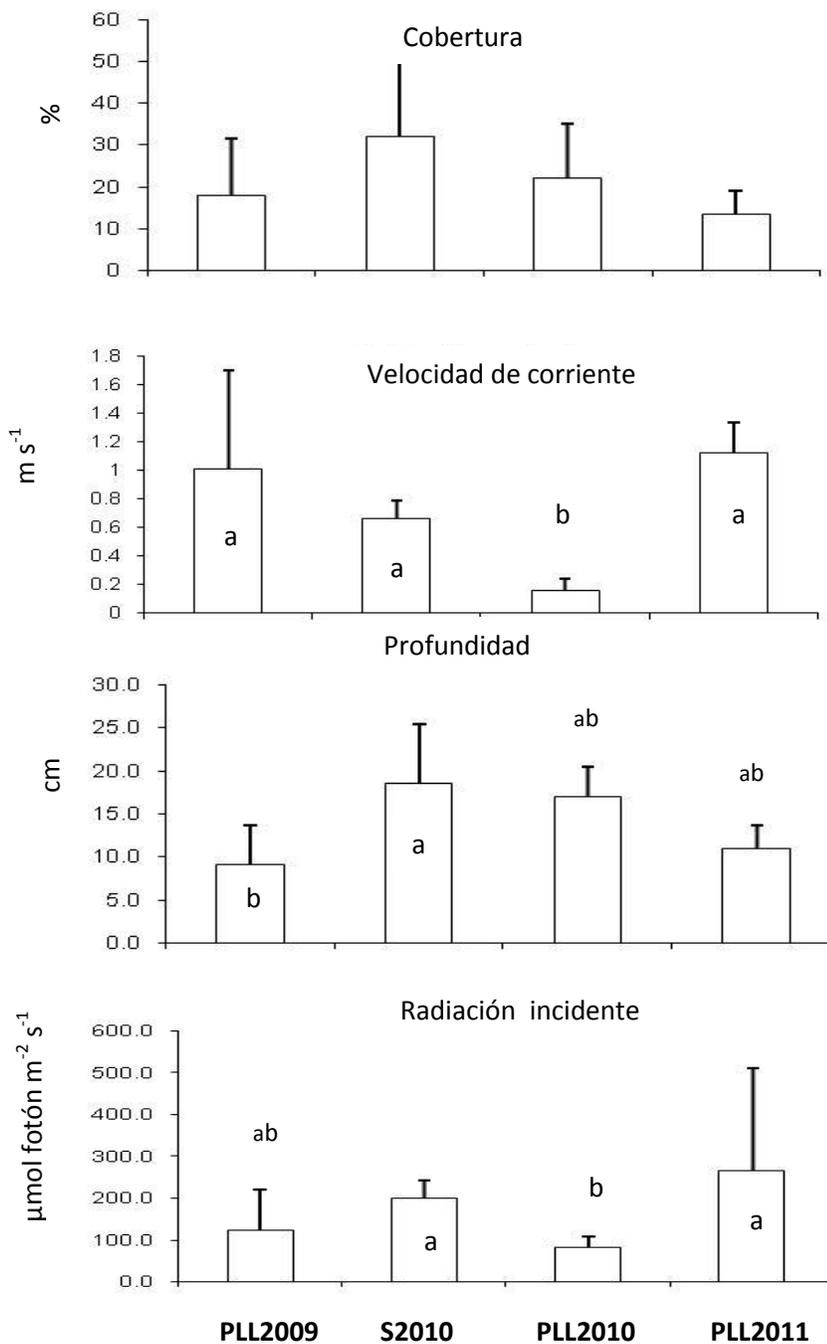


Fig. 1. Características microambientales en las cuatro épocas de colecta del río “La Garita”. Post-lluvias: noviembre 2009 (**PLL2009**), noviembre 2010 (**PLL2010**) y noviembre 2011(**PLL2011**). Secas: febrero 2010 (**S2010**). La misma letra corresponde a datos estadísticamente parecidos y diferente letra a datos con diferencias, con base en la prueba de Mann-Whitney.

Análisis fisiológico.

Actividad nitrogenasa (NASA)

La mayor actividad de la enzima nitrogenasa se registró en **PLL2009** en condiciones de luz, con 826 nmoles de C₂H₄/mg Chl a h⁻¹ y en oscuridad, con 137 n moles C₂H₄/mg Chl a h⁻¹. En **S2010** se detectó una disminución en la actividad de la nitrogenasa en luz, con 190 nmoles/mg Chl a h⁻¹ y en oscuridad, con 12 nmoles/mg Chl a h⁻¹. En esta fecha se presentaron los mayores valores de iones amonio. (Tabla 6).

Actividad fosfatasa (PASA)

La actividad enzimática fosfomonoesterasas fue mayor que la encontrada para la fosfodiesterasas en las cuatro colectas **PLL2009**, **S2010**, **PLL2010**, **PLL2011**. La actividad fosfatasa fue similar en **PLL2009** y **S2010**, donde la concentración de FRS fue de 0.07mg l⁻¹ y 0.04mg l⁻¹, respectivamente, y mayor en **PLL2010** y **PLL2011**, con concentraciones de FRS de 0.1 mg l⁻¹ y 0.18 mg l⁻¹, respectivamente. (Tabla 7).

Tabla 7. Actividad nitrogenasa luz y oscuridad en las cuatro épocas de colecta del río "La Garita". Post-lluvias: noviembre 2009 (**PLL2009**), noviembre 2010 (**PLL2010**) y noviembre 2011(**PLL2011**). Inicio de secas: febrero 2010 (**S2010**). Con los valores de NH₃-N y NID

Fechas de colecta	Nasa Luz nmol C ₂ H ₄ producido mg ⁻¹ Chl a h ⁻¹	Nasa oscuridad nmol C ₂ H ₄ producido mg ⁻¹ Chl a h ⁻¹	NH ₃ -N [mg l ⁻¹]	NID [mg l ⁻¹]
06.xi.2009 PLL2009	826±133 668-995	137±11 45-145	<0.01	0.4
06.ii.2010 SF2010	190±51 127-232	12±11 0.6-20	0.09	0.3
30.xi.2011 PLL2011	164±9 156-174	41±40 15-86	<0.01	1.3

Tabla 8. Actividad fosfomonoesterasa y fosfodiesterasa en las cuatro épocas de colecta del río “La Garita”. Post-lluvias: noviembre 2009 (**PLL2009**), noviembre 2010 (**PLL2010**) y noviembre 2011(**PLL2011**). Inicio de secas: febrero 2010 (**S2010**). Con los valores de FRS.

Fechas de colecta	Fosfomonoesterasa $\mu\text{mol pNP liberados}$ mg^{-1} clorofila a h^{-1} .	Fosfodiesterasa $\mu\text{mol pNP liberados}$ mg^{-1} clorofila a h^{-1} .	FRS [mg l^{-1}]
06.xi.2009 PLL2009	13±4 7-17	5±8 0.001-14	0.07
06.ii.2010 SF2010	10±3 7-15	1.4±0.6 0.6-2	0.04
23.xi.2010 PLL2010	0.8±0.8 0.3-2	0.14±0.05 0.06-0.2	0.1

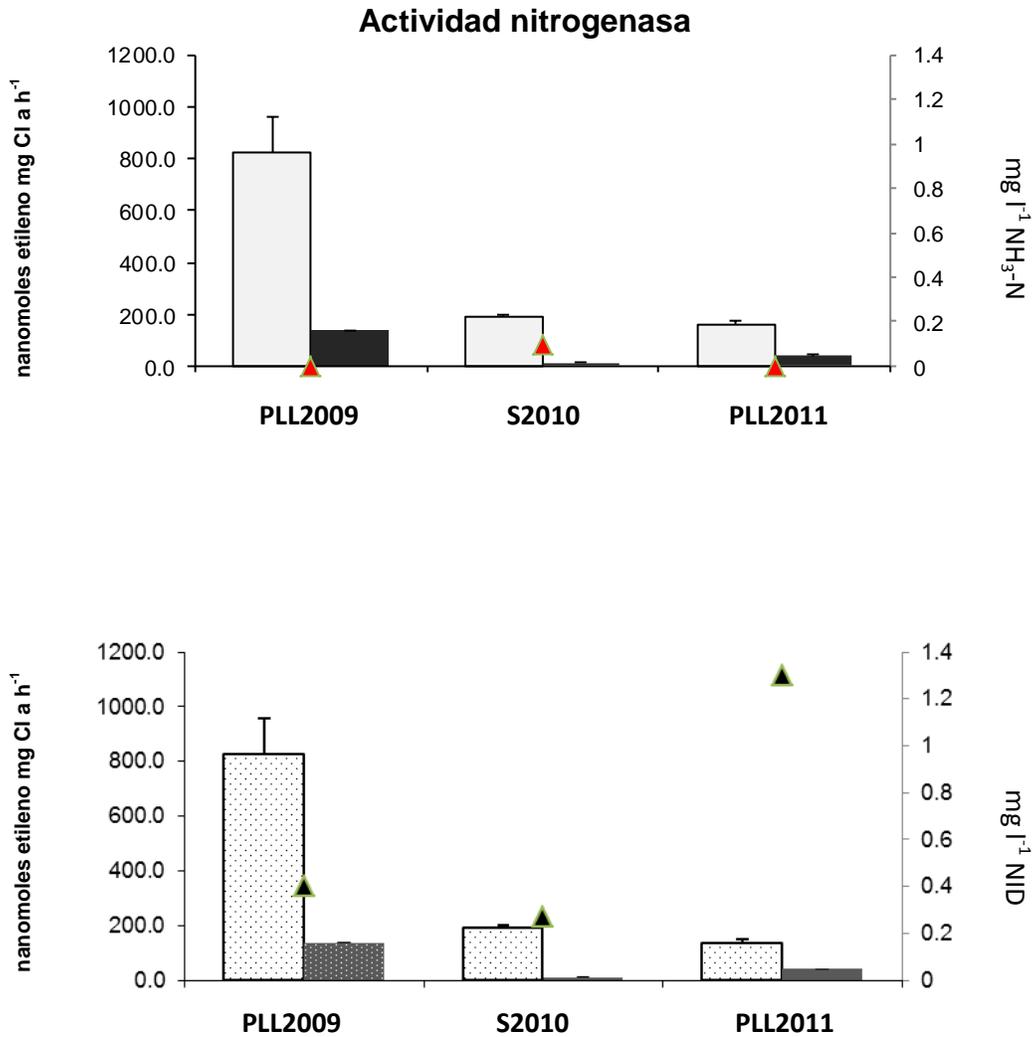


Fig. 2. Relación entre la actividad de la nitrogenasa con la concentración de NH₄⁺ y NID en tres fechas de colecta del río “La Garita”. Post-lluvias: noviembre 2009 (**PLL2009**) y noviembre 2011(**PLL2011**). Secas: febrero 2010 (**S2010**). Barra gris, actividad en luz. Barra negra, actividad en oscuridad. Triángulo, concentración de NID.

Actividad fosfatasa

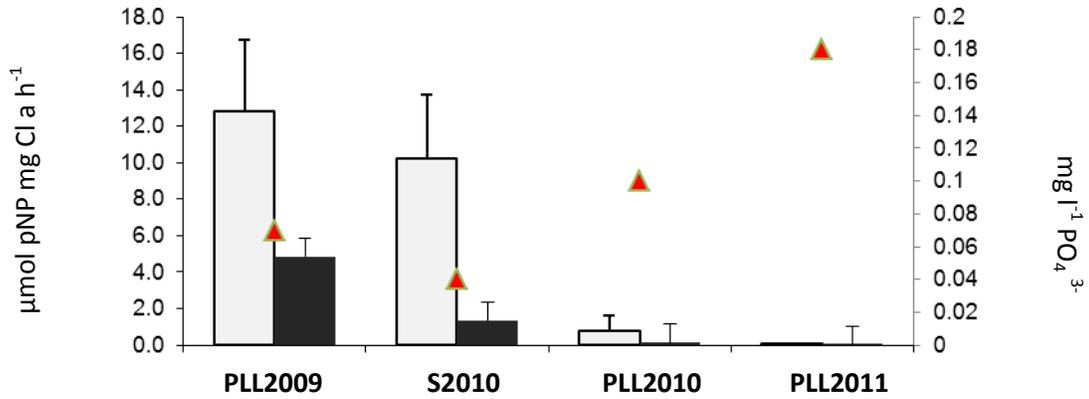


Fig. 3. Relación entre la actividad de las fosfatasa con la concentración de FRS en las cuatro fechas de colecta del río “La Garita”. Post-lluvias: noviembre 2009 (**PLL2009**), noviembre 2010 (**PLL2010**) y noviembre 2011(**PLL2011**). Secas: febrero 2010 (**S2010**). Barra gris fosfomonoesterasas. Barra negra, fosfodiesterasas. Triángulo, concentración de FRS.

Diametro de gránulos de Poli-p

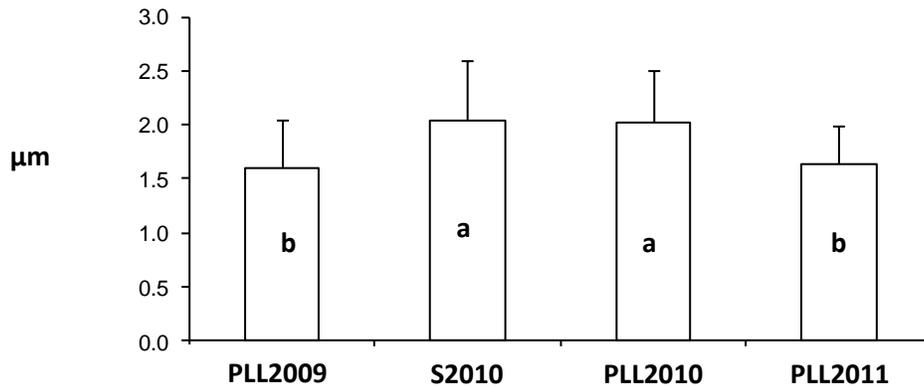


Fig. 4. Diámetro del gránulo de (Poli-P) en las cuatro fechas de colecta del río “La Garita”. Post-lluvias: noviembre 2009 (**PLL2009**), noviembre 2010 (**PLL2010**) y noviembre 2011(**PLL2011**). Secas: febrero 2010 (**S2010**). La misma letra corresponde a datos estadísticamente parecidos y diferente letra a datos con diferencias. Basados en la prueba de Mann-Whitney.

Análisis morfológico

Características macroscópicas

La forma de crecimiento fue gregaria; las colonias se observaron macroscópicas, globosas y lobuladas, formando agregados de color café oscuro, así como sólidas, de 3-5 cm de tamaño y que llegaron a alcanzar los 10 cm de altura.

Características microscópicas

Las células fueron ovales, de 3.6-4.6 μm de longitud; heterocitos subesféricos de 5.6-6.0 μm de longitud; en hábito los encontramos en posición terminal, intercalar y sueltos en la colonia; los acinetos elipsoidales fueron solo encontrados en medio CHUD10 y alcanzaron 7-8 μm de longitud (Tabla 5). Las características morfológicas observadas en muestras naturales obtenidas en las diferentes épocas de colecta-en **PLL2009**, **S2010**, **PLL2010** y **PLL201**- mostraron ser similares en cuanto al tipo de estructuras encontradas en tricomas y heterocitos; estos se observaron de manera terminal, intercalar y libres en la colonia, con fases aseriadas y no se presentaron acinetos (Figs. 8 y 9). En el medio BG11 se encontraron fases globosas durante la mayor parte del tiempo de cultivo y, al final, se observaron fases aseriadas (Fig. 10). En el medio CHUD10, al inicio se observaron fases globosas, pero posteriormente se desarrollaron fases ovales con acinetos y fases aseriadas (Fig. 11

Tabla 6. Épocas de colecta de las poblaciones de *Nostoc verrucosum* y anchura y longitud celular; anchura y longitud del heterocito y diámetro del granulo de poli-P del río “La Garita”. Post-lluvias: noviembre 2009 (**PLL2009**), noviembre 2010 (**PLL2010**) y noviembre 2011(**PLL2011**). Inicio de secas: febrero 2010 (**S2010**).

Fechas de colecta	Longitud celular ¹	Anchura celular ¹	Longitud del heterocito ²	Anchura del heterocito ²	Diámetro del granulo de poli-P ¹
06.xi.2009 PLL09	4.6±0.5 3.0-5.7	3.6±0.7 2.2-5.0	6.3±0.9 4.9-8.6	5.6±0.9 4.2-8.0	1.6±0.4 0.4-3.1
06.ii.2010 SF10	3.6±0.9 1.9-6.1	5.1±0.5 3.6-6.4	6.7±0.6 5.7-8.1	6.0±0.7 4.4-7.5	2.0±0.5 0.7-3.9
23.xi.2010 PLL10	4.5±0.8 3.0-6.5	6.4±0.6 5.3-7.8	6.6±0.8 4.9-8.7	6.1±0.8 4.4-8.1	2.0±0.5 1.0-3.6
30.xi.2011 PLL11	4.3±0.8 2.7-5.9	4.8±0.5 3.5-5.0	6.1±0.7 4.4-7.9	5.6±0.23 4.1-7.8	1.6±0.35 0.5-3.6

¹: n=500; ²: n= 50

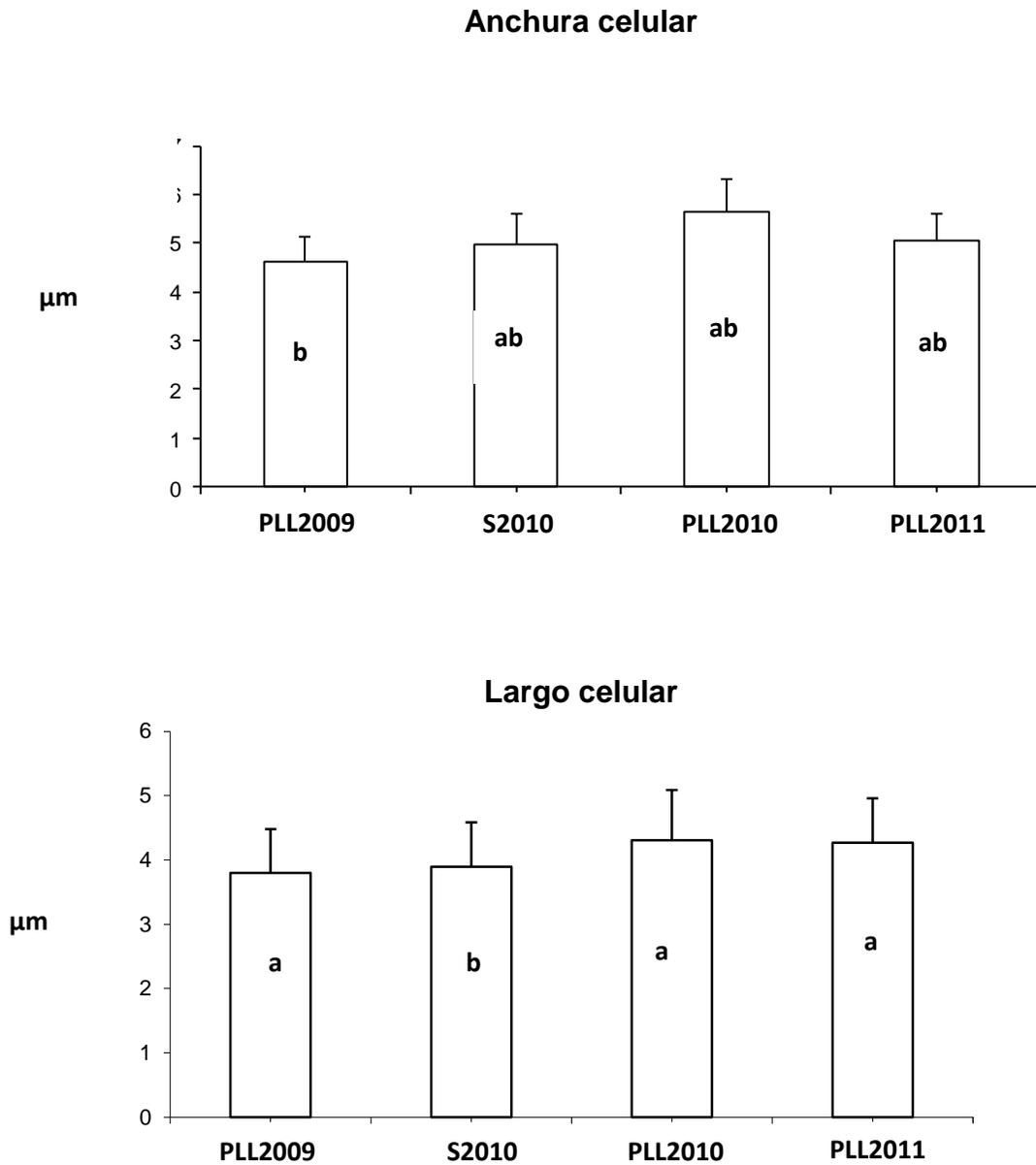


Fig. 5. Tamaño celular ancho y largo en las cuatro fechas de colecta del río “La Garita”. Post-lluvias: noviembre 2009 (**PLL2009**), noviembre 2010 (**PLL2010**) y noviembre 2011(**PLL2011**). Secas: febrero 2010 (**S2010**). La misma letra corresponde a datos estadísticamente parecidos y diferente letra a datos con diferencias, con base en la prueba de Mann-Whitney.

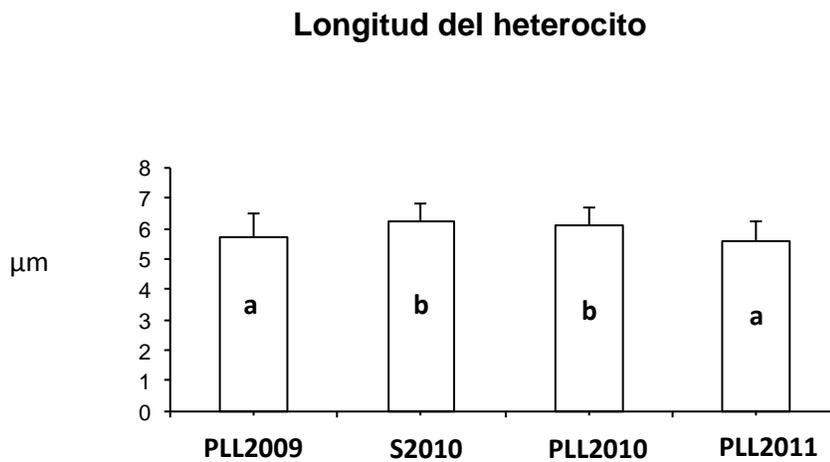
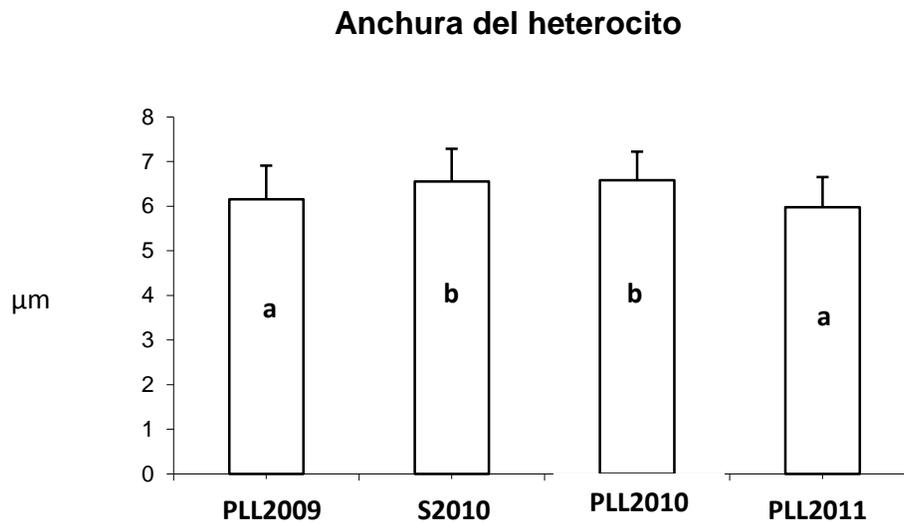
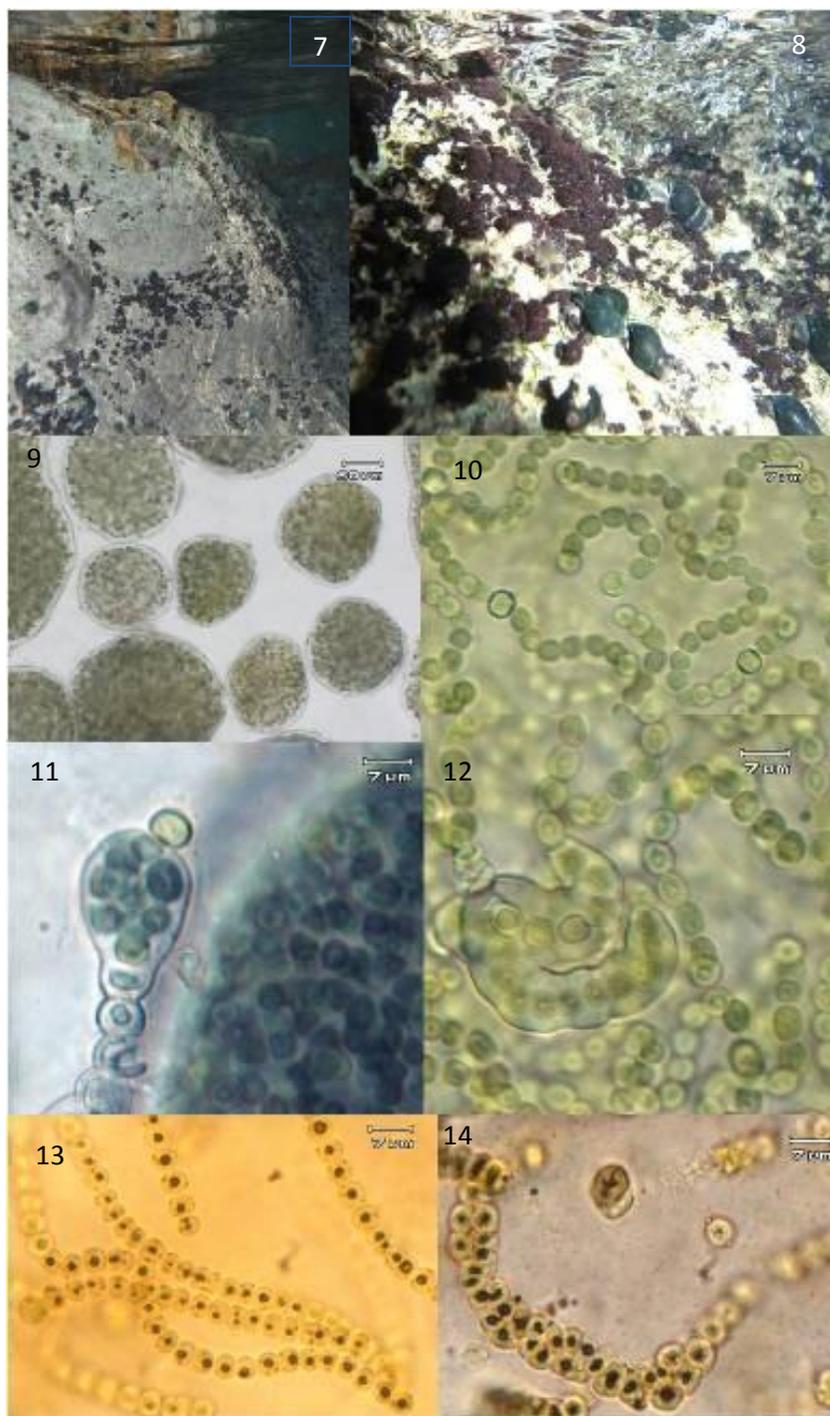


Fig. 6. Tamaño del heterocito anchura y longitud en las cuatro fechas de colecta del río “La Garita”. Post-lluvias: noviembre 2009 (**PLL2009**), noviembre 2010 (**PLL2010**) y noviembre 2011(**PLL2011**). Secas: febrero 2010 (**S2010**). La misma letra corresponde a datos estadísticamente parecidos y diferente letra a datos con diferencias, con base en la prueba de Mann-Whitney.



Figs. 7-14, Características morfológicas macroscópicas y microscópicas de la población de *Nostoc verrucosum* en el río “La Garita”. **Figs. 7 y 8**, Hábito. **Fig. 9**, Colonias juveniles en cultivo. **Fig. 10**, Tricomas con heterocitos. **Figs. 11 y 12**, Estructuras de reproducción. **Fig. 13**, Tinción de gránulos de poli-P. **Fig. 14**, Gránulos de poli-P en estructuras aseriadas.

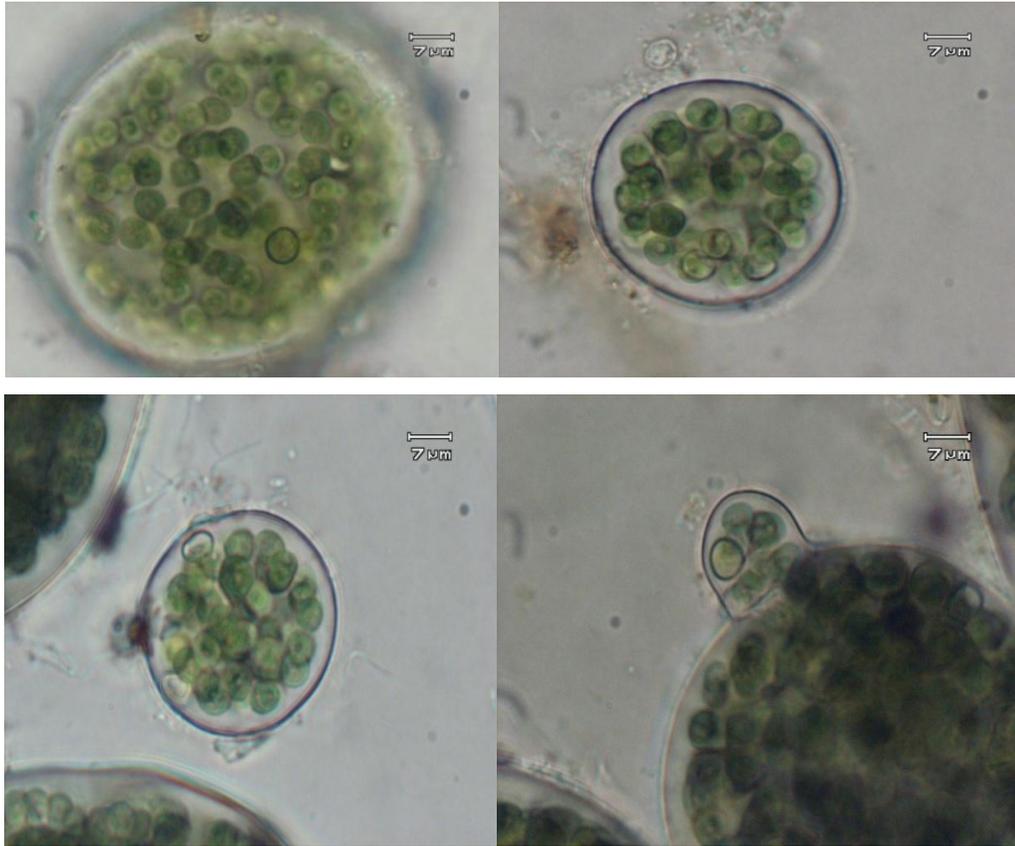


Fig.10. Colonias globosas encontradas en cultivos medio BG11₀.

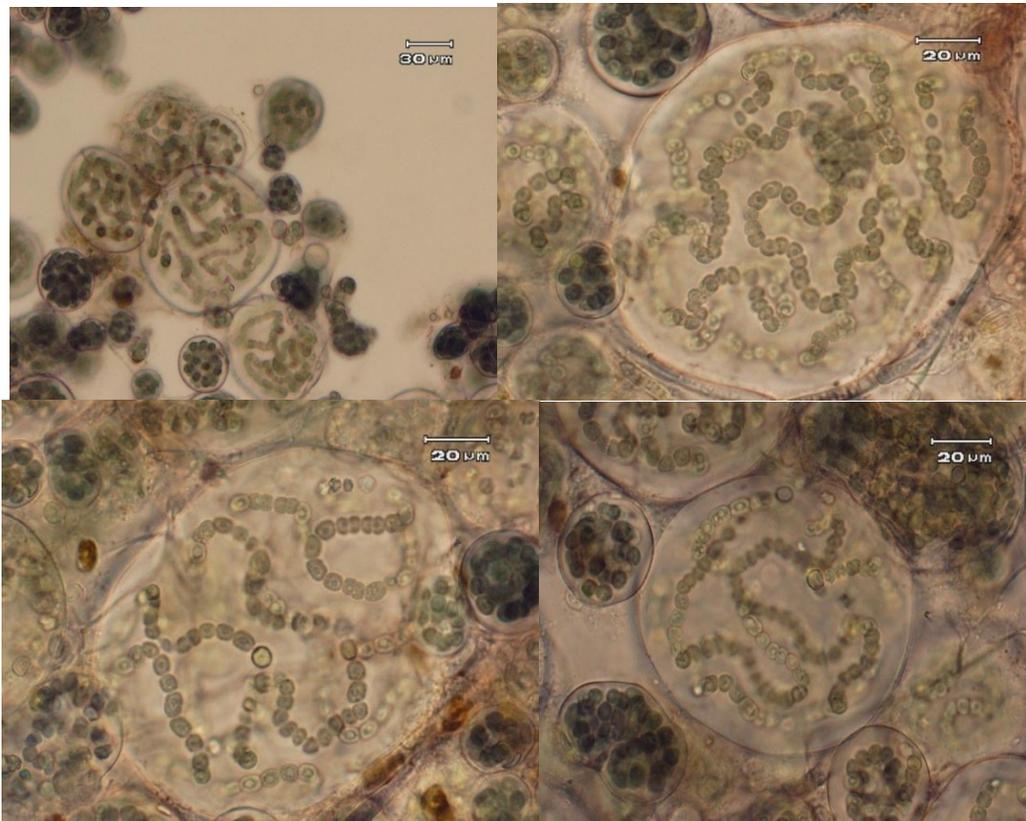


Fig. 11. Estructuras globosas y ovaladas, en el interior se observan acinetos, en el medio CHUD₁₀.

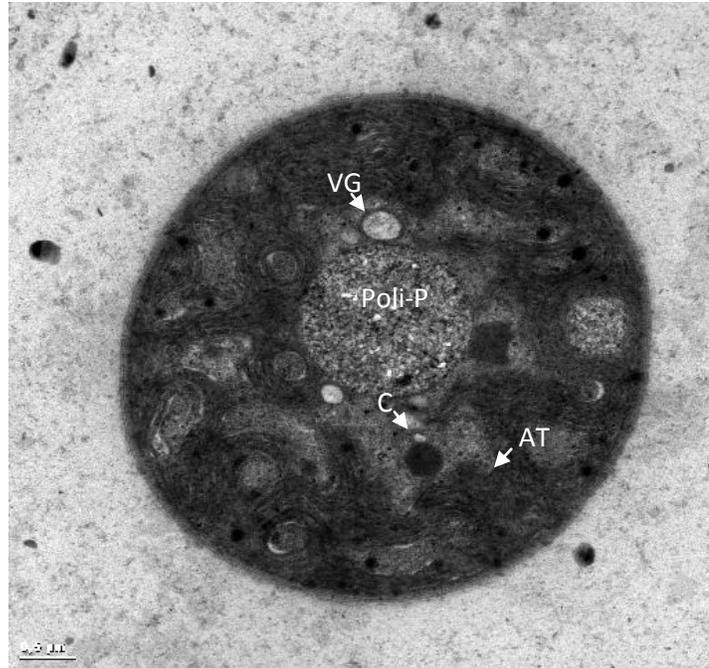


Fig.12. Inclusiones celulares en una célula vegetativa de *N. verrucosum* visto en MET. C= carboxisoma, AT= arreglo tilacoidal. Poli-p, gránulos de polifosfato.

Discusión.

La caracterización ambiental y microambiental

Las poblaciones de *Nostoc verrucosum* son habitantes comunes en ríos de ambientes calcáreos en la cuenca del río Pánuco, con una distribución muy delimitada en manantiales o ríos con abundante corriente y muy sombreados (Montejano *et al.*, 2000). La población del río “La Garita” se registró una de las coberturas porcentuales más abundantes de la región, en especial durante el periodo comprendido entre post-lluvias y hasta secas (noviembre a febrero). Posteriormente, el crecimiento visible desaparece durante el periodo más seco del año (marzo-junio). Al parecer, esta población –como se ha reportado en diversas especies del género- presenta estrategias morfológicas (p.e., acinetos) para soportar la desecación por tiempos prolongados, recobrando su actividad metabólica y los crecimientos masivos después de la rehidratación en el ambiente (Mollenhauer ,1988; Poots, 2000; Dodds *et al.*, 1995).

En términos de sus características ambientales, *N. verrucosum* fue encontrada en aguas cálidas de una región subtropical, en condiciones estrictamente sumergidas y de agua corriente, lo que corresponde a lo descrito por Mollenhauer (1988) para esta especie; su presencia se relaciona también con aguas altamente mineralizadas y bien oxigenadas. Las temperaturas entre 21-25°C fue semejante a lo registrado por Aboal *et al.* (1994) y Aboal *et al.* (2002) para ríos mediterráneos; sin embargo, nuestros valores del pH fueron más bajos a lo reportado por estos autores (6.6-7.6 en este trabajo, 8.0-8.9 en ríos mediterráneos), aunque ambos intervalos de valores entran en lo citado para la especie por Mollenhauer (1999). Por otra parte, la conductividad específica fue mayor a la reportada para ríos mediterráneos (1,117-1,515 $\mu\text{S cm}^{-1}$ en este trabajo y de 447-508 $\mu\text{S cm}^{-1}$ en ríos mediterráneos); esta variación puede estar relacionada con las características geológicas de ríos calcáreos, donde la elevada conductividad específica está relacionada con la dominancia iónica de carbonatos y sulfatos disueltos en el agua (Beltrán *et al.* 2013). Los resultados fueron consistentes con la preferencia de *N.*

verrucosum por carbono inorgánico como H_2CO_3 , la forma predominante en los ríos de regiones calcáreas donde ha sido encontrada esta especie (Tilden, 1910; Aboal *et al.* (2002); Aboal *et al.*, 1994, Mollenhauer *et al.*, 1999; Berrendero 2008; Mateo *et al.*, 2006).

La escasa diferencia en la cobertura y los parámetros microambientales (velocidad de corriente, profundidad y radiación fotosintéticamente activa) en las cuatro épocas de colecta, sugiere que la presencia de *N. verrucosum* se encuentra en condiciones muy particulares: i) un elevado flujo de agua, ii) baja iluminación relacionada con una amplia vegetación de ribera, iii) un sustrato calizo firme y poroso asociado a una importante población de musgo, el cual puede servir como espacio de asentamiento y protección de estructuras de latencia (acinetos), capaces de restablecer la cobertura al cambio de época, tal y como se registra en otras especies de *Nostoc* (Mollenhauer 1988, Poots 2000, Dodds *et al.* 1995). En general, el río “La Garita” presentó condiciones bajas en nutrientes, aunque en alguna época se registraron valores altos (NID de 1.3 mg l^{-1} debido a un aporte importante de NO_3^- -N y FRS de 0.18 mg l^{-1}). Esta variación puede estar relacionada por pulsos de fósforo y nitrógeno que provienen de actividades agrícolas y urbanas poco evidentes asociadas a la ribera del cauce. Sin embargo, estos pulsos no parecen afectar la cobertura porcentual de la población.

La actividad de las enzimas nitrogenasa y fosfatasa

Se observó una importante variación en las actividades de las enzimas nitrogenasas y fosfatasa, las cuales estuvieron relacionadas con la disponibilidad de nutrientes en el río. A partir de los resultados obtenidos en las cuatro épocas de colecta, se registró una mayor actividad de la enzima nitrogenasa en condiciones de luz que en condiciones de obscuridad, lo que coincide con lo descrito para diversas especies del orden Nostocales. Por tal razón, podemos confirmar que *Nostoc verrucosum* es una especie que tiene la capacidad de fijar nitrógeno atmosférico en ambientes pobres en nitrógeno, usando células especializadas (heterocitos) en ambientes aerobios. Las Oscillatoriales y Chroococales, que no presentan heterocitos, pueden fijar el N_2 atmosférico mediante la separación

temporal y/o espacial del proceso fotosintético (Berman *et al*, 2003). Sin embargo, se observó que el incremento de NID en el agua del río -debida principalmente a la presencia de NO_3^- en **PL2011**- provocó una disminución en la actividad enzimática. Por lo tanto, tanto la diferenciación celular como la producción enzimática se estimularon ante la falta de amonio y/o nitrato, situación usual en el tipo de ambiente en el que se ha reportado la especie de este estudio.

La actividad de las enzimas fosfomonoesterasas y fosfodiesterasas estuvo relacionada principalmente con la concentración de FRS disuelto en el agua. La concentración de FRS superior a 0.10 mg l^{-1} disminuyó la actividad de las fosfomonoesterasas, debido a que el fósforo inorgánico como ortofosfatos es la única forma química que puede ser utilizada por los organismos y es factor limitante en la mayoría de los ecosistemas acuáticos (Sundareshwar *et al.* 2003). Cuando las reservas de fósforo son escasas como para convertirse en limitantes, *N. verrucosum* podría utilizar el fósforo orgánico presente en el ambiente gracias a la presencia de enzimas fosfatasas (Whitton *et al.* 1990). De las dos enzimas evaluadas, la mayor actividad se registró en la fosfomonoesterasas, lo que puede ser atribuido a su localización en las células y su especificidad de las enzimas. Las fosfomonoesterasas se localizan en la pared celular externa o extracelulares en la capa mucilaginoso, mientras que las fosfodiesterasas se encuentran en la superficie externa de la pared celular (Whitton *et al.* 1990). Asimismo, la mayor actividad también puede estar explicada por la naturaleza química de las fosfatasas, que son enzimas hidrolasas capaces de hidrolizar ésteres fosfóricos, liberando ortofosfatos, lo que incrementa la disponibilidad del fosfato en el ambiente (Whitton & Hernández, 2000).

Caracterización morfológica y el estado reproductivo

Los resultados morfológicos y morfométricos obtenidos en muestras naturales de *N. verrucosum* durante las cuatro épocas de colecta, mostraron diferencias poco significativas, aun cuando hubo algunos cambios en los parámetros ambientales y microambientales. Esta relativa constancia en los medidas morfológicos, permitieron caracterizar los intervalos de importancia taxonómica. La estructura de la colonia y la

longitud de los acinetos y heterocitos fueron semejantes a los reportes previos de *N. verrucosum* (Bornet et Flahault 1986-1988, Geitler 1932, Desikachary 1959, Komarek & Anagnostidis 1989, 1999, 2005 y 2010, Mollenhauer 1988, 1999), aunque la talla celular superó en 4.6-3.6 μm a lo reportado para esta especie. Sin embargo, la talla celular en *Nostoc verrucosum* encontrada coincide con lo reportado en Komárek (2013), aunque también puede ser el resultado de un distinto estado de desarrollo de las células que forman el filamento (Ramírez *et al.* 2011) En condiciones naturales no se reconocieron acinetos y/o fases tempranas de desarrollo de la colonia, lo cual puede estar relacionado con un proceso estimulado por alguna combinación de parámetros ambientales particulares (*p.e.*, incremento de temperatura del agua y/o disminución del caudal).

La formación de heterocitos y la forma de reproducción por proliferación estuvo relacionada con el medio de cultivo BG110, el cual contiene elevada concentración de nutrientes, lo cual sugiere que un continuo aporte de nutrientes mantiene el crecimiento vegetativo; esta condición ha sido registrada en poblaciones de *Nostoc punctiforme* por Meeks *et al.* (2002).

Por otra parte, en los cultivos con medio CHU D₁₀ sin fuente de nitrógeno y fósforo, presentaron dos características morfológicas relevantes: i) La desaparición de los gránulos de Poli-p después de un largo periodo de mantenimiento en condiciones de cultivo; y los cuales muy probablemente son empleados como reserva de fósforo, tal y como sucede con *N. linckia* (Dodds *et al.* 1995) y otras especies de Nostocales en condiciones de cultivo (Mateo *et al.*, 2006). ii) La aparición de acinetos que presuntamente prepara a la población para entrar en estado de latencia.

El desarrollo de cultivos ha sido una herramienta importante para intentar estimular la aparición de heterocitos, acinetos y/o de las fases del ciclo de vida que permita acercar a la identidad taxonómica de la población. Sin embargo, la cantidad y calidad de luz han sido los factores empleados para la experimentación. Lazaroff (1966) utilizó condiciones de oscuridad en cultivos con *Nostoc muscorum* y encontró que se estimulaba la formación reversible de fases aseriadas, similar a lo encontrado en campo para *N. verrucosum*.

El mantenimiento de cultivo por tiempos prolongados también favorece la formación de acinetos, como lo reporta Mateo *et.al.* (2006).

En conclusión, la presencia de *Nostoc verrucosum* en el río “La Garita” está regulada por una serie de factores ambientales y microambientales bien definidos que la ubican como una población tropical de regiones calcáreas, con una eficiente tasa de fijación de nitrógeno e incorporación y almacenamiento de fósforo, lo que se manifiesta con una cobertura porcentual importante durante el periodo de post lluvias e inicio de secas de noviembre a febrero. La integración de distintas fuentes de información (taxonómica, ecológica y fisiológica) permitirá establecer los intervalos y gradientes de las especies de *Nostoc*. El aporte de la genética molecular ha permitido delimitar la afinidad taxonómica de algunas especies de *Nostoc* (Komárek 2010); sin embargo, aún es necesario establecer los factores ambientales que definen su presencia, regulan su abundancia y su relación con los procesos ecológicos y adaptaciones fisiológicas.

Literatura citada

Aboal, M., Puig, M.A. Sanchez-G, A. & Soler G. 1994. Algal standing-crop in some Mediterranean temporary rivers in southeastern Spain. *Verh. Internat. Verein. Limnol.* 25: 1746-1750.

Aboal, M., Puig, M. A., Mateo, P. & Perona, E. 2002. Implications of cyanophyte toxicity on biological monitoring of calcareous streams in north-east Spain. *J Appl Phycol* 14: 49-56.

APHA. 1995. Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater (Ed. A. E. Greenberg) *American Public Health Association*, Washington, págs. 106-115.

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

Beltrán, Y., Carmona, J. Vilaclara, G. & Bojorge, M. 2013. Calcification of the filamentous cyanobacterium *Blennothrix ganeshii* in calcareous tropical streams of central Mexico region. *Hidrobiologica* 23 (1): 17-27.

Bergman, B., Gallon, J. R., Rai, A. N. & Stal, L. J. 1997. N₂ Fixation by non-heterocystous cyanobacteria. *FEMS Microbiol Ecol* 19: 139-185.

Berman-Frank, I., Lundgren, P. y Falkowski, P. 2003. Nitrogen fixation and photosynthetic oxygen evolution in cyanobacteria. *Res Microbiol* 154: 157–164.

Berrendero, E. 2008. Caracterización morfológica, genética y fisiológica de cinoprocariontes dominantes en sistemas fluviales. Tesis doctoral. Universidad Autónoma de Madrid. 32-47.

Bornet, E. & Flahault, C. 1886-1888. Revision des Nostocaceas heterocystés. *Ann Sci Nat Bot.* 7, ser, 3: 323-381, 4: 343-373, 5: 51-129, 7: 171-262.

Campbell, S.E. 1983. The modern distribution and geological history of calcium carbonate boring microorganisms. En: *Bio-mineralization and Biological metal accumulation*. (Eds. P. Westbroek y P. de Jong), *Reidel Publishing*, Boston, págs. 99– 104.

Carmona, J., Montejano, G. & Necchi, O. 2006. Ecology and morphological characterization of gametophyte and “Chantransia” stages of *Sirodotia huillensis* (Batrachospermales, Rhodophyta) from a stream in central Mexico. *Phycological Research.* 54 (2): 108-115

Castenholz, R. W. 1989a. General characteristics of the cyanobacteria. En: *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, 2ª ed, vol. 3, págs. 582-585. (Eds. D. R. Boone y R. W. Castenholz) *Springer*, New York.

Christmas, M. y Whitton, B. A. 1998. Phosphorous and aquatic bryophytes in the Swale-Ouse river system, North-East England. 1. Relationship between ambient phosphate, internal N:P ratio and surface phosphatase activity. *Sci Total Environ* 210/211: 389-399

Chrost, J. & Krambeck, H.J. 1987. *Kinetics of Alkaline Phosphatase Activity and Phosphorus Availability for Phytoplankton and Bacterioplankton in Lake Plussee (North German Eutrophic Lake)*. *Microbial Ecology.* 13: 229-248.

Chu, S.P. 1942. The influence of the mineral composition of the medio o the growth of planktonic algae. I. Methods and culture media *Journal of Ecology.* 30: 284-325.

Desikachary, T.V. 1959. Cyanophyta. *Indian Council of Agricultural Research. New Delhi.* 686 págs.

Dodds, W. K., Gudder, D. A. & Mollenhauer, D. 1995. The ecology of *Nostoc*. *J. Phycol* 31 (1): 2-18.

Drews, G. & Weckesser, J. 1982. Function, structure and composition of cell walls and external layers. Vol. 19, págs 333-357. En: *The Biology of Cyanobacteria* (Eds. N. G. Carr y B. A. Whitton). *Blackwall Scientific Publications, Oxford.*

Falcón, L.; Cerritos, R.; Eguiarte, L. & Souza, V. 2007. Nitrogen fixation in microbial mat and stromatolite communities from Cuatro Ciénegas, México. *Microbial Ecology* 54: 363-373.

Flores, E. & Guerrero, A. 1994. Assimilatory nitrogen metabolism and its regulation, págs. 487-517. En: *The Molecular Biology of Cyanobacteria*. (Ed. D. A. Bryant) *Kluwer Academic Publishers, The Netherlands.*

Fuhs, W. 1973. Cytochemical examination of blue-green algae En: *The Biology of Blue-Green Algae*, pp. 117-43. Carr. N. & B. Whitton (Ed.). *Blackwell Scientific Publications, Oxford.*

García, E. 1973. Modificaciones al sistema de clasificación Köppen para adaptarlo a las condiciones de la república mexicana. Instituto de Geografía, Universidad Nacional Autónoma de México, México. 246 p.

Geitler, L. 1932. Cyanophyceae. Rabenhorst's Kryptogamen Flora von Deutschland, Österreich und der Schweiz. Akademische Verlagsgesellschaft. Leipzig. Germany. 1196 p.

Gibson, M. & Whitton, B. 1987. Influence of phosphorous on morphology and physiology of freshwater Chaetophora, Draparnaldia and Stigeoclonium (Chaetophorales, Chlorophyta). *Phycologia* 26: 59-69.

Gotelli, N.J. & Ellison, A.M. 2004. A primer of ecological statistics . Sinauer Associates, Inc, USA.

Grainger L., Peat J., Tiwari A. & Whitton, B. 1989. Phosphatase activity of the cyanobacterium (blue-green algae) *Calothrix parietina*. *Microbios* 59: 7-17

Grossman, A. R., Schaefer, M., Chiang, G. G. & Collier, J. L. 1994. The responses of cyanobacteria to environmental conditions: light and nutrients. En: *The Molecular Biology of Cyanobacteria*. Págs 641-675. (Ed. A. Bryant) *Kluwer Academic Publishers*, Netherlands

Guerrero, M. G. & Lara, C. 1987. Assimilation of organic nitrogen. En: *The Cyanobacteria*. Págs. 163-186. (Eds. P. Fay y C. Van Baalen). *Elsevier Science Publisher*, Oxford

Healey, F. P. 1982. Phosphate. En: *The Biology of Cyanobacteria*, vol. 19, págs. 105-124. (Eds. N. G. Carr y B. A. Whitton) *Blackwell Scientific Publisher*, Oxford

Hernández, I. 2006. Caracterización de la capacidad fijadora de nitrógeno en varias cianoprocariontes. Tesis de licenciatura. Universidad Autónoma de Madrid. 35 p.

Instituto Nacional de Estadística, Geografía e Informática. 1985. Síntesis geográfica del Estado de san Luis Potosí. Instituto Nacional de Estadística, Geografía e Informática (INEGI), México. 186 p.

Komárek , J. & K. Anagnostidis. 1989. Modern approach to the classification system of Cyanophytes. Nostocales. *Archives für Hydrobiologie Supplements* 82, 3. *Algological Studies* 36: 247-345.

Komárek, J. 2005. Modern Classification of Cyanoprokaryote (Cyanobacteria). *Oceanological and Hydrobiological Studies* Vol. 34(3): 05-17.

Komárek, J. 2006. Cyanobacterial Taxonomy: Current Problems and Prospects for the Integration of Traditional and Molecular Approaches. *Algae* Vol 21(4): 349-375.

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

Komárek, J. 2013. Heterocytous Genera. En: Sübwasserflora van Mitteleuropa Freshwater Flora of Central Europe. Büdel B., Gartner G., Krienitz L., Schagerl M. (Eds). 4^a Edition. Volumen 19/3. Pringer Spektrum 1130pp.

Lazaroff, N. 1966. Photoinduction and photoreversal of the Nostocacean developmental cycle. *J. Phycol.* 2, 7-17

Marcarelli, M.A., Baker A.M. & Wurtsbaugh A.W. 2008. Is in stream N₂ fixation an important N source for benthic communities and stream ecosystems? *Journal of Norteamerican Benthological Society* 27 (1): 186-211.

Margalef, R. 1983. Limnología. Ediciones Omega. Barcelona, España. 1014pp.

- Mateo, P., Douterelo, I., Berrendero, E. & Perona, E. 2006.** Physiological differences between two species of cyanobacteria in relation to phosphorus limitation. *J Phycol* **42**, 61–66.
- Meeks, J., Campbel, E. Summers, M. & Wong, F. 2002** Cellular differentiation in the cyanobacterium *Nostoc punctiforme*. *Arch Microbiol* **178**: 395-403.
- Mollenhauer, D., 1988.** *Nostoc* species in the field. *Archives für Hydrobiologie Supplements* **80**, 1-4 *Algological Studies* **50-53**: 315-326.
- Mollenhauer, D., Bengtsson, R. & Lindstrom E. 1999.** Macrsocopic cyanobacteria of the genus *Nostoc*: a neglected and endangered constituent of European inland aquatic biodiversity . *Eur. J. Phycol* **34**: 349-360.
- Montejano, G., Carmona, J. & Cantoral, E. 2000.** Algal communities from calcareous springs and streams in La Huasteca, central México: A synthesis. In: Munawar, M., S. G. Lawrence, I.F. Munawar & D. F. Malley (Eds.). *Aquatic Ecosystems of México: Status and Scope*. Ecovision World Monography Series. Backhunys Publishers, The Netherlands, Leiden, pp. 135-149.
- Necchi Jr. O., Branco, L.H.Z. & Branco, C.C.Z. 1995.** Comparison of three techniques for estimating periphyton abundance in bedrock streams. *Archives für Hydrobiologie Supplements / Algological Studies* **134**: 393-402.
- Nichols, J. M. y Adams, D. G. 1982.** Akinetes. En: *The Biology of Cianobacteria*, vol. 19, págs. 387-412. (Eds. N. G. Carr y B. A. Whitton) *Blackwell Scientific Publishers*, Oxford.
- Perona, E., Bonilla, I. y Mateo, P. 1998.** Epilithic cyanobacterial communities and water quality: an alternative tool for monitoring eutrophication in the Alberche River (Spain). *J Appl Phycol* **10**, 183-191.

- Perry, M. J. 1972.** Alkaline phosphatase activity in subtropical Central North Pacific waters using a Sensitive fluorometric method. *Mar Biol* 15,113–119.
- Ramirez, M., Hernandez-Mariné M., Mateo, P., Berrendero, E., & Roldan, M. 2011.** Polyphasic approach and adaptative strategies of Nostoc cf. commune (Nostocales, Nostocaceae) growing on Mayan monuments. *Fottea* 11(1): 73-86
- Ramírez, R. & Carmona, J. 2005.** Taxonomy and distribution of freshwater Prasiola (Prasiolales, Chlorophyta) in central Mexico. *Cryptogamie Algologie* 26: 177-188.
- Ramírez, R. Carmona, J. & Martorell, C. 2006.** Microhabitat and morphometric variation in two species of *Prasiola* (Prasiolales, Chlorophyta) from streams in central Mexico. *Aquatic Ecology* 41 (2): 161-168.
- Smith, A. J. 1982.** Modes of cyanobacterial carbon metabolism. En: *The Biology of Cyanobacteria*, vol. 19, págs 47-85. (Eds. N. G. Carr y B. A. Whitton). *Blackwell Scientific Publishers*, Oxford.
- Stal, L. 2008.** Nitrogen fixation in Cyanobacteria. In: *Encyclopedia of Life Sciences (ELS)*. John Wiley and Sons, Ltd: Chichester.
- Stewart, W.D.P., Fitzgerald, G.P. & Burris, R.H. 1968.** Acetylene reduction by nitrogen-fixing bluegreen algae. *Arch Microbiol* 62 (4), 336-348.
- Stewart, W. D. P. 1980.** Some aspects of structure and function in N₂-fixing cyanobacteria. *Ann Rev Microbiol* 34, 497-538.
- Walsby, A. E. 1974.** The extracelular products of *Anabaena cylindrical* Lemm. I-Isolation of a macromolecular pigment peptide complex and other components. *Br Phycol. J* 9: 371-381.

Wetzel, R. G. & Likens, G. E. 1991. Limnological Analyses. Spring-Verlag, U.S.A., New York. 391p.

Whitton, B. A. 1992. Diversity, ecology and taxonomy of the cyanobacteria. En: Photosynthetic Prokaryotes. vol. 6, págs. 1-51. (Eds. N. H. Mann y N. G. Carr) Biotechnology Handbooks. Plenum Press. London

Whitton, B. A., Potts, M., Simon, J. W. y Grainger, S. L. J. 1990. Phosphatase activity of the bluegreen alga (cyanobacterium) *Nostoc commune* UTEX 584. *Phycologia* 29: 139-145.

Whitton, B.A., Clegg, E., Christmas, M., Gemmell, J.J. y Robinson, P.J. 1999. Development of phosphatase assay for monitoring nutrients in rivers: Methodology manual for measurement of phosphates activity in mosses and green algae in rivers. *Environment Agency of England and Wales* STRE106-E-P págs 53. WRc, Frankland Road, Swindon, Wilts, UK.

Whitton, B.A. & Potts, M. 2000. *The ecology of cyanobacteria*. Their diversity in time and space. Kluwer Academic Publishers. The Netherlands. 504

Wolk, C. P., Ernst, A. & Elia, J. 1994. Heterocyst metabolism and development. En: *The Biology of Cyanobacteria*. Págs. 769-823 (Ed. A. Bryant). *Kluwer Academic Publishers*, The Netherlands.