



# **UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**

**POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS**

**INSTITUTO DE GEOLOGÍA**

**MANEJO INTEGRAL DE ECOSISTEMAS**

## **CARACTERIZACIÓN DE CIANOBACTERIAS EN MICROBIALITAS DEL LAGO CRÁTER ALCHICHICA EN UN GRADIENTE DE PROFUNDIDAD**

### **TESIS**

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

**MAESTRO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS**

PRESENTA:

**BERNARDO ÁGUILA SALGADO**

**TUTOR PRINCIPAL: DRA. ROCÍO JETZABEL ALCÁNTARA HERNÁNDEZ**

**INSTITUTO DE GEOLOGÍA, UNAM**

**COMITÉ TUTOR: DRA. LUISA ISAURA FALCÓN ÁLVAREZ**

**INSTITUTO DE ECOLOGÍA, UNAM**

**DR. GUSTAVO ALBERTO MONTEJANO ZURITA**

**FACULTAD DE CIENCIAS, UNAM**

**MÉXICO, CD. MX., JUNIO 2018**



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.





# **UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**

**POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS**

**INSTITUTO DE GEOLOGÍA**

**MANEJO INTEGRAL DE ECOSISTEMAS**

## **CARACTERIZACIÓN DE CIANOBACTERIAS EN MICROBIALITAS DEL LAGO CRÁTER ALCHICHICA EN UN GRADIENTE DE PROFUNDIDAD**

### **TESIS**

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

**MAESTRO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS**

PRESENTA:

**BERNARDO ÁGUILA SALGADO**

**TUTOR PRINCIPAL: DRA. ROCÍO JETZABEL ALCÁNTARA HERNÁNDEZ**

**INSTITUTO DE GEOLOGÍA, UNAM**

**COMITÉ TUTOR: DRA. LUISA ISAURA FALCÓN ÁLVAREZ**

**INSTITUTO DE ECOLOGÍA, UNAM**

**DR. GUSTAVO ALBERTO MONTEJANO ZURITA**

**FACULTAD DE CIENCIAS, UNAM**

**MÉXICO, CD. MX., JUNIO 2018**



OFICIO CPCB/430/2018

Asunto: Oficio de Jurado para Examen de Grado.

Lic. Ivonne Ramírez Wence  
Directora General de Administración Escolar, UNAM  
Presente

Me permito informar a usted, que el Subcomité de Ecología y Manejo Integral de Ecosistemas del Posgrado en Ciencias Biológicas, en su sesión ordinaria del día 16 de abril de 2018, aprobó el jurado para la presentación de su examen para obtener el grado de **MAESTRO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS** del alumno **ÁGUILA SALGADO BERNARDO** con número de cuenta 100137840 con la tesis titulada "**CARACTERIZACIÓN DE CIANOBACTERIAS EN MICROBIALITAS DEL LAGO CRÁTER ALCHICHICA EN UN GRADIENTE DE PROFUNDIDAD**", realizada bajo la dirección de la **DRA. ROCÍO JETZABEL ALCÁNTARA HERNÁNDEZ**:

Presidente: DR. MARTÍN MERINO IBARRA  
Vocal: DRA. ITZEL BECERRA ABSALÓN  
Secretario: DRA. LUISA ISaura FALCÓN ÁLVAREZ  
Suplente: DRA. PATRICIA MARGARITA VALDESPINO CASTILLO  
Suplente: DR. GUSTAVO ALBERTO MONTEJANO ZURITA

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

Atentamente  
"POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU"  
Cd. Universitaria, Cd. Mx., a 14 de mayo de 2018.

  
DR. ADOLFO GERARDO NAVARRO SIGÜENZA  
COORDINADOR DEL PROGRAMA



# AGRADECIMIENTOS

## Agradecimientos institucionales

Agradezco al Posgrado en Ciencias Biológicas, por las herramientas y conocimientos otorgados, indispensables en mi formación académica. Agradezco también su apoyo en todos los trámites realizados, por su rápida y eficiente respuesta en los mismos.

Esta investigación fue realizada gracias al Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica con el proyecto: “El componente bacteriano y su potencial biogeoquímico en sedimentos y microbialitas de un sistema salino alcalino” UNAM-DGAPA-PAPIIT IA209516. Gracias a CONACYT por el Programa de Apoyo a los Estudios de Posgrado, por la Beca otorgada durante la realización de este trabajo. También agradezco el apoyo PAEP 2017-2 otorgado, así como el apoyo de la Coordinación de Estudios de Posgrado para la Impresión de Tesis y Estimulo a la graduación oportuna 2018-2. Gracias al Instituto de Geología por el equipo e instalaciones proporcionadas en el desarrollo de este trabajo

Agradezco a mi tutora principal la Dra Rocío Jetzabel Alcántara Hernández y a los miembros de mi comité tutor la Dra Luisa Isaura Falcón Álvarez y al Dr. Gustavo Montejano Zurita del Posgrado de Ciencias Biológicas.

## Agradecimientos personales

Quisiera agradecer especialmente a mi directora de tesis, la Dra. Rocío Alcántara, por su paciencia y su disponibilidad, por su gran amabilidad y hacerme sentir bienvenido dentro de la UNAM, por hacer del grupo BiogeoMi una segunda familia, de igual manera agradezco a la Dra. Luisa Falcón por abrirme las puertas y darme la gran oportunidad de pertenecer a su excelente grupo de trabajo, quisiera agradecerle por sus inspiradoras clases y sabios consejos, igualmente por su paciencia.

Quiero agradecer mucho al Dr. Gustavo Montejano y a la Dra. Itzel Becerra por su disponibilidad, por contagiarme su enorme pasión hacia las cianobacterias, que igualmente considero uno de los organismos más fascinantes de la Tierra, gracias por su accesibilidad, apoyo técnico y disposición hacia mí. Gracias a la M. en B. Maria Eugenia Muñiz Diaz de León del Departamento de Biología Comparada de la Facultad de Ciencias por su apoyo con el nanodrop. Agradezco a Rafael López Martínez por su apoyo técnico. Así como a las M. en C. Osiris Gaona e Iris Suárez también por el apoyo técnico para el desarrollo de esta tesis.

Quisiera agradecer de gran manera a mis compañeros de la maestría: Eduardo Aguilar, Jazmín Santillán y Jesús Torres por su ayuda en el procesamiento de muestras y compartimiento de datos, así como a mis compañeros del cubo Jair, Katia, Chuchin, Ely, Teresita y David por su constante ayuda, por crear un ambiente ameno en el cubo. Doy las gracias a mi compañero Tadeo Martínez, a Yislem Beltrán, Patricia Valdespino, Andrés Sánchez y Osiris Gaona por su apoyo en el laboratorio de Ecología microbiana. Gracias también al Dr. Rafael López y a su equipo de buceo, por proporcionar las muestras de microbialita. Gracias a María Rodríguez por su gran amabilidad y disposición ante todos los trámites relacionados al Posgrado de Ciencias Biológicas.

En lo personal quisiera agradecer a mi novia Gaby Cruz que me ayudó con sus consejos, cariño y apoyo en todos los ámbitos, al igual que mi familia que siempre estuvieron ahí para aconsejarme y ayudarme en lo que fuese necesario, gracias a Miriam Rebeca Hernández por facilitarme el departamento para vivir en la ciudad de México, gracias a Laura Ramírez, Ileana Zapata, Graciela Colunga por sus consejos, pláticas y apoyo.

<b>1</b>	<b>Introducción</b> .....	1
1.1	Generalidades y particularidades de las microbialitas .....	1
1.1.1	Definición, origen, formación y clasificación.....	1
1.1.2	Distribución de microbialitas.....	3
1.1.3	Las microbialitas del lago cráter Alchichica.....	4
1.2	Las cianobacterias y su relevancia en la formación de las microbialitas	
1.2.1	Generalidades y clasificación taxonómica.....	6
1.2.2	Importancia de las cianobacterias en la formación de microbialitas.....	7
1.2.3	Adaptaciones diferenciales a la intensidad y calidad de luz.....	7
1.3	Técnicas para la identificación de cianobacterias	
1.3.1	Observaciones por microscopía.....	9
1.3.2	Aislamiento por cultivos en medios líquidos y sólidos.....	10
1.3.3	Técnicas moleculares.....	10
<b>2</b>	<b>Planteamiento y justificación del problema</b> .....	14
<b>3</b>	<b>Hipótesis de trabajo</b> .....	14
<b>4</b>	<b>Objetivos</b>	
4.1	Objetivo general.....	15
4.2	Objetivos particulares.....	15
<b>5</b>	<b>Materiales y Métodos</b>	
5.1	Colecta de muestras .....	16
5.2	Extracción, visualización y cuantificación de ácidos nucleicos .....	16
5.3	Amplificación fragmentos 16S rRNA.....	16
5.4	Librería de clonas.....	17
5.5	Análisis de secuencias.....	18
5.6	Establecimiento de cultivos y aislamiento de cianobacterias.....	18
5.7	Identificación por microscopía y morfometría.....	19



<b>6</b>	<b>Resultados</b>	
6.1	Identificación por microscopía en microbialitas.....	21
6.1.1	Profundidad 3 metros z=3.....	22
6.1.2	Profundidad 10 metros z=10.....	23
6.1.3	Profundidad 20 metros z=20.....	24
6.1.4	Profundidad 30 metros z=30.....	25
6.2	Obtención de cultivos de cianobacterias	
6.2.1	Cultivos en recipientes plásticos.....	28
6.2.2	Cultivos en matraces.....	28
6.2.3	Cultivos en medio sólido.....	30
6.2.4	Aislamiento en medio líquido.....	31
6.2.5	Secuenciación de cultivos aislados.....	34
6.3	Caracterización de cianobacterias por librería de clonas.....	34
6.4	Comparación de técnicas dependientes e independientes de cultivo.....	37
<b>7</b>	<b>Discusión</b>	
7.1	Observaciones a microscopía.....	40
7.2	Adaptación y morfotipos de cultivos.....	42
7.3	Consortios involucrados en la precipitación de carbonatos .....	43
7.4	Análisis de secuencias 16S rRNA.....	44
7.5	Problema de anotación en base de datos y clasificación.....	45
<b>8</b>	<b>Conclusión</b> .....	47
<b>9</b>	<b>Perspectivas</b> .....	47
<b>10</b>	<b>Bibliografía</b> .....	48

## Índice de Figuras

<b>Figura 1.</b> Cronograma de la aparición de microbialitas hace 3500 Ma. y su decrecimiento poblacional hace 1000 Ma .....	1
<b>Figura 2.</b> Clasificación de microbialitas por génesis.....	2
<b>Figura 3.</b> Clasificación de microbialitas por morfología estructural.....	2
<b>Figura 4.</b> Ubicación del lago cráter Alchichica.....	4
<b>Figura 5.</b> Paisaje del lago cráter Alchichica octubre 2016.....	5
<b>Figura 6.</b> Microbialitas de profundidad en el lago Alchichica .....	5
<b>Figura 7.</b> Órdenes de cianobacterias y sus principales características estructurales.....	6
<b>Figura 8.</b> Absorbancias de diferentes clorofilas y fotopigmentos.....	8
<b>Figura 9.</b> Diagrama de la fotosíntesis en cianobacterias.....	8
<b>Figura 10.</b> Regiones hipervariables del 16S rRNA procarionte.....	11
<b>Figura 11.</b> Metodología general para la construcción de librería de clonas .....	12
<b>Figura 12.</b> Zona de muestro de las profundidades 3, 10, 20 y 30 metros.....	16
<b>Figura 13.</b> Recipientes de plástico de 300 ml con fragmentos de microbialita después de 5 meses de crecimiento .....	18
<b>Figura 14.</b> Diagrama de flujo de la metodología.....	20
<b>Figura 15.</b> Microscopía óptica de microbialitas encontradas a 3 m de profundidad .....	22
<b>Figura 16.</b> Microscopía óptica de microbialitas encontradas a 10 m de profundidad .....	23
<b>Figura 17.</b> Microscopía óptica de microbialitas encontradas a 20m de profundidad.....	24
<b>Figura 18.</b> Microscopía óptica de microbialitas encontradas a 30 m de profundidad.....	25
<b>Figura 19.</b> Cultivos de microbialitas de 10 y 20 m de profundidad en matraz Erlenmeyer.....	28
<b>Figura 20.</b> Microscopía de los cultivos en matraz Erlenmeyer de 10 m y 20 m.....	29
<b>Figura 21.</b> Cultivos a los 6 meses de inoculación ordenados por profundidad .....	30
<b>Figura 22.</b> Aislados en frascos con respirador.....	31
<b>Figura 23.</b> Microscopía óptica de cultivos aislados .....	32
<b>Figura 24.</b> Dibujos de cianobacterias a escala visualizadas e identificadas por microscopía óptica....	33
<b>Figura 25.</b> Gel de electroforesis en agarosa de fragmentos 16S rRNA amplificados .....	35
<b>Figura 26.</b> Abundancias de OTUs por profundidad .....	35
<b>Figura 27.</b> Agrupación por similitud de distancias usando BioNeighbor Joining (BioNB) .....	36
<b>Figura 28.</b> Árbol Neighbor-Joining de secuencias 16S rRNA de Nostocales.....	37

<b>Figura 29</b> Árbol Neighbor-Joining de secuencias 16S rRNA para Chroococcidiopsidales y Pleurocapsales.....	37
<b>Figura 30</b> 2 Árbol Neighbor-Joining de secuencias 16S rRNA para Oscillatoriales.....	38
<b>Figura 31</b> Árbol Neighbor-Joining de secuencias 16S rRNA para Chroococcales .....	38
<b>Figura 32.</b> Árbol Neighbor-Joining de secuencias 16S rRNA para Synechococcales .....	39
<b>Figura 33.</b> Microscopía óptica de cambios morfológicos en cultivo de <i>Rivularia</i> .....	42
<b>Figura 34.</b> Microscopía óptica de consorcio de Pleurocapsales .....	43

## Índice de Tablas

<b>Tabla 1.</b> Distribución de microbialitas por país ambiente y morfología.....	3
<b>Tabla 2.</b> Tipos de microscopía.....	9
<b>Tabla 3.</b> Plataformas de secuenciación.....	13
<b>Tabla 4.</b> Secuencia de primers usados amplificar regiones V4 de Cianobacteria .....	17
<b>Tabla 5.</b> Primers M13 usados para amplificar insertos del vector.....	18
<b>Tabla 6.</b> Cianobacterias identificadas en microbialitas y sus abundancias relativas.....	21
<b>Tabla 7.</b> Tablas de morfometría sección I.....	26
<b>Tabla 8.</b> Tablas de morfometría sección II.....	27
<b>Tabla 9.</b> Cianobacterias asiladas en cultivo, amplificación y secuenciación 16S rRNA .....	34
<b>Tabla 10.</b> Número de clonas, secuencias y OTUs obtenidos por profundidad óptica .....	35
<b>Tabla 11.</b> Cianobacterias detectadas por microscopía óptica en este estudio y aquellas reportada en estudios previos.....	41
<b>Tabla 12.</b> Tabla comparativa de detección de cianobacterias en microbialitas del lago Alchichica por diferentes metodologías.....	46

## Resumen

Las microbialitas son estructuras organo-sedimentarias microbianas formadas por la acreción, precipitación y/o unión de minerales. Trabajos previos han demostrado que la fotosíntesis por cianobacterias es un factor importante en la precipitación de estos minerales y la formación de las microbialitas. La fotosíntesis eleva el pH local a través de la asimilación de bicarbonato, favoreciendo la precipitación de carbonatos. Se sabe también que, las sustancias poliméricas extracelulares (EPS) de las cianobacterias actúan como soporte para la acreción y nucleación activa del material mineral. No obstante, la formación de las microbialitas aún no se entiende completamente. Por lo tanto, es crucial describir y estudiar a las cianobacterias para comprender la formación de estas estructuras.

En este trabajo se describió y caracterizó la diversidad de cianobacterias en microbialitas (morfortipo esponjoso) del lago cráter Alchichica (Puebla, México), a lo largo de un gradiente de profundidad ( $z = 3$  m, 10 m, 20 m y 30 m), empleando una aproximación polifásica. Para los métodos independientes de cultivo, las muestras de microbialitas se examinaron mediante microscopía óptica, y los taxones de cianobacterias se caracterizaron mediante morfometría. Mientras que, para el análisis molecular, se analizaron microbialitas a través de la amplificación del gen 16S rRNA, con cebadores específicos para cianobacterias mediante metagenómica dirigida. También se obtuvieron 6 cultivos monocianobacteriales de diferentes cianobacterias que se caracterizaron por microscopía y secuenciación del gen 16S rRNA.

En este estudio se encontró una asociación taxonómica entre los grupos de cianobacterias en microbialitas de profundidades específicas. Los géneros *Calothrix*, *Rivularia* y *Leptolyngbya* estuvieron asociados a la superficie (3-10 m); mientras que, los géneros *Xenococcus*, *Stanieria*, *Chroococcidium* y *Pleurocapsa* se encontraron en todas las profundidades siendo más abundantes en las zonas profundas (> 10 m). *Chroococcus*, *Synechococcus*, *Cyanobium* y otras picocianobacterias también se encontraron distribuidas en todas las profundidades pero sin un patrón de asociación específica al gradiente de profundidad.

Este trabajo representa una contribución al estudio integral de las cianobacterias en las estructuras biosedimentarias; donde las técnicas microscópicas y moleculares se complementaron.

## Abstract

Microbialites are microbial organo-sedimentary structures formed either by mineral accretion, precipitation and/or binding. Previous studies have shown that cyanobacterial photosynthesis is an important factor for mineral precipitation and microbialite formation, since photosynthesis elevates local pH via bicarbonate assimilation, favoring carbonate precipitation. In addition, cyanobacterial extracellular polymeric substances (EPS) act as a template for mineral nucleation. Nonetheless, the microbialite formation process is not fully understood to date. Therefore, it is crucial to describe and study the cyanobacterial component to also understand the microbialite formation process.

In this study, we described and characterized the cyanobacterial diversity in spongy microbialites from lake Alchichica (Puebla, Mexico), along a depth gradient in the water column ( $z=3$  m, 10 m, 20 m, and 30 m), using a polyphasic approach. For culture independent methods, microbialite samples were examined by optical microscopy, and the cyanobacterial taxa were characterized by standard morphological and morphometry identification. While for molecular analysis, microbialites were analyzed by clone libraries construction, through 16S rRNA specific primers for cyanobacteria. We obtained 6 different cyanobacterial cultures which were characterized by microscopy and through 16S rRNA gene sequencing.

We observed a taxonomic relationship between depth and cyanobacterial genera. *Calothrix*, *Rivularia*, and *Leptolyngbya* were associated with shallower depths (3-10 m); while *Xenococcus*, *Stanieria*, *Chroococcidium* and *Pleurocapsa* were present in all samples, being more abundant at deeper zones (> 10 m). In addition, *Chroococcus*, *Synechococcus*, *Cyanobium* and other picocyanobacteria were also found along all depths, without any specific distribution pattern.

This work represents a contribution to the integral study of cyanobacteria in organosedimentary structures; where molecular and microscopic methods complemented each other.

# 1 INTRODUCCIÓN

## 1.1 Generalidades y particularidades de las microbialitas

### 1.1.1 Definición, origen, formación y clasificación

Las microbialitas son estructuras organosedimentarias formadas por la acreción, precipitación y/o unión de material mineral en procesos mediados -activa o pasivamente- por la actividad microbiana (Burne & Moore 1987). Su estructura laminada es semejante a aquella encontrada en los restos fósiles de vida más antiguos conocidos hasta la fecha, con poco más de 3400 millones de años de antigüedad (Flannery & Walter 2012).

Se ha sugerido que estas formas fósiles jugaron un papel importante en los ciclos biogeoquímicos del carbono y del oxígeno a través de la historia evolutiva del planeta durante el Arqueano; desde entonces, las microbialitas han cambiado su propia composición, forma, abundancia y metabolismos microbianos (Merz et al. 1992) (Fig. 1). La evidencia fósil sugiere que en el Precámbrico, las microbialitas eran una forma de vida ampliamente distribuida en la Tierra. Sin embargo, desde hace 1000 millones de años sus poblaciones decrecieron notablemente (Awramik 1971), posiblemente por la depredación por foraminíferos; por lo que actualmente están confinadas a lugares muy específicos (Bernhard et al. 2013).

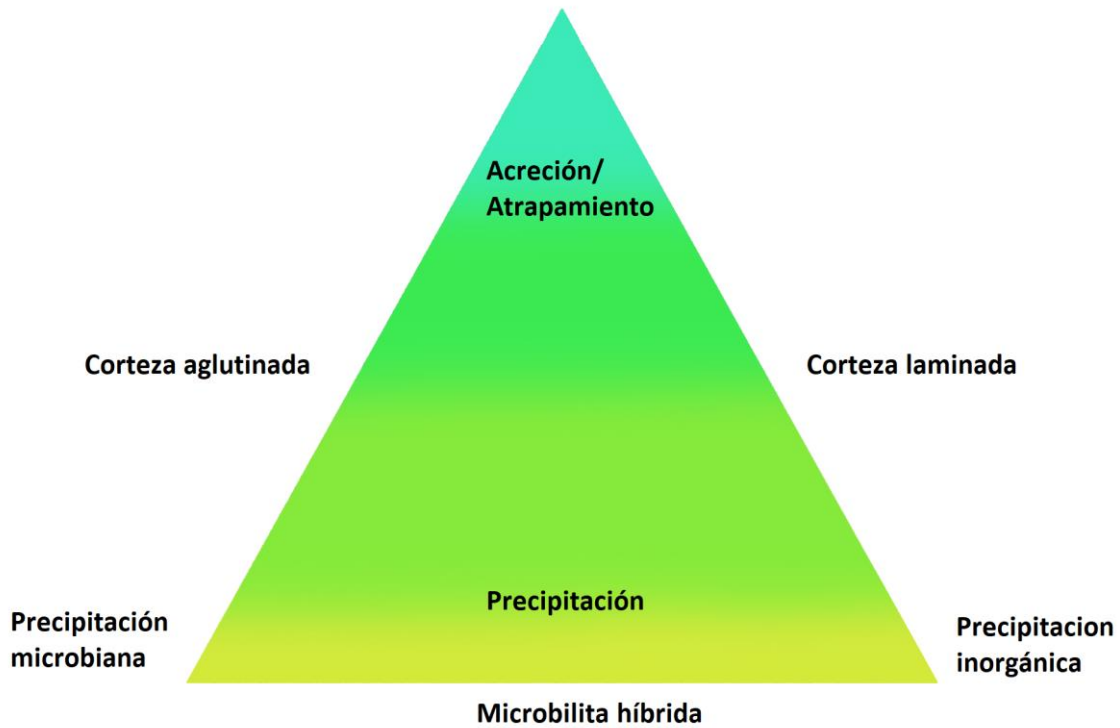


**Figura 1.** Cronograma de la aparición de microbialitas hace 3500 Ma. y su decrecimiento poblacional hace 1000 Ma. Posiblemente por la depredación de foraminíferos y organismos eucariontes que florecieron en la explosión cámbrica hace 541 Ma (Modificado de Knoll et al. (2017) y Falcón (2017)).

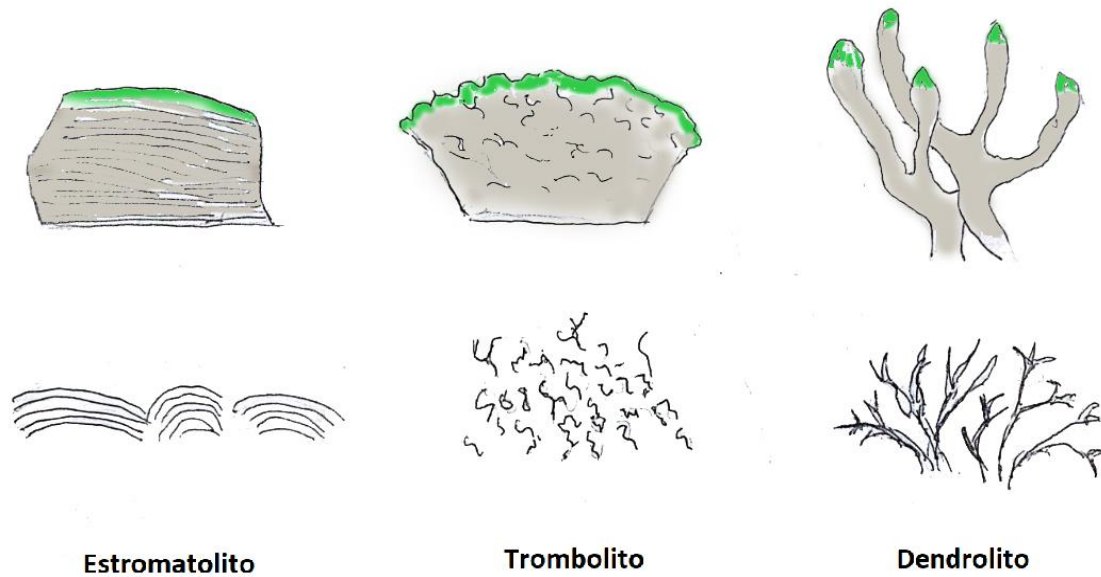
Estas organizaciones microbianas bénticas son metabólicamente activas y se forman por una sucesión microbiana en forma de estratos o capas. Contienen un componente orgánico y otro mineral (Glunk et al. 2011). El componente orgánico se encuentra como un tapete microbiano distribuido en los primeros milímetros de la superficie, donde las capas externas contienen mayormente organismos fotótrofos y las capas internas contienen organismos heterótrofos y quimiolitótrofos. Por otro lado, el componente inorgánico mineral está formado por carbonatos, generalmente aragonita, calcita, dolomita, o magnesita; aunque también pueden ocurrir formas carbonatadas de azufre, hierro, silicio y fósforo (Dupraz et al. 2009, Valdespino-Castillo et al. 2018).

Las microbialitas tienen diferentes mecanismos de formación que incluyen: i) Acreción, cuando los microorganismos atrapan activamente materia orgánica, detritos o material mineral granulado (Frantz et al. 2015); ii) precipitación, pudiendo ser por deposición inorgánica/sedimentación o influenciada pasivamente por metabolismos microbianos (Fig. 2). Entre estos dos tipos de precipitación orgánica e inorgánica existe la precipitación híbrida, donde se alternan litificaciones de tapetes microbianos y estratos de precipitación abiogénica (Kazmierczak et al. 2015).

Las microbialitas también pueden ser clasificadas por morfología estructural en: Estromatolitos (laminados), Trombolitos (esponjosos, amorfos), Dendrolitos (dendríticos, ramificados) y Leiolitos (afaníticos, grano fino) (Fig. 3.); aunque por la complejidad híbrida y morfológica de la mayoría de las microbialitas, la practicidad de esta clasificación sigue en discusión (Riding et al. 2011).



**Figura 2.** Clasificación de microbialitas por génesis. Se dividen en 2 grandes grupos génesis por acreción/atrapamiento y por precipitación, siendo esta última influenciada por actividad microbiana o por precipitación inorgánica (Modificado de Riding 2011).



**Figura 3.** Clasificación de las microbialitas por morfología estructural. La capa verde representa la biopelícula creciendo activamente, y en blanco se muestra la estructura microscópica a detalle (Modificado de Riding 2011).



### 1.1.2 Distribución de las microbialitas

Las microbialitas modernas actualmente se encuentran confinadas a sistemas de agua dulce, lagunas hipersalinas, lagos salino alcalinos, manantiales termales, estuarios, pozas salinas, cuevas y muy pocos sistemas marinos (Laval et al. 2000, Berelson et al. 2011, Centeno et al. 2012). Las condiciones más importantes para su formación parecen estar dirigidas por una alta salinidad, alcalinidad, y nutrientes bajos (sistemas oligotróficos). Así como una disponibilidad y calidad de luz particular, incluso en algunos casos se ha observado a la temperatura como factor determinante de formación (Riding. 2011).

Cabe aclarar que la mayor descripción de las microbialitas modernas se ha dado en sistemas lacustres salinos o alcalinos (Dupraz et al. 2011) (Tabla 1).

**Tabla 1. Distribución de las microbialitas por país, ambiente y morfología.**

Lugar	Ambiente	Referencia
Lago Pavillon, Canadá	Lago agua dulce	Laval et al. 2000
Lago Van, Turquía	Lago salino	Kempe et al. 1991
Cayo Coco, Cuba	Laguna hipersalina	Bouton et al. 2016
Lago Clifton, Australia	Estuario	Burne et al. 1993
Sharkbay, Australia	Marino	Burns et al. 2004
Laguna Bacalar, México	Laguna agua dulce	Gischler et al. 2008
Cuatro Ciénegas, México	Poza alcalina	Breitbart et al. 2009
Lago Alchichica, México	Lago salino alcalino	Tavera et al. 1996, Couradeu et al. 2011, Centeno et al. 2012, Beltrán et al. 2012, Valdespino-Castillo et al. 2014, Alcántara-Hernández et al. 2017
Cuenca de Santos, Brasil	Marino	Rezende et al. 2015
Lago Sarmiento, Chile	Lago alcalino	Solari et al. 2010
Lago Piramidal, Estados Unidos	Lago salino	Arp et al. 1999
Great Salt Lake, Estados Unidos	Lago salino	Reitner et al. 1997
Lago Cráter Satonda, Indonesia	Lago salino	Arp et al. 2003
Lago Huhejaran, China	Lago salino	Arp et al. 1998
Clinton Creek, Yukon Canadá	Mina de asbesto	Power et al. 2011
Isla Kauai, Hawaii	Cueva marina	Léveillé et al. 2000
Isla Andros, Bahamas	Estuario, Marino	Burne & Moore 1987

### 1.1.3 Las microbialitas del lago cráter Alchichica

El lago cráter de Alchichica es un lago salino alcalino que se encuentra en el Eje Neovolcánico Transversal, en la Cuenca Oriental de Puebla (19° 24' N, 97° 24' O, 2300 m s.n.m) en México (Fig. 4). La columna de agua es alcalina (pH 8.7-9.2) y salina (conductividad eléctrica 13 dS m<sup>-1</sup>). Los aniones dominantes son los cloruros y bicarbonatos; mientras que los cationes dominantes son el sodio y magnesio, sobre potasio y calcio (Alcocer & Lugo 2003, Armienta et al. 2008, Can 2011, Mancilla 2012). Debido a las microbialitas que contiene, este sistema lacustre ha sido de gran interés para diferentes estudios hidrológicos, geológicos y de ecología microbiana (Tavera et al. 1998, Falcón et al. 2002, Couradeau et al. 2011, Kaźmierczak et al. 2011, Beltrán et al. 2012, Centeno et al. 2012, Valespino-Castillo et al. 2014, Alcántara-Hernández et al. 2017, Valespino-Castillo et al. 2018) (Fig. 5).

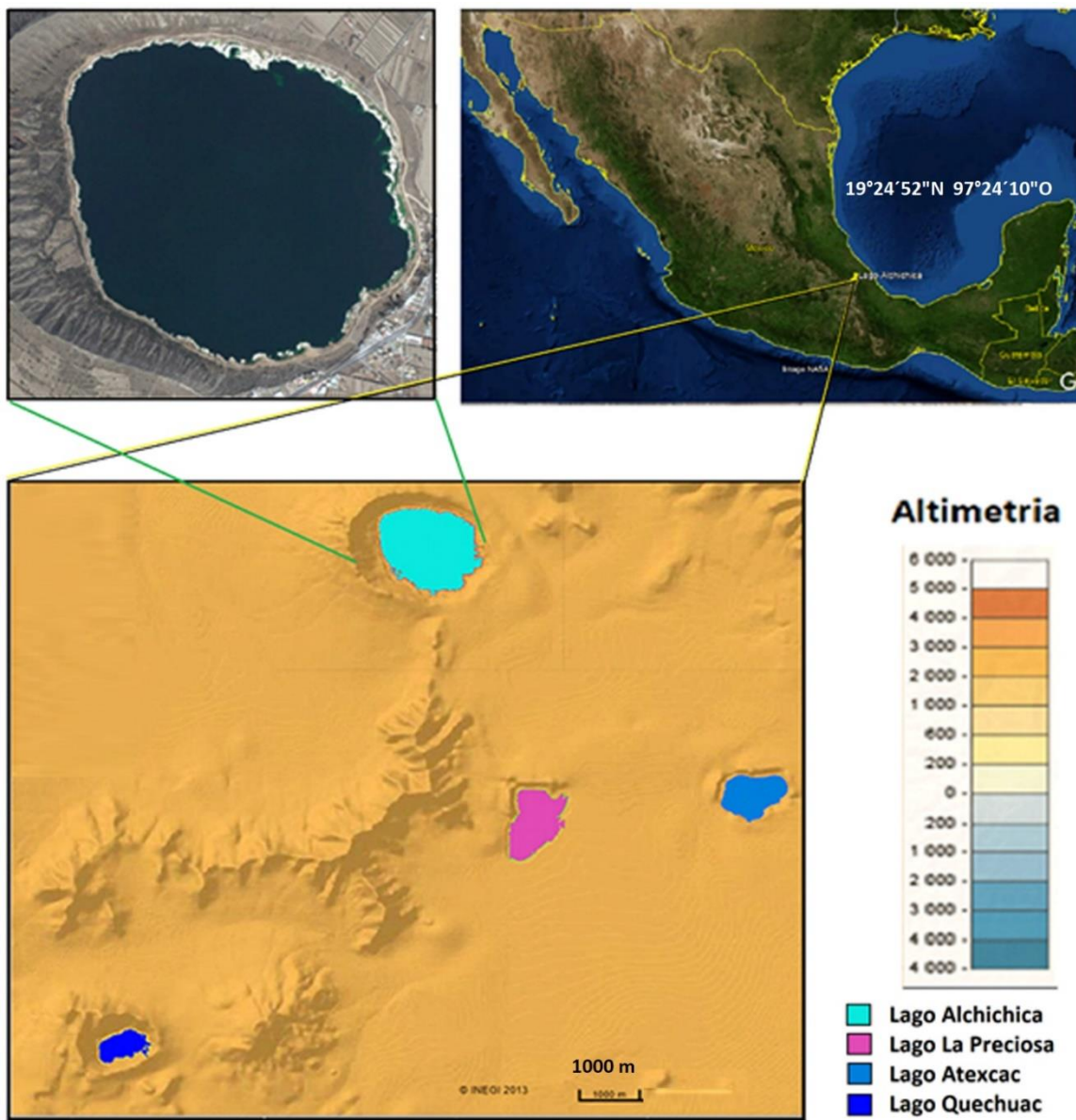
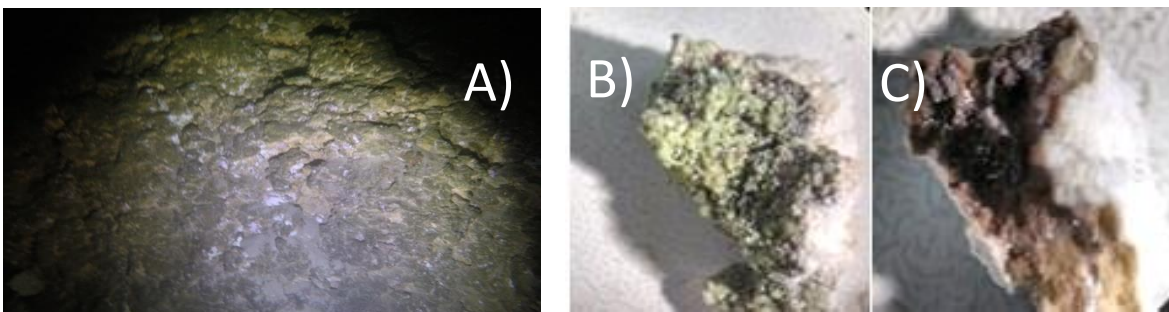


Figura 4. Ubicación del Lago cráter Alchichica (Imagen NASA Google Earth v 7.3.1, INEGI.org).



**Figura 5.** Paisaje del lago cráter Alchichica, octubre 2016. Se observan microbialitas columnares en el fondo saliendo del lago y microbialitas esponjosas en primer plano.

Estudios han descrito que existen dos generaciones morfológicas de microbialitas en el lago. Por un lado, existen domos o columnas ricas en aragonita y una mezcla de magnesio y calcita, datando de 1100 años antes del presente (AP). Por otro lado, existen microbialitas con morfología esponjosa ricas en hidromagnesita, huntita y calcita datadas en 2800 años AP (Fig. 6) (Kaźmierczak et al. 2011). Se cree que la diferencia en el tipo de morfología y composición mineral es resultado de diferentes periodos que sufrió el lago, en donde las microbialitas esponjosas se relacionan con un periodo de sequía y las microbialitas columnares se relacionan a un gran flujo de agua subterránea que diluyó la concentración de Mg/Ca, formándose aragonita en lugar de hidromagnesita (Kaźmierczak et al. 2011). Varios trabajos han descrito la biodiversidad en las microbialitas en una distribución vertical de profundidad. También se ha documentado una gran diversidad procarionte, en especial de proteobacterias y cianobacterias en el lago (Tavera et al. 1998, Couradeau et al. 2011, Kaźmierczak et al. 2011, Centeno et al. 2012). Se ha observado que existe una distribución diferencial de las comunidades microbianas, en un gradiente de profundidad de 0 a 14 metros. Estos cambios en función de la profundidad también están asociados a una pigmentación cambiante de las microbialitas (Couradeau et al. 2011) (Fig. 6).



**Figura 6.** Microbialitas de profundidad en el lago Alchichica. A) Microbialita a 30 m en el sitio. Cambio de coloración en función de la profundidad. B) 3 metros de profundidad. C) 20 metros de profundidad.



## 1.2 Cianobacterias y su relevancia en la formación de microbialitas

### 1.2.1 Generalidades y clasificación taxonómica

Las cianobacterias son un filo del dominio Bacteria. Son los únicos procariontes que llevan a cabo la fotosíntesis oxigénica. Sus células superan a la mayoría de las otras bacterias en tamaño, siendo desde 0.5 micrómetros ( $\mu\text{m}$ ) a 40  $\mu\text{m}$  de diámetro (Rippka et al. 1979). Su envoltura se caracteriza por tener una pared de mureína o peptidoglicano y una envoltura de exopolisacáridos como mucilago (Hoiczky & Hansel 2000). Las cianobacterias fueron responsables de cambiar la atmósfera terrestre durante el Arqueano, de un estado reductor a un estado oxidante, en el llamado Gran Evento Oxidativo (Schirmer et al. 2013). En la actualidad, las cianobacterias son uno de los productores primarios más importantes de sistemas marinos y lacustres, aunque también se les encuentra en sistemas terrestres como suelos, desiertos y cuevas (Büdel 2011).

La clasificación de cianobacterias aún es un tema en discusión, pero pueden dividirse en 8 órdenes: 1) Oscillatoriales, 2) Nostocales, 3) Gloeobacterales, 4) Chroococcales, 5) Pleurocapsales, 6) Chroococciopsidales, 7) Synechococcales y 8) Spirulinales (Fig. 7) (Komárek et al. 2014). Según su morfología celular pueden clasificarse en cocales y filamentosas, pueden crecer en colonias o ser unicelulares, dividiéndose por fisión binaria o fisión múltiple, con planos de división o sin planos definidos. Dentro de las cianobacterias filamentosas pueden presentarse células especializadas como acinetos, heterocistos; así como pueden presentarse ramificaciones falsas o verdaderas. Existen estructuras reproductoras características de orden como necridios, beocitos y hormogonios (Rippka et al. 1979, Komárek 1992).

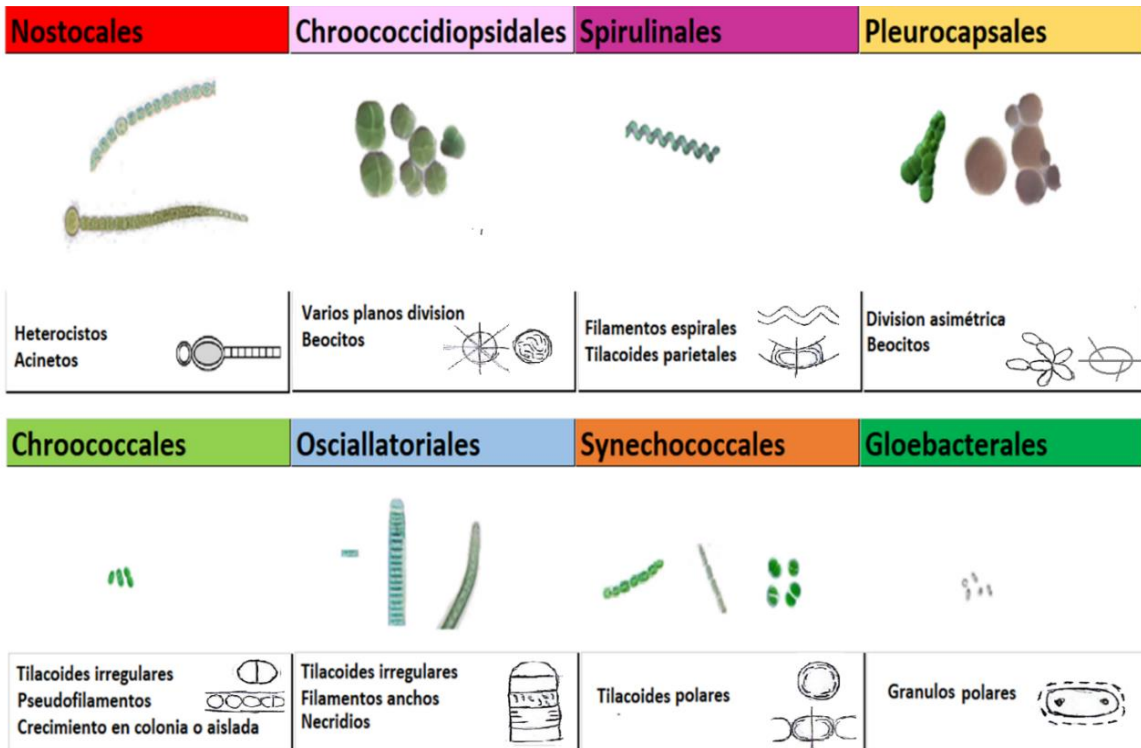


Figura 7. Órdenes de cianobacterias y sus principales características estructurales (Modificado de Komárek et al. 2014; fotos: algaebase.org).

### **1.2.2 Importancia de las cianobacterias en la formación de estructuras organosedimentarias**

Trabajos previos han demostrado que la fotosíntesis, principalmente asociada a cianobacterias, es uno de los metabolismos más relevantes involucrados en la precipitación mineral de las microbialitas. La fotosíntesis conduce al balance de alcalinidad hacia la precipitación de carbonatos, consume bicarbonatos y aumenta el pH localmente (Dupraz et al. 2009).

También se ha descrito que las sustancias poliméricas extracelulares o EPS (por sus siglas en inglés, *Extracellular Polymeric Substances*) producidas por las cianobacterias, secuestran cationes de calcio y magnesio, favoreciendo la acreción de carbonatos (Baumgartner et al. 2006, Braissant et al. 2007). Las sustancias poliméricas extracelulares son principalmente polímeros de carbohidratos que tienen la función de envolver a las bacterias y protegerlas del medio con condiciones ambientales adversas, así como conferir adhesión a sustratos.

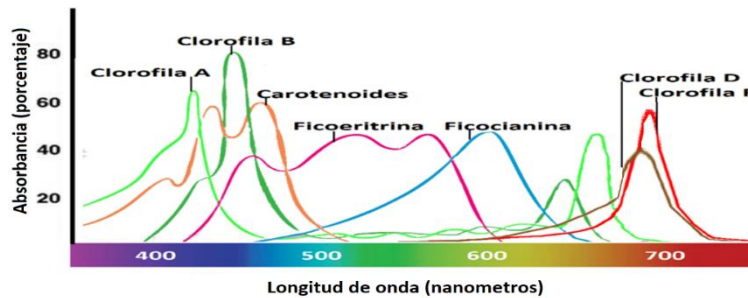
El EPS sirve también como soporte a otros microorganismos, como bacterias heterotróficas, que en asociación con los organismos fotosintéticos autotróficos, pueden incrementar sus tasas de crecimiento y materia orgánica particulada (POM, por sus siglas en inglés) (Brocke et al. 2015). A la vez, la liberación de EPS y mucilago en biopelículas puede servir para excluir competitivamente a otras bacterias, envolviéndolas para evitar que tengan acceso a nutrientes, ya que se ha observado que existe un intercambio o *trade off* entre la producción de EPS y la capacidad de dispersión de bacterias en biopelículas (Nadell et al. 2008). Se considera que esta capacidad de adhesión y producción de EPS es uno de los mayores factores involucrados en la acreción mineral. Se ha demostrado que Chroococcales junto con las Pleurocapsales son uno de los órdenes que producen mayor cantidad de EPS (Pannard et al. 2016).

### **1.2.3 Adaptaciones diferenciales a la intensidad de luz y fotosíntesis**

Se sabe que las cianobacterias sintetizan diferentes clorofilas y foto pigmentos como ficocianinas y ficoeritrinas para absorber diferentes longitudes de onda, y poder llevar a cabo la fotosíntesis. Las principales clorofilas en cianobacterias son las clorofilas *a* y *b*; sin embargo, también se han descrito clorofila *d* en cianobacterias Synechococcales de diversos sistemas marinos (Behrendt et al. 2011) (Fig. 8). Así como clorofila *f* descrita en el orden Chroococcales en estromatolitos de Shark Bay Australia (Chen et al. 2012) que absorben en el espectro infrarrojo (Trampe & Kühl 2016). Las foto adaptaciones a la intensidad y longitud de onda del espectro, así como el tipo de clorofila y la cantidad que producen los organismos fotótrofos, está directamente relacionada al hábitad y nicho del organismo (Kühl et al. 2005).

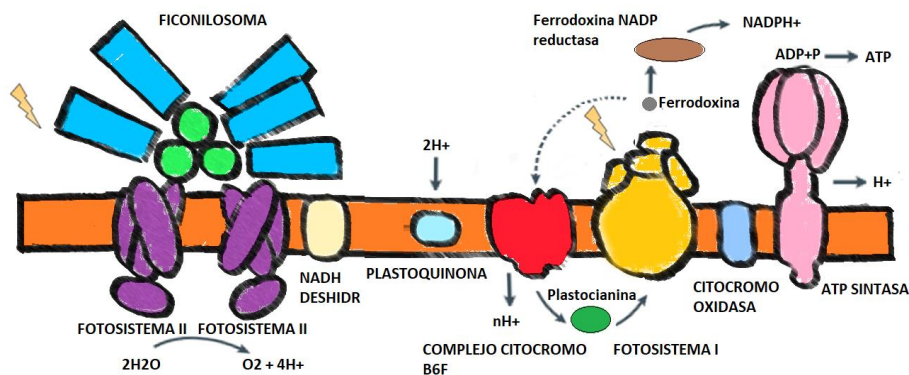
En el lago Alchichica por ejemplo, se ha observado una coloración cambiante en las microbialitas con relación a la profundidad del lago. Las microbialitas de superficie muestran coloraciones verdes mientras que las de profundidad muestran pigmentos rojos, púrpuras y marrones (Couradeau et al. 2011, Kaźmierczak et al. 2011). Al analizar por microscopía y técnicas moleculares se ha reportado que cianobacterias pertenecientes al orden Oscillatoriales dominan zonas de superficie, mientras que Pleurocapsales dominan zonas profundas.

Otros estudios de microbialitas en lagos hipersalinos muestran resultados similares con una gran diversidad del orden Synechococales distribuida en todas las profundidades, mientras que en superficie se encuentran mayormente cianobacterias filamentosas como Oscillatoriales y Nostocales. En lagos profundos (más de 30 m) pueden encontrarse microbialitas dominadas por Chroococales o Pleurocapsales en el fondo, como el Lago Van en Turquía (Russell et al. 2014), el lago Clifton en Australia (Burne et al. 2014), el lago Pavilion (Lopéz-García et al. 2005), entre otros. En resumen, existe una relación taxonómica de cianobacterias con el tipo y calidad de luz disponible para las microbialitas debido a su capacidad foto adaptativa.



**Figura 8.** Absorbancias de diferentes clorofilas y fotopigmentos (basado en Chen & Blankenship 2011).

La fotosíntesis oxigénica transforma la materia inorgánica ( $\text{CO}_2$  y  $\text{HCO}_3^-$ ) en materia orgánica gracias a la energía de la luz. La reacción inicia en el fotosistema II, donde la energía de los fotones es absorbida por las clorofilas y fotopigmentos, que pasan la energía por resonancia a un centro de reacción. Con la energía transportada se puede dividir una molécula de agua  $\text{H}_2\text{O}$ , liberando oxígeno ( $\text{O}_2$ ) en el proceso y quedándose con 2 hidrógenos ( $\text{H}^+$ ). Estos últimos pueden servir para obtener poder reductor en forma de NADPH en el lumen de la membrana del tilacoide y/o para transportarlos mediante una cadena de electrones y complejos proteicos de quinonas y citocromos para generar un gradiente de protones que es usado por la ATP sintasa para obtener ATP. Tanto el poder reductor en forma de NADPH y la energía en forma de ATP será usada después para la fijación de carbono o en el anabolismo de hidratos de carbono, que posteriormente, podrán ser convertidos en otros azúcares mediante respiración celular según requiera la célula (Vermaas 2001) (Fig. 9).



**Figura 9.** Diagrama de la fotosíntesis en cianobacterias. Modificado de Yang et al. (2016). Fotosistema II (PDB 2AXT), ferredoxin-NADP reductasa (PDB 1EWY), ferredoxina (PDB 4FXC), ferredoxin NADP reductasa (PDB 2BSA), fotosistema I (PDB 2WSC), ferredoxina (PDB IGR1), plastocianina (PDB 1BYO), F-ATPasa (Loll et al. 2005).

## 1.3 Técnicas para identificación de cianobacterias

### 1.3.1 Observaciones por microscopía

Debido a su tamaño de entre 0.5 a 80 micras, una de las técnicas más ampliamente usadas para la identificación de cianobacterias es la microscopía óptica. Asimismo, la microscopía electrónica de barrido (*scanning electron microscopy* SEM) o de transmisión electrónica (*transmission electron microscopy* TEM) ayudan a obtener detalles de estructuras como tilacoides, vainas y membranas. Algunas técnicas de microscopía óptica pueden acoplarse a técnicas de infrarrojo o microscopía confocal láser de barrido (*confocal laser scanning microscopy*, CLSM) para excitar clorofilas y fotopigmentos y así, discernir a las cianobacterias de otras bacterias en muestras ambientales (Hernández et al. 2004) (Tabla 2).

La morfología y morfometría pueden usarse para clasificar cianobacterias a nivel de género (Rogers & Kadner 2018). Sin embargo, se sabe que las cianobacterias son capaces de sufrir rápidas e importantes adaptaciones morfológicas, por lo que la recomendación universal es complementar estas técnicas con caracterizaciones moleculares y de cultivo (Komáreck 2006, Larsson et al. 2011).

**Tabla 2. Tipos de microscopía.**

Principio	Técnica	Referencia
<b>Microscopía Óptica</b>	De campo brillante	Zenhausern et al. 1994
	De campo oscuro	Pluta & Maksymilian 1988
	Contraste de fases	Snigirev et al. 1995
	Contraste de interferencia diferencial	Hoffman & Gross 1970
	Fluorescencia	Leung & Chou 2011
	Confocal, Láser	Webb 1996
	De dos fotones	Denk et al. 1990
<b>Microscopía Electrónica</b>	De transmisión	Williams & Carter 1996
	De barrido	Unakar et al. 1981
	Digital	Danino et al. 2001
	Efecto túnel	Binnig et al. 1982

### 1.3.2 Aislamiento de cultivos

El aislamiento en microbiología ha sido una técnica crucial para caracterizar microorganismos, el cultivo de un microorganismo se usa para realizar diferentes pruebas morfológicas, bioquímicas, fisiológicas y moleculares. Sin embargo, se estima que sólo 1% de las especies de bacterias pueden ser cultivadas por medios tradicionales (Vartoukian et al. 2010). Una de las mayores dificultades para aislar cianobacterias, es que muchos géneros descritos pueden encontrarse en estados viables no cultivables, además de que sus tiempos de duplicación son largos pudiendo ser de horas hasta

días (Chen et al. 2012, Møller et al. 2014). Así mismo, el aislamiento se complica más cuando se trabajan con muestras ambientales, donde el inóculo inicial está formado por una comunidad diversa, y que por condiciones diferenciales del cultivo los organismos empiezan a excluirse competitivamente unos a otros (Palinska & Krumbein 1998, Stuart et al. 2015).

En el caso de cianobacterias, factores importantes a considerar para cultivos son: luz, temperatura, salinidad, pH y nutrientes. Los medios comúnmente usados son BG11, BG11o, BG11o-PGY, ASN-III agar Difco-bacto, medio MLA, medio Zarrouk (Bolch & Blackburn 1996). Debido a que cada medio de cultivo puede favorecer en cianobacterias cambios fenotípicos y genotípicos, debe darse un seguimiento continuo en microscopía o técnicas moleculares a los cultivos para evidenciar cualquier adaptación o cambio que sufran en el proceso de aislamiento y no confundir posibles contaminaciones con plasticidad fenotípica (Acreman et al. 1994).

### **1.3.3 Técnicas moleculares para identificación de cianobacterias**

Existen diferentes técnicas moleculares para identificar cianobacterias, pueden dividirse en tres aproximaciones:

1) La primera aproximación se basa en un ensayo de ausencia/presencia, en donde se busca amplificar por la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) un biomarcador específico. Esta técnica es útil para identificar pico cianobacterias difíciles de observar por microscopía. Pueden usarse como biomarcadores genes de ciano-toxinas (Yen et al. 2012), genes *nif* involucrados en la fijación de nitrógeno (Gaby & Buckley 2014) y otros genes asociados a fotosíntesis (Summons et al. 1999). Si bien, estas técnicas no tienen una gran profundidad taxonómica descriptiva; es decir, no discernen filogenéticamente los tipos de cianobacterias, sí aportan información cuantitativa relativa, dando información de la abundancia que hay del marcador en lugares específicos. Esta herramienta es muy útil para comparar sitios, tratamientos diferenciales o expresión diferencial de genes asociados a grupos específicos de cianobacterias (Savichtcheva et al. 2011).

2) La segunda aproximación se basa en una comparación de diferencias genéticas entre organismos, en regiones específicas del genoma o fragmentos del mismo, se pueden identificar por ejemplo patrones de bandeo al tratar enzimáticamente el genoma de diferentes organismos (cada especie puede presentar un patrón específico o huella genética) (Rasmussen et al. 1998). También pueden compararse presencia o ausencia de secuencias específicas en un ensayo de hibridación al ADN conocido como Chips de microarreglos (Rantala et al. 2008). Estas técnicas sirven para caracterizar y discernir finamente organismos que son muy parecidos, por ejemplo, entre géneros o variedades de cianobacterias, por lo que se requiere trabajar con cultivos monocianobacteriales (Bodrossy & Sessitsch 2004).

3) La tercera aproximación se basa en la secuenciación de los ácidos desoxirribonucleicos (ADN), ya sea del genoma completo o regiones específicas del mismo (Shah et al. 2011). Estas técnicas de secuenciación son las más utilizadas para describir nuevos géneros y especies de cianobacterias. Actualmente existen diferentes plataformas de secuenciación y pueden dividirse en 3 grandes grupos: secuenciación de primera generación, de segunda generación o de secuenciación masiva y de tercera generación (Heather & Chain 2016). Cuando las técnicas de secuenciación se utilizan para caracterizar muestras ambientales se les conoce como metagenómica (Petrosino et al. 2009).



En la secuenciación de primera generación, se infiere el orden de cada base al realizar reacciones de síntesis de ADN y terminaras a diferentes tiempos, con bases terminadoras marcadas radio o fluorométricamente, que después al correr en un gel de electroforesis o capilar podrán visualizarse en orden de tamaño (Sanger & Coulson 1978, Klindwort et al. 2013). Pueden secuenciarse regiones pre amplificadas de un genoma o genomas cortos, de entre 500 a 1000 pares de bases (pb). A este límite en pb se le conoce como longitud de lectura o *read* y será establecido por la plataforma de secuenciación (Wommack et al. 2008). Una de las más grandes ventajas que presenta la secuenciación clásica es la de calidad y precisión de los *reads*, ya que cada secuencia se trabaja individualmente (Schuster. 2007). Estas técnicas de secuenciación se utilizan cuando cepas de cianobacterias están aisladas, mediante PCR de las regiones hiper-variables de la subunidad 16 ribosomal (16S rRNA), que sirven para clasificar taxonómicamente grupos bacterianos. Gracias a que existen cebadores o *primers* específicos para la amplificación de regiones 16S rRNA de cianobacterias (Neiland 1995, Nubel 1997) se puede discriminar de otros grupos bacterianos. Se ha establecido la región hipervariable V4 como un sitio deseable para análisis taxonómicos en cianobacterias (Fig. 10) (Komáreck 2014, Yang et al. 2016). Aunque, debido a que el genoma de cianobacterias es altamente variable en tiempos generacionales cortos (reflejo de sus rasgos adaptativos y de desarrollo), muchas veces un sólo análisis de la secuencia 16S ribosomal no es suficiente y se recomienda comparar otros clúster de genes simultáneamente (Larsson et al. 2011, Shih et al. 2013).

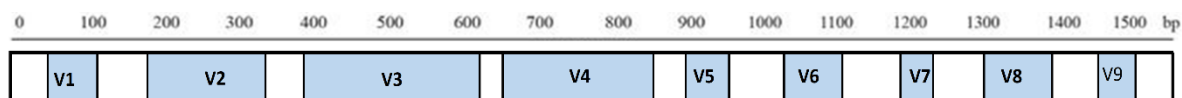
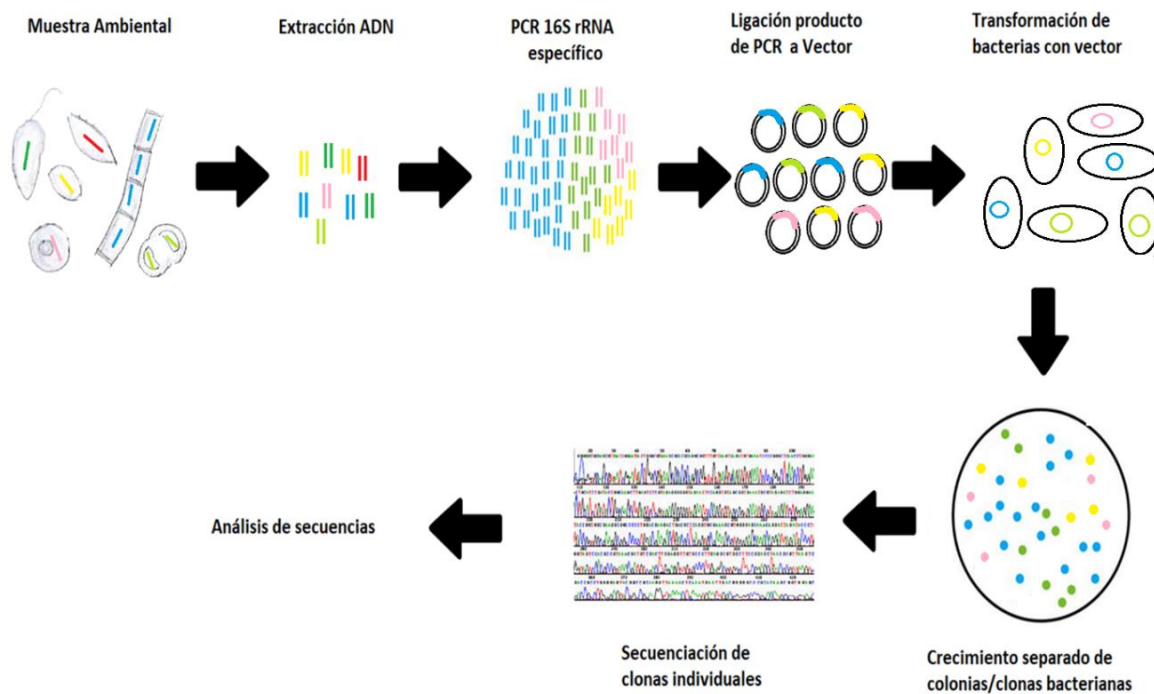


Figura 10. Regiones hiper variables del 16S rRNA procarionte (Modificado de Singer et al. 2016).

También se han desarrollado derivaciones de métodos para trabajar metagenomas con secuenciación de primera generación, como la librería de clonas, que permite separar diferentes secuencias en diferentes clonas para secuenciarse independientemente. La librería se basa en insertar por transformación fragmentos pre-amplificados, por ejemplo, regiones del 16S de cianobacterias en células competentes -generalmente en *Escherichia coli*-. Esta técnica toma el supuesto de que cada colonia transformada, viene de una clona que contiene una secuencia 16S rRNA diferente. Al secuenciar independientemente las colonias se obtendrá un conjunto de secuencias que representan la diversidad parcial de la muestra de estudio (Fig. 11).

Esta técnica permite mayor resolución cuando se acopla a secuenciación de primera generación, aunque su información de abundancias es pobre (Kawata et al. 1998, Heijs et al. 2007, Quail et al. 2012). Las librerías de clonas de meta genomas siguen siendo un recurso importante en trabajos de diversidad y función genética de grupos específicos mega diversos, como es el caso de las cianobacterias (Wommack et al. 2008).



**Figura 11.** Metodología general para la construcción de librería de clones (basado en Ackermans et al. 1995).

Por otra parte, la secuenciación de segunda generación o secuenciación masiva, se basa en medir en tiempo real metabolitos secundarios durante la síntesis de ADN, como el pirofosfato acoplado a una reacción con luciferasa (Pirosecuenciación 454), terminadores reversibles marcados (Illumina HiSeq y MiSeq), cambios de pH (Ion Proton) o mediante ADN ligasas (SOLiD). El ADN a secuenciar se fija en una base sólida o emulsión aceitosa para crear librerías y poder identificar los productos de la síntesis o ligación. La ventaja de estas técnicas es que pueden procesarse paralelamente cientos de pequeños fragmentos de ADN de entre 100 a 700 pb, según la plataforma, reduciendo los tiempos de secuenciación y costos de reactivos (Quince et al. 2017).

Las secuencias o *reads* pueden ensamblarse posteriormente por un análisis computacional, lo que a veces puede dificultar la identificación de secuencias únicas por sub-representación, o generar quimeras de ADN (Wommack et al. 2008), por esta razón la metagenómica total se limita a ensamblajes de genomas de novo o a información metabólica/funcional de grupos generales de organismos (Shih et al. 2013). A pesar de estos problemas, las diferentes plataformas Next-gen cada vez mejoran en costo y calidad de secuencias (Alvarenga et al. 2017) (Tabla 3).

Para una aproximación taxonómica procarionte de mayor cobertura existe la metagenómica dirigida, en donde se secuencian solamente las regiones del 16S rRNA seleccionados mediante una pre-amplificación con PCR (Cuvelier et al. 2010, Caporaso et al. 2012). Esta técnica da información tanto de diversidad taxonómica como de abundancias relativas (Wang et al. 2009).

Gracias a la metagenómica dirigida se ha podido describir una enorme diversidad procarionte en diversos ecosistemas. Se discute que, aunque la metagenómica dirigida es una herramienta muy poderosa para caracterización taxonómica de muestras ambientales, éstas se deben contrastar con técnicas de secuenciación de primera generación, que permitan corroborar las secuencias identificadas y evitar la sobre o sub representación de datos genómicos (Shah et al. 2011).

Las tecnologías de 3ra generación se basan en la secuenciación de una sola cadena en tiempo real con *reads* desde 3000 a 15000 pb, por lo que se utilizan en paralelo con NGS para funcionar como andamios en el ensamble de genomas *de Novo*, aunque sus plataformas todavía tienen un porcentaje de error y precio alto, estas tecnologías aún siguen en desarrollo, por lo que se espera su constante mejora (Heather & Chain 2016).

**Tabla 3. Plataformas de secuenciación.**

Generación	Plataforma	Principio químico	Tamaño de las secuencias (pb)	Tiempo	Ventaja
1ra	Sanger	Terminación de la cadena	300-1000	1-2 días	<i>Reads</i> alta calidad
2da	454 Roche GS	Piro secuenciación	500-700	8-23 hr	<i>Reads</i> largos
2da	Illumina MiSeq y HiSeq	Terminadores marcados	100-400	2 días	Bajo costo
2da	SOLiD	Ligación	0-85	8 días	<i>Reads</i> alta calidad
2da	Ion Proton	Detección pH	100-200	2 hr	Rápido
3ra	Pac Bio	Detección tiempo real	3000-15000	20 min	<i>Reads</i> largos

Cabe aclarar que el mayor problema que existe en los análisis moleculares de secuenciación se presenta por la calidad y cantidad del ADN extraído. Ya que dependiendo del medio donde se extrae, el ADN puede contener diferentes sales y metales que interfieran en el proceso de amplificación o secuenciación (Goldberg et al. 2016). Para cianobacterias se sabe en especial que los órdenes Chroococcales, Pleurocapsales y Nostocales son difíciles para extraer DNA por sus gruesas paredes celulares y su abundante EPS (Pannard et al. 2016), lo que muchas veces puede sesgar las abundancias de comunidades cianobacterianas (Luna et al. 2006).

## **2 PLANTEAMIENTO Y JUSTIFICACIÓN DEL PROBLEMA**

Las cianobacterias son microorganismos importantes en la acreción y precipitación de minerales carbonatados, como aragonita, hidromagnesita, entre otros. También se sabe que existe una estrecha interacción entre estos organismos fotótrofos y la formación de microbialitas.

Aunque trabajos previos sobre microbialitas del lago Alchichica aportan un panorama general de la descripción de la diversidad de procariontes y cianobacterias (Tavera & Komárek. 1996, Couradeau et al. 2011, Kaźmierczak et al. 2011, Centeno et al. 2012, Valdespino-Castillo et al. 2018), se necesita un conocimiento más detallado de las cianobacterias en microbialitas a profundidades mayores de 14 metros. Por tanto, el interés de este trabajo radica en dar continuidad en la identificación de la biodiversidad de cianobacterias desde superficie hasta 30 m de profundidad, identificando finamente por microscopía y comparando con diferentes métodos moleculares, para caracterizar cianobacterias en las diferentes profundidades que pueden estar favoreciendo la precipitación mineral en las microbialitas del lago cráter de Alchichica.

## **3 HIPÓTESIS DE TRABAJO**

La diversidad de las cianobacterias a nivel género será mayor en microbialitas someras, y será menor al aumentar la profundidad, ya que existirán más cianobacterias adaptadas a vivir a mayor intensidad de luz.

## **4 OBJETIVOS**

### **4.1 Objetivo General**

Describir y caracterizar las cianobacterias presentes en microbialitas esponjosas del lago cráter Alchichica a lo largo de un gradiente de profundidad (de 3 a 30 m) empleando métodos independientes y dependientes de cultivo.

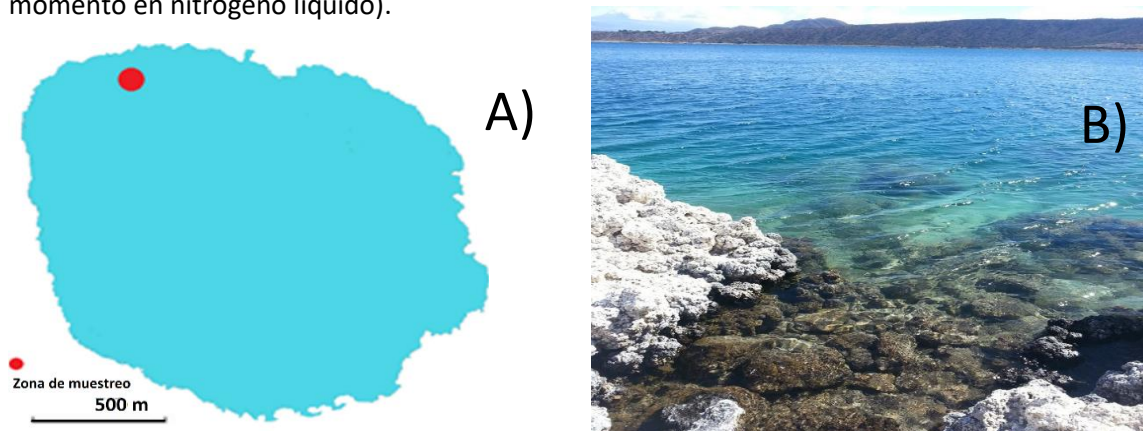
### **4.2 Objetivos Particulares**

- Detectar las cianobacterias presentes en las microbialitas esponjosas del lago a diferentes profundidades por métodos independientes de cultivo (>3 m).
- Obtener cultivos de cianobacterias a partir de muestras >3 m.
- Caracterizar los cultivos de cianobacterias obtenidos por análisis tanto morfológico como molecular (16S rRNA)

## 5 MATERIALES Y MÉTODOS

### 5.1 Colecta de muestras de microbialitas en un gradiente de profundidad

Se colectaron muestras vivas de microbialitas en la zona norte del lago (para un fácil acceso del equipo de buceo) de 4 profundidades: 3, 10, 20 y 30 m en marzo y octubre de 2016 (Fig. 12). Al momento de ser colectadas las muestras se separaron para los diferentes análisis en: i) microscopía (~100 g en frascos con papel secante), ii) establecimiento de cultivos (~100 g en botellas de agua con medio circundante, por duplicado) y 3) extracción de ácidos nucleicos (~5 g congeladas al momento en nitrógeno líquido).



**Figura 12.** Zona de muestro de las profundidades 3, 10, 20 y 30 metros. A) Localización del sitio de muestreo en un gradiente vertical. B) Zona de descenso para el buceo.

### 5.2 Extracción, visualización y cuantificación de ácidos nucleicos.

La extracción de ADN metagenómico se realizó con el Kit DNAeasy PowerSoil (Qiagen), a partir de 250 mg de muestra y siguiendo las especificaciones del fabricante. Para la extracción de DNA genómico a partir de cultivos, se hizo con un pre tratamiento de 3 ciclos de congelamiento por nitrógeno líquido y maceraciones de las células descritas según lo descrito en Palinka et al. (2006). Posteriormente, se extrajo el DNA con el kit UltraClean Microbial DNA Isolation Kit (Mobio, Carlsbad, CA, Estados Unidos). El ADN obtenido se visualizó en geles de agarosa al 1% y fue cuantificado mediante espectrofotometría (Nanodrop ThermoFisher) y fluorometría (Qubit™ dsDNA HS Assay Kit, Thermo Scientific).

### 5.3 Amplificación de fragmentos 16S rRNA

Para identificar las cianobacterias en las muestras de microbialitas por métodos independientes de cultivo, se realizaron reacciones de PCR a partir del ADN metagenómico extraído de cada microbialita a diferentes profundidades (z3, z10, z20 y z30). Para ello se utilizaron primers específicos para cianobacteria: Cya359F y Cya781R (Nübel et al. 1997) (Tabla 4). Las reacciones de PCR se llevaron a cabo en un volumen de 25  $\mu$ l, con 2  $\mu$ l de ADN metagenómico (1-20 ng), 0.2  $\mu$ l Taq DNA Polimerasa (5 U/ $\mu$ l) (Invitrogen), 2.5  $\mu$ l de MgCl<sub>2</sub> (50 mM), 2.5  $\mu$ l de Buffer 10X para Taq Polimerasa (200 mM Tris-HCl pH 8.4, 500 mM KCl), 1  $\mu$ l de cada primer (10  $\mu$ M) y 0.5  $\mu$ l de dNTPs (200 mM).

**Tabla 4. Secuencia de los primers usados amplificar regiones V4 16S rRNA de Cianobacteria (Nübel et al. 1997).**

Nombre	Secuencia (5' – 3')
CYA359Fc	GGG GAA TYT TCC GCA ARG GG
Cya781Re	GAG TAC TGG ATC TAA TCC CAT T

Las condiciones del protocolo de amplificación fueron una desnaturalización inicial a 94°C por 4 min, seguida de 35 ciclos de 1) desnaturalización a 94°C por 30 segundos, 2) alineamiento a 60°C por 30 segundos, y 3) elongación a 72°C por 30 segundos. Con una extensión final de 72°C por 10 min. Las reacciones se realizaron por quintuplicado para cada profundidad y los productos (*ca.* 380 pb) se corrieron en un gel de agarosa 1% con SYBR safe (Invitrogen) y solución amortiguadora TAE al 1X (80 V durante 40 min). Para visualizar el tamaño correcto de los productos se empleó un marcador de tamaño molecular adecuado, una vez identificadas las bandas se escindieron los productos del tamaño requerido para purificarlos mediante el kit QIAquick® Gel Extraction Kit (Qiagen), para posteriormente ser utilizarlos en la construcción de los vectores para la librería de clonas.

Para identificar a las cianobacterias aisladas mediante 16S rRNA se utilizaron los primers CYA359Fc y CYA781R (Nübel et al. 1997). Para ello, se amplificaron por reacciones de PCR en un volumen de reacción de 25 µl, con 2 µl de ADN genómico (1-20 ng) bajo las condiciones de reacción y el protocolo de amplificación anteriormente mencionados. Los amplicones se confirmaron por electroforesis. Se cuantificó su concentración final mediante fluorometría con el kit fluorometría (Qubit™ dsDNA HS Assay Kit, Thermo Scientific). Los amplicones se mandaron a secuenciar directamente a Macrogen (Corea del Sur) y a la Unidad de síntesis y secuenciación de DNA, Instituto de Biotecnología UNAM (IBT-UNAM).

#### 5.4 Librería de clonas

Para determinar las secuencias de cianobacterias del ADN metagenómico en las diferentes muestras (z3, z10, z20 y z30), se construyeron librerías mediante clonación. Para ello, los amplicones purificados (4 µl) se ligaron al vector pCR 2.1 TOPO (Invitrogen) siguiendo las especificaciones del fabricante. Estos vectores circulares se emplearon para transformar células quimio competentes de *Escherichia coli* TOP 10. Para obtener las clonas con inserto, se realizó una selección mediante  $\alpha$ -complementación siguiendo los protocolos reportados por el fabricante. Para ello, las transformantes (150 µl) fueron plaqueadas en cajas Petri con medio LB con ampicilina (100 mg/ml) y X-Gal (40 mg/ml). Las clonas con señal positiva de inserción, fueron seleccionadas, y la región insertada (*i.e.* la región V4 cianobacterial) fue amplificada con los primers M13F:M13R (Tabla 5), siguiendo los protocolos determinados (Invitrogen). Finalmente, los amplicones fueron enviados al servicio de Macrogen (Corea del Sur) y secuenciados con el primer M13F.

**Tabla 5. Primers M13 usados para amplificar insertos del vector.**

Nombre	Secuencia (5' – 3')
M13F	GTA AAA CGA CGG CCA G
M13R	CAG GAA ACA GCT ATG AC

## 5.5 Análisis de secuencias

Para el análisis de comunidades de cianobacterias, las secuencias obtenidas de librería de clonas, se limpiaron, eliminando secuencias con mala calidad en el cromatograma, se eliminaron vectores, las secuencias se alinearon y se colapsaron en OTUs (Unidad Taxonómica Operacional) con un cut-off al 97% mediante el pipeline de Mothur (Schloss et al. 2009).

Cada OTU fue analizado mediante el programa BLAST (Kent. 2002) y mediante una agrupación por similitud se construyó un dendograma en el programa Seaview por el método del vecino más cercano (Neighbor Joining) con el modelo Kimura 2P y un bootstrap de 1000. Las secuencias OTUs de la librería de clonas fueron comparadas mediante BLAST con 1) secuencias tipo de cianobacterias de la base de datos NCBI, 2) secuencias cianobacterias no cultivadas reportadas en la base de datos NCBI, 3) cianobacterias del lago Alchichica previamente reportadas por Couradeau et al. (2011), 4) OTUs de secuenciaciones MiSeq del mismo grupo de trabajo, y 5) secuencias de cultivos aislados

Los análisis filogenéticos de las secuencias se llevaron a cabo usando el programa Mega v.7 (Tamura et al. 2011). Los árboles se construyeron usando algoritmos de Neighbor Joining, Parsimonia y Máxima Verosimilitud. El mejor modelo filogenético para Máxima Verosimilitud se calculó mediante una matriz comparativa.

## 5.6 Establecimiento de cultivos y aislamiento de cianobacterias

En octubre 2016 se colocaron trozos de microbialita viva (de 10 y 20 m de profundidad) en recipientes plásticos (8 x 8 cm) por duplicado, con 300 ml de agua del lago Alchichica, y se dejaron crecer en condiciones de luz natural y temperatura ambiente. Los cultivos se mantuvieron creciendo por dos años, hasta que por evaporación decayeron perdiendo coloración. En estos fragmentos se encontraron organismos heterotróficos, así como larvas de insecto y nemátodos. En febrero 2017 se inoculó otro trozo de microbialita congelada de z=30 se dejó crecer igual en condiciones de temperatura ambiente y luz natural (Fig. 13).



**Figura 13.** Recipientes de plástico de 300 ml con fragmentos de microbialita después de 5 meses de crecimiento en condiciones de luz natural y temperatura ambiente, de izquierda a derecha dos de 10 m de profundidad (z=10), dos 20 m de profundidad (z=20) y uno de 30 m de profundidad (z=30) que se inoculó en marzo 2017.



Consecuentemente, se establecieron otras estrategias para aislar cianobacterias. De las muestras tomadas en fresco en el muestreo, se sembraron fragmentos de microbialita de 2 cm en placas Petri por triplicado por profundidad, enriquecidas con medio sólido Bayfolan, BG11, BG11 (0) y agua filtrada de Alchichica (membranas de 0.2  $\mu\text{m}$ , Millipore). Todas las cajas se dejaron crecer a temperatura ambiente y condiciones de luz natural. Del tapete microbiano que se formó, se separaron colonias por estiramiento y se aislaron por morfología y color durante año y medio, hasta que se obtuvieron cultivos monocianobacteriales. Se resembraron los aislados de cajas Petri en frascos de cultivo con respirador y medio líquido BG11 en condiciones de temperatura ambiente y luz natural.

Independientemente, en matraces de 250 ml con agua de Alchichica (300 ml) se sembraron directamente fragmentos de 2-5 cm de microbialita, se dejaron a temperatura ambiente y luz natural. De los tapetes formados en matraz igualmente se resembraron y aislaron en cajas Petri para su posterior análisis en microscopía y caracterización por técnicas moleculares. Paralelamente se mantuvieron cajas Petri con BG11 en termostato 26°C.

### **5.7 Identificación por microscopía y morfometría**

Para realizar observaciones al microscopio se hicieron preparaciones semipermanentes con una solución fenol (20g/l) y glicerina (20 g/l) con muestras de microbialita secas y tratadas con ácido acético al 5% para separar la fase orgánica de la mineral. Las observaciones se realizaron en un fotomicroscopio Olympus BXX51 con contraste interferencial diferencial DIC, y cámara digital DP 12. Se utilizó el programa Sigma Scan Pro para tomar dimensiones y medidas. Las características de las cepas se analizaron con base a las características morfológicas y morfométricas, i.e. color, ancho y largo de las células, presencia o ausencia de vaina, de mucilago, estructuras reproductivas como necridios, hormogonios o beocitos. La información recabada fue comparada con aquella reportada en Komárek et al. (2014). Estas observaciones se realizaron en el laboratorio de Ficología de la Facultad de Ciencias, UNAM. Por otra parte, se hizo microscopía de los cultivos durante el aislamiento y se monitorearon las colonias cada 15 días con un microscopio Primo Star Zeiss en el laboratorio de Ecología Microbiana en el Instituto de Ecología, UNAM. Posteriormente, los cultivos monocianobacteriales fueron llevados al microscopio Olympus BXX51 para análisis morfométricos.

# Metodología

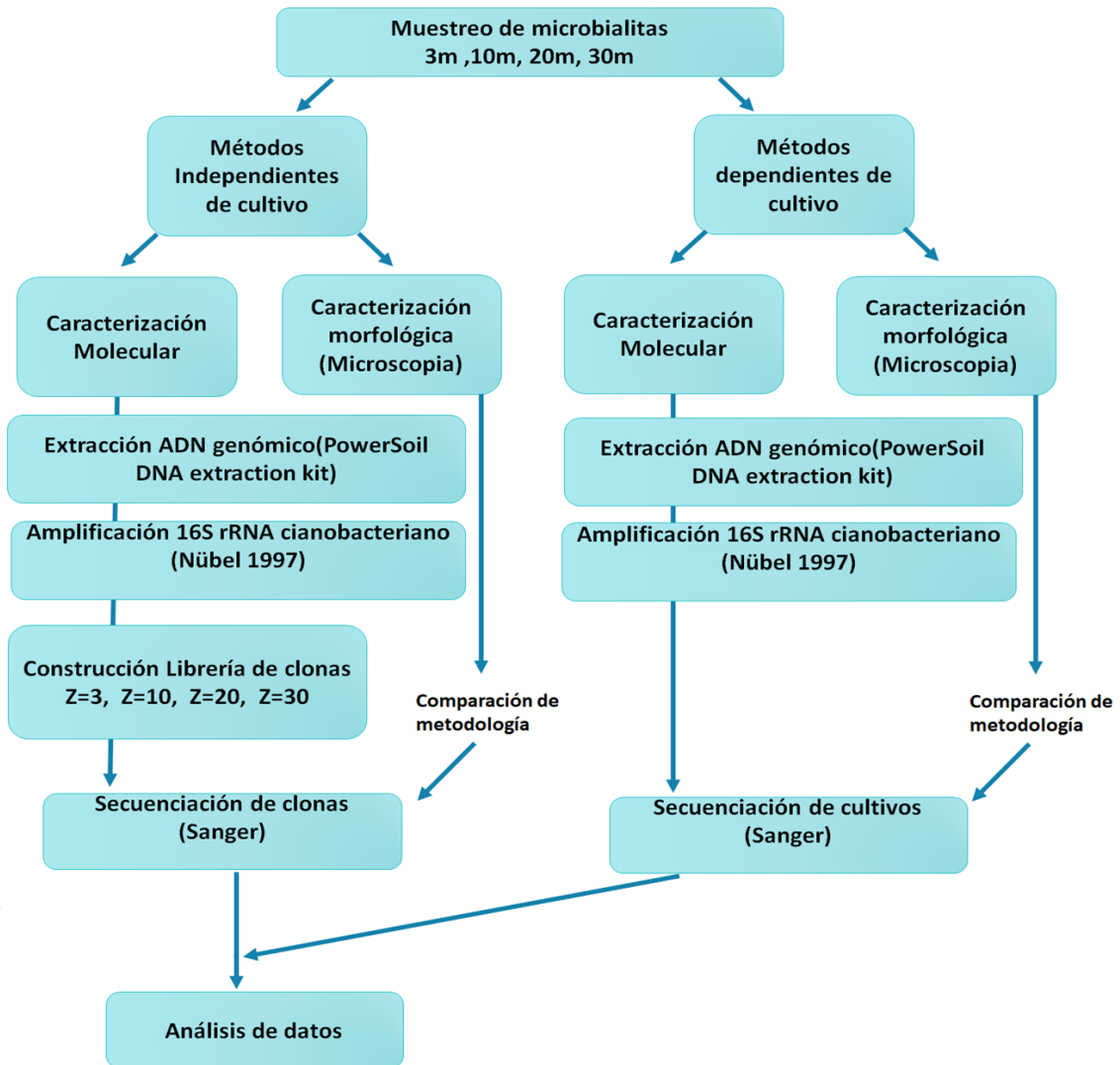


Figura 14. Diagrama de flujo de la metodología empleada en esta investigación.

## 6 RESULTADOS

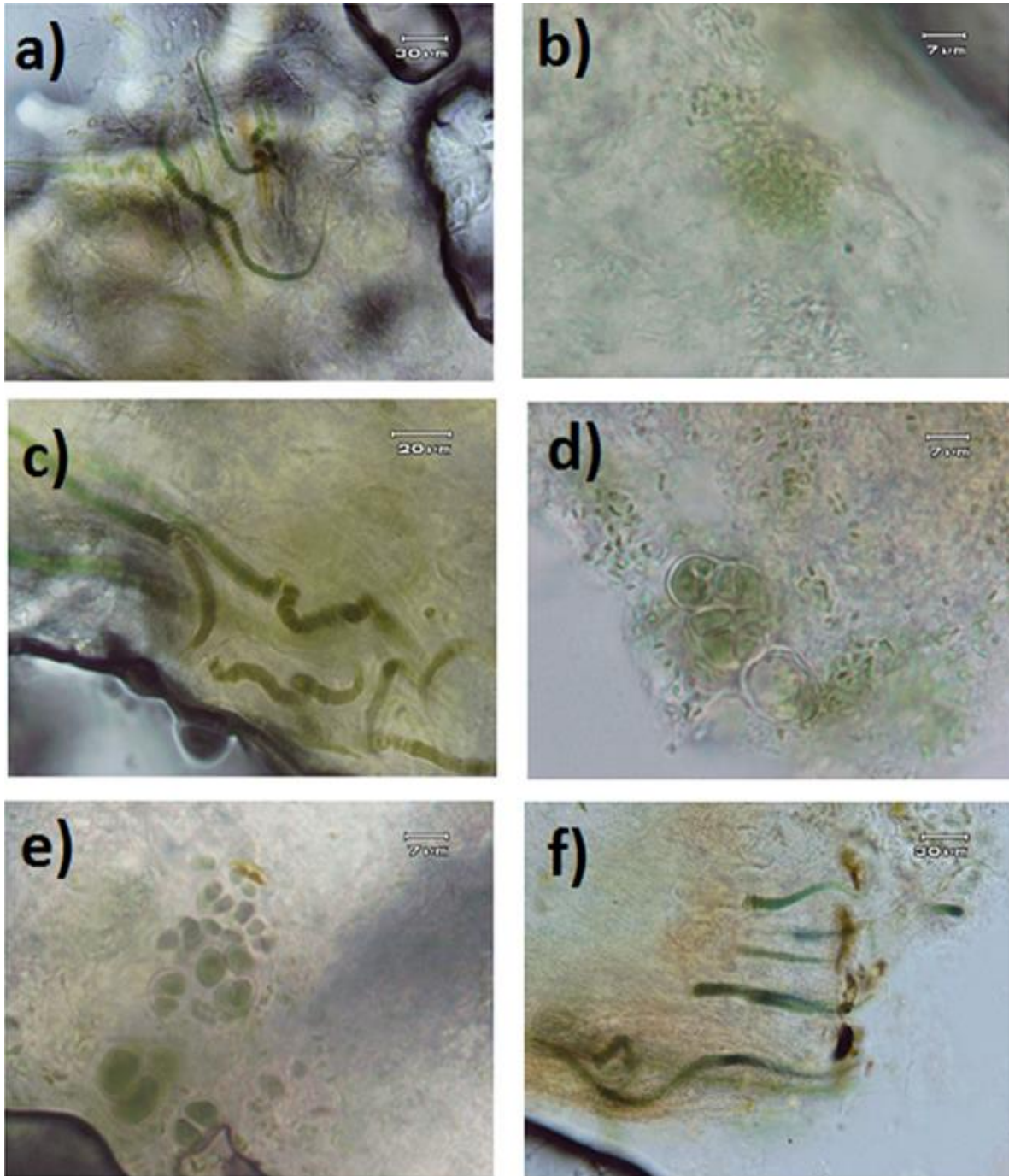
### 6.1 Identificación de cianobacterias en microbialitas por microscopía óptica

En la identificación de las cianobacterias en las microbialitas por microscopía óptica, se realizaron 20 preparaciones fijas por profundidad (80 en total) y otras 30 preparaciones sin fijación (120 en total) para observar la diversidad a través de las diferentes profundidades. Se compararon microbialitas de los dos muestreos (marzo y octubre), pero no se encontró ninguna diferencia significativa en las comunidades cianobacterianas de las profundidades de 10 y 20 m. Sin embargo, se encontró una mayor cantidad de clorofitas, diatomeas y cianobacterias filamentosas en colectas de octubre a 3 metros, patrón que ya se ha estudiado en florecimientos en la columna de agua durante invierno (Alcocer et al. 2008). Las especies identificadas por microscopía, cultivos y secuenciación se describen en la Tabla 7, las observaciones microscópicas obtenidas en las Figuras 15, 16, 17 y 18 y sus datos morfométricos en las Tablas 8 y 9.

**Tabla 6. Cianobacterias identificadas en microbialitas y sus abundancias relativas.**

Especie	Características	Abundancia
		3 10 20 30
<i>Rivularia sp.</i>	Nostocal más abundante en microbialita de 3m de profundidad, forma colonias radiales, heterocistos basales adheridos a detritos, gruesa envoltura de mucilago, tricomas atenuados.	■
<i>Calothrix cf parietina.</i>	Presenta ramas falsas, crecimiento isopolar, coloraciones verdes olivo y pardas, abundante en superficie, tricomas más anchos y menos atenuados que <i>Rivularia sp.</i>	■
<i>Nodosilinea sp.</i>	Filamentos verdes y delgados de 2 micras de ancho, presenta enredamiento y formación de nudos característicos del género. Abundante en 3 y 20 metros.	■ ■
<i>Xenococcus candelarie</i>	Coloración violeta, células amorfas de 1 a 2 micras de diámetro, envueltas en beocitos o forma libre, abundante a 30m de profundidad creciendo sobre detritos, no se encontraron fases epifitas.	■ ■ ■
<i>Chroococcidium gelatinosum</i>	Células cocales amorfas de tamaños diferentes, presente en todas las profundidades, coloraciones verdes, marrones en superficie, violetas en profundidad, división múltiple.	■ ■ ■ ■
<i>Pleurocapsa sp.</i>	Domina zonas de 20 m, presenta coloraciones verdes, negras y marrones, células amorfas envueltas en vaina gruesa, pseudofilamentos, a veces crecimiento radial.	■ ■ ■ ■
<i>Stanieria sp.</i>	Coloración morada-violeta, presenta gran producción de ficoeritrina en cultivo y beocitos grandes de hasta 20 micras de diámetro, siempre en consorcio con <i>Chroococcidium</i> y <i>Pleurocapsa</i> .	■ ■ ■ ■
<i>Chroococciopsis sp.</i>	Pequeñas colonias cocales asimétricas de tamaño regular, presenta coloración marrón-café, abundante en 20 metros y cultivos.	■ ■ ■ ■
<i>Phormidium sp.</i>	Filamentos delgados de 2 micras de largo, necridios rectangulares, tricomas isopolares, hormogonios abundantes en cultivo, solo se detectó en superficie.	■ ■ ■ ■
<i>Chroococcus cf schizodermaticus</i>	Muy rara solo en zonas intermedias 10 y 20 metros de profundidad se obtuvo abundante en cultivos pero no se pudo aislar.	■ ■ ■ ■
<i>Synechococcus sp.</i>	Picocianobacterias en forma de bacilo, alargadas entre 1 y 2 micras de largo muy abundante en secuencias 16S rRNA.	■ ■ ■ ■
<i>Pseudoanabaena sp.</i>	De color roja, filamentos largos de 3 micras y delgados de 1 micra de ancho, forman filamentos trenzados, muy abundantes en cultivos pero apenas detectables en muestras de superficie.	■ ■ ■ ■
<i>Leptolyngbya sp.</i>	Abundante en 3 y 10 metros de profundidad, cianobacteria de mayor biomasa en cultivos, se perciben vainas de filamentos muertos hasta 30 metros de profundidad	■ ■ ■ ■
<i>Oculatella sp.</i>	Filamentos largos y delgados, en cultivo desarrollan punta con ficoeritrina característica.	■ ■ ■ ■
<i>Chlorogloea sp.</i>	Abundante a 3 y 20 metros de profundidad, vaina mucilaginoso gruesa y crecimiento en un plano de división	■ ■ ■ ■
<i>Entophysalis atrata.</i>	Abundante de 3 a 20 metros de profundidad envuelta en vaina de mucilago grueso y transparente, presentan un plano de división y pseudofilamentos, coloraciones rojas verdes y moradas.	■ ■ ■ ■
<i>Cyanobium sp.</i>	Muy rara en microbialita de 3 metros, pero abundante en cultivos, tamaño de 1 a 2 micras de diámetro.	■ ■ ■ ■
<i>Aphanotece sp.</i>	En 3 y 10 metros de profundidad células verdes envueltas en mucilago, crecimiento en colonias envueltas. Debe compararse con <i>Aphanocapsa sp.</i>	■ ■ ■ ■

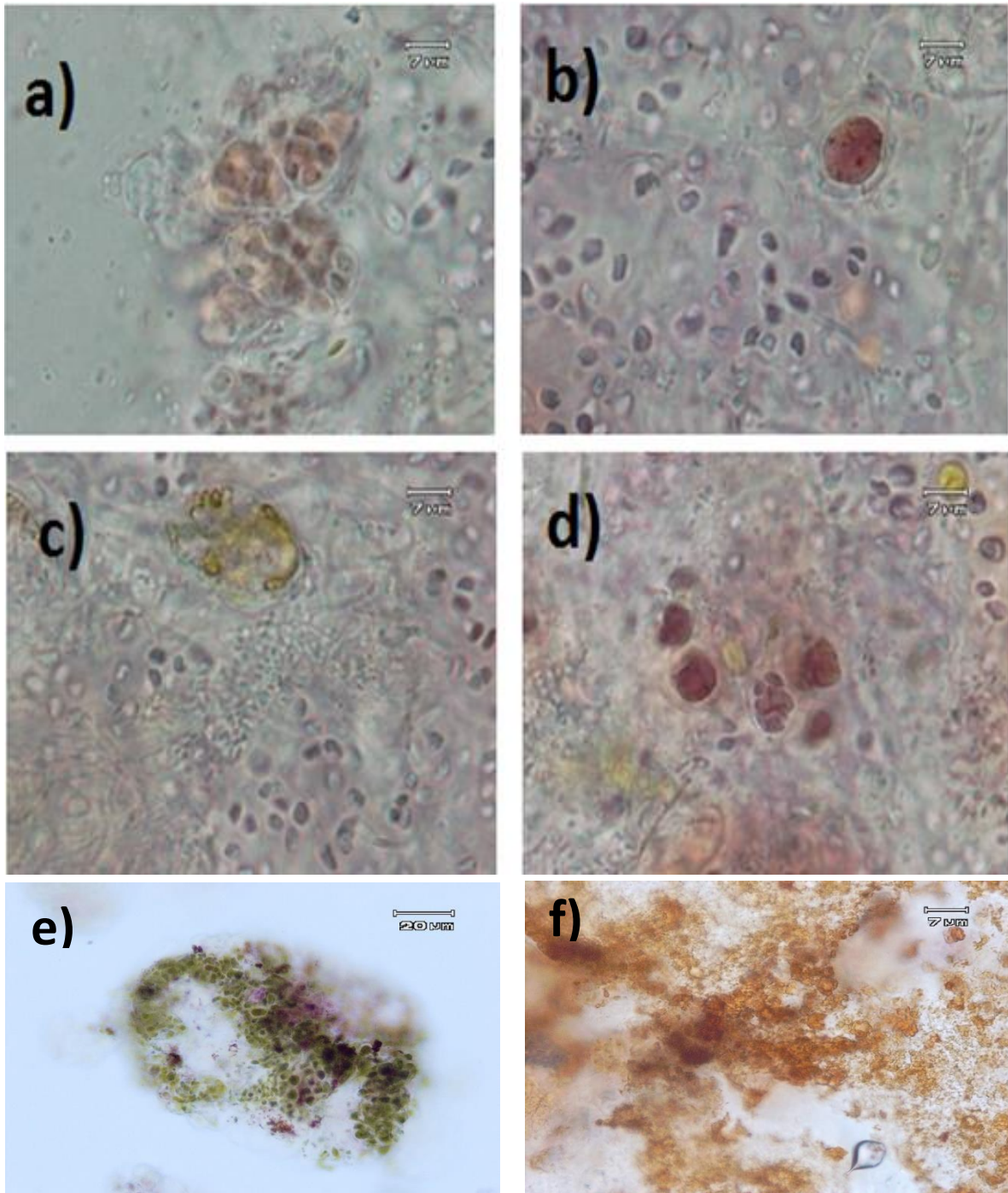
## Cianobacterias detectadas por microscopía en microbialitas a 3 metros de profundidad



**Figura 15.** Microscopía óptica de cianobacterias encontradas en microbialitas a 3 m de profundidad, tratadas con ácido acético al 1% y fijadas con formol. a) Dos tipos de cianobacterias filamentosas que se describieron como *Calothrix cf. parietina* (atrás) y *Rivularia sp.* (delante), por su característica de tricomas atenuados, formar ramas falsas y ser heteropolares. b) *Aphanotece sp.* y atrás posibles filamentos de *Leptolyngbya sp.*, *Nodosilinea sp.* u *Oculatella sp.* c) Ramas falsas características de *Calothrix cf. parietina* d) Células hijas de *Chroococcidium gelatinosum* y picocianobacterias posibles *Cyanobium sp.* o *Synechococcus sp.* e) Fases de división de *Chroococcidium gelatinosum*. f) *Rivularia sp.* es la cianobacteria Nostocal más abundante en 3 m como ya se ha reportado.

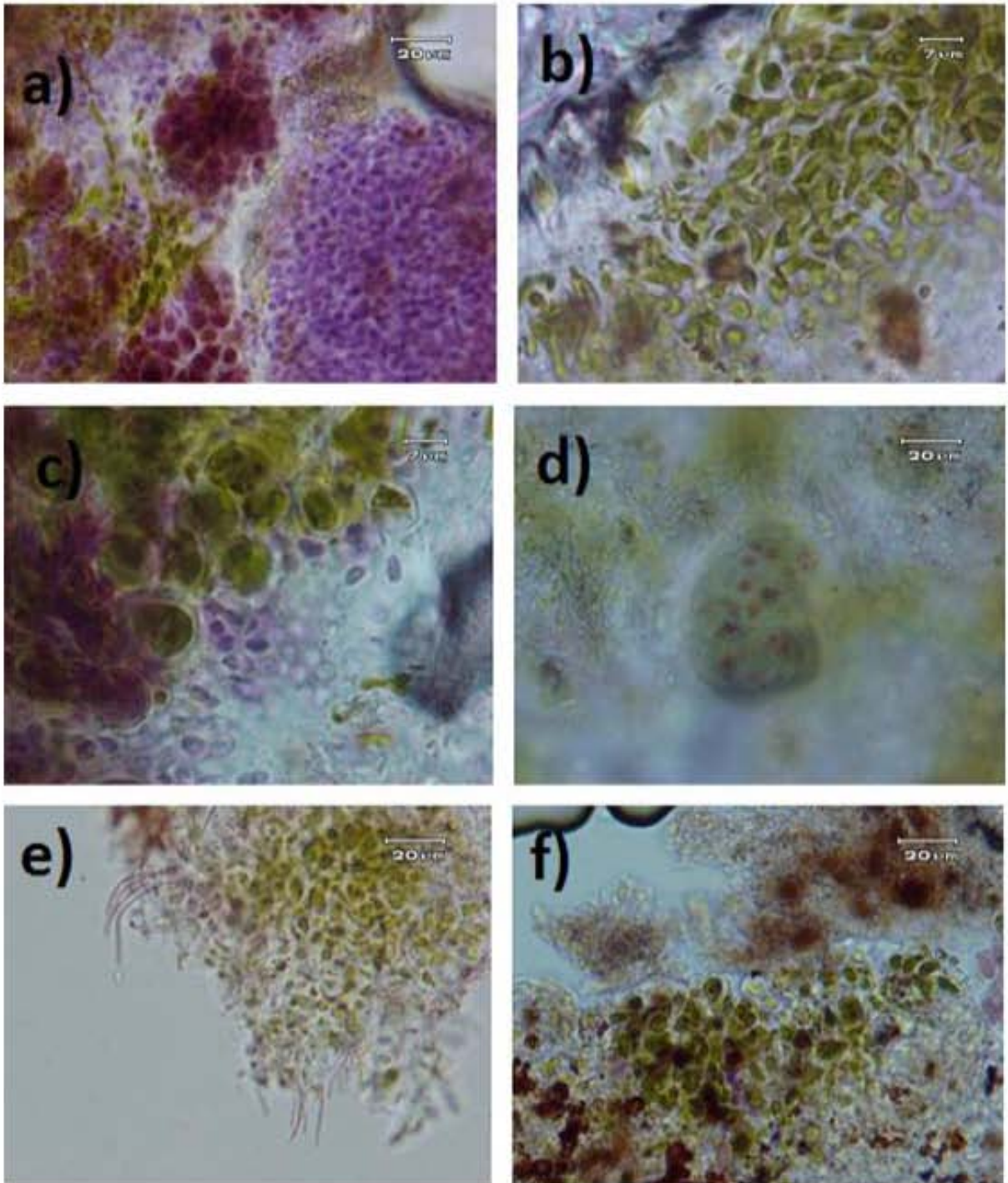


## Cianobacterias detectadas por microscopía en microbialitas a 10 metros de profundidad



**Figura 16.** Microscopía óptica de cianobacterias encontradas en microbialitas a 10 m de profundidad, tratadas con ácido acético al 1% y fijadas con formol. a) posible *Chroococidiopsis* sp. con picocianobacterias alargadas tipo *Synechococcus* sp. b) *Entophysalis atrata*. y beocito de *Stanieria* sp. c) *Entophysalis atrata* en púrpura y posible *Chlorogloea* sp., en verde, alrededor filamentos muy tenues de otras cianobacterias posiblemente *Leptolyngbya* y picocianobacterias posibles *Synechococcus* sp. d) Posible división de *Pleurocapsa* sp. e) consorcio de Pleurocapsales en verde *Chroocidium gelatinosum*, en morado *Staineria* sp. f) Microscopía de zona roja de microbialita, se observan detritos con células muertas y restos de lo que pudo ser *Entophysalis atrata*.

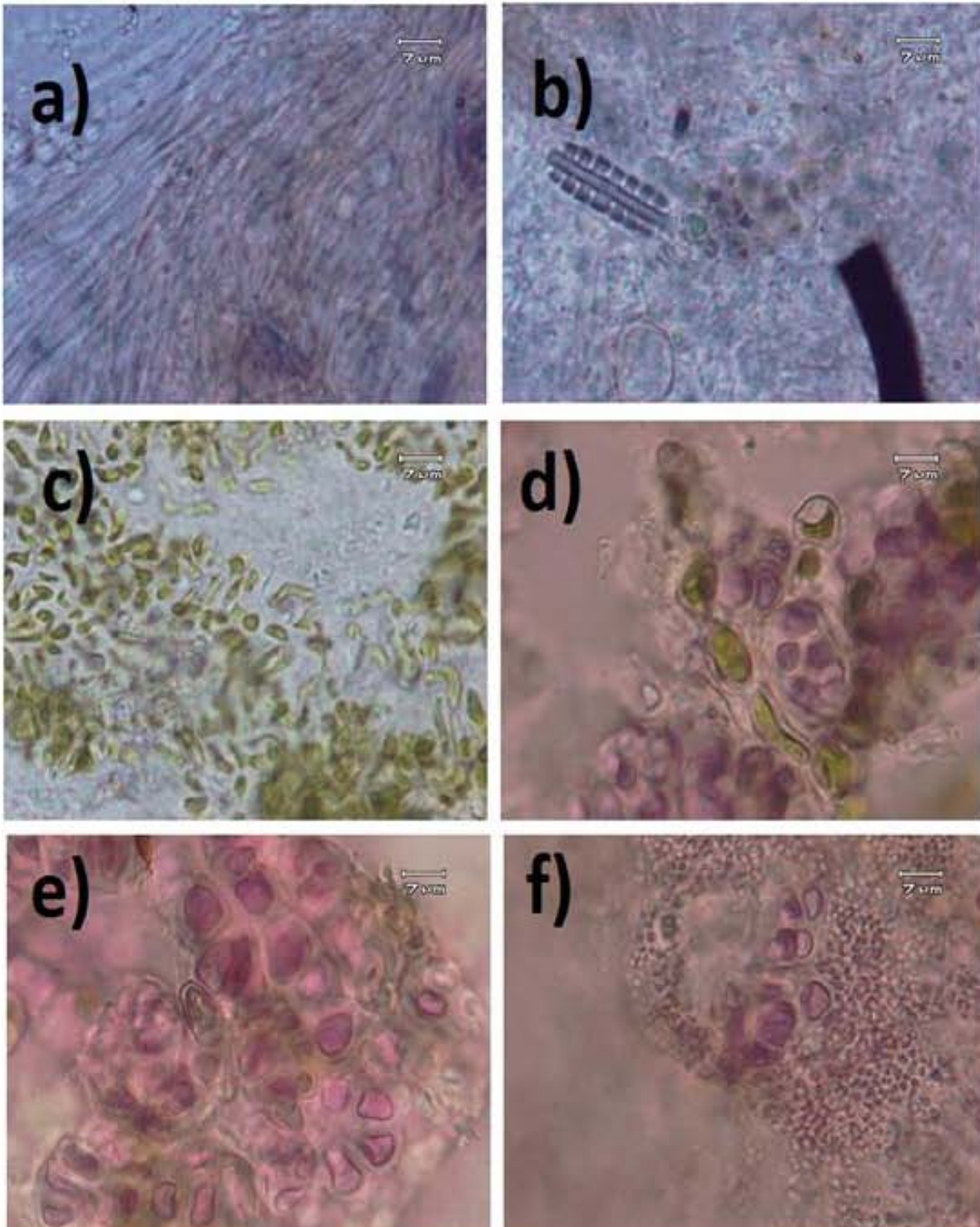
## Cianobacterias detectadas por microscopía en microbialitas a 20 metros de profundidad



**Figura 17.** Microscopía óptica de cianobacterias encontradas en microbialitas a 20 m de profundidad. a) Cuatro tipos diferentes de Pleurocapsales, en verde se sigue un plano de división posiblemente *Aphanotece* sp., en morado se ve en forma cocal *Chroococcidium gelatinosum*., en rosa oscuro y con morfología más grande parece distinguirse *Chroococcidiopsis* sp., en marrón hay pequeñas células no distinguibles. b) Células irregulares de clorofitas c) clorofitas mezcladas con *Stanieria* sp. y *Entophysalis atrata*.. abajo en un solo plano de división d) filamentos delgados de posible *Nodosilinea* sp. y la fase inicial de *Gloeocapsa* sp. envuelta en mucilago. e) Cianobacterias filamentosas posiblemente *Leptolyngbya* sp. f) En café pequeñas células de *Aphanotece* sp., en verde fases de división de *Pleurocapsa* sp. una de las cianobacterias mas abundantes a 20 metros.



Cianobacterias detectadas por microscopía en microbialitas a 30 metros de profundidad



**Figura 18.** Microscopía óptica de cianobacterias encontradas en microbialitas a 30 m de profundidad, a) y b) Región calcificada de cianobacterias filamentosas y diatomeas muertas con posible *Aphanotece* sp, c) y d) La diversidad de cianobacterias se limita a *Pleurocapsa* sp, *Chroococcidium gelatinosum* y pocos *Xenococcus candelariae* a 30 m, también fases de *Cladophora* son abundantes, e) *Chroococcidium gelatinosum*, f) Fases de división de *Xenococcus candelariae*.

**A)**

<b><i>Rivularia sp.</i></b>			
	Largo heterocisto basal	Alto célula	Ancho célula
Promedio	11.96	2.574	3.997
Dv Est	5.072	1.115	1.806
Err Est	1.23	0.142	0.228
95% Conf	2.608	0.283	0.455
99% Conf	3.593	0.377	0.605
n	37	62	63
Min	5.624	0.145	1.651
Max	21.617	5.515	7.354

**B)**

<b><i>Calothrix cf parietina</i></b>			
	Largo heterocisto basal	Largo célula	Alto célula
Promedio	5.443	3.311	4.125
Dv Est	0.993	0.994	1.271
Err Est	0.217	0.217	0.24
95% Conf	0.452	0.452	0.493
99% Conf	0.617	0.617	0.665
n	30	28	28
Min	3.321	1.581	1.656
Max	7.62	5.97	5.778

**C)**

<b><i>Nodosilinea sp.</i></b>			
	Ancho con vaina	Ancho célula	Alto célula
Promedio	2.254	1.706	0.801
Dv Est	0.281	0.278	0.299
Err Est	0.038	0.037	0.037
95% Conf	0.076	0.074	0.075
99% Conf	0.101	0.099	0.099
n	55	56	64
Min	1.763	1.213	0.309
Max	2.867	2.317	2.089

**D)**

<b><i>Xenococcus candelariae</i></b>			
	Diámetro célula madre	D beocitos	D vaina
Promedio	6.348	2.467	6.748
Dv Est	2.081	0.564	2.481
Err Est	0.264	0.075	0.664
95% Conf	0.528	0.15	0.928
99% Conf	0.703	0.199	1.103
n	62	57	62
Min	2.652	1.312	3.052
Max	12.322	3.723	12.722

**E)**

<b><i>Chroococcus cf schizodermatic</i></b>		
	Alto célula	Ancho célula
Promedio	1.122	2.157
Dv Est	0.308	0.361
Err Est	0.042	0.049
95% Conf	0.083	0.098
99% Conf	0.111	0.13
n	35	35
Min	0.528	1.337
Max	2.118	3.076

**F)**

<b><i>Phormidium sp.</i></b>		
	Alto célula	Ancho célula
Promedio	1.061	2.021
Dv Est	0.366	0.316
Err Est	0.045	0.038
95% Conf	0.091	0.075
99% Conf	0.12	0.099
n	65	71
Min	0	1.2
Max	1.834	2.884

**G)**

<b><i>Leptolyngbya sp.</i></b>		
	Ancho	Alto
Promedio	1.117	0.863
Dv Est	0.279	0.294
Err Est	0.037	0.039
95% Conf	0.074	0.077
99% Conf	0.099	0.103
n	57	58
Min	0.451	0.319
Max	1.596	1.627

**Tabla 7.** Tabla de morfometría sección I. Dimensión en micrómetros de cianobacterias identificadas por microscopía óptica. Se utilizó un foto-microscopio Olympus BX 51 equipado con DIC (Contraste interferencial, diferencial), y el programa Sigmascan Pro para obtener las morfometrías, se realizaron aproximadamente 60 observaciones, de al menos 5 fotografías de microbialitas y de cultivos para cada posible género de cianobacterias, las características fueron comparadas con la información de la página CyanoDB, Komarek y Agnostidis (1998). A) *Rivularia*, B) *Calothrix cf parietina*, C) *Nodosilinea sp.* D) *Xenococcus candelariae* E) *Chroococcus cf schizodermaticus*, F) *Phormidium sp.* y G) *Leptolyngbya sp.*



H) <i>Pseudoanabaena sp.</i>			I) <i>Oculatella sp.</i>			J) <i>Synechococcus sp.</i>		
	Alto célula	Ancho célula		Alto célula	Ancho célula		Alto célula	Ancho célula
Promedio	2.304328358	0.984	Promedio	2.248	1.249	Promedio	1.748	0.899
Dv Est	0.764477612	0.195	Dv Est	0.595	0.244	Dv Est	0.482	0.144
Err Est	0.086044776	0.026	Err Est	0.08	0.031	Err Est	0.043	0.021
95% Conf	0.171268657	0.051	95% Conf	0.161	0.061	95% Conf	0.021	0.034
99% Conf	0.227089552	0.068	99% Conf	0.214	0.081	99% Conf	0.044	0.061
n	5.895522388	58	n	55	64	n	55	64
Min	1.119402985	0.567	Min	1.331	0.743	Min	0.069	0.455
Max	7.014925373	1.469	Max	4.551	2.032	Max	1.468	1.015

K) <i>Entophysalis atrata.</i>				L) <i>Pleurocapsa sp.</i>			
	Alto célula	Ancho célula	Ancho vaina		Ancho	Alto	Ancho vaina
Promedio	3.325	2.055	2.955	Promedio	5.359	5.076	5.859
Dv Est	0.712	0.383	0.383	Dv Est	1.209	1.829	1.209
Err Est	0.096	0.052	0.052	Err Est	0.163	0.236	0.163
95% Conf	0.193	0.104	0.104	95% Conf	0.327	0.473	0.327
99% Conf	0.256	0.138	0.138	99% Conf	0.435	0.629	0.435
n	55	55	55	n	55	60	55
Min	1.629	1.205	2.105	Min	3.123	1.445	3.623
Max	5.925	2.815	3.715	Max	7.944	9.383	8.444

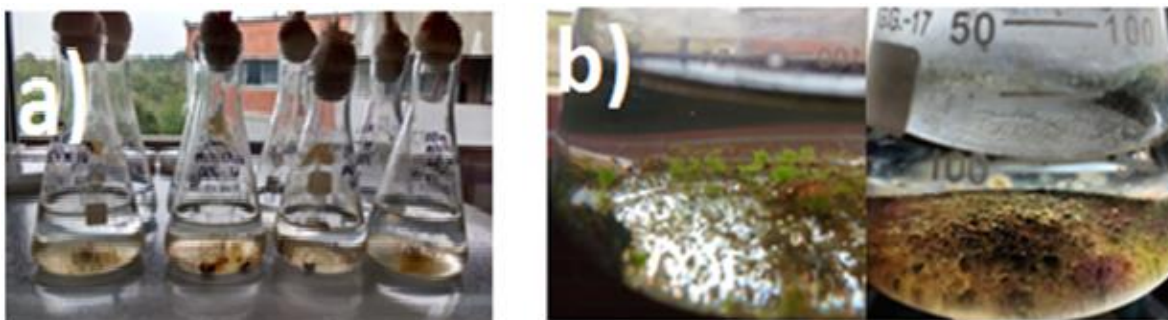
M) <i>Stanieria sp.</i>			N) <i>Chroococcidium gelatinosum</i>			O) <i>Cyanobium sp.</i>		
	Diámetro célula	Diámetro vaina		Alto célula	Base célula		Alto célula	Ancho célula
Promedio	10.121	10.721	Promedio	5.557	6.345	Promedio	1.748	0.899
Dv Est	1.692	1.692	Dv Est	1.426	1.812	Dv Est	0.482	0.144
Err Est	0.228	0.228	Err Est	0.187	0.24	Err Est	0.043	0.021
95% Conf	0.457	0.457	95% Conf	0.375	0.481	95% Conf	0.021	0.034
99% Conf	0.609	0.609	99% Conf	0.499	0.64	99% Conf	0.044	0.061
n	55	55	n	58	57	n	55	64
Min	6.352	6.952	Min	2.652	0.281	Min	0.069	0.455
Max	14.022	14.622	Max	9.246	10.219	Max	1.468	1.015

**Tabla 8.** Tabla de morfometría sección II. Continuación de tabla 6. Las unidades están dadas en micrómetros. H) *Pseudoanabaena*, I) *Oculatella*, J) *Synechococcus*, K) *Entophysalis atrata*, L) *Pleurocapsa sp.*, M) *Stanieria sp.*, N) *Chroococcidium gelatinosum* y O) *Cyanobium sp.* Cabe aclarar que para *Aphanotece sp.*, no se alcanzó una n mayor a 30 por lo que no se proporcionan sus medidas.

## 6.2 Obtención de cultivos de cianobacterias

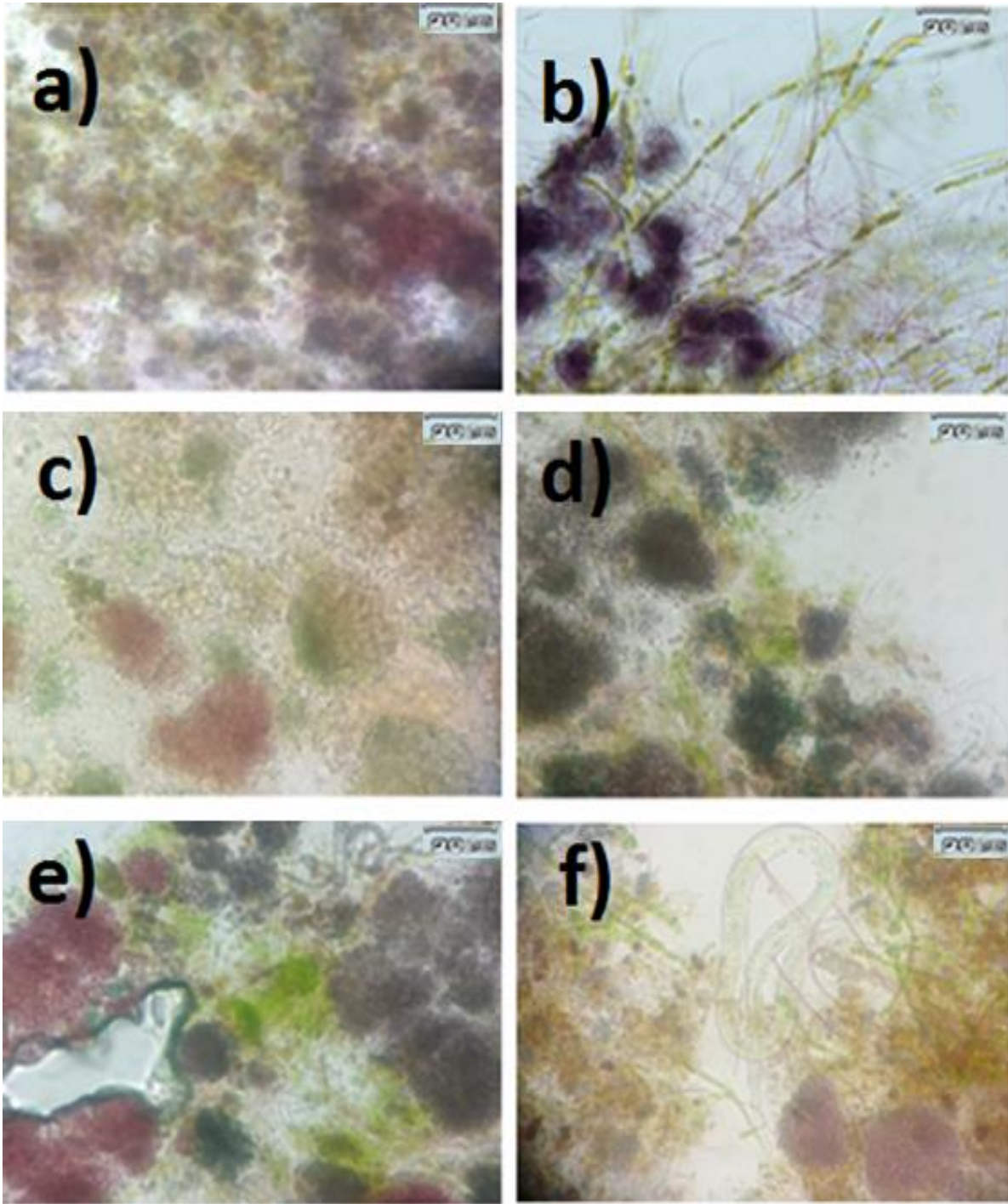
### 6.2.2 Crecimiento en matraces

En octubre 2016, se inocularon 4 matraces Erlenmeyer de 150 ml con fragmentos de 1 cm de microbialita (z=10 y 20 m) por duplicado. Se adicionó 100 ml de agua de Alchichica y se dejaron crecer en condiciones ambientales (Fig. 19a). Tres matraces (dos de z=10 y uno de z=20) mostraron crecimiento de cianobacterias en enero 2017, formando un biofilm o biopelícula en el fondo del frasco (Fig. 19b).



**Figura 19.** Cultivos de cianobacterias de microbialitas de 10 y 20 m de profundidad en matraz Erlenmeyer. a) Matraces a los 3 meses de inoculación con crecimiento de diatomeas en el fondo. b) Matraces a los 4 meses de inoculación con tapete microbiano en el fondo.

Por microscopia se observó que las cianobacterias en matraz coincidían con las observadas previamente en las muestras de microbialita fresca (Fig. 20). Aunque las abundancias cambiaron, se mantuvo una alta diversidad de cianobacterias. En Junio 2017, se usaron algunos trozos de tapete para cultivar en medio sólido, y tratar de aislar en paralelo con los demás cultivos. Para Septiembre 2017, la diversidad en los matraces sólo se limitó a consorcios de *Pleurocapsales* como *Staneiria sp* *Pleurocapsa sp* y *Chroococcidiopsis sp.* junto con otras clorofitas.



**Figura 20.** Microscopía de las cianobacterias encontradas en cultivos de microbialitas de 10 y 20 m en matraz. a) Tres tipos de *Pleurocapsales* se identificaron como persistentes en todas las profundidades de las microbialitas esponjosas. b) Un tipo de clorofita, posiblemente *Cladophora*. c, d, e) Posibles comunidades de *Xenococcaceae* o *Chroococcidium* (en violeta), un tipo de *Acharyochloris* en verde y una *Pleurocapsa sp.* en negro café. f) Un nemátodo con diatomeas alimentándose de cianobacterias y materia orgánica.

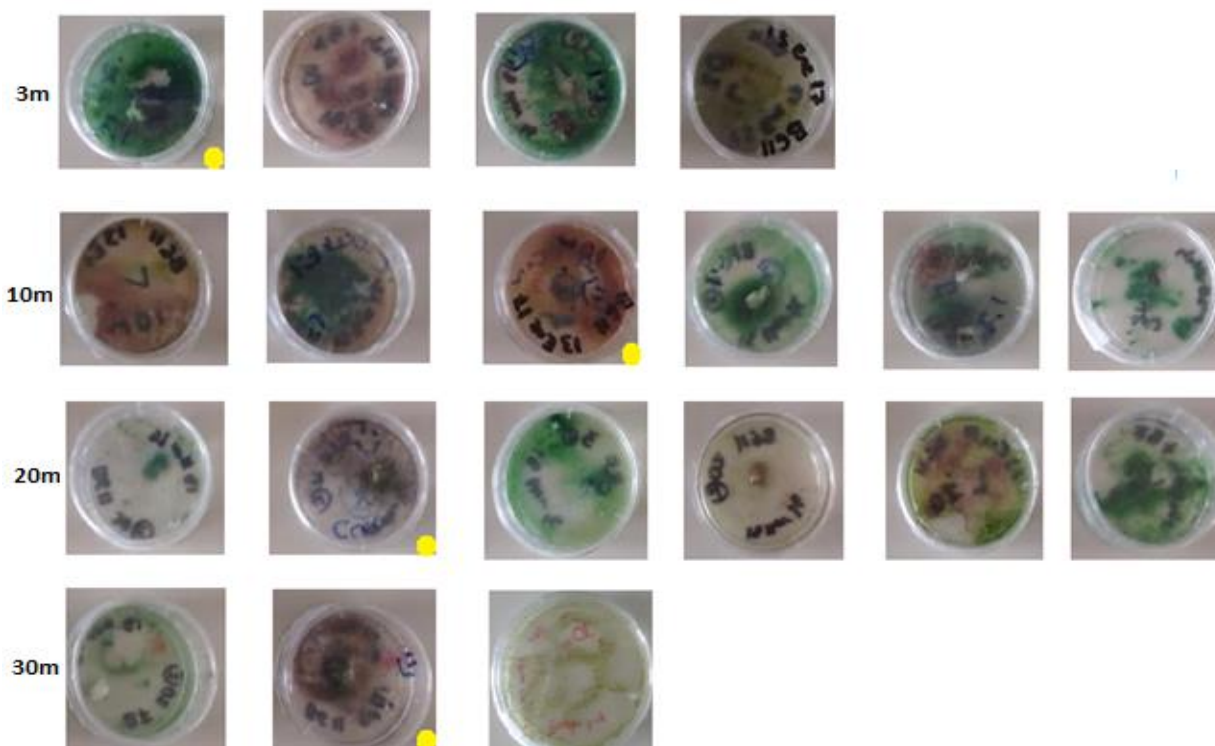
### 6.2.3 Aislamiento de cianobacterias en medio sólido

En noviembre (2017) se cultivaron trozos de microbialita de aproximadamente 2 cm x 1 cm cada uno, y de cada profundidad (3, 10, 20 y 30 m;) en cajas Petri de 5 ml. Cada profundidad se cultivó por triplicado con dos medios de cultivo: BG11 y Bayfolan; y con dos condiciones ambientales: en termostato a 28°C con fotoperiodos 12/12 hrs, 200 Lúmenes de intensidad lumínica y a temperatura ambiente con luz natural.

Los cultivos que se incubaron a temperatura ambiente con condiciones de luz natural crecieron a los 3 meses. Los cultivos que se dejaron en termostato no crecieron. Para algunos cultivos funcionó el medio Bayfolan, pero se optó por mantener el medio BG11. Las cajas Petri se rehidrataron contantemente con medio BG11 (2- 3 ml) cada 15 días (Fig. 21).

Las inoculaciones y resiembras que se hicieron siguieron el siguiente calendario:

- Enero 2017: se inoculó con las biopelículas que crecieron en los matraces.
- Marzo 2017: se inocularon medios sólidos con agua del lago Alchichica (i.e. agua del lago Alchichica estéril y agar), con microbialitas de un contenedor plástico.
- Abril 2017: resiembras de los cultivos de las biopelículas que crecieron en los matraces.
- Diciembre 2017: se sembraron 8 cajas de cepas puras.



**Figura 21.** Cultivos de cianobacterias a los 6 meses de inoculación. Las fotografías se ordenan por profundidad, los puntos amarillos indican aislamiento en monocultivo.



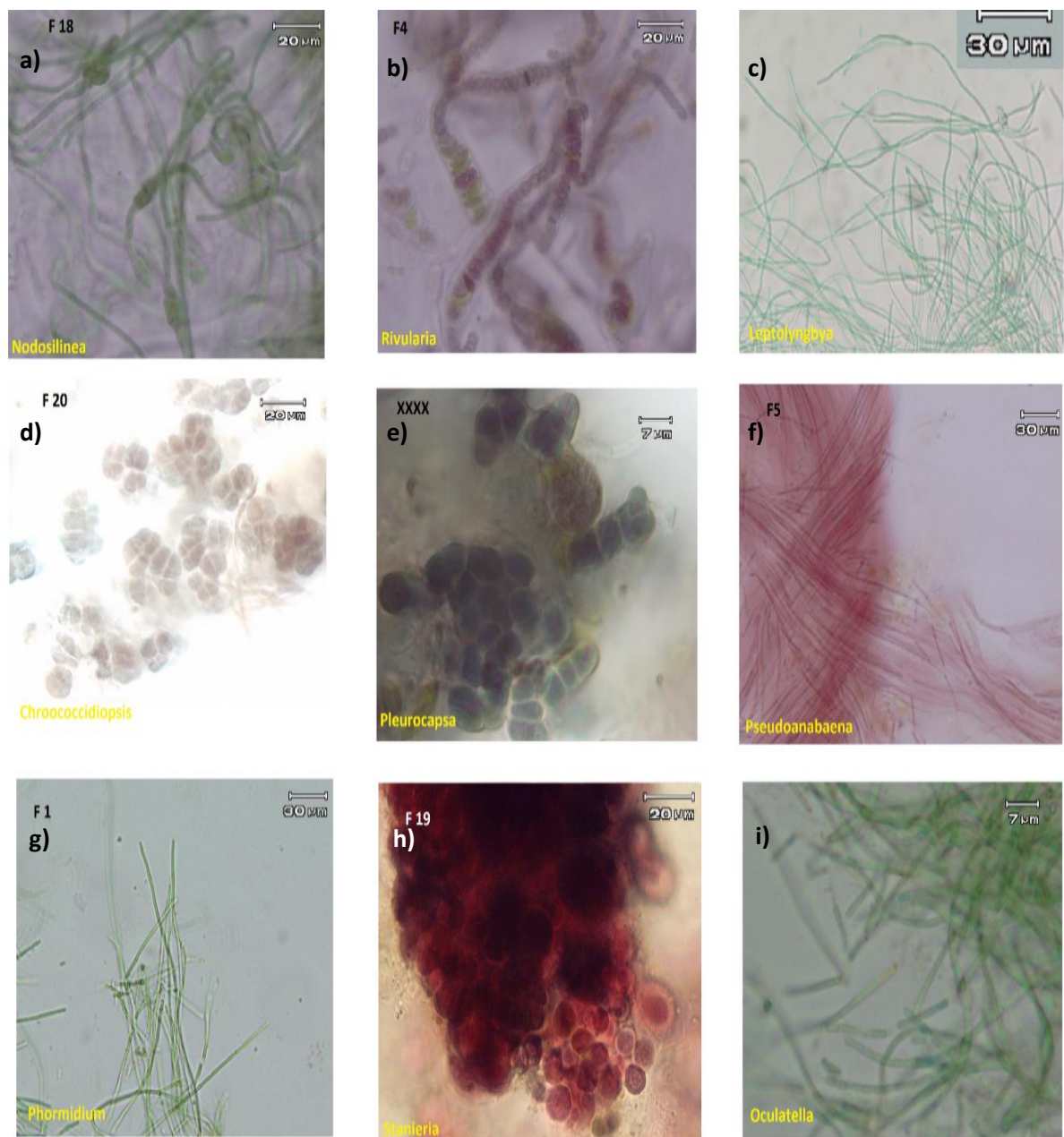
#### 6.2.4 Obtención de monocultivos en medio líquido

A partir de los cultivos en medio sólido, se inocularon 16 frascos de cultivo con respirador de 25 ml con medio BG11 (abril 2017) (Fig. 22). Se dejaron en condiciones de luz natural a temperatura ambiente. Se agregaron 20 ml de BG11 cada 15 días. Los frascos sin monocultivo se desecharon, y los puros se siguieron sembrando para obtener la mayor cantidad de biomasa posible. En diciembre 2017, se hicieron pases de cultivos puros a 10 frascos nuevos.



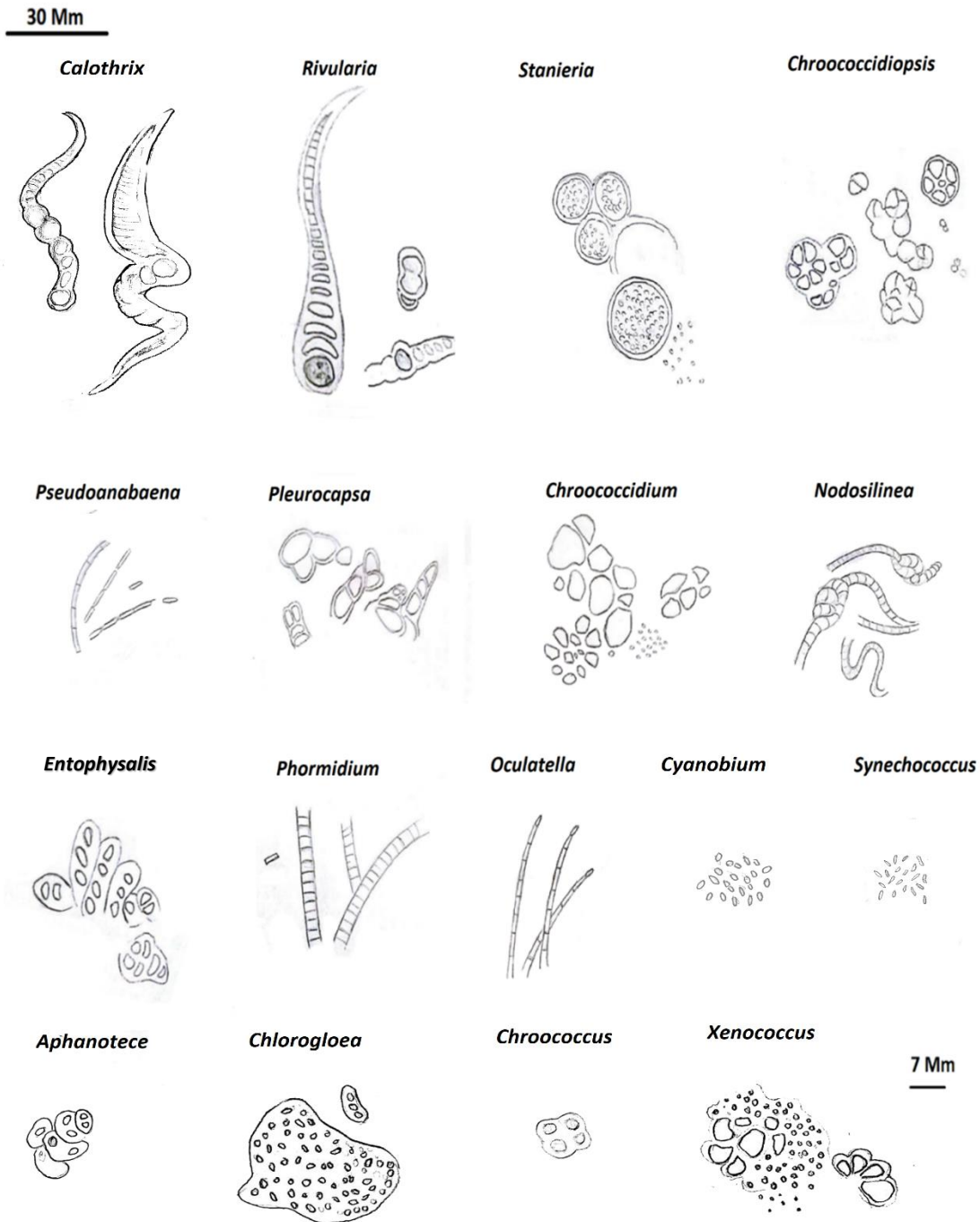
**Figura 22.** Aislados en frascos con respirador, se obtuvieron en total 20 frascos de los cuales se fueron haciendo traslados a medio sólido y de nuevo a medio líquido.

En agosto 2017, los cultivos fueron resembrados en medio sólido a partir de este medio líquido de abril. En octubre 2017 se aisló mediante capilar cepas de interés bajo supervisión de la Dra. Itzel Becerra Absalón. Algunos cultivos de medio sólido se mantuvieron en condiciones de termostato (28°C) en el laboratorio del Dr Gustavo Montejano. En la Figura 23 se muestran las microscopías de los cultivos aislados.



**Figura 23.** Microscopía óptica de cultivos aislados. a) *Nodosilinea* sp. característica por presentar enrollamiento y nudos en filamentos. b) *Rivularia* sp. característica de heterocistos y división polar con filamentos apicales. c) *Leptolyngbya* sp. filamentos delgados. d) *Chroococidiopsis* sp. presenta división múltiple simétrica. e) *Pleurocapsa* sp. presenta beocitos y divisiones asimétricas en varios planos y crecimiento en pseudofilamentos. f) *Pseudoanabaena* sp. presenta filamentos delgados y células largas sin vainas, sus filamentos se trenzan. g) *Phormidium* sp. delgada presenta necridios y hormogonios. h) *Stanieria* sp. con beocitos grandes y circulares regulares. i) *Oculatella* sp. presenta pigmentos rojos en la punta del filamento.

Gracias a los cultivos en líquido se pudieron finalmente identificar 9 géneros mediante microscopía: *Rivularia*, *Pleurocapsa*, *Nodosilinea*, *Oculatella*, *Phormidium*, *Pseudonabaena*, *Chroococidiopsis*, *Stanieria*, y *Leptolyngbya* (Fig. 24). Estos cultivos se mantienen para continuar con análisis moleculares.



**Figura 24.** Esquema de cianobacterias visualizadas e identificadas por microscopía óptica, en muestras frescas de microbialita y cultivos. Los dibujos se utilizan para presentar en una sola imagen y a una sola escala varios planos detallados a la vez, que no se pueden observar en una fotografía.

### 6.2.5 Identificación de cultivos por secuenciación del 16S ribosomal

Sólo 10 diferentes cianobacterias aisladas desarrollaron suficiente biomasa para poder extraer ADN genómico y mandar a secuenciar la región V4 del 16S ribosomal (Tabla 8). Debido a la dificultad para extraer ADN de cultivos se emplearon 2 técnicas, mediante el Kit DNA Easy PowerSoil (Qiagen) y mediante una molienda previa con nitrógeno líquido. De las extracciones de ADN, sólo 8 diferentes pudieron ser amplificadas empleando los primers de Nübel et al. (1997). De éstos, sólo se obtuvieron 5 secuencias con calidad para hacer alineamientos mediante BLAST.

**Tabla 9. Cianobacterias aisladas en cultivo, amplificación y secuenciación 16S rRNA**

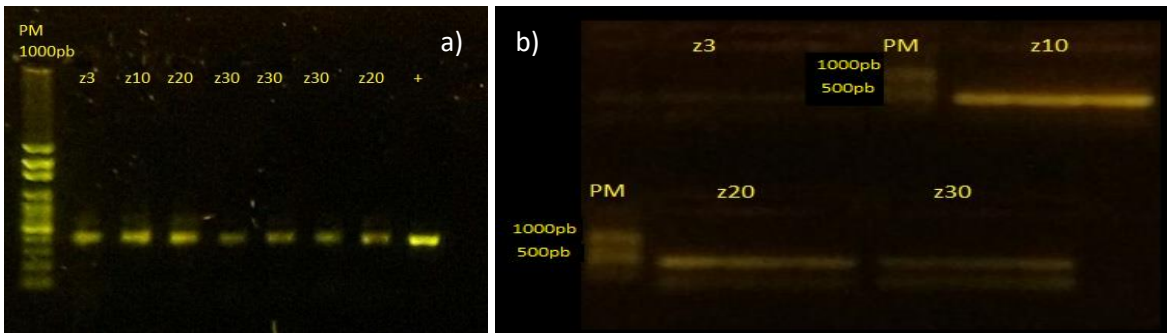
Aislado	Género	Extracciones de ADN realizadas	16S rRNA amplificado	16S rRNA secuenciado
F1	<i>Phormidium sp.</i>	2	1	1
F2	<i>Oculatella sp.</i>	1	1	1
F4	<i>Rivularia sp.</i>	4	3	0
F5	<i>Pseudoanabaena sp.</i>	2	1	1
F6	<i>Leptolyngbya sp.</i>	1	1	0
F18	<i>Nodosilinea sp.</i>	1	1	1
F19	<i>Stanieria sp.</i>	1	0	0
F20	<i>Chroococcidiopsis sp.</i>	3	3	1
Fx	<i>Pleurocapsa sp.</i>	1	0	0
F30	<i>Cyanobium sp.</i>	1	0	0

### 6.3 Caracterización de cianobacterias por librería de clonas

Para identificar a las cianobacterias presentes en las microbialitas se realizaron librerías de clonas. Primeramente, se llevaron a cabo con productos 16S rRNA obtenidos con los primers 27F y 23Sr (Lane et al. 1991). Sin embargo, estos productos de ~1400 pb resultaron tener muy bajo rendimiento en el proceso de ligación al vector. Como resultado, en la primera librería no se obtuvo ninguna clona y en la segunda librería, sólo pudieron obtenerse 10 clonas de z3.

Por esta razón, se decidió emplear los primers CYA359F y CYA781R (Nübel et al. 1997), que dan un producto de ~380 pb; y con ello se mejoró la eficiencia de transformación (Fig. 25). De esta forma se obtuvieron 22 clonas para z3, 24 clonas para z10, 84 clonas para z20, y 76 clonas para z30 (Tabla 9).





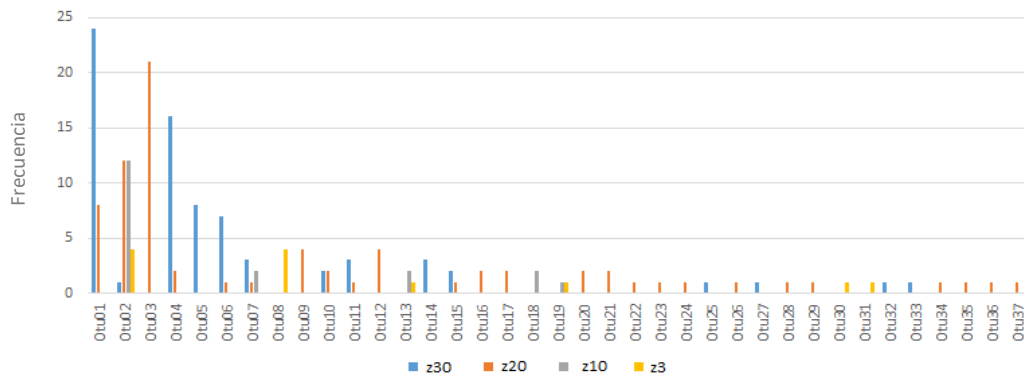
**Figura 25.** Gel de electroforesis en agarosa de fragmentos 16S rRNA amplificados. a) Productos de PCR (Nübel et al. 1997) obtenidos a partir de ADN metagenómico de z3 (3 m), z10 (10 m), z20 (20 m) y z30 (30 m). PM= marcador molecular de 1000 pb, banda esperada 420 pb aprox. b) Purificación de fragmentos 16S rRNA en gel de agarosa 1%.

**Tabla 10. Número de clonas, secuencias y OTUs obtenidos por profundidad**

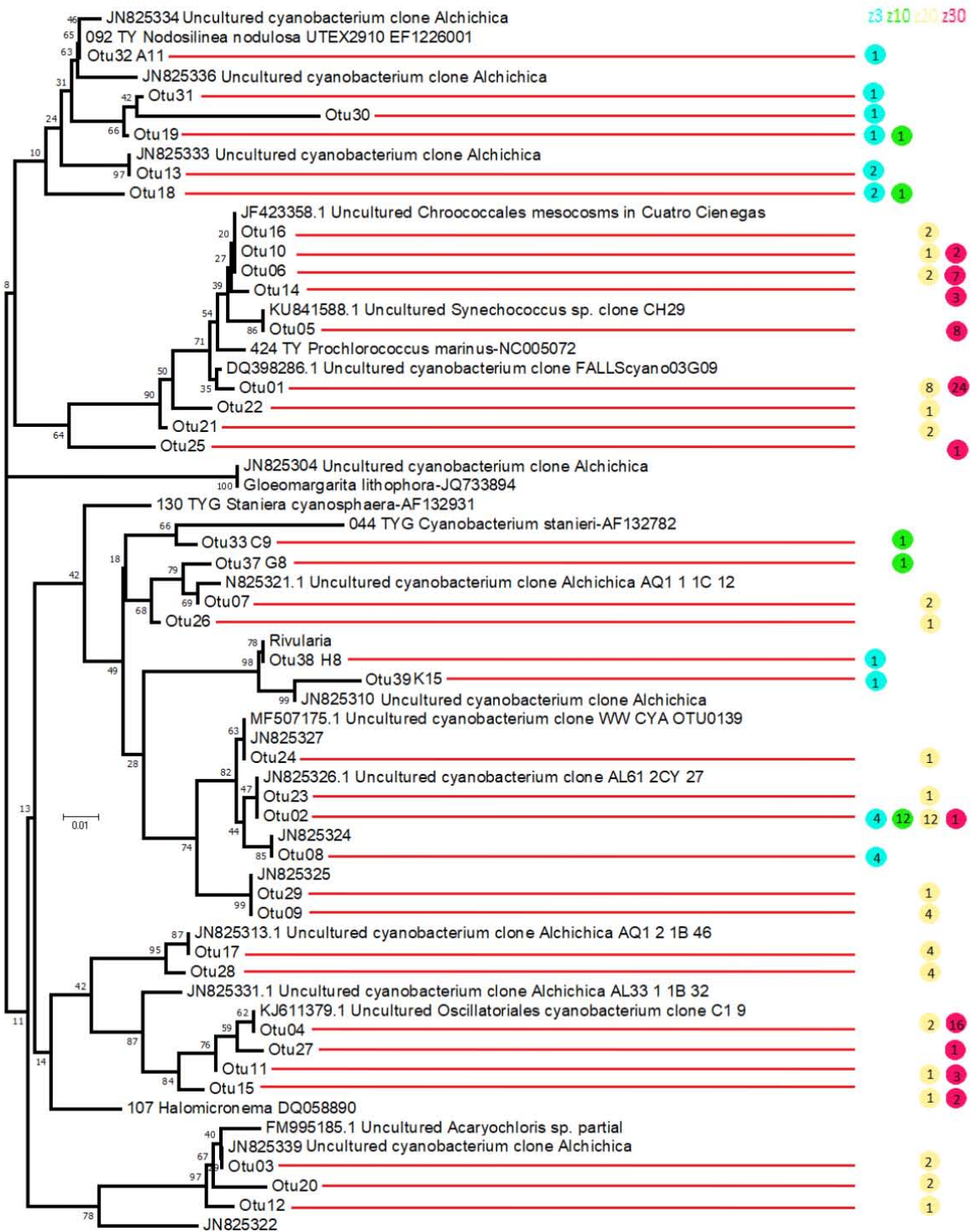
Profundidad	Número de clonas	Clonas secuenciadas	OTUs* detectados
3 m	22	22	7
10 m	24	24	10
20 m	84	76	26
30 m	76	76	16
<b>Total</b>	<b>206</b>	<b>198</b>	

\* OTUs obtenidos a 3% cut-off.

Finalmente, se analizaron los OTUs en un dendograma empleando el modelo del vecino más cercano (BioNeighbor-Joining), considerando todos los OTUs obtenidos: 5 OTUs de librería z3(27F:23Sr) y 32 OTUs de z3, z10, z20, z30(CYA359F:CYA81R). Dando un total de 37 OTUs por las 3 librerías de clonas (Fig. 26). Las secuencias se analizaron en conjunto con secuencias de la base de datos NCBI para ver la distribución de los diferentes OTUs en las diferentes profundidades (Fig. 27).



**Figura 26.** Abundancias de OTUs obtenidos por profundidad.

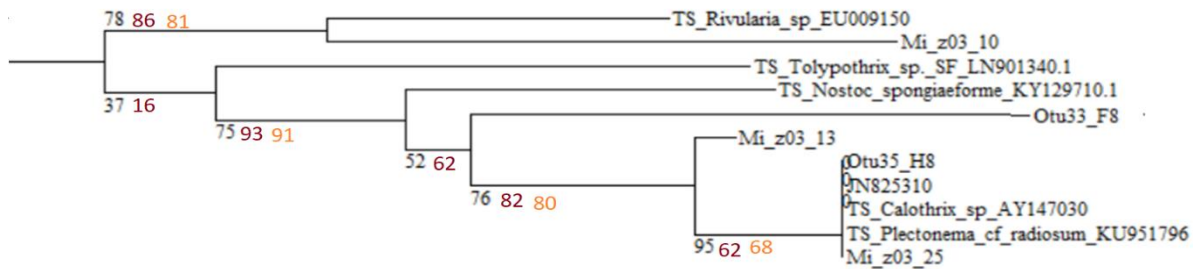


**Figura 27.** Agrupación por similitud de distancias de secuencias 16S rRNA de cianobacterias. Se empleó BioNeighbor Joining (BioNB) con un bootstrap de 1000 y un modelo Kimura 2-parameter (K2P), que asume que las transiciones son más comunes que las transversiones. Sólo se incluyen los OTUs obtenidos y las secuencias más parecidas de la base de datos. En cada círculo se indica el número de secuencias que corresponden a ese OTU y la profundidad de donde se obtuvieron.

## 6.4 Comparación de técnicas dependientes e independientes de cultivo.

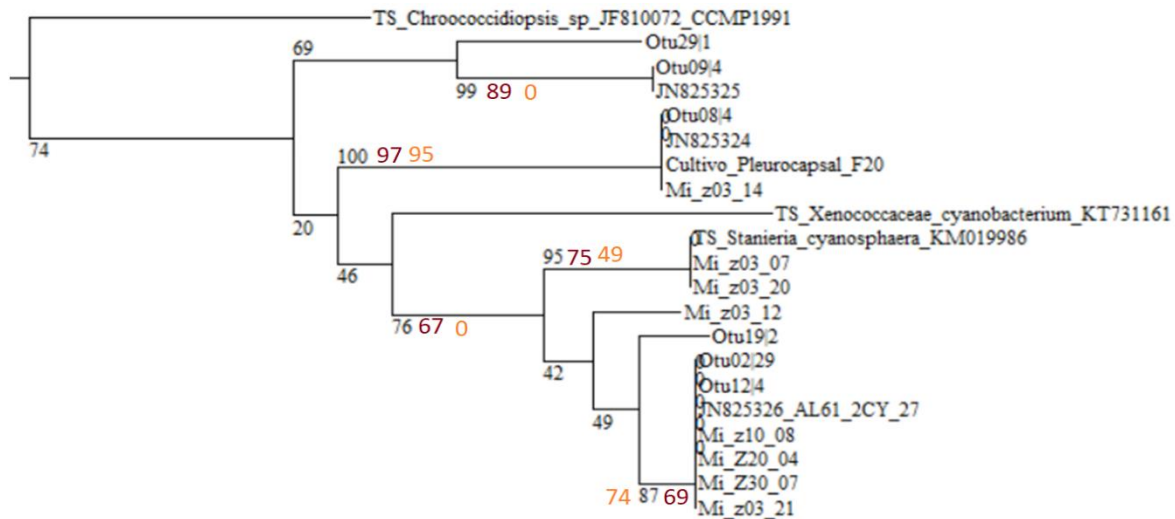
En el grupo de trabajo se llevó paralelamente una secuenciación por Illumina MiSeq del DNA metagenómico de microbialitas dirigido a genes procariontes con los primers 515F y 806R (Caporaso et al. 2012). Con los datos de secuencias de librería de clonas, secuencias de cultivos y secuencias de Illumina MiSeq se construyeron árboles filogenéticos mediante Neighbor-Joining (BioNeighbor-Joining), Parsimonia (Maximum Parsimony) y Máxima Verosimilitud (Maximum Likelihood). Las secuencias se alinearon junto con secuencias tipo de cianobacterias y secuencias anotadas de cianobacterias no cultivadas de la base de datos NCBI. También se agregaron también secuencias de cianobacterias un trabajo previo (Couradeau et al. 2011) (Figs. 28-32).

### Nostocales



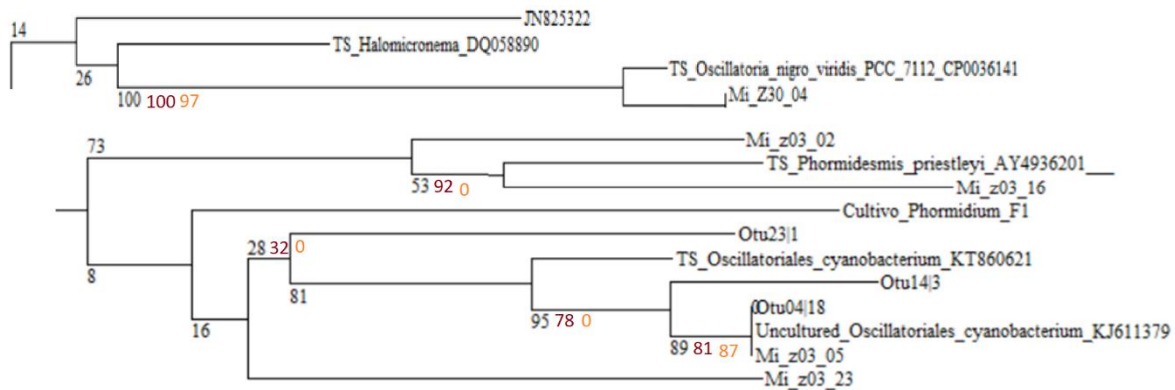
**Figura 28.** Árbol Neighbor-Joining de secuencias 16S rRNA de Nostocales. Se usó el K2P y un bootstrap de 1000, las secuencias fueron de 250 pb. OTU= OTUs de las 3 librerías de clonas, Mi\_: OTUs obtenidos por Illumina MiSeq, TS: Secuencias tipo, JN82: Secuencias de cianobacterias reportadas (Couradeau et al. 2011). Cultivo: secuencias de cultivos. El bootstrap en negro representa el obtenido por Neighbor-Joining; en rojo, Máxima Parsimonia y naranja, Máxima Verosimilitud. La ausencia de Bootstrap indica que estadísticamente no se conservó esa rama.

### Chroococciopsidales y Pleurocapsales



**Figura 29** Árbol Neighbor-Joining de secuencias 16S rRNA de Chroococciopsidales y Pleurocapsales. Se usó el K2P y un bootstrap de 1000, las secuencias fueron de 250 pb. OTU= OTUs de las 3 librerías de clonas, Mi\_: OTUs obtenidos por Illumina MiSeq, TS: Secuencias tipo, JN82: Secuencias de cianobacterias reportadas (Couradeau et al. 2011). Cultivo: secuencias de cultivos. El bootstrap en negro representa el obtenido por Neighbor-Joining; en rojo, Máxima Parsimonia y naranja, Máxima Verosimilitud. La ausencia de Bootstrap indica que estadísticamente no se conservó esa rama.

## Oscillatoriales



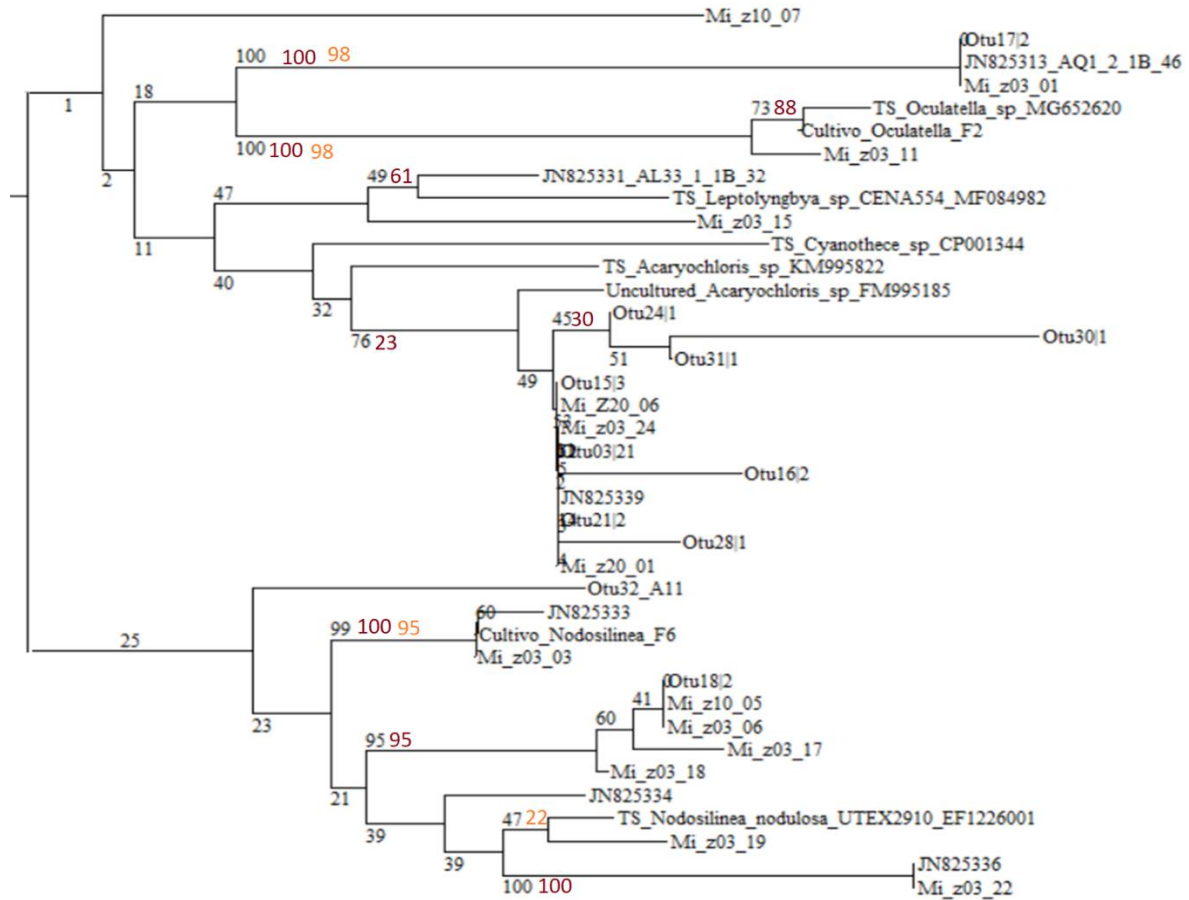
**Figura 30.** Árbol Neighbor-Joining de secuencias 16S rRNA de Oscillatoriales. Se usó el K2P y un bootstrap de 1000, las secuencias fueron de 250 pb. OTU= OTUs de las 3 librerías de clonas, Mi\_: OTUs obtenidos por Illumina MiSeq, TS: Secuencias tipo, JN82: Secuencias de cianobacterias reportadas (Couradeau et al. 2011). Cultivo: secuencias de cultivos. El bootstrap en negro representa el obtenido por Neighbor-Joining; en rojo, Máxima Parsimonia y naranja, Máxima Verosimilitud. La ausencia de Bootstrap indica que estadísticamente no se conservó esa rama.

## Chroococcales



**Figura 31.** Árbol Neighbor-Joining de secuencias 16S rRNA de Chroococcales. Se usó el K2P y un bootstrap de 1000, las secuencias fueron de 250 pb. OTU= OTUs de las 3 librerías de clonas, Mi\_: OTUs obtenidos por Illumina MiSeq, TS: Secuencias tipo, JN82: Secuencias de cianobacterias reportadas (Couradeau et al. 2011). Cultivo: secuencias de cultivos. El bootstrap en negro representa el obtenido por Neighbor-Joining; en rojo, Máxima Parsimonia y naranja, Máxima Verosimilitud. La ausencia de Bootstrap indica que estadísticamente no se conservó esa rama.

## Synechococcales



**Figura 32.** Árbol Neighbor-Joining de secuencias 16S rRNA para Synechococcales. Se usó el K2P y un bootstrap de 1000, las secuencias fueron de 250 pb. OTU= OTUs de las 3 librerías de clonas, Mi\_: OTUs obtenidos por Illumina MiSeq, TS: Secuencias tipo, JN82: Secuencias de cianobacterias reportadas (Couradeau et al. 2011). Cultivo: secuencias de cultivos. El bootstrap en negro representa el obtenido por Neighbor-Joining; en rojo, Máxima Parsimonia y naranja, Máxima Verosimilitud. La ausencia de Bootstrap indica que estadísticamente no se conservó esa rama.

## 7 DISCUSIÓN

### 7.1 Observaciones mediante microscopía

Las observaciones en microscopía confirmaron la mayoría de especies identificadas en otros estudios (Tavera et al. 1997, Kaźmierczak et al. 2011, Couradeau et al. 2011). Encontramos el mismo patrón y diversidad de cianobacterias en donde Synechococcales y Nostocales, dominan zonas superficiales de 3 y 10 m, y sus abundancias van decreciendo en profundidades de 20 y 30 metros. Las Pleurocapsales por otra parte, se encuentran en todas las profundidades y son el orden dominante a profundidades de 30 m.

Las cianobacterias observadas con mayor biomasa en observaciones de 3 metros corresponden a *Nodosilinea sp.* y *Leptolyngbya sp.*, junto con géneros de la familia Rivulariaceae, como *Rivularia sp.* y *Calothrix cf parietina*. Cabe aclarar que aún está la posibilidad de que los diferentes géneros puedan ser morfotipos pertenecientes a un solo género de Nostocales la única diferencia se presente en el ancho y coloración de las células. En superficie también se reportaron picocianobacterias que no pudieron identificarse por simple morfometría, las cuales se sospecha pertenecen al orden Synechococcales. También se encontró en menor proporción *Phormidium sp.*, que en un inicio fue confundida con *Leptolyngbya sp.* o *Pseudoanabaena sp.*, estas últimas se encontraron desde 3 hasta 20 m de profundidad. También se encontraron cianobacterias Pleurocapsales en menor proporción como *Pleurocapsa sp.* y *Chroococcidium gelatinosum*.

A 10 metros de profundidad se notó la ausencia de Nostocales, y se encontraron Pleurocapsales y Chroococciopsidales. Se identificó a *Chroococcidium gelatinosum*, y algunos *Xenococcus candelaria*. A esta profundidad todavía se observaron filamentos de posibles *Leptolyngbya sp.* o *Phormidium sp.* Debido al pretratamiento con ácido acético muchas cianobacterias filamentosas perdieron coloración y forma, por lo que fue difícil observar filamentos definidos pero sus vainas aun eran notorias.

A 20 metros de profundidad se observó un incremento en la diversidad de cianobacterias Pleurocapsales. Pudo observarse en abundancia *Chroococcidium gelatinosum* y *Xenococcus candelarie*, así como fases reproductivas de *Stanieria sp.* Por otra parte *Pleurocapsa sp.* fue muy abundante a 20 metros, *Chlorogloea sp.* y *Entophysalis sp.* se encontraron en menor medida. Se notó un mayor número de picocianobacterias que en 10 metros. También se observaron vainas y restos de cianobacterias filamentosas en mayor cantidad que en 10 metros, como *Leptolyngbya sp.*, *Oculatella sp.* y *Phormidium sp.* Finalmente, a 30 metros sólo se observaron Pleurocapsales como *Xenococcus candelaria*, *Pleurocapsa sp.* y *Chroococcidium gelatinosum*; así como restos muertos de células filamentosas y diatomeas. Fue de notar una presencia abundante de fases reproductiva de *Cladophora* en esta profundidad.

Hubo algunos géneros de cianobacterias no encontrados en microscopía de descripciones previas. La mayoría por ser epifitas de *Cladophora* tales como *Chamaesiphon*, *Heteroleibleinia* y *Mantellum*; tampoco se encontró *Nodularia*, ni *Anabaena* (Tavera et al. 1996).

Trabajos previos han sugerido el papel de *Gloeomargarita* en la precipitación intracelular de carbonato de calcio en el lago Alchichica (Couradeau et al. 2011). Sin embargo, una revisión más actual confirmó la importancia del orden Pleurocapsales y su papel en la precipitación extracelular de carbonatos como el mecanismo más relevante en la formación de microbialitas en el lago Alchichica (Saghaï et al. 2015).

Con los datos observados por microscopía, se realizó una tabla comparativa de ausencia/presencia por profundidad (Tabla 10). En esta se resumen los resultados encontrados y aquellos reportados previamente.

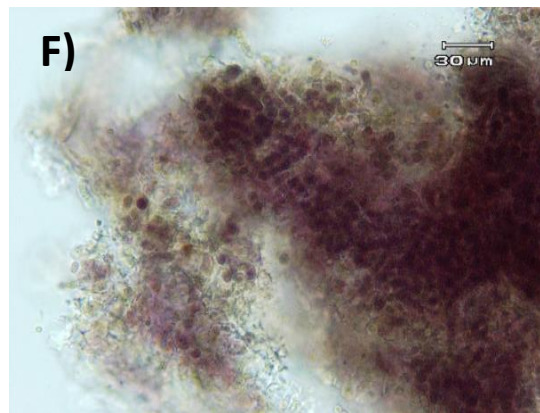
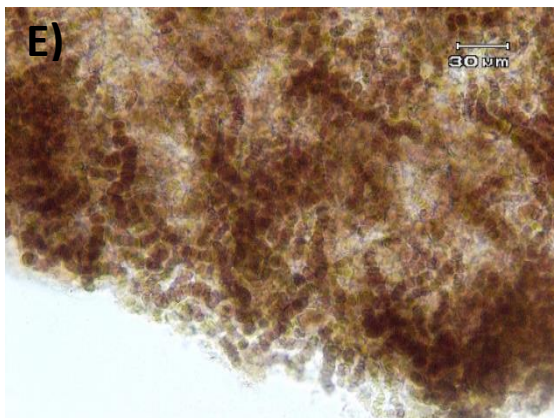
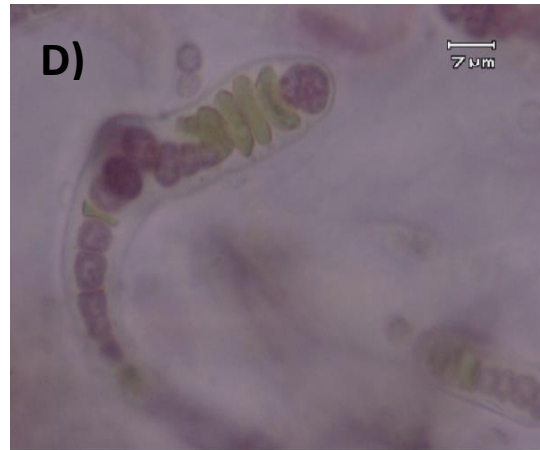
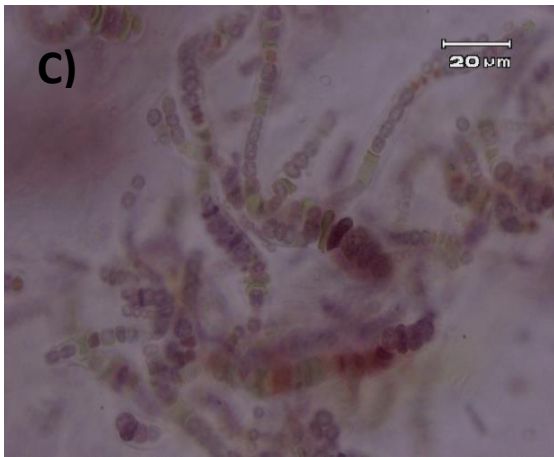
**Tabla 11. Cianobacterias detectadas por microscopía óptica en este estudio y aquellas reportada en estudios previos.**

Orden	Géneros reportados previamente	Detección			
		3 m	10 m	20 m	30 m
Nostocales	<i>Calothrix cf parietina</i>	x			
	<i>Rivularia sp.</i>	x	x		
Pleurocapsales	<i>Xenococcus candelaria</i>		x	x	x
	<i>Stanieria sp.</i>	x	x	x	
	<i>Cyanocistis sp.</i>				
	<i>Pleurocapsa sp.</i>		x	x	x
Chroococcidopsidales	<i>Chroococcidium gelatinosum</i>	X	x	x	x
Synechococcales	<i>Chroococcus sp.</i>	X	x	x	x
	<i>Synechococcus sp.</i>	X	x	x	
	<i>Leptolyngbya sp.</i>	X	x	x	
	<i>Nodosilinea sp.</i>				
	<i>Chamaesiphon sp.</i>				
	<i>Gloeomargarita lithopora</i>				
Oscillatoriales	<i>Oscillatoria sp.</i>				
	<i>Phormidium sp.</i>	x	x		
Chroococcales	<i>Gloeocapsa sp.</i>				
	<i>Aphanothece sp.</i>	x		x	
	<i>Chroococcopsis sp.</i>	x		x	
	<i>Entophysalis sp.</i>	x		x	
	<i>Chlorogloea sp.</i>	x		x	
	<i>Cyanodermatium sp.</i>				

## 7.2 Adaptaciones y morfotipos de cultivos

Como era de esperarse, durante el establecimiento de cultivos pudieron observarse varios cambios morfológicos y características como foto adaptaciones y plasticidad fenotípica, debido a las condiciones diferenciales de cultivo. Por ello se evaluaron constantemente los cambios de los cultivos puros. El caso más notable se documentó en los cultivos de *Rivularia sp.* en donde éste cambió a una coloración marrón y negra; y se observó pérdida de heterocistos en medio BG11, pero recuperación de los mismos en BG11(0) (Fig. 33). En algunos otros casos se observaron heterocistos múltiples en lugar de basales, pérdida de polaridad de crecimiento, pérdida de filamentos apicales, pareciéndose más a la morfología de *Nostoc*. Otros cambios comunes fueron la producción de ficoeritrinas, ya reportados en la literatura (Zapomělová et al. 2008). También se observó un incremento en el tamaño en las células de *Stanieria sp.* llegando a medir hasta 20 micras en diámetro, así como una gran producción de ficoeritrina. Lo mismo sucedió con los cultivos de *Pleurocapsa sp.*, cambios también ya previamente reportados (Tandon et al. 2016).





**Figura 33.** Microscopía óptica de cambios morfológicos en cultivo de *Rivularia*. A) *Rivularia* en microbialita z=3. B) Pérdida de heterocistos en BG11. C, D) Recuperación de heterocistos, pérdida de polaridad y cambio de coloración en BG11(0). F y G) Cambio de morfología, coloración y pérdida de filamentos apicales.



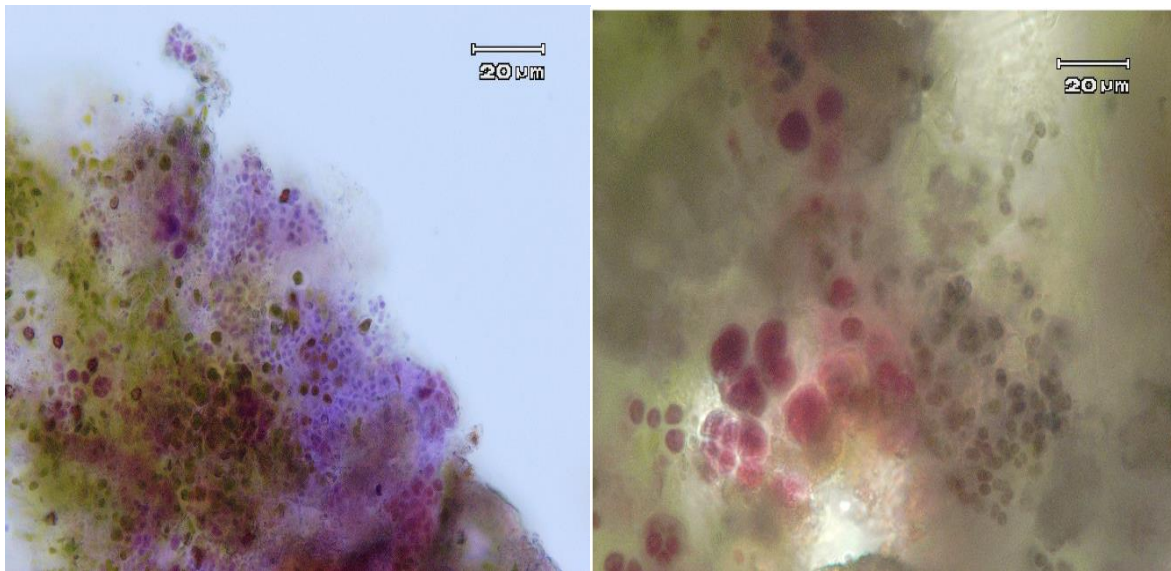
### 7.3 Consorcios involucrados posiblemente en la precipitación de carbonatos

Se pudo observar por microscopía un consorcio de cianobacterias Pleurocapsales en muestras de microbialita presente en todas las profundidades. Gracias a la librería de clonas se pudieron confirmar estas asignaciones con al menos 5 OTUs específicos para Pleurocapsales, en muestras de 20 y 30 m.

Estudios previos (Couradeau et al. 2011) mostraron especial interés en el papel de *Gloeomargarita* como el organismo principal asociado a precipitación de carbonatos y formación de microbialitas. Por las caracterizaciones realizadas en este trabajo no pudimos confirmar una presencia importante de *Gloeomargarita* por microscopía en muestras de profundidad de 20 y 30 metros, y en ninguna profundidad por métodos moleculares en muestra de microbialita, aunque en otro estudio de nuestro grupo de trabajo, métodos moleculares si la detectaron en sedimento.

Interesantemente, el consorcio de Pleurocapsales pudo mantenerse en medio de cultivo. A pesar de los esfuerzos por separar los consorcios de Pleurocapsales, los cultivos parecieron mostrar resistencia a permanecer y crecer sólo en consorcio. Pudo aislarse por dos meses *Chroococciopsis sp.*, pero el cultivo decayó, al igual que *Stanieria sp.* y *Pleurocapsa sp.*, los cuales sólo pudieron mantenerse aislados temporalmente en medio sólido, pero no desarrollarse en medio líquido. El consorcio en matraz debe mantenerse para escalarse, ya que existe especial interés en realizar pruebas físico químicas del mismo, debido a una alta actividad metabólica del cultivo observada. Se cree que estos consorcios están más asociados a la precipitación activa de material mineral y formación de microbialitas de profundidad de lago Alchichica (Fig. 34).

Este patrón de cianobacterias Pleurocapsales dominantes en zonas de profundidad ya ha sido reportado previamente en microbialitas del lago Pavillon en Canadá y en el Lago Van Turquía (López-García et al. 2005, Russell et al. 2015). Un análisis comparativo sería interesante. Es importante observar que también existen otros grupos asociados a la formación de microbialitas a esas profundidades, como son foto sintetizadores anoxigénicos, (bacterias púrpuras y verdes del azufre), clorofitas y otros microorganismos eucariontes. En el caso del lago Alchichica es de llamar la atención de fases de *Cladophora* muy abundante en todas las profundidades.



**Figura 34.** Izquierda. Microscopía óptica de consorcio de Pleurocapsales en muestra de microbialita de 20 metros, derecha consorcio de Pleurocapsales en cultivo, se observa material mineral precipitado.

## 7.4 Análisis de las secuencias 16S rRNA

### *Nostocales*

En el orden de Nostocales pudieron encontrarse dos OTUs derivados de la librería de clonas de microbialitas a 3 m de profundidad. Es de remarcar que estas secuencias concuerdan con lo observado en la microscopía. La familia Rivulariaceae, -en específico los géneros *Rivularia* y *Calothrix* están bien representados y dominan zonas superficiales, lo que concuerda con trabajos previos (Couradeau et al. 2011). El género *Scitonematopsis* observado por microscopía no se encontró en secuencias de ningún tipo por lo que se descartó. Cabe aclarar que los cultivos aislados de *Rivularia* sp. sí se secuenciaron, pero sus secuencias fueron de mala calidad por lo que no se agregaron al árbol.

### *Chroococcidopsidales y Pleurocapsales*

Para el orden de Chroococcidopsidales se encontraron 2 OTUs cercanos en la librería de clonas de 20 metros de profundidad. En cambio, para el orden Pleurocapsales se encontró una gran descripción de OTUs distribuidos en todas las profundidades; lo cual coincide con las observaciones por microscopía. Interesantemente, el cultivo identificado como *Pleurocapsa* sp. se soporta bien (bootstrap de 95) dentro de secuencias tipo del género *Xenococcus* sp. Esto cuadra con las observaciones a microscopio, ya que las Pleurocapsales se encuentran distribuidas en todas las profundidades y sus abundancias aumentan a profundidades mayores de 20 metros. En trabajos previos en las microbialitas de Alchichica se ha mencionado su presencia (Couradeau et al. 2011).

### *Oscillatoriales*

Para el orden Oscillatoriales corresponden secuencias de un cultivo identificado como *Phormidium* sp., así como 3 OTUs de la librería de clonas (z=3 m). La clasificación de este Orden es un ejemplo de la complejidad histórica que representa la taxonomía de cianobacterias, ya que hay grupos de investigación que clasifican a *Leptolyngbya* dentro de Oscillatoriales y en la clasificación empleada para este trabajo se consideran como Synechococcales (Komarék 2014). Cabe aclarar que la secuencia del cultivo *Phormidium* tiene la misma similitud (93%) entre una secuencia tipo de *Leptolyngbya* (*Leptolyngbya* sp. CENA134) y una secuencia tipo *Phormidium* (*Phormidium* sp. NTDV11). En un inicio el cultivo obtenido también fue clasificado como *Leptolyngbya* por su tamaño, pero fue reclasificado debido a la presencia de necridios, lo que permitió diferenciar a este cultivo como un *Phormidium* sp. pequeño. Aún debe esclarecerse la base de datos de la secuencia *Leptolyngbya* sp. CENA134 (GenBank: HQ730083.1), ya que viendo el árbol en general, este cultivo tiene mayor coherencia dentro del grupo Oscillatoriales.

### *Chroococcales*

En el orden Chroococcales se encontraron similitudes con *Prochlorococcus* y *Cyanobium* en todas las profundidades. También se encontraron secuencias de *Chroococcus*, *Synechocystis* y *Halomicronema* en superficie, es importante mencionar que, aunque se obtuvo un cultivo de *Pseudoanabaena* sp, este no correspondió con secuencias de librería de clonas pero si con MiSeq,

## *Synechococcales*

El orden de *Synechococcales* fue el más diverso y pudo distinguirse claramente un cultivo de *Nodosilinea nodulosa* y otras especies de *Nodosilinea* en profundidades de 3 y 10 metros. También pudo identificarse el cultivo de *Oculatella* sp. En las secuencias MiSeq se identificaron grupos de *Acharyochloris* y *Leptolyngbya* (z=3 m). El resto de la diversidad se distribuyó en picocianobacterias como *Synechococcus* y otros géneros aún no descritos con una baja similitud con las secuencias tipo. No se pudieron obtener cultivos monocianobacteriales de estas picocianobacterias, aunque en muestras de microbialita y cultivos se observaron constantemente, por su pequeño tamaño no pudieron llegarse a separar muchas cianobacterias del orden *Synechococcales*. En ninguna de las secuencias de librería de clonas y MiSeq de microbialitas se identificó *Gloeomargarita*, como se ha reportado en trabajos previos. Sin embargo, en el grupo de trabajo sí se pudo identificar *Gloeomargarita* mediante secuenciación masiva pero en muestras de sedimentos superficiales (0-1 cm) obtenidas a 30 m de profundidad.

## **7.5 Problemas de anotación en las bases de datos y reclasificación de grupos cianobacterianos**

El problema con los estudios previos a 2013, radica en reasignaciones a diferentes órdenes de cianobacterias. Por ejemplo, *Leptolyngbya* sp., una de las cianobacterias más abundantes en superficie fue descrita dentro del orden Oscillatoriales en el trabajo de Couradeau et al. (2011), cuando en la nueva clasificación pertenece a *Synechococcales* (Komáreck 2014). Igualmente, trabajos previos que han hecho énfasis en una gran diversidad de Oscillatoriales deben revisarse con cuidado y tomar en consideración la nueva clasificación. En concreto especies dentro de los órdenes Gloeobacterales, Oscillatoriales, *Synechococcales* y Chroococcales. Muchos de los análisis metagenómicos toman estas bases de datos en automático, considerando ensayos de abundancias relativas sin una revisión de clasificaciones por secuencia ni contrastes en muestras por microscopía. Lo anterior puede generar una mala interpretación o mala caracterización de grupos cianobacterianos reportados.

También existen secuencias tipo y secuencias de OTUs no cultivados anotadas de manera diferencial entre NCBI y GreenGenes. Estas secuencias que no han pasado por una revisión minuciosa, es por esto que, aunque las técnicas moleculares aportan sustancialmente conocimiento de la diversidad microbiana a *grosso modo*, deben ser en la medida de lo posible contrastadas con técnicas de microscopía y cultivo. Así, las secuencias deben anotarse debidamente y evitar mal interpretaciones como es el caso de muchos géneros en el orden Chroococcales, tal como *Acharyochloris*, que siempre aparece en todos los análisis.

Es importante evaluar constantemente los diferentes morfotipos en cultivos y adaptaciones debido a que muchas de las clasificaciones aún se basan en características morfológicas. Para técnicas moleculares se ha sugerido incluso que un *Cut-off* al 95% para asignar entidades a nivel género en cianobacterias puede no ser suficiente (Stackebrandt & Ebers 2006). Fue gracias a los cultivos secuenciados que se pudo dar mayor coherencia a los árboles filogenéticos obtenidos.

En este trabajo con el arreglo de técnicas utilizadas, se pudo corroborar la presencia de la mayoría de especies identificadas en otros estudios (Tavera et al. 1997, Kaźmierczak et al. 2011, Couradeau et al. 2011). Encontramos el mismo patrón y diversidad de cianobacterias en donde *Calothrix cf parietina* y *Rivularia sp* dominan zonas superficiales de 3 y 10 m, donde sus abundancias van decreciendo en profundidades de 20 y 30 metros. Por otra parte *Xenococcus candelariae*, *Stanieria sp*, *Chroococcidium gelatinosum* y *Pleurocapsa sp*, se encuentran en todas las profundidades y son el orden dominante a profundidades de 30 m, aunque en biomasa también se encuentre abundantemente clorofitas. Para contrastar las caracterizaciones tanto de microscopía de microbialitas, cultivos, librería de clonas y secuencias obtenidas por secuenciación masiva, se realizó una tabla comparativa de ausencia presencia (Tabla 11).

**Tabla 12. Tabla comparativa de detección de cianobacterias en microbialitas del lago Alchichica por diferentes metodologías.**

		Microscopía	Cultivos	Librería de clonas	MiSeq
Nostocales	<i>Calothrix cf parietina</i>	X		x	X
	<i>Rivularia</i>	X	x	X	x
Pleurocapsales	<i>Xenococcus candelarie</i>	X		X	X
	<i>Stanieria sp.</i>	X	x	X	x
	<i>Chroococcidium gelatinosum</i>	X	x	X	
	<i>Pleurocapsa sp.</i>	X	x	x	X
Chroococcidopsidales	<i>Chroococciopsis sp.</i>	X	x		
Synechococcales	<i>Chroococcus cf schizodermaticus</i>	X			X
	<i>Cyanobium sp.</i>	X	x	x	X
	<i>Synechococcus sp.</i>	X	x		X
	<i>Leptolyngbya sp.</i>	X	x	x	X
	<i>Pseudoanabaena sp.</i>	X	x		X
	<i>Oculatella sp.</i>	X	x		X
	<i>Nodosilinea sp.</i>	x	x	x	X
	<i>Acharyochloris</i>			x	X
	<i>Gloeomargarita</i>				X
Oscillatoriales	<i>Oscillatoria</i>				X
	<i>Phormidium</i>	X	x	x	X
Chroococcales	<i>Gloeocapsa sp.</i>	X			
	<i>Aphanothece sp</i>	X			X
	<i>Entophysalis sp</i>	X			
	<i>Microcystis sp</i>	X			
	<i>Chlorogloea sp.</i>	X			X

## 8 CONCLUSIONES

Se encontró una clara asociación funcional/taxonómica de cianobacterias a profundidades específicas. *Calothrix cf parietina* y *Rivularia sp.* están asociadas a superficie junto con *Leptolyngbya sp.* y otras cianobacterias filamentosas, mientras que *Xenococcus candelaria*, *Stanieria sp.*, *Chroococcidium gelatinosum* y *Pleurocapsa sp.* se encuentran en todas las profundidades con abundancias dominantes en profundidades mayores a 10 metros. *Synechococcus sp.* *Cyanobium sp.* y otras picocianobacterias se encuentran distribuidas en todas las profundidades sin un patrón de distribución específico.

Es probable que la formación de microbialitas del lago cráter Alchichica esté dada en mayor medida por precipitación extracelular de cianobacterias Pleurocapsales, como *Xenococcus candelaria*, *Stanieria sp.* *Pleurocapsa sp.* y *Chroococcidium gelatinosum* sean clave en los procesos de litificación a profundidades de 20 y 30 m.

Las técnicas microscópicas y moleculares fueron útiles y complementarias (tanto para métodos independientes de cultivo como dependientes de cultivo) para describir la diversidad de cianobacterias asociadas a microbialitas en un gradiente de profundidad. Las picocianobacterias deben ser sometidas a una microscopía de mayor resolución, ya que los análisis moleculares sí las detectan y muchas de estas secuencias pueden ser nuevos géneros en el orden de Chroococcales y Synechococcales.

## 9 Perspectivas

Se necesita continuar la identificación de cultivos por técnicas bioquímicas y moleculares que den mayor resolución en la descripción a nivel especie; así como es necesario establecer un cepario de los cultivos ya aislados, para futuros trabajos. Es de especial interés la caracterización del cultivo en matraz del consorcio de Pleurocapsales para análisis metagenómicos, pruebas de mineralogía y ensayos fisiológicos, dado que no existen estudios previos que dilucidan los procesos fisiológicos en Pleurocapsales relacionados con la precipitación de carbonatos y formación de microbialitas en el lago cráter Alchichica.

## 9 BIBLIOGRAFÍA

- Acreman, J. (1994). Algae and cyanobacteria: isolation, culture and long-term maintenance. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*, 13(3), 193-194.
- Akkermans, A. D., Van Elsas, J. D., & De Bruijn, F. J. (Eds.). (1995). *Molecular microbial ecology manual* (No. C/576.15 M6). Dordrecht, The Netherlands: Kluwer academic publishers.
- Alcántara-Hernández, R. J., Valdespino-Castillo, P. M., Centeno, C. M., Alcocer, J., Merino-Ibarra, M., & Falcón, L. I. (2017). Genetic diversity associated with N-cycle pathways in microbialites from Lake Alchichica, Mexico. *Aquatic Microbial Ecology*, 78(2), 121-133.
- Alcocer, J., & Lugo, A. (2003). Effects of El Niño on the dynamics of Lake Alchichica, central Mexico. *Geofísica Internacional*, 42(3), 523-528.
- Alcocer, J., Escobar, E., & Oseguera, L. A. (2008). Acoplamiento pelágico-bentónico: respuesta de la zona bentónica profunda a la sedimentación del florecimiento invernal de diatomeas en el lago oligotrófico Alchichica, Puebla, México. *Hidrobiológica*, 18, 115-122.
- Alvarenga, D. O., Fiore, M. F., & Varani, A. M. (2017). A metagenomic approach to cyanobacterial genomics. *Frontiers in microbiology*, 8, 809.
- Armienta, M. A., Vilaclara, G., De la Cruz-Reyna, S., Ramos, S., Cenicerros, N., Cruz, O. & Arcega-Cabrera, F. (2008). Water chemistry of lakes related to active and inactive Mexican volcanoes. *Journal of Volcanology and Geothermal Research*, 178(2), 249-258.
- Arp, G., Hofmann, J., & Reitner, J. (1998). Microbial fabric formation in spring mounds ("microbialites") of alkaline salt lakes in the Badain Jaran sand sea, PR China. *Palaios*, 13(6), 581-592.
- Arp, G., Reimer, A., & Reitner, J. (2003). Microbialite formation in seawater of increased alkalinity, Satonda Crater Lake, Indonesia. *Journal of sedimentary research*, 73(1), 105-127.
- Arp, G., Thiel, V., Reimer, A., Michaelis, W., & Reitner, J. (1999). Biofilm exopolymers control microbialite formation at thermal springs discharging into the alkaline Pyramid Lake, Nevada, USA. *Sedimentary Geology*, 126(1-4), 159-176.
- Awramik SM Precambrian columnar stromatolite diversity: reflection of metazoan appearance: *Science* (1971) 174: 825-827.
- Baumgartner LK, Reid RP, Drupaz C, Decho AW, Buckley DH. Et al. Sulfate reducing bacteria in microbial mats: Changing paradigms. *New discoveries, Sedimentary Geology* (2006) 185: 131-145.
- Behrendt, L., Larkum, A. W., Norman, A., Qvortrup, K., Chen, M., Ralph, P., & Kühl, M. (2011). Endolithic chlorophyll d-containing phototrophs. *The ISME journal*, 5(6), 1072.
- Berelson WM, Corsetti FA, Pepe-Ranney C, Hammond DE, Beaumont W, Spear JR. Hot spring siliceous stromatolites from Yellowstone National Park: assessing growth rate and laminae formation. *Geobiology*(2011) 9:411–424.
- Bernhard JM, Edgcomb VP, Visscher PT, McIntyre-Wressnig A, Summons, et al. Insights into foraminiferal influences on microfabrics of microbialites at Highborne Cay, Bahamas. *PNAS* (2013) 110: 9830-9834.

- Binnig, G., Rohrer, H., Gerber, C., & Weibel, E. (1982). Surface studies by scanning tunneling microscopy. *Physical review letters*, 49(1), 57.
- Bodrossy, L., & Sessitsch, A. (2004). Oligonucleotide microarrays in microbial diagnostics. *Current opinion in microbiology*, 7(3), 245-254.
- Bouton, A., Vennin, E., Pace, A., Bourillot, R., Dupraz, C., Thomazo, C. & Visscher, P. T. (2016). External controls on the distribution, fabrics and mineralization of modern microbial mats in a coastal hypersaline lagoon, Cayo Coco (Cuba). *Sedimentology*, 63(4), 972-1016.
- Braissant O, Decho AW, Dupraz C, Glunk C, Przekop KM, et al. Exopolymeric substances of sulfatereducing bacteria: Interactions with calcium at alkaline pH and implication for formation of carbonate minerals. *Geobiology*(2007) 5: 401-411.
- Breitbart, M., Hoare, A., Nitti, A., Siefert, J., Haynes, M., Dinsdale, E. & Hollander, D. (2009). Metagenomic and stable isotopic analyses of modern freshwater microbialites in Cuatro Ciénegas, Mexico. *Environmental microbiology*, 11(1), 16-34.
- Brocke, H. J., Polerecky, L., De Beer, D., Weber, M., Claudet, J., & Nugues, M. M. (2015). Organic matter degradation drives benthic cyanobacterial mat abundance on Caribbean coral reefs. *PLoS One*, 10(5), e0125445.
- Büdel, B. (2011). Cyanobacteria: habitats and species. In *Plant desiccation tolerance* (pp. 11-21). Springer Berlin Heidelberg.
- Burne R. V., Moore LS *Microbialites: Organosedimentary Deposits of Benthic Microbial Communities*. *PALAIOS* (1987) 2:241–254.
- Burne, R. V., Moore, L. S., Christy, A. G., Troitzsch, U., King, P. L., Carnerup, A. M., & Hamilton, P. J. (2014). Stevensite in the modern thrombolites of Lake Clifton, Western Australia: A missing link in microbialite mineralization. *Geology*, 42(7), 575-578.
- Burns, B. P., Goh, F., Allen, M., & Neilan, B. A. (2004). Microbial diversity of extant stromatolites in the hypersaline marine environment of Shark Bay, Australia. *Environmental Microbiology*, 6(10), 1096-1101.
- Caporaso J Gregory, Christian L Lauber, William A Walters, et al. Ultra-high-throughput microbial community analysis on the IlluminaHiSeq and MiSeq platforms. *ISME Journal* (2012) 6, 1621–1624
- Centeno CM, Legendre P, Beltran Y, Alcántara-Hernández RJ, Lidstroem UE, Ashby MN, Falcón L. I. Microbialite genetic diversity and composition relate to environmental variables. *FEMS MicrobiolEcol* (2012) 82:724–735.
- Chen & Blankenship, *Trends Plant Sci* 16: 427-431, 2011; Li et al., *BBA Bioenergetics*, 2012; Porra et al., *BBA Bioenergetics* 975: 384-394, 1989
- Chen, H., Fu, L., Luo, L., Lu, J., White, W. L., & Hu, Z. (2012). Induction and resuscitation of the viable but nonculturable state in a cyanobacteria-lysing bacterium isolated from cyanobacterial bloom. *Microbial ecology*, 63(1), 64-73.

- Chen, M., Li, Y., Birch, D., & Willows, R. D. (2012). A cyanobacterium that contains chlorophyll f—a red-absorbing photopigment. *FEBS letters*, 586(19), 3249-3254.
- Coordinators, N. R. (2016). Database resources of the national center for biotechnology information. *Nucleic acids research*, 44(Database issue), D7.
- Couradeau E, Benzerara K, Moreira D, Gérard E, Kaźmierczak J, Tavera R, López-García P. Prokaryotic and eukaryotic community structure in field and cultured microbialites from the alkaline Lake Alchichica (Mexico). *PLoS ONE* (2011) 6:e28767.
- Cuvelier, M. L., Allen, A. E., Monier, A., McCrow, J. P., Messié, M., Tringe, S. G. & Binder, B. J. (2010). Targeted metagenomics and ecology of globally important uncultured eukaryotic phytoplankton. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 107(33), 14679-14684.
- Danino, D., Bernheim-Groswasser, A., & Talmon, Y. (2001). Digital cryogenic transmission electron microscopy: an advanced tool for direct imaging of complex fluids. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, 183, 113-122.
- Denk, W., Strickler, J. H., & Webb, W. W. (1990). Two-photon laser scanning fluorescence microscopy. *Science*, 248(4951), 73-76.
- Drupaz C, Reid RP, Braissant O, Decho AW, Norman RS, et al. (2009) Processes of carbonate precipitation in modern microbial mats. *Earth Science Reviews* 96: 141-162.
- Dupraz, C., Reid, R. P., & Visscher, P. T. (2011). Microbialites, modern. In *Encyclopedia of Geobiology* (pp. 617-635). Springer, Dordrecht.
- Falcón, L. I., Cerritos, R., Eguiarte, L. E., & Souza, V. (2007). Nitrogen fixation in microbial mat and stromatolite communities from Cuatro Ciénegas, Mexico. *Microbial ecology*, 54(2), 363-373.
- Falcón, L (2017) México, Comunidades bacterianas: estromatolitos, microbialitos, trombolitos, fijación de nutrientes y carbono, producción y respiración Ecosur 2. <http://200.34.194.65/ecosur2/img/files/Ponencias%20Taller%20Eris/COMUNIDADES%20BACTERIANAS%20ESTROMATOLITOS%20Dra%20Luisa%20Falcon.pdf>
- Flannery, D. T., & Walter, M. R. (2012). Archean tufted microbial mats and the Great Oxidation Event: new insights into an ancient problem. *Australian Journal of Earth Sciences*, 59(1), 1-11.
- Foster, J. S., Green, S. J., Ahrendt, S. R., Golubic, S., Reid, R. P., Hetherington, K. L., & Bebout, L. (2009). Molecular and morphological characterization of cyanobacterial diversity in the stromatolites of Highborne Cay, Bahamas. *The ISME journal*, 3(5), 573.
- Frantz, C. M., Petryshyn, V. A., & Corsetti, F. A. (2015). Grain trapping by filamentous cyanobacterial and algal mats: implications for stromatolite microfabrics through time. *Geobiology*, 13(5), 409-423.
- Gaby, J. C., & Buckley, D. H. (2014). A comprehensive aligned nifH gene database: a multipurpose tool for studies of nitrogen-fixing bacteria. *Database*, 2014, bau001.
- Gérard, E., Ménez, B., Couradeau, E., Moreira, D., Benzerara, K., Tavera, R., & López-García, P. (2013). Specific carbonate–microbe interactions in the modern microbialites of Lake Alchichica (Mexico). *The ISME journal*, 7(10), 1997.



- Gischler, E., Gibson, M. A., & Oschmann, W. (2008). Giant holocene freshwater microbialites, laguna bacalar, quintana roo, Mexico. *Sedimentology*, 55(5), 1293-1309.
- Glunk C, Dupraz C, Braissant O, Gallagher KL, Verrecchia EP, Visscher PT (2011) Microbially mediated carbonate precipitation in a hypersaline lake, Big Pond (Eleuthera, Bahamas). *Sedimentology* 58:720–736.
- Goldberg, C. S., Turner, C. R., Deiner, K., Klymus, K. E., Thomsen, P. F., Murphy, M. A., ... & Laramie, M. B. (2016). Critical considerations for the application of environmental DNA methods to detect aquatic species. *Methods in Ecology and Evolution*, 7(11), 1299-1307.
- Gugger, M. F., & Hoffmann, L. (2004). Polyphyly of true branching cyanobacteria (Stigonematales). *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 54(2), 349-357.
- Heijs, S. K., Haese, R. R., Van der Wielen, P. W., Forney, L. J., & Van Elsas, J. D. (2007). Use of 16S rRNA gene based clone libraries to assess microbial communities potentially involved in anaerobic methane oxidation in a Mediterranean cold seep. *Microbial Ecology*, 53(3), 384-398.
- Heather, J. M., & Chain, B. (2016). The sequence of sequencers: the history of sequencing DNA. *Genomics*, 107(1), 1-8.
- Hernández M. , Mariné, E. Clavero & M. Roldán (2004) Microscopy methods applied to research on cyanobacteria *Limnetica* 23(1-2): 179-186 ISSN: 0213-8409
- Hoffman, R., & Gross, L. (1970). Reflected-light differential-interference microscopy: principles, use and image interpretation. *Journal of microscopy*, 91(3), 149-172.
- Hoffmann, L., Komárek, J., & Kaštovský, J. (2005). System of cyanoprokaryotes (cyanobacteria)—state in 2004. *Algological Studies*, 117(1), 95-115.
- Hoiczyk, E., & Hansel, A. (2000). Cyanobacterial cell walls: news from an unusual prokaryotic envelope. *Journal of bacteriology*, 182(5), 1191-1199.
- Kawata, Y., Yano, S. I., & Kojima, H. (1998). Construction of a genomic DNA library with a TA vector and its application in cloning of the phytoene synthase gene from the cyanobacterium *Spirulina platensis* M-135. *Chinese Journal of Oceanology and Limnology*, 16(1), 17-24.
- Kaźmierczak, J., Fenchel, T., Kühn, M., Kempe, S., Kremer, B., Łącka, B., & Małkowski, K. (2015). CaCO<sub>3</sub> precipitation in multilayered cyanobacterial mats: clues to explain the alternation of micrite and sparite layers in calcareous stromatolites. *Life*, 5(1), 744-769.
- Kaźmierczak, J., Kempe, S., Kremer, B., López-García, P., Moreira, D., & Tavera, R. (2011). Hydrochemistry and microbialites of the alkaline crater lake Alchichica, Mexico. *Facies*, 57(4), 543-570.
- Kempe, S., Kazmierczak, J., Landmann, G., Konuk, T., Reimer, A., & Lipp, A. (1991). Largest known microbialites discovered in Lake Van, Turkey. *Nature*, 349(6310), 605.
- Kent, W. J. (2002). BLAT—the BLAST-like alignment tool. *Genome research*, 12(4), 656-664.
- Klindworth, A., Pruesse, E., Schweer, T., Peplies, J., Quast, C., Horn, M., & Glöckner, F. O. (2013). Evaluation of general 16S ribosomal RNA gene PCR primers for classical and next-generation sequencing-based diversity studies. *Nucleic acids research*, 41(1), e1-e1.

- Knoll, A. H., & Nowak, M. A. (2017). The timetable of evolution. *Science advances*, 3(5), e1603076.
- Komárek, J. (2006). Cyanobacterial taxonomy: current problems and prospects for the integration of traditional and molecular approaches. *ALGAE-INCHON-*, 21(4), 349.
- Komárek, J., Kaštovský, J., Mareš, J., & Johansen, J. R. (2014). Taxonomic classification of cyanoprokaryotes (cyanobacterial genera) 2014, using a polyphasic approach. *Preslia*, 86(4), 295-335.
- Kühl, M., Chen, M., Ralph, P. J., Schreiber, U., & Larkum, A. W. (2005). Ecology: a niche for cyanobacteria containing chlorophyll d. *Nature*, 433(7028), 820-820.
- Lane, D.J. 1991. 16S/23S rRNA sequencing. In: *Nucleic acid techniques in bacterial systematics*. Stackebrandt, E., and Goodfellow, M., eds., John Wiley and Sons, New York, NY, pp. 115-175.
- Larsson, J., Nylander, J. A., & Bergman, B. (2011). Genome fluctuations in cyanobacteria reflect evolutionary, developmental and adaptive traits. *BMC Evolutionary Biology*, 11, 187. <http://doi.org/10.1186/1471-2148-11-187>
- Laval B, Cady SL, Pollack JC, McKay CP, Bird JS Modern freshwater microbialite analogues for ancient dendritic reef structures. *Nature* (2000) 407:626–629.
- Leung, B. O., & Chou, K. C. (2011). Review of super-resolution fluorescence microscopy for biology. *Applied spectroscopy*, 65(9), 967-980.
- Léveillé, R. J., Fyfe, W. S., & Longstaffe, F. J. (2000). Geomicrobiology of carbonate–silicate microbialites from Hawaiian basaltic sea caves. *Chemical Geology*, 169(3-4), 339-355.
- López-García, P., Kazmierczak, J., Benzerara, K., Kempe, S., Guyot, F., & Moreira, D. (2005). Bacterial diversity and carbonate precipitation in the giant microbialites from the highly alkaline Lake Van, Turkey. *Extremophiles*, 9(4), 263-274.
- López-García, P., Kazmierczak, J., Benzerara, K., Kempe, S., Guyot, F., & Luna, G. M., Dell'Anno, A., & Danovaro, R. (2006). DNA extraction procedure: a critical issue for bacterial diversity assessment in marine sediments. *Environmental Microbiology*, 8(2), 308-320.
- Marchesi, J. R., Sato, T., Weightman, A. J., Martin, T. A., Fry, J. C., Hiom, S. J., & Wade, W. G. (1998). Design and evaluation of useful bacterium-specific PCR primers that amplify genes coding for bacterial 16S rRNA. *Applied and environmental microbiology*, 64(2), 795-799.
- Merz, M. U. E., 1992. The biology of carbonate precipitation by cyanobacteria. *Facies*, 26, 81–102.
- Møller, C. L., Vangsøe, M. T., & Sand-Jensen, K. (2014). Comparative growth and metabolism of gelatinous colonies of three cyanobacteria, *Nostoc commune*, *Nostoc pruniforme* and *Nostoc zetterstedtii*, at different temperatures. *Freshwater biology*, 59(10), 2183-2193.
- Moran J, et al Spatially tracking 13C-labelled substrate (bicarbonate) accumulation in microbial communities using laser ablation isotope ratio mass spectrometry *Environmental Microbiology Reports* (2014) 6(6), 786–79
- Moreira, D. (2005). Bacterial diversity and carbonate precipitation in the giant microbialites from the highly alkaline Lake Van, Turkey. *Extremophiles*, 9(4), 263-274.

- Nadell, C. D., Xavier, J. B., Levin, S. A., & Foster, K. R. (2008). The evolution of quorum sensing in bacterial biofilms. *PLoS biology*, 6(1), e14.
- Neilan, B. A. (1995). Identification and phylogenetic analysis of toxigenic cyanobacteria by multiplex randomly amplified polymorphic DNA PCR. *Applied and environmental microbiology*, 61(6), 2286-2291.
- Nina A. Kamennaya, Caroline M. Ajo-Franklin, Trent Northen and Christer Jansson \* Cyanobacteria as Biocatalysts for Carbonate Mineralization *Minerals* (2012) 2(4), 338-364.
- Nübel, U., Garcia-Pichel, F., and Muyzer, G. 1997. PCR primers to amplify 16S rRNA genes from cyanobacteria. *Applied and Environmental Microbiology* 63: 3327–3332.
- Palinska Katarzyna A., Krumbein Wolfgang, E., 1998 Axenic cultures of cyanobacteria obtaining methods and associated problems *Oceanological Studies* 1(69-78) ISSN 1505-232X.
- Pannard, A., Pédrone, J., Bormans, M., Briand, E., Claquin, P., & Lagadeuc, Y. (2016). Production of exopolymers (EPS) by cyanobacteria: impact on the carbon-to-nutrient ratio of the particulate organic matter. *Aquatic ecology*, 50(1), 29-44.
- Pluta, M., & Maksymilian, P. (1988). *Advanced light microscopy* (Vol. 1, pp. 339-340). Amsterdam: Elsevier.
- Power, I. M., Wilson, S. A., Dipple, G. M., & Southam, G. (2011). Modern carbonate microbialites from an asbestos open pit pond, Yukon, Canada. *Geobiology*, 9(2), 180-195.
- Quail, M. A., Matthews, L., Sims, S., Lloyd, C., Beasley, H., & Baxter, S. W. (2012). Genomic libraries: II. Subcloning, sequencing, and assembling large-insert genomic DNA clones. In *Molecular Methods for Evolutionary Genetics* (pp. 59-81). Humana Press.
- Quince, C., Walker, A. W., Simpson, J. T., Loman, N. J., & Segata, N. (2017). Shotgun metagenomics, from sampling to analysis. *Nature biotechnology*, 35(9), 833.
- Reid, R. P., James, N. P., Macintyre, I. G., Dupraz, C. P., & Burne, R. V. (2003). Shark Bay stromatolites: microfabrics and reinterpretation of origins. *Facies*, 49(1), 299.
- Reitner, J., Arp, G., Thiel, V., Gautret, P., Galling, U., & Michaelis, W. (1997). Organic matter in Great Salt Lake ooids (Utah, USA)-First approach to a formation via organic matrices. *Facies*, 36, 210-219.
- Reitner, J., Quéric, N. V., & Arp, G. (2011). *Advances in stromatolite geobiology*, Springer (Vol. 131, 237-239).
- Rezende, M. F., & Pope, M. C. (2015). Importance of depositional texture in pore characterization of subsalt microbialite carbonates, offshore Brazil. *Geological Society, London, Special Publications*, 418(1), 193-207.
- Riding, R. 2011. Microbialites, stromatolites, and thrombolites. In J. Reitner and V. Thiel (eds). *Encyclopedia of Geobiology. Encyclopedia of Earth Science Series*, Springer, Heidelberg, 635-654.
- Rippka, R., Deruelles, J., Waterbury, J. B., Herdman, M., & Stanier, R. Y. (1979). Generic assignments, strain histories and properties of pure cultures of cyanobacteria. *Microbiology*, 111(1), 1-61.

- Rogers & Kadner 2018 Classification by morphology, biochemistry, and other features Encyclopædia Britannica <https://www.britannica.com/science/bacteria/Classification-by-morphology-biochemistry-and-other-features>
- Russell, J. A., Brady, A. L., Cardman, Z., Slater, G. F., Lim, D. S. S., & Biddle, J. F. (2014). Prokaryote populations of extant microbialites along a depth gradient in Pavilion Lake, British Columbia, Canada. *Geobiology*, 12(3), 250-264.
- Sanger, F., & Coulson, A. R. (1978). The use of thin acrylamide gels for DNA sequencing. *FEBS letters*, 87(1), 107-110.
- Savichtcheva, O., Debroas, D., Kurmayer, R., Villar, C., Jenny, J. P., Arnaud, F. & Domaizon, I. (2011). Quantitative PCR enumeration of total/toxic *Planktothrix rubescens* and total cyanobacteria in preserved DNA isolated from lake sediments. *Applied and environmental microbiology*, 77(24), 8744-8753.
- Schirmer, B. E., de Vos, J. M., Antonelli, A., & Bagheri, H. C. (2013). Evolution of multicellularity coincided with increased diversification of cyanobacteria and the Great Oxidation Event. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 110(5), 1791-1796.
- Schloss, P.D., et al., Introducing mothur: Open-source, platform-independent, community-supported software for describing and comparing microbial communities. *Appl Environ Microbiol*, 2009. 75(23):7537-41.
- Schuster, S. C. (2007). Next-generation sequencing transforms today's biology. *Nature methods*, 5(1), 16.
- Shah, N., Tang, H., Doak, T. G., & Ye, Y. (2011). Comparing bacterial communities inferred from 16S rRNA gene sequencing and shotgun metagenomics. In *Biocomputing 2011* (pp. 165-176).
- Shih, P. M., Wu, D., Latifi, A., Axen, S. D., Fewer, D. P., Talla, E. & Herdman, M. (2013). Improving the coverage of the cyanobacterial phylum using diversity-driven genome sequencing. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 110(3), 1053-1058.
- Singer, E., Bushnell, B., Coleman-Derr, D., Bowman, B., Bowers, R. M., Levy, A. & Hallam, S. J. (2016). High-resolution phylogenetic microbial community profiling. *The ISME journal*, 10(8), 2020.
- Snigirev, A., Snigireva, I., Kohn, V., Kuznetsov, S., & Schelokov, I. (1995). On the possibilities of x-ray phase contrast microimaging by coherent high-energy synchrotron radiation. *Review of scientific instruments*, 66(12), 5486-5492.
- Solari, M. A., Hervé, F., Le Roux, J. P., Airo, A., & Sial, A. N. (2010). Paleoclimatic significance of lacustrine microbialites: A stable isotope case study of two lakes at Torres del Paine, southern Chile. *Palaeogeography, Palaeoclimatology, Palaeoecology*, 297(1), 70-82.
- Stuart, R. K., Mayali, X., Lee, J. Z., Everroad, R. C., Hwang, M., Bebout, B. M. & Thelen, M. P. (2015). Cyanobacterial reuse of extracellular organic carbon in microbial mats. *The ISME journal*, 10(5), 1240.
- Summons, R. E., Jahnke, L. L., Hope, J. M., & Logan, G. A. (1999). 2-Methylhopanoids as biomarkers for cyanobacterial oxygenic photosynthesis. *Nature*, 400(6744), 554.

- Tavera, R., & Komárek, J. (1996). Cyanoprokaryotes in the volcanic lake of Alchichica, Puebla State, Mexico. *Arch. Hydrobiol.(Suppl.)(Algol. Stud.)*, 117, 511-538.
- Trampe, E., & Kùhl, M. (2016). Chlorophyll f distribution and dynamics in cyanobacterial beachrock biofilms. *Journal of phycology*, 52(6), 990-996.
- Torres J (2017) Detección y caracterización molecular de las bacterias sulfato reductoras en microbialitas de un lago cráter alcalino de México (Tesis maestría) Posgrado en Ciencias del Mar y Limnología UNAM México
- Turner, S., Pryer, K.M., Miao, V.P.W., and Palmer, J.D. 1999. Investigating deep phylogenetic relationships among cyanobacteria and plastids by small subunit rRNA sequence analysis. *Journal of Eukaryotic Microbiology* 46: 327–338.
- Unakar, N. J., Tsui, J. Y., & Harding, C. V. (1981). Scanning electron microscopy. *Ophthalmic Research*, 13(1), 20-35.
- Vartoukian Sonia R., Palmer Richard M., William G. Wade Strategies for culture of 'unculturable' bacteria *Microbiology Letters* Volume 309, Issue 1 August 2010 Pages 1–7 DOI: 10.1111/j.1574-6968.2010.02000
- Vermaas Wim FJ (2001) Photosynthesis and Respiration in Cyanobacteria. *Encyclopedia of life sciences* Macmillan Publishers Ltd, Nature Publishing Group / www.els.net DOI: 10.1038/npg.els.0001670
- Wang Q, A. S. Kulam-Syed-Mohideen, D. M. McGarrell, A. M. Bandela, E. Cardenas, G. M. Garrity, and J. M. Tiedje The ribosomal database project (RDP-II): introducing myRDP space and quality controlled public data *Nucl. Acids Research* (2007)5:169-172.
- Wang, Y., & Qian, P. Y. (2009). Conservative fragments in bacterial 16S rRNA genes and primer design for 16S ribosomal DNA amplicons in metagenomic studies. *PloS one*, 4(10), e7401.
- Webb, R. H. (1996). Confocal optical microscopy. *Reports on Progress in Physics*, 59(3), 427.
- Williams, D. B., & Carter, C. B. (1996). The transmission electron microscope. In *Transmission electron microscopy* (pp. 3-17). Springer, Boston, MA.
- Wommack, K. E., Bhavsar, J., & Ravel, J. (2008). Metagenomics: read length matters. *Applied and environmental microbiology*, 74(5), 1453-1463.
- Xiong, J., & Bauer, C. E. (2002). Complex evolution of photosynthesis. *Annual Review of Plant Biology*, 53(1), 503-521.
- Yang, B., Wang, Y., & Qian, P. Y. (2016). Sensitivity and correlation of hypervariable regions in 16S rRNA genes in phylogenetic analysis. *BMC bioinformatics*, 17(1), 135.
- Yen, H. K., Lin, T. F., & Tseng, I. C. (2012). Detection and quantification of major toxigenic *Microcystis* genotypes in Moo-Tan reservoir and associated water treatment plant. *Journal of Environmental Monitoring*, 14(2), 687-696.
- Zapomělová, E., Hrouzek, P., Řeháková, K., Šabacká, M., Stibal, M., Caisová, L., ... & Lukešová, A. (2008). Morphological variability in selected heterocystous cyanobacterial strains as a response to varied temperature, light intensity and medium composition. *Folia Microbiologica*, 53(4), 333.

Zenhausern, F., O'boyle, M. P., & Wickramasinghe, H. K. (1994). Apertureless near-field optical microscope. *Applied Physics Letters*, 65(13), 1623-1625.

Zhu Tingting, Dittrich Maria Carbonate precipitation through microbial activities in natural environment, and their potential in biotechnology: a review. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology* (2016) 4: 2296-4185.