

00366

2



**Universidad Nacional Autónoma de México**

**Posgrado del Instituto de Ciencias del Mar y Limnología  
Maestría en Biología Marina**

RECEBIDO EN EL  
INSTITUTO DE CIENCIAS DEL MAR Y LIMNOLOGIA  
EL 12 DE ABRIL DE 2000

**Efecto de la radiación ultravioleta sobre la fijación de  
nitrógeno de diversos consorcios de cianobacterias en  
el lago cráter de Alchichica, Puebla**

**T E S I S**

Que para obtener el título de Maestra en Ciencias

**PRESENTA:**

Biól. Luisa I. Falcón Alvarez

**Directora de Tesis:**

Dra. Elva G. Escobar Briones

Departamento de Sistemas Oceanográficos y Costeros, ICML UNAM

México, D.F. 2000

280366



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 del Instituto de Ciencias del Mar y Limnología  
Maestría en Biología Marina

**Efecto de la radiación ultravioleta sobre la fijación de  
nitrógeno de diversos consorcios de cianobacterias en  
el lago cráter de Alchichica, Puebla!**

TESIS

Que para obtener el título de Maestra en Ciencias

PRESENTA

Biól. Luisa I. Falcón Alvarez

Directora de Tesis:

Dra. Elva G. Escobar Briones

Departamento de Sistemas Oceanográficos y Costeros, ICML UNAM.

Jurado:

Dr. David Romero Camarena  
Programa de Genética Molecular de Plásmidos Bacterianos, CIFN UNAM

Dra. Rosa Luz Tavera Sierra  
Laboratorio de Ficología, FC UNAM

Dr. Javier Alcocer Durand  
Laboratorio de Limnología/Proyecto de Conservación y Mejoramiento del  
Ambiente/UIICSE, ENEP-Iztacala UNAM

Dr. Antonio Peña Díaz  
Departamento de Genética Molecular, IFC UNAM

Formato seguido de *Hidrobiología* (Holanda).

## Indice

Resumen.....	i
Dedicatoria.....	ii
Agradecimientos.....	iii
Lista de figuras.....	iv
Lista de tablas.....	vi
Anexos.....	viii
Introducción.....	1
<i>Fijación de nitrógeno</i> .....	2
<i>Organismos diazótrofos (Cianobacterias)</i> .....	4
<i>Las cianobacterias en la cadena trófica</i> .....	12
Area de Estudio.....	14
Antecedentes.....	16
Planteamiento del problema.....	17
Objetivos específicos e hipótesis.....	18
Métodos.....	20
<i>Método de reducción del acetileno</i> .....	20
<i>Obtención de datos preliminares y montaje de la técnica</i> .....	22
Alchichica, Puebla.	
<i>Diseño experimental</i> .....	22
<i>Obtención de unidades de etileno</i> .....	25
<i>Análisis de datos</i> .....	26

Resultados.....	27
I.    Antes del florecimiento de <i>N. cf. spumigena</i> (marzo)	
<i>Estromatolito esponjoso (ciclo de 24 horas)</i>	
a) Ausencia de radiación UV.....	27
b) Presencia de radiación UV.....	27
<i>Estromatolito columnar (ciclo de 24 horas)</i>	
a) Ausencia de radiación UV.....	28
b) Presencia de radiación UV.....	28
II.   Durante el florecimiento de <i>N. cf. spumigena</i> (mayo)	
<i>N. cf. spumigena (ciclo de 24 horas)</i>	
a) Ausencia de radiación UV.....	31
b) Presencia de radiación UV.....	31
<i>Estromatolito esponjoso</i>	
a) Ausencia de radiación UV.....	32
b) Presencia de radiación UV.....	32
<i>Estromatolito columnar</i>	
a) Ausencia de radiación UV.....	32
b) Presencia de radiación UV.....	32
III.  Después del florecimiento de <i>N. cf. spumigena</i> (julio)	
<i>Estromatolito esponjoso</i>	
a) Ausencia de radiación UV.....	34
b) Presencia de radiación UV.....	34

<i>Estromatolito columnar</i>	
a) Ausencia de radiación UV.....	35
b) Presencia de radiación UV.....	35
<i>Análisis de resultados</i> .....	36
Discusión.....	40
<i>Ciclos de 24 horas</i> .....	40
<i>Radiación UV</i> .....	43
<i>Variaciones estacionales: antes, durante y después del florecimiento de N.</i> <i>cf. spumigena</i> .....	45
<i>Comparación con otros ambientes de estudio</i> .....	45
<i>Actividad diazótrofa en el lago cráter de Alchichica: destinos posibles del</i> <i>nitrógeno reducido</i> .....	48
Conclusiones.....	50
Propuestas y Perspectivas.....	52
Referencias.....	55
Anexo 1.....	64
Anexo 2.....	67
Anexo 3.....	69

## Resumen

Alchichica es un lago cráter localizado en el estado de Puebla, México. Formas estromatolíticas están presentes en su periferia y un florecimiento de la cianobacteria *Nodularia* cf. *spumigena* se presenta anualmente durante la primavera. Este trabajo describe los patrones de fijación de nitrógeno en los estromatolitos y de la cianobacteria planctónica para un ciclo de 24 horas. Los experimentos se realizaron antes, durante y después del florecimiento de *N. cf. spumigena*. Las tasas de fijación de nitrógeno se obtuvieron mediante el método de reducción del acetileno. Se analizó el efecto de la radiación UV (por debajo de los 390 nm) sobre las tasas de fijación de nitrógeno. Los estromatolitos tuvieron picos máximos de fijación de nitrógeno de 6 a 12 y 12 a 18 horas, mientras que *N. cf. spumigena* presentó su actividad máxima de 18 a 24 horas. La radiación UV no afectó significativamente ( $p < 0.05$ ) las tasas de fijación de nitrógeno en ambos estromatolitos, pero la tendencia fue a aumentar la actividad diazótropa en su ausencia. Por el contrario, la *N. cf. spumigena* fue afectada negativamente de forma significativa ( $p < 0.05$ ) en su actividad diazótropa por la radiación UV.

## **Dedicatoria**

Porque en la distancia los extraño y recuerdo en cada momento,  
les dedico esta tesis a mis padres, abuelos y abuelas, hermanos y hermanas,  
primos y primas, tíos y tías, amigos y amigas,  
mascotas varias...

---

Papá, Mamá y Ri, son las personas más queridas y especiales para mí: a todos los admiro, quiero con todo el corazón y extraño inmensamente. A todos les agradezco además apoyarme y entusiasmarme en no importa que proyecto me invente...

Todos los demás saben que están siempre en mi corazón y que sin ustedes la vida pierde su encanto... gracias por todo.

Cris, gracias por todo amor.



## **Agradecimientos**

Este estudio fue financiado por los proyectos CONACyT 25430-T, DGAPA IN-204597 e IN-217298. El resto del apoyo fue otorgado por los Institutos de Ciencias del Mar y Limnología y Fijación de Nitrógeno de la UNAM.

Quisiera agradecer a Javier Alcocer, Laura Peralta y Luis Oseguera por su apoyo en el trabajo de campo, y por su compañerismo sin límites.

A Edgar Valencia, por toda su ayuda en el proceso de la tesis, en la búsqueda de bibliografía y en el trabajo de laboratorio.

A Cristian Ezcurdia por ser el mejor asistente de campo y laboratorio, especialmente en los experimentos de las 5:30 am...porque los intervalos de 24-6 y 6-12 hrs. son capaces de matar a cualquiera.

Agradezco muy especialmente a la coordinación de posgrado del ICMYL: Al Dr. Martín Merino por su apoyo continuo a lo largo de toda la maestría, antes y después...a Normita y Gaby.

Agradezco también a todos mis profesores y profesoras, compañeros y compañeras de clase, por hacer de esta maestría una experiencia inolvidable.

Muy especialmente agradezco al comité tutorial, a los doctores Rosa Luz Tavera, David Romero y Elva Escobar por todo su apoyo y sugerencias que son los puntos que permitieron la realización de esta tesis.

A Elva Escobar le agradezco el haber sido una excelente tutora, y tener la confianza en mi para llevar a cabo una investigación totalmente nueva para las dos, en donde su experiencia en la dinámica de diversos ambientes acuáticos fue fundamental para el planteamiento de este trabajo.

Quisiera agradecer también a los miembros del jurado, doctores Antonio Peña y Javier Alcocer, por todos sus comentarios e impresiones.

## Lista de figuras

- Figura 1.** Interacciones biogeoquímicas en un tapete microbiano (inhibición → ; sin inhibición ⇌)(Van Gernerden, 1983).....9
- Figura 2.** Situación geográfica del área de estudio (modificada de Tavera & Komárek, 1996).....14
- Figura 3.** a) estromatolito esponjoso, b) estromatolito columnar y c) florecimiento de *N. cf. spumigena* (fotografías por L. Falcón), d) tricomas de *N. cf. spumigena* (fotografía tomada de Tavera & Komárek, 1996) .....23
- Figura 4a.** Tasas de producción de  $C_2H_4$  (media y d.e.) ( $\mu\text{moles m}^{-2}\text{h}^{-1}$ ), para el estromatolito esponjoso a lo largo de un ciclo de 24 horas, en ausencia (■) y presencia (□) de radiación UV.....28
- Figura 4b.** Tasas de producción de  $C_2H_4$  (media y d.e.) ( $\mu\text{moles m}^{-2}\text{h}^{-1}$ ), para el estromatolito columnar a lo largo de un ciclo de 24 horas, en ausencia (■) y presencia (□) de radiación UV.....29
- Figura 4c.** Tasas de producción de  $C_2H_4$  (media y d.e.) ( $\mu\text{moles m}^{-2}\text{h}^{-1}$ ), para *N. cf. spumigena* a lo largo de un ciclo de 24 horas, en ausencia (■) y presencia (□) de radiación UV.....31
- Figura 5a.** Tasas de producción de  $C_2H_4$  (media y d.e.) ( $\mu\text{moles m}^{-2}\text{h}^{-1}$ ), para el estromatolito esponjoso en los intervalos de 6-12 hrs y 12-18 hrs; en ausencia (sólidos) y presencia (blancos) de radiación UV: marzo (●,○), mayo (■,□) y julio (▲,△).....34

**Figura 5b.** Tasas de producción de C<sub>2</sub>H<sub>4</sub> (media y d.e.) (μmoles m<sup>-2</sup> h<sup>-1</sup>), para el estromatolito columnar en los intervalos de 6-12 hrs y 12-18 hrs; en ausencia (sólidos) y presencia (blancos) de radiación UV: marzo (●,○), mayo (■,□) y julio (▲,Δ).....35

**Figura 6.** Patrones de fijación de nitrógeno en un ciclo de 24 horas, **a)** cianobacterias heterocíticas, **b)** cianobacterias no-heterocíticas fotótrofas aerobias y **c)** cianobacterias no-heterocíticas fotótrofas anaerobias (Según Stal, 1999).....40

## Lista de tablas

- Tabla 1.** Réplicas (n) utilizadas por intervalo de experimentación para el estromatolito esponjoso (EE), columnar (EC) y blancos.....25
- Tabla 2.** Tasas de producción de  $C_2H_4$  ( $\mu\text{moles m}^{-2} \text{h}^{-1}$ ) para un ciclo de 24 horas en estromatolitos esponjoso (EE) y columnar (EC), para tratamiento sin UV (sin UV), con UV (UV), blancos de acetileno y blancos de agua (sin  $C_2H_2$ ).....30
- Tabla 3.** Tasas de producción de  $C_2H_4$  ( $\mu\text{moles m}^{-2} \text{h}^{-1}$ ) para un ciclo de 24 horas en *N. cf. spumigena*, así como para los intervalos de 6-12 hrs y 12-18 hrs en los estromatolitos esponjoso (EE) y columnar (EC), para el tratamiento sin UV (sin UV) y con UV (UV); blancos de acetileno y blancos de agua (sin  $C_2H_2$ ).....33
- Tabla 4.** Tasas de producción de  $C_2H_4$  ( $\mu\text{moles m}^{-2} \text{h}^{-1}$ ) para los intervalos de 6-12 hrs y 12-18 hrs en los estromatolitos esponjoso (EE) y columnar (EC), para el tratamiento sin UV (sin UV) y con UV (UV); blancos de acetileno y blancos de agua (sin  $C_2H_2$ ).....36
- Tabla 5.** Actividad diazotrofa ( $\mu\text{moles } C_2H_4 \text{ m}^{-2} \text{h}^{-1}$ ) diurna (D) y nocturna (N), en estromatolitos esponjoso (EE), columnar (EC) y *N. cf. spumigena*, para tratamientos con UV (UV) y sin UV (sin UV); [media (x) y d.e.].....36
- Tabla 6.** Actividad diazotrofa ( $\mu\text{moles } C_2H_4 \text{ m}^{-2} \text{h}^{-1}$ ) para tratamientos de radiación UV en estromatolitos esponjoso (EE), columnar (EC) y *N. cf. spumigena*; [media (x) y d.e.].....38

**Tabla 7.** Actividad diazótropa ( $\mu\text{moles C}_2\text{H}_4 \text{ m}^{-2} \text{ h}^{-1}$ ) antes (marzo), durante (mayo) y después (julio) del florecimiento de *N. cf. spumigena* para tratamientos con UV (UV) y sin UV (sin UV) en estromatolitos esponjoso (EE) y columnar (EC); [media ( $\bar{x}$ ) y d.e.].....39

**Tabla 8.** Valores de fijación de nitrógeno en tapetes microbianos, estromatolitos y florecimientos en columna de agua generados por cianobacterias en diversos ambientes: a) bentónico marino, b) bentónico limnético, c) pelágico marino, d) pelágico limnético.....46

## Anexos

<b>1a.</b> Area bajo la curva ( $\mu\text{V}$ ) de etileno para experimentos realizados durante el mes de marzo de 1999.....	64
<b>1b.</b> Area bajo la curva ( $\mu\text{V}$ ) de etileno para experimentos realizados durante el mes de mayo de 1999.....	65
<b>1c.</b> Area bajo la curva ( $\mu\text{V}$ ) de etileno para experimentos realizados durante el mes de julio de 1999.....	66
<b>2a.</b> Tasas de producción de $\text{C}_2\text{H}_4$ en $\mu\text{moles m}^{-2} \text{ h}^{-1}$ calculados de los experimentos realizados durante el mes de marzo de 1999.....	67
<b>2b.</b> Tasas de producción de $\text{C}_2\text{H}_4$ en $\mu\text{moles m}^{-2} \text{ h}^{-1}$ calculados de los experimentos realizados durante el mes de mayo de 1999.....	68
<b>2c.</b> Tasas de producción de $\text{C}_2\text{H}_4$ en $\mu\text{moles m}^{-2} \text{ h}^{-1}$ calculados de los experimentos realizados durante el mes de julio de 1999.....	69
<b>3a.</b> Tasas de producción de $\text{C}_2\text{H}_4$ en $\mu\text{moles m}^{-2} \text{ h}^{-1}$ calculados de los experimentos realizados durante el mes de diciembre de 1998.....	69

## Introducción

La producción primaria en los ambientes acuáticos suele estar limitada por nutrientes entre los que destacan las formas reducidas de nitrógeno, especialmente el ion amonio ( $\text{NH}_4^+$ ) y el amoniaco ( $\text{NH}_3$ ) (Bronk et al., 1994). El caso del nitrógeno es interesante, ya que es una molécula muy abundante en la atmósfera (78%); sin embargo, su triple enlace ( $\text{N}\equiv\text{N}$ ) le confiere una gran estabilidad, siendo pocos los organismos que pueden incorporarla de manera reducida a la red trófica (Libes, 1992).

Debido a que los ciclos biogeoquímicos de los elementos en la naturaleza están relacionados entre sí desde el nivel celular hasta el ecosistémico, la disponibilidad de un elemento limitante como el nitrógeno, está determinada tanto por factores abióticos como por las relaciones tróficas presentes en el sistema (Rastettler et al., 1992).

La importancia de conocer la tasa de fijación de nitrógeno atmosférico en un ecosistema se basa en la importancia de obtener un valor inicial del nutriente (por ejemplo, amoniaco o amonio), el cual es necesario para comprender las relaciones energéticas dentro de un ecosistema. Sin embargo, aún se conoce poco acerca de la biología de los organismos fijadores de nitrógeno (diazótrofos), así como de los factores ambientales que regulan este proceso (Coyer et al., 1996). El conocer las tasas de fijación de nitrógeno atmosférico aporta información esencial para el estudio de la energética y la biogeoquímica de un ambiente.

**Fijación de nitrógeno.-** La fijación de nitrógeno es la reducción de dinitrógeno atmosférico a amoníaco (Coyer et al., 1996). Esta reacción está catalizada por la enzima nitrogenasa, la cual se compone de dos proteínas: la ferroproteína con hierro y la molibdeno-ferroproteína (MoFe) con molibdeno y hierro. En algunos tipos de bacterias fijadoras de nitrógeno, el molibdeno puede estar sustituido por vanadio (vanadio-ferroproteína) (Kirshtein et al., 1991).

La reacción de reducción de dinitrógeno atmosférico en amoníaco es la siguiente (ecuación 1):



En donde:  $\text{N}_2$  es nitrógeno,  $\text{e}^-$  los electrones,  $\text{H}^+$  los protones,  $\text{MgATP}$  es el adenosín trifosfato con  $\text{Mg}$ ,  $\text{NH}_3$  el amoníaco y  $\text{P}$  el fósforo.

El sitio de unión y de reducción del  $\text{N}_2$  está localizado, casi con seguridad, en la proteína de MoFe. Durante la catálisis, es probable que la ferredoxina se una a dos moléculas de  $\text{MgATP}$ , se reduzca, se asocie con la proteína de MoFe y le done a ésta un electrón. La reacción ocurre acoplada a la hidrólisis de ATP (Dean & Jacobson, 1992).

La fijación de nitrógeno requiere un gasto energético de por lo menos dos moléculas de  $\text{MgATP}$  por cada electrón oxidado, lo que indica la necesidad de obtener energía asimilable a partir de la fotosíntesis (Coyer et al., 1996); es decir, del metabolismo de biomoléculas como la glucosa, por ejemplo (Zehr, 1992). Además de requerir substratos energéticos, esta reacción necesita la presencia de elementos como el molibdeno, el vanadio



y el hierro (Mulder, 1975). La actividad de la nitrogenasa también está afectada por la presencia de nitratos y del amoníaco. Esta enzima se inactiva en presencia de oxígeno, el cual afecta la ferroproteína (Paerl et al., 1989) por lo que acoplar este proceso a la fotosíntesis presenta problemas.

Las tasas de fijación de nitrógeno presentan variaciones tanto diales como estacionales, que están en función de los factores ecológicos que la regulan como son: luz, radiación ultravioleta, temperatura, pH, salinidad, O<sub>2</sub>, micronutrientes y nitrógeno inorgánico (Blackburn & Sørensen, 1985). El producto final de la fijación de nitrógeno, el amoníaco, es a su vez un regulador importante, en donde la concentración intracelular de esta molécula controla de forma inversa el proceso de fijación (Stewart et al., 1975). Las condiciones que se presentan en un ambiente en relación con la concentración de nutrientes son causa de variación en la fijación de nitrógeno; se ha observado que los sistemas mesotróficos y eutróficos tienden a presentar una actividad baja, mientras que los oligotróficos suelen presentar una actividad alta de fijación de nitrógeno (Libes, 1992). Lo anterior se ha atribuido al hecho de que en los sistemas que están fuertemente limitados por la ausencia de nutrientes, un proceso tan costoso energéticamente como la fijación de nitrógeno, puede favorecerse por resultar indispensable para la incorporación de nutrientes (Libes, 1992).

**Organismos diazótrofos.-** Existen diferentes organismos diazótrofos, es decir con la capacidad de fijar nitrógeno; todos ellos forman parte de los dominios Eubacteria y Archaeobacteria, en donde las primeras llegan a presentar simbiosis con eucariontes (Sprent & Sprent, 1990). Todos los organismos diazótrofos tienen la enzima nitrogenasa y por lo tanto, los genes *nif* (Steppe et al., 1996). Existe la tendencia a creer que los organismos diazótrofos más importantes en un ecosistema son las cianobacterias ya que estas pueden combinar tanto la fijación de carbono como la fijación de nitrógeno (Olson et al., 1999). Sin embargo, estudios recientes (Olson et al., 1999) han mostrado por medio del análisis molecular de diversos consorcios de microorganismos, que hay una gran diversidad de organismos diazótrofos, que incluye bacterias sulfato-reductoras, sulfato-oxidantes, metanogénicas, fotótrofas anoxigénicas y heterótrofas (Zehr, 1992). En algunos tapetes microbianos dominados por la cianobacteria *Microcoleus chthonoplastes* se ha comprobado que ésta carece de los genes *nif* (Olson et al., 1999). Estos autores proponen que en este tipo de tapete microbiano existe una simbiosis entre las cianobacterias y bacterias diazótrofas que viven como epífitas en micro regiones anóxicas, formadas dentro de la capa de exudado mucilaginoso que recubre los filamentos de *M. chthonoplastes*; en estas micro regiones se podría llevar a cabo la fijación de nitrógeno.

Las cianobacterias se encuentran en una variedad de ambientes, desde el terrestre hasta el acuático, tanto continental como marino (Shilo,

1989). Dentro de los ambientes acuáticos están presentes en formas libres como parte del plancton y del bentos así como en forma simbiótica, llegando a presentarse en altas densidades en ambientes marinos (Carpenter & Capone, 1992). Estos organismos llevan a cabo tanto fotosíntesis como fijación de nitrógeno, con y sin la presencia de heterocitos (células especializadas para la fijación de nitrógeno) (Stal, 1988; Gallon & Stal, 1992).

Para poder fijar nitrógeno, las cianobacterias deben de cumplir con dos condiciones: 1) separar la fijación de nitrógeno de la fotosíntesis oxigénica y 2) prevenir o limitar la entrada de oxígeno a la célula (Stal, 1995). Las cianobacterias han resuelto esta situación en tres formas (Stal, 1999):

- 1) Un grupo de cianobacterias presenta *heterocitos*, en donde el fotosistema II está ausente y hay anaerobiosis dentro de la célula (Haselkorn, 1986); esto permite separar espacialmente ambos procesos.
- 2) Las cianobacterias que carecen de heterocitos y sin embargo fijan nitrógeno en condiciones aerobias han encontrado otras alternativas. Separan temporalmente la fijación de nitrógeno y la fotosíntesis oxigénica, fijando nitrógeno de noche y fotosintetizando de día (Bergman et al., 1997). Otras cianobacterias no-heterocíticas que fijan nitrógeno de día como por ejemplo *Trichodesmium* spp., forman fascículos. Bergman (1999) propone que existe una separación espacial entre los procesos de fotosíntesis y fijación de nitrógeno, ya que células

en donde la nitrogenasa ha sido identificada por medio de epifluorescencia enzimática son diferentes a las células que presentan incorporación de  $^{14}\text{CO}_2$ , existiendo la posibilidad de una respiración más pronunciada en las células que tienen la nitrogenasa; esta situación ha sido expuesta ya que las células con la nitrogenasa tienen mayor cantidad de citocromo oxidasa.

- 3) Otros grupos de cianobacterias fijan nitrógeno en condiciones de fotosíntesis anaerobia, en donde la actividad diazótropa no está bien diferenciada entre el día y la noche: los mecanismos mediante los cuales llevan a cabo la fijación de nitrógeno son muy poco conocidos (Stal, 1999). La cianobacteria anaerobia facultativa, *Oscillatoria limnetica* ha sido estudiada por su capacidad de alternar entre fotosíntesis oxigénica y anoxigénica, fijando nitrógeno en condiciones anaerobias (Shahak et al., 1999).

Se ha observado un incremento en la tasa de fijación de nitrógeno por cianobacterias con heterocitos en presencia de luz solar, evidenciando la posibilidad de acoplamiento entre este proceso y la fotosíntesis. Debido a la ausencia del fotosistema II en los heterocitos, el fotosistema I no puede reducir a la ferroproteína de la nitrogenasa; sin embargo, se cree que un intermediario del ciclo del ácido cítrico podría actuar como donador del fotosistema I, llevando a la reducción de la ferredoxina, la cual reduce a su vez a la ferroproteína. Este donador podría ser transportado de las células vegetativas a las heterocíticas. Los monosacáridos son degradados en

gliceraldehído 3-fosfato, el cual es metabolizado durante la glucólisis y el ciclo de los ácidos tricarbóxicos. Los reductores resultantes, NADH, NADPH, piruvato e  $H_2$  son utilizados como donadores de electrones para la reducci3n de la ferredoxina. Las reacciones entre estos donadores de electrones y los transportadores de electrones, ferredoxina y flavodoxina, son llevadas a cabo por enzimas. Algunos donadores de electrones como el piruvato y el NADPH pueden reducir la ferredoxina en oscuridad, sin embargo, la reducci3n de la ferredoxina por el  $H_2$  o el NADH depende del fotosistema I (Boethe & Neuer, 1988). En formas no-heterocíticas, la nitrogenasa podría ser reducida directamente por la cadena fotosintética de transporte de electrones (Mayne, 1984).

Las cianobacterias heterocíticas están mejor adaptadas a condiciones de vida diaz3trofas y sin embargo éstas no siempre son las cianobacterias más abundantes en la composici3n de tapetes microbianos y estromatolitos (Stal, 1999). Es posible que las cianobacterias heterocíticas sean más afectadas que las no-heterocíticas por la formaci3n de sulfuro, como residuo de la actividad de bacterias sulfato-reductoras, presentes tanto en los tapetes microbianos como en los estromatolitos (Villbrandt & Stal, 1996). De la misma forma, el sulfuro inhibe la fotosíntesis oxigénica, favoreciendo así la fijaci3n de nitr3geno por cianobacterias no-heterocíticas (Stal, 1999).

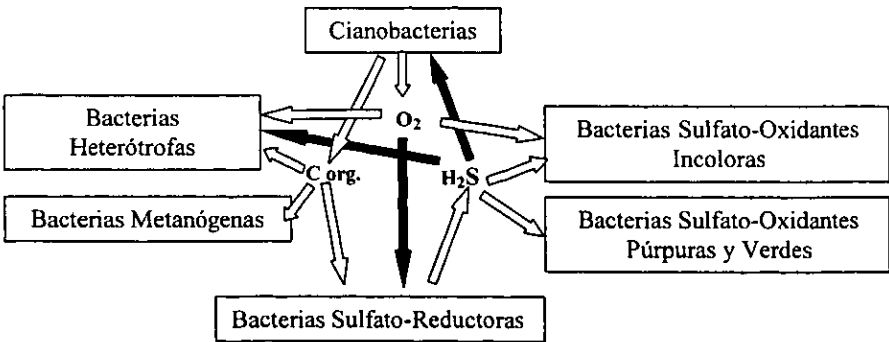
Las cianobacterias son estudiadas por su importancia evolutiva y ecol3gica, así como por su fisiología y biología molecular. Además de ser

componentes unicelulares o filamentosos en la columna de agua, llegan a formar tapetes microbianos y estromatolitos en la periferia y fondos de cuerpos acuáticos.

Los tapetes microbianos son acumulaciones macroscópicas estructuralmente coherentes de microorganismos que forman estratos laminados (Stal, 1995). Los estromatolitos son tapetes microbianos litificados por la precipitación de carbonato de calcio, que constituyen algunas de las evidencias más antiguas de la vida sobre la Tierra (Walter et al., 1992); son estructuras organo-sedimentarias que se forman por el resultado de la actividad de comunidades microbianas bentónicas (Moore & Burne, 1995). Las cianobacterias en unión con otras bacterias y algas, precipitan carbonato de calcio formando así los estromatolitos (Krumbein, 1978). Este proceso de precipitación de carbonato de calcio puede ser el resultado de la asimilación del dióxido de carbono o de un proceso de unión bioquímica del ion calcio (Szulc & Smyk, 1994). La forma de los estromatolitos depende de su composición microbiológica y de factores ambientales como la variabilidad de la luz (Wharton, 1994).

En ambientes salinos, el crecimiento de los tapetes microbianos inicia con la colonización de cianobacterias, entre las cuales las formas filamentosas son las más abundantes. La materia orgánica introducida en la estructura sedimentaria por la actividad fotosintética de las cianobacterias es utilizada por bacterias heterótrofas y los productos de esta asimilación son utilizados por las bacterias sulfato-reductoras; el

sulfato producido puede ser utilizado por las bacterias sulfato-oxidantes y fotótrofas anoxigénicas (Van Gernerden, 1983). En un sistema de tapete microbiano existen muchas interacciones biogeoquímicas entre los diversos microorganismos del consorcio. El oxígeno producido por las cianobacterias es utilizado por las bacterias heterótrofas y por las bacterias sulfato-oxidantes incoloras; sin embargo, el oxígeno inhibe a las bacterias sulfato-reductoras y a las bacterias metanógenas. El sulfuro producido inhibe a las cianobacterias fotótrofas oxigénicas, a las bacterias heterótrofas y en cierta medida a las bacterias metanógenas; el sulfuro favorece a las bacterias sulfato-oxidantes incoloras, púrpuras y verdes. El carbón orgánico producido por las cianobacterias es utilizado por las bacterias heterótrofas, metanógenas y sulfato-reductoras (Van Gernerden, 1983) (Fig. 1).



**Figura 1.** Interacciones biogeoquímicas en un tapete microbiano (inhibición  $\blackrightarrow$  ; sin inhibición  $\whitearrow$ )(Van Gernerden, 1983).

La presencia de tapetes microbianos se encuentra generalmente en regiones de condiciones extremas de salinidad, temperatura o en ambientes aislados, de tal forma que no haya la presencia de otros organismos competidores y poca presión de bioturbación o de herbivoría (Stal, 1985). La distribución actual de los tapetes microbianos está limitada en gran medida por la depredación y por la competencia por espacio con otros organismos; los tapetes microbianos pueden ser encontrados en suelo, roca, lagos, arroyos, lagunas hipersalinas, ambientes de elevada temperatura y ambientes marinos (Des Marais, 1995).

Como grupo taxonómico, las cianobacterias son conocidas como habitantes de ambientes que suelen estar sujetos a una intensa radiación solar, siendo comúnmente organismos colonizadores en suelo y roca (Whitton, 1987). Para contrarrestar los efectos nocivos de la alta radiación solar, en especial de los rayos ultravioleta (UV), las cianobacterias han desarrollado una serie de mecanismos que incluyen: fotorreparación y reparación del ADN en la oscuridad, además de presencia de carotenoides fotoprotectores, fototaxis negativa y síntesis de filtros biológicos para rayos UV. Aún así, se ha observado fotoblanqueamiento y fotoinhibición en cianobacterias expuestas a radiación ultravioleta (García-Pichel et al., 1993), donde los efectos negativos de ésta son diversos e incluyen a la fotosíntesis, el crecimiento, la movilidad, la foto-orientación y la diferenciación celular.



Los rayos UV-a (320-400 nm) están asociados con la producción de compuestos de oxígeno reactivo como  $^1\text{O}_2$ , con la peroxidación de lípidos, el blanqueamiento de clorofilas, la degradación de ficobilinas y el daño a las unidades D1 y D2 del fotosistema II. Los rayos UV-b (280-320 nm) inhiben la actividad de la Rubisco, de la ATP-sintetasa, la síntesis de clorofila a, la transferencia energética del ficobilisoma a la clorofila a y la fijación de nitrógeno (Brenowitz & Castenholz, 1997; Castenholz & Garcia-Pichel, 1997; Holm-Hansen et al., 1993); el ADN es un blanco para este tipo de radiación (Mitchell & Karentz, 1993).

La scitonemina es un pigmento extracelular con un espectro de absorción en las longitudes de onda del UV (280-400 nm), con una absorción máxima *in vivo* de 370 nm. Este pigmento ha sido identificado en más de 30 especies de cianobacterias de distintos ambientes (Garcia-Pichel & Castenholz, 1991). Existe una clase de compuestos incoloros, solubles en agua que presentan bandas de absorción estrechas con máximos entre los 310 y 360 nm; éstos provienen de una familia de compuestos conocidos como aminoácidos tipo micosporina (Garcia-Pichel & Castenholz, 1993). Este tipo de aminoácidos ha sido identificado en una gran variedad de organismos marinos, incluyendo corales, algas y equinodermos (Karentz et al., 1991). Garcia-Pichel & Castenholz (1993) proponen que las cianobacterias que presentan aminoácidos tipo micosporina, adicionalmente a la scitonemina, tendrán una protección casi

total ante la radiación UV debido a que ambos compuestos se sobrelapan en las regiones de absorción.

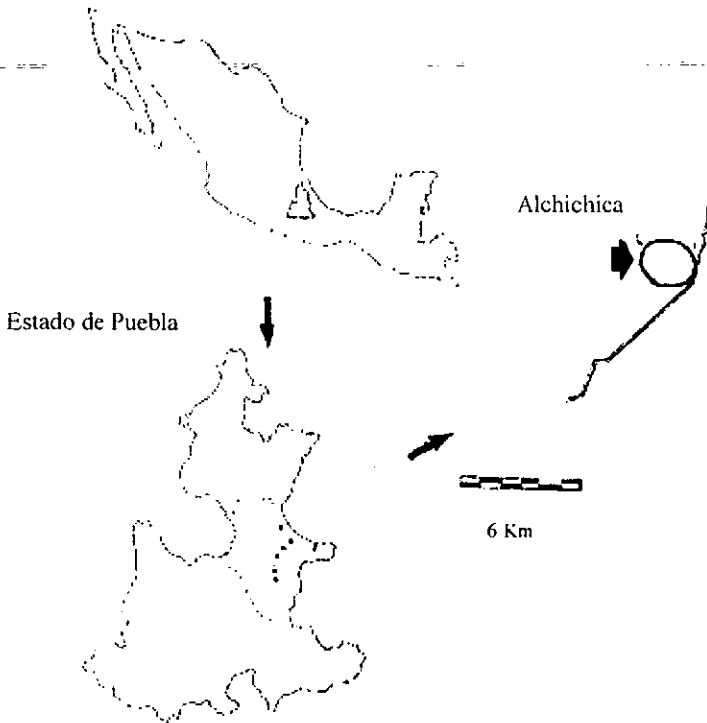
**Las cianobacterias en la cadena trófica.**- Este grupo de organismos es sumamente importante en una diversidad de ecosistemas, especialmente en los sistemas acuáticos, en donde cumplen un papel esencial como productores primarios e incorporadores de formas reducidas de nitrógeno (Babu et al., 1998). Sin embargo, las cianobacterias también son conocidas por producir sustancias tóxicas como hepatotoxinas (p.ej. *Nodularia spumigena*) y neurotoxinas (p.ej. *Anabaena* sp.) que no sólo son dañinas para los vertebrados sino también para los organismos del zooplancton (Carmichael, 1994).

En muchos casos, las formas reducidas de nitrógeno incorporadas al sistema por la acción de cianobacterias, no entran a la cadena trófica sino hasta después de la muerte y descomposición de las células. Este proceso de incorporación al sistema de las formas reducidas de nitrógeno (principalmente del amoníaco) por medio de la autólisis del material biológico, es conocido como amonificación (Postgate, 1978). Es posible que exista lisis celular por la acción de virus, los cuales estarían colaborando con la liberación de nutrientes (C, N, P) al sistema (Thingstad et al., 1993; Suttle, 1999). Este proceso se llama regeneración y es el responsable de aportar del 54 al 94% de las formas reducidas de nitrógeno necesarias para la producción primaria en ambientes acuáticos (Suttle, 1999).

En los lagos, los nutrientes escasean rápidamente después de los florecimientos de algas o cianobacterias en primavera (zona templada y tropical) o en invierno (zonas tropicales). El ingreso de nutrientes depende de los procesos de circulación del lago, del aporte por ríos, de los procesos de amonificación a partir de la descomposición de los organismos y de su liberación por el zooplancton. Sin embargo, se ha observado también que en los sistemas en los que se presentan grandes florecimientos de cianobacterias hay una baja abundancia de organismos del zooplancton, ya que no las pueden consumir, debido a su producción de toxinas (Hobbie & Fletcher, 1988).

## Area de Estudio

Alchichica es un lago cráter que se encuentra en el estado de Puebla (19°24' latitud N y 97°24' longitud O) a una altitud 2,345 metros sobre el nivel del mar (msnm), con una profundidad media de 38.6 m y un área de 1.81 km<sup>2</sup> (Fig. 2). Ha sido estudiado extensamente en su caracterización físico-química por Alcocer et al. (1993), en sus comunidades limnéticas por Lugo et al. (1993) y en su funcionamiento por Escobar et al. (1999).



**Figura 2.** Situación geográfica del área de estudio (modificada de Tavera & Komárek, 1996).

Alchichica presenta un evento de mezcla anual en el invierno que homogeniza y oxigena la capa profunda. Es un lago salino con valor de sólidos totales disueltos (STD) de  $7.2 \pm 0.1 \text{ gL}^{-1}$ , con límites de temperatura en el epilimnion entre 14-22 °C.

Se reconocen precipitaciones de carbonato de calcio en la zona litoral que conforman estromatolitos, compuestos por comunidades de cianobacterias y otros microorganismos. Tavera & Komárek (1996) han descrito tres tipos de estromatolitos en este lago, de los cuales son dos los más importantes con respecto a su abundancia: el tipo esponjoso y el tipo columnar. El más abundante es de tipo esponjoso, irregular-poroso y se presenta a lo largo de todo el perímetro del lago, desde la superficie hasta profundidades de 12 m; el segundo tipo de estromatolito es columnar y ocurre en el primer metro de profundidad solamente, en la región sur del lago. Estos autores han caracterizado al componente cianobacteriano en los estromatolitos de Alchichica. Es interesante mencionar que comparando las especies de cianobacterias que se presentan en este lago con base en la presencia o ausencia de heterocitos, se encuentra que el tipo esponjoso presenta cianobacterias con y sin heterocitos, mientras que el tipo columnar está formado por una comunidad cianobacteriana carente de heterocitos.

Para el tipo esponjoso, Tavera & Komárek (1996) distinguen tres capas de color. La primera y más superficial es negra, en donde hay dominancia de cuatro especies de cianobacterias *Calothrix* cf. *parietina*,

*Calothrix* sp., *Entophysalis atrata* y *Entophysalis* sp., además de otras especies que llegan a estar presentes como *Leptolyngbya* sp. 1 y algunas diatomeas. En la capa verde intermedia se presentan las cianobacterias, *Chroococcidium* cf. *gelatinosum*, *Leptolyngbya* sp. 1, *Leptolyngbya* sp. 2, *Aphanocapsa* sp. y *Aphanothece* sp. La tercera capa, la más profunda está formada básicamente por diatomeas. Para el tipo columnar, los autores no reconocen una zonación. Reconocen la presencia de anillos concéntricos de crecimiento en donde el anillo exterior está dominado por *Entophysalis lithophila*. Los autores señalan así mismo, un florecimiento, al inicio del verano, de la cianobacteria planctónica *Nodularia* cf. *spumigena*, la cual presenta heterocitos.

**Antecedentes.**- Si bien el lago cráter de Alchichica ha sido estudiado con diversos enfoques, no existen antecedentes de trabajos sobre la fijación de nitrógeno. En México, los estudios de esta naturaleza en ambientes acuáticos incluyen los trabajos de Bebout (1992) y Stal et al. (1994), en los tapetes microbianos de Guerrero Negro, BCS.

En el ámbito mundial, los estudios de fijación de nitrógeno en ambientes acuáticos comenzaron a principios del siglo pasado, identificando organismos diazótrofos en una diversidad de ambientes (Capone & Carpenter, 1999). La cianobacteria no-heterocítica, planctónica marina del género *Trichodesmium* ha sido extensamente estudiada en su papel como fijadora de nitrógeno en grandes regiones del océano

oligotrófico (Carpenter & McCarthy, 1975; Carpenter & Price, 1976; Carpenter, 1983; Capone et al., 1997; Capone et al., 1998; Carpenter & Capone, 1992; Bell et al., 1999). En ambientes bentónicos, la fijación de nitrógeno se ha estudiado principalmente en tapetes microbianos (Capone, 1983; Mayne, 1984; Stal et al., 1984; Bebout, 1992), en donde algunos de estos trabajos incluyen la relación entre la fijación de nitrógeno y la fotosíntesis oxigénica (Bebout et al., 1987; Paerl et al., 1989). En ambientes bentónicos arrecifales, las cianobacterias han sido mencionadas por su papel como fijadoras de nitrógeno (Larkum, 1999), tanto como epífitas de rocas (Larkum et al., 1988; Burris, 1976), como en arena y en tapetes microbianos (Charpy-Roubaud et al., 1997).

**Planteamiento del problema.**- Trabajos como el de Escobar et al. (1999) marcan la pauta para realizar este estudio, ya que al describir las relaciones tróficas del sistema pelágico a través de isotopía estable, permitieron reconocer la ausencia de integración directa de *N. cf. spumigena* en la trama trófica.

En Alchichica, la abundancia estacional de la cianobacteria *N. cf. spumigena* reconocida por su capacidad de fijar nitrógeno (Carmichael, 1994), y la presencia de estromatolitos vivos, permitió la realización de un estudio sobre la capacidad de fijación de nitrógeno por ambos tipos de comunidades de organismos. Siendo un lago monomíctico cuyos nutrientes se encuentran atrapados por debajo de la capa eufótica durante

gran parte del año, provee un excelente laboratorio natural para evaluar la incorporación de formas reducidas de nitrógeno.

Existen antecedentes de la afectación negativa de la radiación UV sobre la fijación de nitrógeno en cianobacterias (Brenowitz & Castenholz, 1997; Castenholz & Garcia-Pichel, 1997; Holm-Hansen et al., 1993), por lo que este estudio planteó realizar experimentos que permitieran observar además este efecto sobre las cianobacterias diazótroficas de Alchichica. El que este lago se encuentre en altitud y expuesto a la radiación UV incrementó el interés por observar la existencia del efecto sobre la fijación de nitrógeno por esta radiación.

*Objetivo específico 1:* Cuantificar y describir la tasa de fijación de nitrógeno en el estromatolito esponjoso para un ciclo de 24 horas identificando los picos de actividad de la nitrogenasa; bajo la *hipótesis 1*, en la cual la fijación de nitrógeno será diurna y nocturna al haber cianobacterias tanto heterocíticas como no-heterocíticas en la composición de este estromatolito.

*Objetivo específico 2:* Cuantificar y describir la tasa de fijación de nitrógeno en el estromatolito columnar para un ciclo de 24 horas, identificando los picos de actividad de la nitrogenasa; bajo la *hipótesis 2*, en la cual la fijación de nitrógeno será nocturna al haber cianobacterias no-heterocíticas en la composición de este estromatolito.



*Objetivo específico 3:* Cuantificar y describir la tasa de fijación de nitrógeno en la cianobacteria *N. cf. spumigena* para un ciclo de 24 horas, identificando los picos de actividad de la nitrogenasa; bajo la *hipótesis 3*, en la cual la fijación de nitrógeno será máxima durante el día ya que al ser una cianobacteria heterocítica, la fotosíntesis no afectará negativamente a la fijación de nitrógeno.

*Objetivo específico 4:* Cuantificar y describir la tasa de fijación de nitrógeno en los estromatolitos esponjoso, columnar y en *N. cf. spumigena* en presencia y ausencia de radiación UV; bajo la *hipótesis 4*, en la cual la fijación de nitrógeno de ambos estromatolitos y cianobacteria de columna de agua será afectada negativamente por esta radiación.

*Objetivo específico 5:* Cuantificar y describir la tasa de fijación de nitrógeno en los estromatolitos esponjoso y columnar durante los picos máximos de actividad de la nitrogenasa antes, durante y después del florecimiento de agua de *N. cf. spumigena*; bajo la *hipótesis 5*, en la cual la fijación de nitrógeno en ambos estromatolitos disminuirá después del florecimiento de *N. cf. spumigena* por la incorporación que realiza ésta de formas reducidas de nitrógeno al sistema.

## Métodos

La actividad de la nitrogenasa puede ser evaluada mediante dos métodos: a) incorporación del isótopo  $^{15}\text{N}$  y b) reducción del acetileno en etileno (Stal, 1988).

Durante este trabajo se utilizó el método de reducción del acetileno expresando ésta como la formación de etileno ( $\mu\text{moles C}_2\text{H}_4 \text{ m}^{-2} \text{ h}^{-1}$ ) (Bebout, 1992). Este método es utilizado comúnmente en los trabajos de fijación de nitrógeno ya que aunque es un método indirecto de estimación de la fijación de nitrógeno, la reducción de acetileno en etileno es específica para todos los organismos diazotrofos y se desconocen otros mecanismos biológicos que puedan llevar a cabo esta reacción (Stal, 1988).

**Método de reducción del acetileno.**- Este método permite medir de forma precisa la actividad de la nitrogenasa y por lo tanto de la fijación de nitrógeno (Bell et al., 1999). De acuerdo con Bebout (1992), se tomó un  $\text{cm}^2$  de material (estromatolitos) de grosor variable, que incluyó las capas múltiples en donde se encuentran los microorganismos y un ml de agua con la cianobacteria *N. cf. spumigena*.

El material se colocó en una botella universal de 58 ml y se añadieron 20 ml de agua del lago no filtrada. Previamente se produjo el acetileno en el laboratorio, a partir de la reacción del carburo de calcio con agua. Se inyectaron cinco ml de acetileno en la botella, formando burbujas

con el agua ya que es recomendado tener un volumen de acetileno superior al 10% de la fase gaseosa (Stal, 1988). Las incubaciones fueron de seis horas, que es el tiempo recomendado para este tipo de experimento (Stal, 1988). Al término de seis horas de incubación se extrajeron diez ml de gas, el cual se almacenó en frascos VACUTAINER de 10 ml sellados al vacío. El análisis de gases por cromatografía se realizó en el Centro de Investigación sobre Fijación de Nitrógeno de la UNAM.

La cromatografía de gas es un método de separación de compuestos que se encuentran en la fase gaseosa. Las muestras de gas son introducidas en el cromatógrafo de gases a través del inyector, el cual transporta la muestra hacia la fase móvil de la columna de separación. La muestra gaseosa sale de la columna a través de un detector (Rouessac, 1992).

El cromatógrafo de gas utilizado fue un Varian 3300, equipado con una columna de acero inoxidable Porapak de 2 m, con diámetro externo de 0.32 cm; el integrador fue un Varian 4290. El detector es de ionización de flama, es decir que la corriente gaseosa proveniente de la columna de separación llega a una flama alimentada por un flujo de hidrógeno y aire. La combustión separa la muestra gaseosa en iones y partículas cargadas que provocan una corriente iónica entre los electrodos que soportan la flama. La corriente es transformada por un electrómetro en una tensión que produce la señal que es registrada por el integrador. La tensión

generada es función de la masa de átomos de carbono presentes en la molécula detectada (Rouessac, 1992).

**Obtención de datos preliminares y montaje de la técnica.**- Se llevaron a cabo experimentos de medición de la tasa de formación de etileno en dos tapetes microbianos en Guerrero Negro, BCS en diciembre de 1998. Uno de los tapetes se caracterizó por la predominancia (en el consorcio de microorganismos) de la cianobacteria *Lyngbya* sp. y el otro tapete por la predominancia de la cianobacteria *Calothrix* sp. Ambos tapetes se caracterizaron *in situ* por R. Castenholz y B. Bebout. Los intervalos de incubación de las muestras fueron los reportados por Bebout (1992) como de mayor actividad de la nitrogenasa. Durante estos experimentos se trabajó en ausencia y presencia de radiación UV.

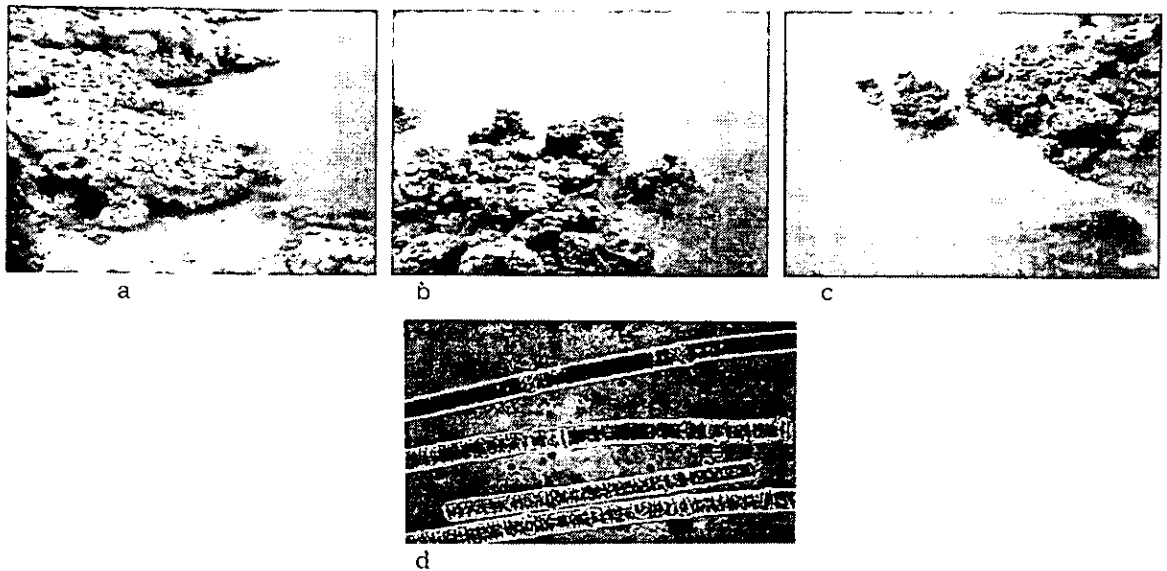
### **Alchichica, Puebla.**

**Diseño experimental.**- Este implicó tres fases:

- 1) Recolecta del material.
- 2) Incubación y tratamientos con y sin radiación UV.
- 3) Experimentación y obtención de datos.

- 1) Las muestras de cada tipo de estromatolito se recolectaron manualmente en la zona litoral durante los tres periodos de experimentación. Las muestras de *N. cf. spumigena* se recolectaron manualmente de columna de agua durante el periodo de florecimiento

utilizando botellas de plástico (Fig. 3a, b y c). El material fue transportado en agua del lago al laboratorio.



**Figura 3.** a) estromatolito esponjoso, b) estromatolito columnar y c) florecimiento de *N. cf. spumigena* (fotografías por L. Falcón), d) tricomas de *N. cf. spumigena* (fotografía tomada de Tavera & Komárek, 1996).

2) Las incubaciones y experimentación se llevaron a cabo en la Ciudad de México la cual tiene una altitud media de 2,200 msnm por lo cual se asumió que la radiación UV no sería distinta a la encontrada en el lago cráter de Alchichica, Puebla; sin embargo, la radiación UV no fue medida en ninguna de las dos localidades. Las muestras se colocaron en recipientes transparentes con agua del lago no filtrada. Las incubaciones se llevaron a cabo en presencia y en ausencia de radiación UV. En presencia de radiación UV, las muestras se incubaron directamente a la luz solar durante 12 horas y posteriormente a lo largo de los experimentos de reducción de acetileno. Para evitar la incidencia

de ésta radiación sobre las muestras, se utilizó un filtro Lee # 266 opaco, que evita el paso del 90% de la radiación por debajo de los 390 nm. Las muestras fueron incubadas durante 12 horas bajo este filtro antes de llevar a cabo la medición de la actividad de la nitrogenasa, continuando a lo largo de los experimentos de reducción de acetileno. Todas las muestras fueron incubadas juntas, es decir que las condiciones de insolación no variaron entre éstas.

3) Los experimentos se realizaron durante tres periodos en el año de 1999:

- a) **Antes del florecimiento en columna de agua de *N. cf. spumigena* (marzo).**- En marzo se trabajó únicamente con los estromatolitos dada la ausencia de *N. cf. spumigena* en la columna de agua. Los experimentos se realizaron para obtener datos de actividad de la nitrogenasa en un ciclo de 24 horas, tanto en presencia como en ausencia de radiación UV. Los intervalos de experimentación fueron: 0-6; 6-12; 12-18 y 18-24 horas, al final de los cuales se suspendió la incubación y se tomó la muestra de 10 ml de gas de cada dispositivo experimental. Se buscó identificar los picos de actividad máxima de la nitrogenasa como en los experimentos preliminares realizados en Guerrero Negro, BCS a partir del método de Bebout (1992).
- b) **Durante el florecimiento (mayo).**- Se trabajó con los estromatolitos únicamente en los picos de actividad máxima de la nitrogenasa (Bebout, 1992). Se realizó un ciclo de 24 horas para *N. cf. spumigena* tanto en presencia como en ausencia de radiación UV para los intervalos considerados anteriormente.

c) **Después del florecimiento (julio).**- Se trabajó únicamente con ambos estromatolitos para los intervalos de actividad máxima de la nitrogenasa.

Durante cada intervalo de experimentación se trabajó con cuatro réplicas por estromatolito y por tratamiento de radiación UV. En cada intervalo se incluyeron tres blancos por tipo de estromatolito, en presencia de radiación UV, a los cuales no se les agregó acetileno para observar la formación natural de etileno. Se hicieron tres blancos de agua sin acetileno por intervalo de experimentación (tabla 1). En el caso de producción de etileno en los blancos de agua, se procedió a restar este valor de los valores de los experimentos realizados durante ese intervalo.

**Tabla 1.** Réplicas (n) utilizadas por intervalo de experimentación para el estromatolito esponjoso (EE), columnar (EC) y blancos.

n	EE		EC		blancos	
	Con UV	Sin UV	Con UV	Sin UV	Sin C <sub>2</sub> H <sub>2</sub> : EE y EC Con UV	Agua
	4	4	4	4	3 y 3	3

**Obtención de unidades de etileno ( $\mu\text{moles de C}_2\text{H}_4 \text{ m}^{-2} \text{ h}^{-1}$ ).**- La transformación de los valores de área bajo la curva de etileno a  $\mu\text{moles de C}_2\text{H}_4 \text{ m}^{-2} \text{ h}^{-1}$  se llevó a cabo aplicando la ecuación de Bebout (1992):

$$\frac{((\text{valor de área bajo la curva de etileno } (\mu\text{V}) * 7.29787 \times 10^{-6} (\mu\text{V L}^{-1})) - (0.005058) * (\text{volumen de aire en la botella universal } (\text{L}^1)) * (1/\text{área } (\text{m}^2)) * (1/\text{horas de incubación}))}{(2)}$$

En donde  $7.29787 \times 10^{-6}$  es la pendiente y 0.005058 es la ordenada al origen, ambas se calcularon por Bebout (1992). El valor de la pendiente ( $\mu\text{V L}^{-1}$ ) fue generado a partir de múltiples lecturas en un cromatógrafo de gases, de un volumen de etileno puro diluido en una botella universal de volumen conocido; el área bajo la curva en  $\mu\text{V}$  equivale a un volumen de etileno a partir del cual se obtiene la cantidad de etileno en moles a partir de la ley de los gases perfectos. Al normalizar nuestros datos para un  $\text{m}^2$  y una hora, obtenemos las unidades de cantidad de moles de  $\text{C}_2\text{H}_4$  por metro cuadrado y por hora.

**Análisis de datos.**- Los valores obtenidos fueron analizados mediante gráficos, pruebas de T y ANOVA para reconocer diferencias ( $p < 0.05$ ) ó similitudes. La significancia de las tendencias se evaluó por medio del programa estadístico Statistica versión 5. Cada estromatolito y la *N. cf. spumigena* fueron analizados de forma independiente debido a que cada consorcio de microorganismos al igual que la cianobacteria planctónica muestran diferencias en su biología.



## Resultados

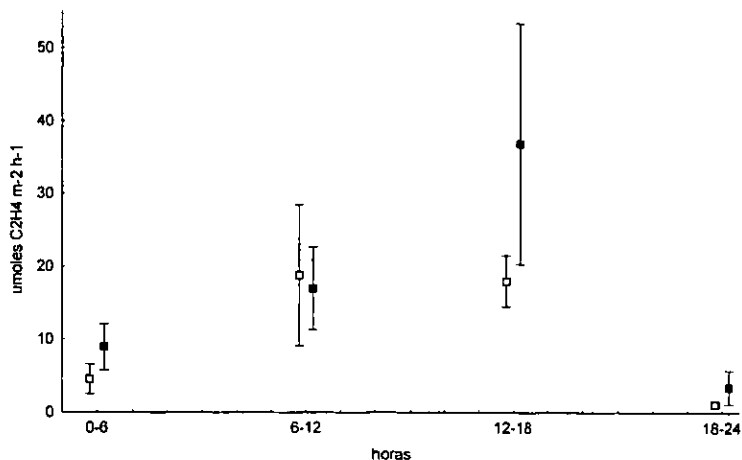
### I. Antes del florecimiento de *N. cf. spumigena* (marzo).

*Estromatolito esponjoso* (ciclo de 24 hrs) (Fig. 4a).

a) *Ausencia de radiación UV*.- Los valores de formación de etileno estuvieron entre 2.15 y 55.71  $\mu\text{moles C}_2\text{H}_4 \text{ m}^{-2} \text{ h}^{-1}$ . Los valores máximos se observaron en los intervalos de incubación de 6-12 hrs ( $17 \pm 5.7 \mu\text{moles C}_2\text{H}_4 \text{ m}^{-2} \text{ h}^{-1}$ ) y de 12-18 hrs ( $36.8 \pm 16.5 \mu\text{moles C}_2\text{H}_4 \text{ m}^{-2} \text{ h}^{-1}$ ). Ambos valores de formación máxima de etileno mostraron diferencias significativas ( $p < 0.05$ ) con los valores de los otros intervalos, [6-12 hrs ( $p = 0.0063$ ) y 12-18 hrs ( $p = 0.0249$ )].

b) *Presencia de radiación UV*.- Los valores de formación de etileno estuvieron entre 0.63 y 25.72  $\mu\text{moles C}_2\text{H}_4 \text{ m}^{-2} \text{ h}^{-1}$ . Durante este tratamiento se observaron valores máximos de formación de etileno en los mismos tiempos que en el tratamiento anterior, de 6-12 hrs ( $18.8 \pm 9.7 \mu\text{moles C}_2\text{H}_4 \text{ m}^{-2} \text{ h}^{-1}$ ) y  $18 \pm 3.5 \mu\text{moles C}_2\text{H}_4 \text{ m}^{-2} \text{ h}^{-1}$  de 12-18 hrs. Se presentaron diferencias significativas ( $p < 0.05$ ) entre los valores de 6-12 hrs ( $p = 0.0347$ ) y 12-18 hrs ( $p = 0.0021$ ) con los valores de los otros intervalos.

Los valores de la fijación de nitrógeno para el estromatolito esponjoso se sintetizan en la tabla 2.



**Figura 4a.** Tasas de producción de C<sub>2</sub>H<sub>4</sub> (media y d.e.) (μmoles m<sup>-2</sup> h<sup>-1</sup>), para el estromatolito esponjoso a lo largo de un ciclo de 24 horas, en ausencia (■) y presencia (□) de radiación UV.

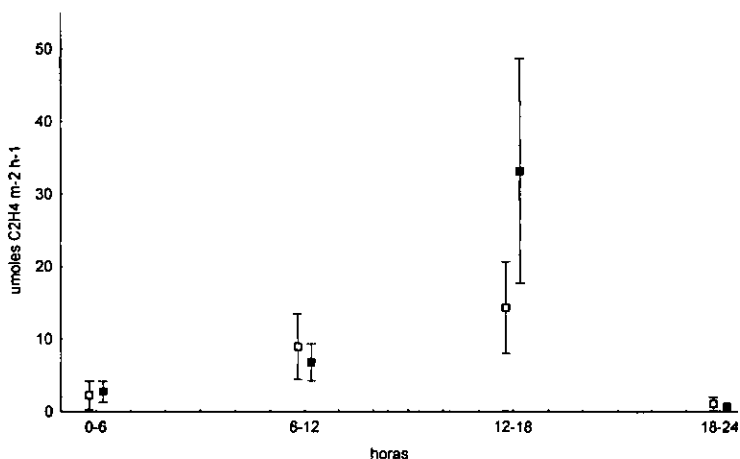
*Estromatolito columnar* (ciclo de 24 hrs) (Fig. 4b).

a) *Ausencia de radiación UV.*- Los valores de formación de etileno estuvieron entre 0.52 y 47.19 μmoles C<sub>2</sub>H<sub>4</sub> m<sup>-2</sup> h<sup>-1</sup>. Se observaron valores máximos para los intervalos de incubación de 6-12 hrs con 6.8 ± 2.5 μmoles C<sub>2</sub>H<sub>4</sub> m<sup>-2</sup> h<sup>-1</sup> y 12-18 hrs con 33.1 ± 15.4 μmoles C<sub>2</sub>H<sub>4</sub> m<sup>-2</sup> h<sup>-1</sup>. Ambos valores de formación máxima de etileno mostraron diferencias significativas (p<0.05) con los valores de los otros intervalos, (p = 0.0012) de 6-12 hrs y (p = 0.0001) de 12-18 hrs.

b) *Presencia de radiación UV.*- Los valores de formación de etileno estuvieron en el rango de 0.24 a 20.26 μmoles C<sub>2</sub>H<sub>4</sub> m<sup>-2</sup> h<sup>-1</sup>. Durante este tratamiento se observaron valores máximos de formación de etileno

en los mismos tiempos que en el tratamiento anterior, de 6-12 hrs ( $8.9 \pm 4.5 \mu\text{moles C}_2\text{H}_4 \text{ m}^{-2} \text{ h}^{-1}$ ) y  $14.3 \pm 6.3 \mu\text{moles C}_2\text{H}_4 \text{ m}^{-2} \text{ h}^{-1}$  de 12-18 hrs. Se presentaron diferencias significativas ( $p < 0.05$ ) entre los valores de 6-12 hrs ( $p = 0.0016$ ) y 12-18 hrs ( $p = 0.0002$ ) con los valores de los otros intervalos.

Los valores de la fijación de nitrógeno para el estromatolito columnar se sintetizan en la tabla 2.



**Figura 4b.** Tasas de producción de  $\text{C}_2\text{H}_4$  (media y d.e.) ( $\mu\text{moles m}^{-2} \text{ h}^{-1}$ ), para el estromatolito columnar a lo largo de un ciclo de 24 horas, en ausencia (■) y presencia (□) de radiación UV.

**Tabla 2.** Tasas de producción de C<sub>2</sub>H<sub>4</sub> (μmoles m<sup>-2</sup> h<sup>-1</sup>) para un ciclo de 24 horas en estromatolitos esponjoso (EE) y columnar (EC), para tratamiento sin UV (sin UV), con UV (UV), blancos de acetileno y blancos de agua (sin C<sub>2</sub>H<sub>2</sub>).

intervalos	réplica	EE			EC			blancos agua
		UV	sin UV	sin C <sub>2</sub> H <sub>2</sub>	UV	sin UV	sin C <sub>2</sub> H <sub>2</sub>	
24-6	1	4.75	13.23	1.37	2.59	3.75	0	0
24-6	2	4.29	5.91	3.21	4.71	1.18	0	0
24-6	3	2.16	7.44	4.40	*	4.22	0	0
24-6	4	7.08	9.21		1.91	1.97		
6-12	1	4.49	17.71	0	5.76	3.81	0	0
6-12	2	22.93	15.58	0	6.79	6.13	0	0
6-12	3	25.72	24.15	0	15.57	7.46	0	0
6-12	4	22.06	10.43		7.68	9.86		
12-18	1	16.28	18.53	0	12.03	23.27	0	0.42
12-18	2	22.30	28.50	0	6.42	16.65	0	0.55
12-18	3	14.25	44.34	0	20.26	45.38	0	0
12-18	4	19.17	55.71		18.38	47.19		
18-24	1	1.02	2.35	0	0.86	0.54	0	0.55
18-24	2	1.66	2.15	0	0.82	1.03	0	0.11
18-24	3	1.12	6.88	0	0.24	0.52	0	0
18-24	4	0.63	2.33		2.36	0.76		

\* se perdió la muestra

## II. Durante el florecimiento de *N. cf. spumigena* (mayo).

*N. cf. spumigena* (ciclo de 24 hrs) (Fig. 4c).

a) *Ausencia de radiación UV.*- Los valores de formación de etileno estuvieron entre 12.47 y 92.91  $\mu\text{moles C}_2\text{H}_4 \text{ m}^{-2} \text{ h}^{-1}$ . Se observó un incremento de los valores de formación de etileno con un máximo en el intervalo de 18-24 hrs de  $78.9 \pm 12.1 \mu\text{moles C}_2\text{H}_4 \text{ m}^{-2}\text{h}^{-1}$ . Se observa (Fig. 4c) que los intervalos son diferentes entre sí ( $p < 0.05$ ).

b) *Presencia de radiación UV.*- Los valores de formación de etileno estuvieron entre 4.72 y 45.95  $\mu\text{moles C}_2\text{H}_4 \text{ m}^{-2} \text{ h}^{-1}$ . Durante este tratamiento se observó un patrón de formación de etileno, con valores máximos en el intervalo de 18-24 hrs ( $36.2 \pm 9.3 \mu\text{moles C}_2\text{H}_4 \text{ m}^{-2} \text{ h}^{-1}$ ); con diferencias con los valores de los otros intervalos ( $p = 0.0088$ ).

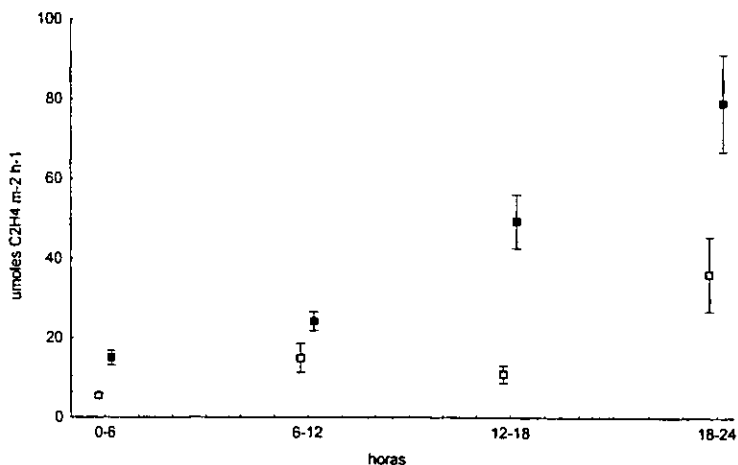


Figura 4c. Tasas de producción de  $\text{C}_2\text{H}_4$  (media y d.e.) ( $\mu\text{moles m}^{-2} \text{ h}^{-1}$ ), para *N.cf. spumigena* a lo largo de un ciclo de 24 horas, en ausencia (■) y presencia (□) de radiación UV.

Los valores de fijación de nitrógeno para *N. cf. spumigena* se sintetizan en la tabla 3.

Los valores obtenidos para ambos estromatolitos durante este periodo, corresponden únicamente a los intervalos que presentaron los valores máximos de fijación de nitrógeno a las 6-12 hrs y 18 -24 hrs.

*Estromatolito esponjoso* (Fig. 5a).

a) *Ausencia de radiación UV.*- Los valores de formación de etileno estuvieron entre 16.95 y 24.55  $\mu\text{moles C}_2\text{H}_4 \text{ m}^{-2} \text{ h}^{-1}$ .

b) *Presencia de radiación UV.*- Los valores de formación de etileno estuvieron entre 4.92 y 21.43  $\mu\text{moles C}_2\text{H}_4 \text{ m}^{-2} \text{ h}^{-1}$ .

*Estromatolito columnar* (Fig. 5b).

a) *Ausencia de radiación UV.*- Los valores de formación de etileno estuvieron entre 15.18 y 29.56  $\mu\text{moles C}_2\text{H}_4 \text{ m}^{-2} \text{ h}^{-1}$ .

b) *Presencia de radiación UV.*- Los valores de formación de etileno estuvieron entre 10.87 y 19.65  $\mu\text{moles C}_2\text{H}_4 \text{ m}^{-2} \text{ h}^{-1}$ .

Los datos de fijación de nitrógeno para ambos estromatolitos se muestran en la tabla 3.

**Tabla 3.** Tasas de producción de  $C_2H_4$  ( $\mu\text{moles m}^{-2} \text{h}^{-1}$ ) para un ciclo de 24 horas en *N. cf. spumigena*, así como para los intervalos de 6-12 hrs y 12-18 hrs en los estromatolitos esponjoso (EE) y columnar (EC), para el tratamiento sin UV (sin UV) y con UV (UV); blancos de acetileno y blancos de agua (sin  $C_2H_2$ ).

intervalos	réplica	EE			EC			<i>Nodularia cf. spumigena</i>			blancos agua
		UV	Sin UV	sin $C_2H_2$	UV	sin UV	sin $C_2H_2$	UV	sin UV	sin $C_2H_2$	
24-6	1							5.48	15.18	0	0
24-6	2							4.72	12.47	0	0
24-6	3							5.86	15.90	0	0
24-6	4							5.67	16.55		
6-12	1	9.71	*	0	14.84	15.18	0	18.76	25.97	0	0
6-12	2	4.92	17.24	0	11.42	24.89	0	15.32	26.47	0	0
6-12	3	6.91	24.55	0	15.38	18.89	0	15.72	22.95	0	0
6-12	4	12.18	16.95		11.98	20.61		10.05	21.48		
12-18	1	13.22	23.58	0	11.36	29.56	0	11.36	39.86	0	0
12-18	2	12.65	21.34	0	13.46	21.33	0	10.00	55.06	0	0
12-18	3	21.43	19.67	0	10.87	15.65	0	13.59	52.91	0	0
12-18	4	16.75	18.78		19.65	22.25		8.56	49.14		
18-24	1							45.95	66.13	0	0
18-24	2							30.18	84.62	0	0
18-24	3							42.14	71.98	0	0
18-24	4							26.39	92.91		

\* se perdió la muestra

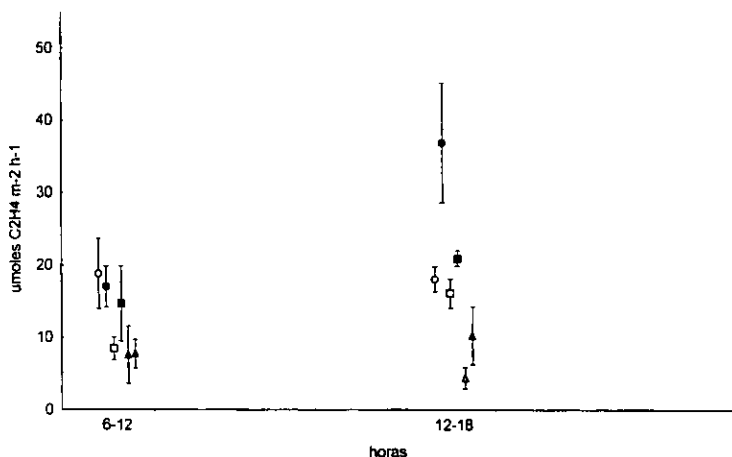
### III. Después del florecimiento de *N. cf. spumigena* (julio).

Durante este periodo, los valores de fijación de nitrógeno para cada estromatolito en ambos tratamientos de radiación UV corresponden únicamente a los intervalos de 6-12 hrs y 12-18 hrs.

*Estromatolito esponjoso* (Fig. 5a).

a) *Ausencia de radiación UV.*- Los valores de formación de etileno estuvieron entre 3.66 y 21.77  $\mu\text{moles C}_2\text{H}_4 \text{ m}^{-2} \text{ h}^{-1}$ .

b) *Presencia de radiación UV.*- Los valores de formación de etileno estuvieron entre 1.72 y 19.16  $\mu\text{moles C}_2\text{H}_4 \text{ m}^{-2} \text{ h}^{-1}$ .



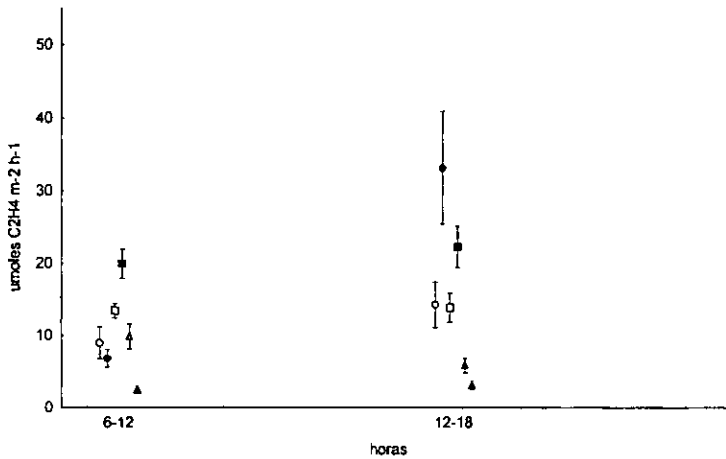
**Figura 5a.** Tasas de producción de  $\text{C}_2\text{H}_4$  (media y d.e.) ( $\mu\text{moles m}^{-2} \text{ h}^{-1}$ ), para el estromatolito esponjoso en los intervalos de 6-12 hrs y 12-18 hrs; en ausencia (sólidos) y presencia (blancos) de radiación UV: marzo (●,○), mayo (■,□) y julio (▲,Δ).



*Estromatolito columnar* (Fig. 5b).

a) *Ausencia de radiación UV.*- Los valores de formación de etileno estuvieron entre 1.62 y 5.08  $\mu\text{moles C}_2\text{H}_4 \text{ m}^{-2} \text{ h}^{-1}$ .

b) *Presencia de radiación UV.*- Los valores de formación de etileno estuvieron entre 3.13 y 13.68  $\mu\text{moles C}_2\text{H}_4 \text{ m}^{-2} \text{ h}^{-1}$ .



**Figura 5b.** Tasas de producción de  $\text{C}_2\text{H}_4$  (media y d.e.) ( $\mu\text{moles m}^{-2} \text{ h}^{-1}$ ), para el estromatolito columnar en los intervalos de 6-12 hrs y 12-18 hrs; en ausencia (sólidos) y presencia (blancos) de radiación UV: marzo ( $\bullet, \circ$ ), mayo ( $\blacksquare, \square$ ) y julio ( $\blacktriangle, \triangle$ ).

Los valores de fijación de nitrógeno para ambos estromatolitos se muestran en la tabla 4.

**Tabla 4.** Tasas de producción de  $C_2H_4$  ( $\mu\text{moles m}^{-2}\text{h}^{-1}$ ) para los intervalos de 6-12 hrs y 12-18 hrs en los estromatolitos esponjoso (EE) y columnar (EC), para el tratamiento sin UV (sin UV) y con UV (UV); blancos de acetileno y blancos de agua (sin  $C_2H_2$ ).

intervalos	réplica	EE			EC			blancos agua
		UV	sin UV	sin $C_2H_2$	UV	sin UV	sin $C_2H_2$	
6-12	1	19.16	13.33	0	9.05	1.63	0	0
6-12	2	1.72	4.39	0	11.31	3.03	0	0
6-12	3	3.53	7.49	0	5.46	3.56	0	0
6-12	4	5.97	5.76		13.68	1.62		
12-18	1	2.41	3.66	0	5.29	2.18	0	0
12-18	2	4.77	7.46	0	3.13	5.08	0	0
12-18	3	8.34	7.85	0	7.20	2.87	0	0
12-18	4	1.92	21.77		7.59	1.93		

**Análisis de resultados.**- Las diferencias o similitudes significativas ( $p < 0.05$ ) entre la actividad diazotrofa diurna y nocturna de ambos estromatolitos (marzo) y *N. cf. spumigena* (mayo) durante los ciclos de 24 horas de producción de etileno se muestran en la tabla 5.

**Tabla 5.** Actividad diazotrofa ( $\mu\text{moles } C_2H_4 \text{ m}^{-2} \text{ h}^{-1}$ ) diurna (D) y nocturna (N), en estromatolitos esponjoso (EE), columnar (EC) y *N. cf. spumigena*, para tratamientos con UV (UV) y sin UV (sin UV); [media (x) y d.e.].

	D (x ± d.e.)	UV		D (x ± d.e.)	sin UV	
		N (x ± d.e.)	p (<0.05)		N (x ± d.e.)	p (<0.05)
EE	18.4 ± 6.7	2.8 ± 2.3	0.0000	26.8 ± 15.6	6.2 ± 3.9	0.0029
EC	11.6 ± 5.8	1.7 ± 1.5	0.0003	20.0 ± 17.4	2.0 ± 1.5	0.0105
<i>N. cf. spumigena</i>	12.9 ± 3.5	20.8 ± 17.5	0.2332	36.7 ± 14.2	47.0 ± 35.1	0.4567

Los resultados mostrados en la tabla 5, rechazan la hipótesis 1, en la cual se esperaba que la tasa de fijación de nitrógeno sería diurna y nocturna para el estromatolito esponjoso, ya que éste tiene una actividad diazótropa diurna, tanto en presencia ( $p=0.0000$ ) como en ausencia ( $p=0.0029$ ) de radiación UV. Así mismo, se rechaza la hipótesis 2, en la cual se esperaba una actividad diazótropa nocturna para el estromatolito columnar, ya que éste presenta una actividad diazótropa diurna tanto en presencia ( $p=0.0003$ ) como en ausencia ( $p=0.0105$ ) de radiación UV. La hipótesis 3, en la cual se esperaba una actividad diazótropa diurna para *N. cf. spumigena* se rechaza, ya que ésta no presentó diferencias entre la actividad diazótropa diurna y nocturna, en presencia ( $p=0.2332$ ) y ausencia ( $p=0.4567$ ) de radiación UV.

Para analizar el efecto de la radiación UV sobre la actividad diazótropa de ambos estromatolitos así como de la cianobacteria de columna de agua, se consideraron todos los resultados obtenidos para las tres series de experimentos (marzo, mayo y julio) para los estromatolitos y el de mayo para *N. cf. spumigena*, (tabla 6).

**Tabla 6.** Actividad diazotrofa ( $\mu\text{moles C}_2\text{H}_4 \text{ m}^{-2} \text{ h}^{-1}$ ) para tratamientos de radiación UV en estromatolitos esponjoso (EE), columnar (EC) y *N. cf. spumigena*; [media (x) y d.e.].

	x $\pm$ d.e.	p (<0.05)
EE	9.9 $\pm$ 7.9	0.0523
EC	8.7 $\pm$ 5.8	0.2806
<i>N. cf. spumigena</i>	16.8 $\pm$ 12.9	0.0019

Con base en los resultados indicados en la tabla 6, se rechaza la hipótesis 4, en la cual se esperaba una afectación negativa sobre las tasas de formación de etileno durante ambos tratamientos de radiación UV en los estromatolitos esponjoso ( $p=0.0523$ ) y columnar ( $p=0.2806$ ); se acepta para el caso de la *N. cf. spumigena* ( $p=0.0019$ ), ya que presenta diferencias significativas entre los valores de fijación de nitrógeno en presencia y ausencia de radiación UV.

Las diferencias o similitudes ( $p<0.05$ ) en las tasas de fijación de nitrógeno en los estromatolitos esponjoso y columnar antes, durante y después del florecimiento de *N. cf. spumigena*, para ambos tratamientos de radiación UV se muestran en la tabla 7.

**Tabla 7.** Actividad diazotrofa ( $\mu\text{moles C}_2\text{H}_4 \text{ m}^{-2} \text{ h}^{-1}$ ) antes (marzo), durante (mayo) y después (julio) del florecimiento de *N. cf. spumigena* para tratamientos con UV (UV) y sin UV (sin UV) en estromatolitos esponjoso (EE) y columnar (EC); [media (x) y d.e.].

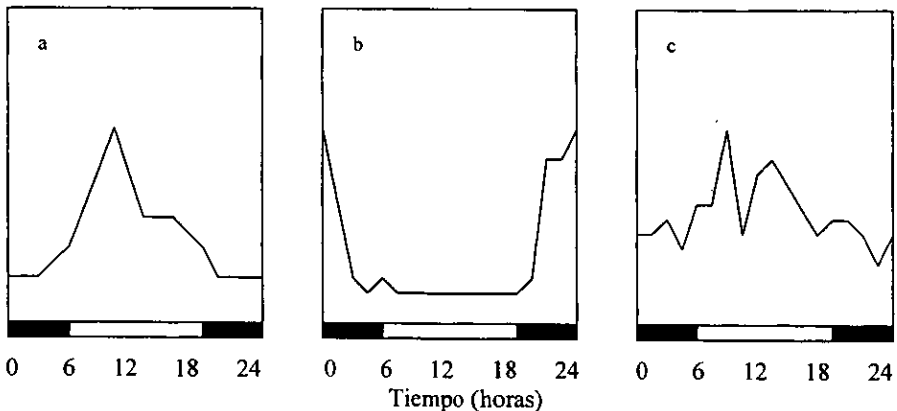
	Marzo (x ± d.s.)	UV Mayo (x ± d.s.)	Julio (x ± d.s.)	p (<0.05)	Marzo (x ± d.s.)	sin UV Mayo (x ± d.s.)	Julio (x ± d.s.)	p (<0.05)
E	18.4 ± 6.8	12.2 ± 5.3	6.0 ± 5.7	A vs Du (0.0542) A vs De (0.0344) Du vs De (0.0235)	26.8 ± 15.6	17.8 ± 7.7	9.0 ± 6.0	A vs Du (0.0602) A vs De (0.0018) Du vs De (0.0405)
C	11.6 ± 5.8	13.6 ± 2.9	7.8 ± 3.4	A vs Du (0.5466) A vs De (0.0487) Du vs De (0.0216)	20.0 ± 17.4	21.04 ± 4.7	2.3 ± 1.2	A vs Du (0.3982) A vs De (0.0388) Du vs De (0.0028)

Los resultados mostrados en la tabla 7 permiten aceptar la hipótesis 5, en la cual se esperan diferencias significativas ( $p < 0.05$ ) para las tasas de fijación de nitrógeno de los dos estromatolitos para ambos tratamientos de radiación UV, antes y durante vs después del florecimiento de la cianobacteria en columna de agua. No hay diferencias significativas para los valores de producción de etileno de ambos estromatolitos en los dos tratamientos antes y durante el florecimiento de la cianobacteria.

## Discusión

El lago cráter Alchichica constituye un ecosistema único en cuanto a sus características fisicoquímicas como biológicas, que permiten la presencia de formaciones estromatolíticas y del florecimiento estacional en columna de agua de *N. cf. spumigena* (Tavera & Komárek, 1996).

**Ciclos de 24 horas.**- Los patrones de fijación de nitrógeno encontrados para ambos estromatolitos así como para la cianobacteria planctónica, reflejan las características peculiares de cada uno de estos consorcios de microorganismos, lo cual nos lleva a enriquecer nuestra visión de la ecología de este ecosistema. Según Stal (1999), existen tres patrones de típicos de actividad de la nitrogenasa en tapetes microbianos (Fig. 6).



**Figura 6.** Patrones de fijación de nitrógeno en un ciclo de 24 horas, a) cianobacterias heterocíticas, b) cianobacterias no-heterocíticas fotótrofas aerobias y c) cianobacterias no-heterocíticas fotótrofas anaerobias (Según Stal, 1999).

Comparando nuestros resultados con los patrones propuestos por Stal (1999) observamos que la actividad de la nitrogenasa en el estromatolito esponjoso se aproxima al tipo heterocítico (Fig. 6 a). Sabemos por la descripción de Tavera & Komárek (1996), que este estromatolito está constituido por cianobacterias heterocíticas y no-heterocíticas. La ausencia de actividad nocturna de la nitrogenasa coincide con el patrón propuesto por Stal (1999) para actividad diazótropa por cianobacterias heterocíticas.

El estromatolito columnar presentó un patrón de actividad de la nitrogenasa comparable con el propuesto por Stal (1999) para cianobacterias heterocíticas (Fig. 6 b) sin embargo, Tavera & Komárek (1996) indican que al interior de este estromatolito no hay cianobacterias heterocíticas. Dentro de los consorcios de cianobacterias y bacterias que forman tapetes microbianos y estromatolitos se han identificado diversos organismos diazótropos además de las cianobacterias (Paerl et al., 2000). Es posible que la actividad diazótropa diurna en ausencia de cianobacterias heterocíticas se deba a la acción de bacterias sulfato-oxidantes fotótrofas anaerobias; a la actividad de bacterias metanógenas o heterótrofas que ocupen nichos anóxicos dentro del consorcio (Steppe et al., 1996; Olson et al., 1999; Paerl et al., 2000).

La actividad diazótropa de las cianobacterias no-heterocíticas fotótrofas aerobias y anaerobias es poco conocida. Se ha propuesto que en tapetes microbianos y estromatolitos, la presencia de sulfato-reducción inhibe la fotosíntesis aerobia, favoreciendo la fijación de nitrógeno diurna

por cianobacterias no-heterocíticas fotótrofas anaerobias (Stal, 1995; Stal, 1999), las cuales son menos afectadas por el sulfuro que las cianobacterias heterocíticas (Castenholz, 1976). De hecho, existen dentro de estos consorcios de microorganismos, bacterias diazótrofes sulfato-oxidantes fotótrofas anaerobias (Shahak et al., 1999). Stal (1995) señala la posibilidad de que la fotosíntesis anoxigénica esté acoplada a la fijación de nitrógeno a través de la cadena respiratoria para la obtención de equivalentes reductores. Es posible que la protección de la nitrogenasa en las formas no-heterocíticas se presente como propone Postgate (1978). Esta se explica por la formación de regiones con microanaerobiosis, mediante el agrupamiento de células en colonias, en donde la fotosíntesis se lleva a cabo en la periferia y la fijación de nitrógeno al centro. Es importante señalar que al interior de este tipo de consorcios, hay diversos microorganismos diazótrofes, los cuales podrían estar fijando nitrógeno en micro regiones anoxigénicas del consorcio (Paerl et al., 2000).

Las cianobacterias heterocíticas muestran una clara dependencia entre la actividad fotosintética y la fijación de nitrógeno. El heterocito depende de las células vegetativas que le aportan tanto equivalentes reductores como moléculas aceptoras de las formas reducidas de nitrógeno (Stal, 1995).

La actividad de la nitrogenasa en *N. cf. spumigena* presentó un pico de actividad máximo a la media noche. Los modelos reconocidos por Vanderhoef et al. (1975) sugieren que cianobacterias diazótrofes



heterocíticas planctónicas podrían presentar una afectación en su actividad provocada por la incidencia de altas radiaciones durante el día, fijando nitrógeno por la noche. En la oscuridad, la fijación de nitrógeno puede estar favorecida debido a la acumulación diurna de moléculasceptoras de formas reducidas de nitrógeno, así como de equivalentes reductores (Stal, 1995). Es importante recalcar que durante estos experimentos, el agua del lago cráter no fue filtrada, es decir que tal vez exista la presencia de otros microorganismos diazótrofos en la columna de agua como fue reportado por Zehr (1992) para ambientes oceánicos.

Los resultados encontrados en este trabajo muestran la importancia de enfocar los estudios de fijación de nitrógeno no solamente en las cianobacterias del consorcio; es posible que la respuesta a las preguntas aquí expuestas pueda ser encontrada en el análisis de otros microorganismos diazótrofos (p.ej. bacterias metanógenas, sulfato-oxidantes, sulfato-reductoras, heterótrofas).

**Radiación UV.-** La reducción de la capa de ozono estratosférico y el aumento resultante en la radiación UV en la atmósfera afectan negativamente la producción primaria planctónica (Smith et al., 1992). Babu et al. (1998) han mostrado que esta radiación provoca una disminución en la biomasa y concentración de clorofila de cianobacterias, e indican que esta situación podría afectar negativamente a la fijación de nitrógeno.

En este trabajo se observó que la actividad diazótrofa de *N. cf. spumigena* fue afectada significativamente por la radiación UV, disminuyendo 2.5 veces en presencia de esta radiación. Las tasas de fijación de nitrógeno no fueron significativamente diferentes entre ambos tratamientos de radiación UV para las dos formas estromatolíticas, sin embargo se observó que al quitar esta radiación, la actividad diazótrofa aumentó de 0.4-1.7 veces. Los experimentos realizados en dos tapetes microbianos de Guerrero Negro, BCS mostraron un aumento de la fijación de nitrógeno de 2.5 veces en el tapete dominado por *Lyngbya* sp. y de 1.9 veces en el tapete dominado por *Calothrix* sp. en ausencia de radiación UV.

Es posible que la estructura carbonatada de los estromatolitos proteja a las células de la incidencia de la radiación UV, mientras que tanto la cianobacteria de columna de agua como las cianobacterias en los tapetes microbianos están expuestas directamente a esta radiación. La complejidad estructural de los consorcios estromatolíticos (Des Marais, 1995) podría ser otro factor que amortigüe el efecto nocivo de la radiación UV. Castenholz et al. (1994), Garcia-Pichel & Castenholz (1994) y Bebout & Garcia-Pichel (1995) indican que cianobacterias expuestas a radiación UV pueden migrar hacia el interior del tapete microbiano, situación que se podría presentar en los estromatolitos para protección de las células ante esta radiación. La presencia de pigmentos protectores a la radiación UV como la scitonemina o los aminoácidos tipo micosporina (Garcia-Pichel & Castenholz, 1991) podría encontrarse en la composición de ambos

consorcios estromatolíticos al igual que en la cianobacteria de columna de agua.

***Variaciones estacionales: antes, durante y después del florecimiento***

***de N. cf. spumigena.***- El proceso de fijación de nitrógeno en el lago cráter Alchichica presentó variaciones temporales en ambas formas estromatolíticas, en relación con el florecimiento de *N. cf. spumigena*. Es posible que durante el florecimiento de esta cianobacteria en la columna de agua haya aumentado la concentración de formas reducidas de nitrógeno (amonio y amoniaco) a partir de su actividad diazótropa. Como las cianobacterias pueden obtener el amonio y amoniaco por absorción cuando estos nutrientes no son limitantes en el sistema (Stal, 1995), las cianobacterias presentes en ambos tipos de estromatolitos podrían haber estado obteniendo estas formas reducidas de nitrógeno durante el florecimiento de la cianobacteria en columna de agua. Stewart et al. (1975) mostraron que las concentraciones intracelulares de amoniaco son un factor que regula la actividad de la nitrogenasa, por lo que la disminución en la actividad diazótropa en ambos estromatolitos después del florecimiento puede estar asociada a este factor.

***Comparación con otros ambientes de estudio.***- Los valores obtenidos en este estudio incluidos a la tabla 8 consideran solamente aquellos en presencia de radiación UV, ya que no hay otros estudios que hayan

trabajado directamente con la influencia de esta radiación sobre la fijación de nitrógeno en estromatolitos o florecimientos de cianobacterias en columna de agua. La tabla 8 incluye solamente algunos de los múltiples valores que han sido generados en la investigación sobre fijación de nitrógeno en ambientes acuáticos.

**Tabla 8.** Valores de fijación de nitrógeno en tapetes microbianos, estromatolitos y florecimientos en columna de agua generados por cianobacterias en diversos ambientes: a) bentónico marino, b) bentónico limnético, c) pelágico marino, d) pelágico limnético.

		$\mu\text{moles C}_2\text{H}_4 \text{ m}^{-2} \text{ h}^{-1}$
Bebout et al. (1987):	(a) Tapete microbiano dominado por <i>Lyngbya aestuarii</i> , <i>Microcoleus chthonoplastes</i> , <i>Phormidium</i> spp. (Carolina del Norte, EUA) (cianobacterias no-heterocíticas)	11
Bebout et al. (1993):	a) Tapete microbiano dominado por <i>Microcoleus chthonoplastes</i> , <i>Lyngbya</i> sp., <i>Oscillatoria</i> sp. (Carolina del Norte, EUA) b) <i>Lyngbya</i> sp. aislada del consorcio (cianobacterias no-heterocíticas)	175 15
Stal et al. (1994):	a) Tapete microbiano dominado por <i>Lyngbya</i> sp. (Guerrero Negro, BCS, México) (cianobacteria no-heterocítica)	190
Stal (1999):	a) Tapete microbiano dominado por <i>Oscillatoria</i> sp. (isla de Texel, Holanda) (cianobacteria no-heterocítica)	20
Este estudio:	b) Estromatolito esponjoso (cianobacterias heterocíticas y no-heterocíticas)	10
	b) Estromatolito columnar (Alchichica, Puebla, México) (cianobacterias no-heterocíticas)	9
	a) Tapete microbiano dominado por <i>Lyngbya</i> sp. (cianobacteria no-heterocítica)	42
	a) Tapete microbiano dominado por <i>Calothrix</i> sp. (Guerrero Negro, BCS, México) (cianobacteria heterocítica)	0.6
Carpenter & Romans (1991):	c) <i>Trichodesmium</i> sp. (Océano Atlántico Norte) (cianobacteria no-heterocítica)	22
Este estudio:	d) <i>N. cf. spumigena</i> (Alchichica, Puebla, México) (cianobacteria heterocítica)	17

La mayor parte de los consorcios de microorganismos bentónicos indicados en la tabla 8 están compuestos por cianobacterias no-

heterocíticas; las excepciones son el estromatolito esponjoso (Alchichica) y el tapete microbiano dominado por *Calothrix* sp. (Guerrero Negro). Stal (1999) propone que la dominancia de cianobacterias no-heterocíticas en este tipo de consorcio puede deberse al efecto dañino del sulfuro como residuo de la actividad sulfato-reductora, al cual las cianobacterias heterocíticas son menos tolerantes. La inhibición de la fotosíntesis por el sulfuro favorecería la actividad diazótrofa de las cianobacterias no-heterocíticas; sin embargo no medimos este compuesto.

La actividad de la nitrogenasa en los consorcios bentónicos varía en más de dos órdenes de magnitud (0.6-190), lo cual es interesante a nivel del aporte de formas reducidas de nitrógeno por diversos consorcios de microorganismos. En columna de agua, los valores de actividad diazótrofa de la cianobacteria no-heterocítica oceánica *Trichodesmium* sp. y la cianobacteria heterocítica limnética *N. cf. spumigena* son similares (22 y 17  $\mu\text{M C}_2\text{H}_4 \text{ m}^{-2} \text{ h}^{-1}$ ). Ambas cianobacterias presentan florecimientos estacionales. En el caso de *Trichodesmium* sp., representa un aporte global de nitrógeno planctónico oceánico importante (Capone & Carpenter, 1999), sin embargo aún se desconoce con certeza este valor. Estos autores proponen que en el ámbito mundial para el ambiente oceánico las tasas de fijación de nitrógeno planctónicas son de 65 Tg año<sup>-1</sup> y las bentónicas son de 15 Tg año<sup>-1</sup>. Aún no existen estas estimaciones para ambientes limnéticos.

**Actividad diazotrofa en el lago cráter de Alchichica: destinos posibles del nitrógeno reducido.**

Alchichica se caracteriza por presentar una productividad generalmente baja y uniforme, ocasionada por una limitación de nutrientes a lo largo del año, con excepción del periodo de florecimiento primaveral, cuando la columna de agua no está estratificada. Es de esperarse que a través del florecimiento de *N. cf. spumigena*, se aportaran formas reducidas de nitrógeno al sistema, las cuales serían incorporadas directamente a la cadena trófica. Escobar et al. (1999) mostraron que el carbono biogénico originado por la *N. cf. spumigena* no es incorporado al sistema pelágico. Es posible que la mayor parte de este material sea transportado al fondo, generando condiciones de anoxia, debido a su descomposición bacteriana. La columna de agua que se encuentra fuertemente estratificada durante casi nueve meses, fomenta la acumulación de las células de *N. cf. spumigena* por debajo de la zona eufótica, mediante su exportación al fondo (hipolimnion). Es posible que una parte de las células de *N. cf. spumigena* durante el florecimiento sean llevadas a la orilla por efecto del viento, en donde podrían descomponerse y tal vez favorecer la biomasa de invertebrados bentónicos. Las cianobacterias suelen ser incorporadas a la cadena trófica vía el detrito (Stewart, 1975). Verschuren et al. (1999) proponen que diversas especies limnéticas de cladóceros podrían estar adaptados a una dieta de cianobacterias filamentosas. Otra posibilidad es que exista lisis celular del florecimiento de *N. cf. spumigena* en la zona eufótica por la acción de viral,

los cuales liberarían las formas reducidas de nitrógeno al sistema (Thingstad et al., 1993). En el caso de los estromatolitos, es posible que las formas reducidas de nitrógeno generadas mediante su actividad diazótropa sean incorporadas directamente por invertebrados bentónicos o por la ruta de los detritos, sin embargo no existen pruebas al respecto.

Este estudio ha permitido reconocer que existe una actividad diazótropa en el lago cráter de Alchichica tanto por los estromatolitos como por el florecimiento de la cianobacteria de columna de agua *N. cf. spumigena*. Los valores obtenidos nos han permitido ampliar nuestra visión de este proceso en los ambientes acuáticos de México, pero sobre todo han dejado muchas preguntas abiertas para quien decida continuar sobre esta rama de investigación.

## Conclusiones

- 1) La actividad diazotrofa del estromatolito esponjoso fue diurna para ambos tratamientos de radiación UV, con valores máximos para los intervalos de incubación de las 6-12 hrs (con UV:  $18.8 \pm 9.7$   $\mu\text{moles C}_2\text{H}_4 \text{ m}^{-2} \text{ h}^{-1}$ , sin UV:  $17 \pm 5.7$   $\mu\text{moles C}_2\text{H}_4 \text{ m}^{-2} \text{ h}^{-1}$ ) y 12-18 hrs (con UV:  $18 \pm 3.5$   $\mu\text{moles C}_2\text{H}_4 \text{ m}^{-2} \text{ h}^{-1}$ , sin UV:  $36.8 \pm 16.5$   $\mu\text{moles C}_2\text{H}_4 \text{ m}^{-2} \text{ h}^{-1}$ ). La radiación UV no afectó significativamente la tasa de fijación de nitrógeno ( $p = 0.0523$ ) sin embargo en su ausencia, la actividad de la nitrogenasa aumentó de 1.4-1.7 veces.
- 2) La actividad diazotrofa del estromatolito columnar presentó valores máximos para ambos tratamientos de radiación UV de 6-12 hrs (con UV:  $8.9 \pm 4.5$   $\mu\text{moles C}_2\text{H}_4 \text{ m}^{-2} \text{ h}^{-1}$ , sin UV:  $6.8 \pm 2.5$   $\mu\text{moles C}_2\text{H}_4 \text{ m}^{-2} \text{ h}^{-1}$ ) y de 12-18 hrs (con UV:  $14.3 \pm 6.3$   $\mu\text{moles C}_2\text{H}_4 \text{ m}^{-2} \text{ h}^{-1}$ , sin UV:  $33.1 \pm 15.4$   $\mu\text{moles C}_2\text{H}_4 \text{ m}^{-2} \text{ h}^{-1}$ ). Aún cuando no hubo diferencias significativas para la actividad diazotrofa en presencia de radiación UV ( $p = 0.2806$ ), los valores tendieron a aumentar en ausencia de esta de 0.4 a 1.6 veces.
- 3) La cianobacteria planctónica *N. cf. spumigena* presentó actividad diazotrofa tanto diurna como nocturna en presencia de radiación UV, con un pico máximo de actividad en el intervalo de incubación de 18-24 hrs ( $36.2 \pm 9.3$   $\mu\text{moles C}_2\text{H}_4 \text{ m}^{-2} \text{ h}^{-1}$ ). En ausencia de radiación UV la actividad de la nitrogenasa continuó ascendiendo de las 6-24 hrs, con



máximo de actividad de 18-24 hrs ( $78.9 \pm 12.1 \mu\text{moles C}_2\text{H}_4 \text{ m}^{-2} \text{ h}^{-1}$ ). La radiación UV afectó significativamente la fijación de nitrógeno ( $p = 0.0019$ ), y en su ausencia aumentó 2.5 veces.

- 4) Ambos estromatolitos presentaron diferencias significativas en sus tasas de fijación de nitrógeno después del florecimiento de *N. cf. spumigena*: estromatolito esponjoso ( $p = 0.0109$ ) y estromatolito columnar ( $p = 0.0030$ ) antes vs después del florecimiento; estromatolito esponjoso ( $p = 0.0227$ ) y estromatolito columnar ( $p = 0.0000$ ) durante vs después del florecimiento.

## Propuestas y Perspectivas

En los estromatolitos del lago cráter Alchichica, se podrían incluir trabajos sobre la actividad diazótrofa de los diversos microorganismos del consorcio. Lo anterior implica afrontar el estudio de este sistema desde una perspectiva multidisciplinaria que incluya aspectos de biología molecular y celular, ecofisiología, ecología microbiana y biogeoquímica del consorcio microbiano.

El análisis molecular de los genes *nif* en ambos consorcios estromatolíticos como consorcio planctónico durante el florecimiento resultaría indispensable para caracterizar a los componentes diazótrofos de este sistema.

Experimentos que se podrían llevar a cabo para identificar la aportación de los diversos grupos diazótrofos incluyen el estudio de la afectación a las tasas de fijación de nitrógeno por la utilización de inhibidores metabólicos específicos para bacterias sulfato-reductoras, sulfato-oxidantes, fotótrofas oxigénicas y anoxigénicas, metanógenas y heterótrofas. Este tipo de experimento podría utilizarse para aprender más acerca del consorcio de microorganismos planctónico durante el florecimiento primaveral.

Sería interesante realizar ciclos de 24 horas de actividad de la nitrogenasa en los estromatolitos para antes, durante y después de la circulación invernal del lago y florecimiento de primavera. Es posible que

haya una variación temporal en la presencia de los picos máximos de actividad diazótropa en los estromatolitos.

Hace falta profundizar en el conocimiento de la distribución de la nitrogenasa en las cianobacterias no-heterocíticas de los consorcios estromatolíticos al igual que conocer la proporción de células que presentan la nitrogenasa con relación a células con actividad fotosintética dentro del consorcio. Estos estudios nos permitirían comprender mejor los patrones de fijación de nitrógeno en ambos tipos de estromatolitos.

Resultaría importante conocer los patrones de actividad diazótropa en un gradiente batimétrico para poder obtener así una estimación del aporte global de formas reducidas de nitrógeno al lago cráter, tanto por la cianobacteria en columna de agua durante el florecimiento como por ambos estromatolitos. Estos estudios deberán de ir asociados al análisis de la actividad fotosintética en el gradiente batimétrico.

Sería interesante aislar a los diferentes microorganismos de cada consorcio estromatolítico y cuantificar en cultivo su actividad diazótropa, para evaluar el aporte de cada uno de estos a la tasa global de fijación de nitrógeno. Resultaría también muy interesante conocer la relación entre la biomasa de cada grupo de organismos y su actividad diazótropa.

Resulta necesario llevar a cabo mediciones de las formas de nitrógeno presentes en el agua y sedimento en los periodos de antes, durante y después del florecimiento de *N. cf. spumigena*.

El efecto de la radiación UV sobre los estromatolitos y la *N. cf. spumigena* deberán ser llevados a cabo con mayor detalle. Por ejemplo, se podrían estudiar los posibles patrones de migración de las cianobacterias ante la exposición a la radiación UV, y el efecto de esta sobre la asimilación de  $^{14}\text{CO}_2$  para observar el efecto sobre fotosíntesis. La presencia de pigmentos protectores a la radiación UV como scitonemina y amino ácidos *tipo* micosporina en los microorganismos de ambos estromatolitos podría ser analizado.

Referencias  
(formato seguido de: *Hydrobiologia*)

- Alcocer, J., A. Lugo, A. Estrada, S. Ubeda, & E. Escobar, 1993. Littoral chironomids of a Mexican Plateau athallassohaline lake. *Verh. Internat. Verein. Limnol.* 25, 444-447.
- Babu, G. S., P. C. Joshi, & P. N. Viswanathan, 1998. UVB-induced reduction in biomass and overall productivity of cyanobacteria. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 244, 138-142.
- Bebout, B. M., H. W. Paerl, K. M. Crocker & L. E. Prufert, 1987. Diel interactions of oxygenic photosynthesis and N<sub>2</sub> fixation (acetylene reduction) in a marine microbial mat community. *App. environ. Microbiol.* 53 (10), 2352-2362.
- Bebout, B. M., 1992. Interactions of carbon and nitrogen cycling in microbial mats and stromatolites, Ph. D. Dissertation, University of North Carolina at Chapel Hill, 134 pp.
- Bebout, B. M., M. W. Fitzpatrick & H. W. Paerl, 1993. Identification of the sources of energy for nitrogen fixation and physiological characterization of nitrogen-fixing members of a marine microbial mat community. *App. environ. Microbiol.* 59 (5), 1495-1503.
- Bebout, B. M. & F. Garcia-Pichel, 1994. UV B-induced vertical migrations of cyanobacteria in a microbial mat. *App. environ. Microbiol.* 61 (12), 4215-4222.
- Bell, P. R. F, I. Elmetri & P. Uwins, 1999. Nitrogen fixation by *Trichodesmium* spp. in the Central and Northern Great Barrier Reef Lagoon: relative importance of the fixed-nitrogen load. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 186, 119-126.
- Bergman, B., 1981. Glyoxylate decreases the oxygen sensitivity of nitrogenase activity and photosynthesis in the cyanobacterium *Anabaena cylindrica*. *Planta.* 152, 302-306.

- Bergman, B., J. R. Gallon, A. N. Rai & L. J. Stal, 1997. N<sub>2</sub> fixation by non-heterocystous cyanobacteria. *FEMS Microbiol. Rev.* 19, 139-185.
- Bergman, B., 1999. Distribution of nitrogenase in the marine non-heterocystous cyanobacterium *Trichodemium*: a review. In L. Charpy & A. W. D. Larkum (eds.), *Marine Cyanobacteria*. Bull. Inst. Oceano. Monaco. 19, 223-227.
- Blackburn, T. H. & J. Sørensen, 1985. Nitrogen cycling in coastal marine environments. John Wiley & Sons, N. Y. 123 pp.
- Boeth, H. & G. Neur, 1988. Electron donation to nitrogenase in heterocysts. In J. N. Aleson & M. I. Simon (eds.), *Methods in Enzymology, Cyanobacteria*. 167, 494-501.
- Brenowitz, S. & R. W. Castenholz, 1997. Long-term effects of UV and visible irradiance on natural populations of a scytonemin-containing cyanobacterium (*Calothrix* sp.). *FEMS Microbiol. Ecol.* 24, 343-352.
- Bronk, D., P. M. Glibert & B. B. Ward, 1994. Nitrogen uptake, dissolved organic nitrogen release, and new production. *Science*. 265, 1843-1846.
- Burris, R. H., 1976. Nitrogen fixation by blue-green algae of the Lizard Island area of the Great Barrier Reef. *Aust. J. Plant Physiol.* 3, 41-51.
- Capone, D. G., 1983. Benthic nitrogen fixation. In E. J. Carpenter & D. G. Capone (eds.), *Nitrogen in the marine environment*. Academic Press, N.Y. pp. 105-137.
- Capone, D. G., J. Zehr, H. Paerl, B. Bergman & E. J. Carpenter, 1997. *Trichodesmium*: A globally significant marine cyanobacterium. *Science*. 276, 1221-1229.
- Capone, D. G., A. Subramaniam, J. P. Montoya, M. Voss, C. Humborg, A. M. Johansen, R. L. Siefert & E. J. Carpenter, 1998. An extensive bloom of the N<sub>2</sub>-fixing cyanobacterium *Trichodesmium erythraeum* in the central Arabian Sea. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 172, 281-292.

- Capone, D. G. & E. J. Carpenter, 1999. Nitrogen fixation by marine cyanobacteria: historical and global perspectives. In L. Charpy & A. W. D. Larkum (eds.), *Marine Cyanobacteria*. Bull. Inst. Oceano. Monaco. 19, 235-256.
- Carmichael, W. W., 1994. The toxins of cyanobacteria. *Sci. Am.* 270 (1), 64-72.
- Carpenter, E. J. & J. J. McCarthy, 1975. Nitrogen fixation and uptake of combined nitrogenous nutrients by *Oscillatoria (Trichodesmium) thiebautii* in the western Sargasso Sea. *Limnol. Oceanogr.* 20, 389-401.
- Carpenter, E. J. & C. C. Price, 1976. Marine *Oscillatoria (Trichodesmium)*: explanation for aerobic nitrogen fixation without heterocysts. *Science*. 191, 1278-1280.
- Carpenter, E. J., 1983. Nitrogen fixation by marine *Oscillatoria (Trichodesmium)* in the world's oceans. In E. J. Carpenter & D. G. Capone (eds.), *Nitrogen in the marine environment*. Academic Press, Inc. pp. 65-103.
- Carpenter, E. J. & K. Romans, 1991. Major role of the cyanobacterium *Trichodesmium* in nutrient cycling in the North Atlantic Ocean. *Science*. 254, 1356-1358.
- Carpenter, E. J. & D. G. Capone, 1992. Nitrogen fixation in *Trichodesmium* blooms. In E. J. Carpenter, D. G. Capone & J. G. Reuter (eds.), *Marine pelagic cyanobacteria: Trichodesmium and other diazotrophs*. Kluwer Academic Publishers, London. pp. 211-218.
- Castenholz, R. W., 1976. The effect of sulfide on the blue-green algae of hot springs. I. New Zealand and Iceland. *J. Phycol.* 12, 54-68.
- Castenholz, R. W. & F. Garcia-Pichel, 1997. Cyanobacterial responses to UV-radiation. In B. A., Whitton & M. Potts (eds.), *Ecology of cyanobacteria: Their diversity in time and space*. Kluwer Academic Publications, London. pp. 78-89.

- Charpy-Roubaud, C., L. Charpy, A. W. D. Larkum, 1997. Contribution of N<sub>2</sub> fixation to N primary productivity of the lagoon of Tikehau. Proc. 8<sup>th</sup> Int. Coral Reef Symp. 1, 803-808.
- Coyer, J. A., A. Cabello-Pasini, H. Swift & R. Alberte, 1996. N<sub>2</sub> fixation in marine heterotrophic bacteria: Dynamics of environmental and molecular regulation. Proc. Natn. Acad. Sci. U.S.A. 93, 3575-3580.
- Dean, D. & M. R. Jacobson, 1992. Biochemical genetics of the nitrogenase. In G. Stacey, R. H. Burris & H. J. Evans (eds.), Biological nitrogen fixation. Chapman & Hall, N.Y. pp. 763-833.
- Des Marais, D. J., 1995. The biogeochemistry of hypersaline microbial mats. In J. G. Jones (ed.), Advances in Microbial Ecology, 14. Plenum Press, N.Y. pp. 251-274.
- Escobar, E., J. Alcocer, E. Cienfuegos, & P. Morales, 1999. Carbon stable isotopes ratios of pelagic and littoral communities in Alchichica crater-lake, Mexico. Int. J. Salt Lake Res. 7 (4), 345-355.
- Gallon, J. R. & L. J. Stahl, 1992. N<sub>2</sub> fixation in non-heterocystous cyanobacteria: an overview. In E. J. Carpenter, D. G. Capone & J. G. Reuter (eds.), Marine pelagic cyanobacteria: *Trichodesmium* and other diazotrophs. Kluwer Academic Publishers, London. pp. 115-140.
- Garcia-Pichel, F. & R. W. Castenholz, 1993. Occurrence of UV-absorbing, mycosporine-like compounds among cyanobacterial isolates and an estimate of their screening capacity. Appl. environ. Microbiol. 59, 163-169.
- Garcia-Pichel, F. & R. W. Castenholz, 1991. Characterization and biological implications of Scytonemin, a cyanobacterial sheath pigment. J. Phycol. 27, 395-409.
- Garcia-Pichel, F., C. W. Wingard & R. W. Castenholz, 1993. Evidence regarding the UV sunscreen role of a mycosporine-like compound in the cyanobacterium *Gloeocapsa* sp. Appl. environ. Microbiol. 59 (1), 170-176.



- Garcia-Pichel, F. & R. W. Castenholz, 1994. On the significance of solar ultraviolet radiation for the ecology of microbial mats. In L. J. Stal & P. Caumette (eds.), *Microbial mats: structure, development and environmental significance*. Springer-Verlag. pp. 77-84.
- Haselkorn, R., 1986. Organization of the genes for nitrogen fixation in photosynthetic bacteria and cyanobacteria. *Ann. Rev. Microbiol.* 40, 525-547.
- Herbst, D. B., 1998. Potential salinity limitations on nitrogen fixation in sediments from Mono Lake, California. *Int. J. Salt Lake Res.* 7, 261-274.
- Hobbie, J. E. & M. M. Fletcher, 1988. The aquatic environment. In J. M. Lurch & J. E. Hobbie (eds.), *Micro-organisms in action: Concepts and applications in microbial ecology*. Blackwell Scientific Publications, N. Y. pp. 132-262.
- Holm-Hansen, O., D. Lubin & E. W. Heibling, 1993. Ultraviolet radiation and its effect on organisms in aquatic environments. In Young, A. R., L. O. Björn, J. Moan & W. Nultsch (eds.), *Environmental UV Photobiology*. Plenum Press, N.Y. pp. 379-425.
- Karentz, D., F. S. McEuen, M. C. Land & W. C. Dunlap, 1991. Survey of mycosporin-like amino acid compounds in Antarctic marine organisms: potential protection from ultraviolet exposure. *Mar. Biol.* 108, 157-166.
- Khamees, H. S., J. R. Gallon & A. E. Chaplin, 1987. The pattern of acetylene reduction by cyanobacteria grown under alternating light and darkness. *Brit. Phycol. J.* 22, 55-60.
- Kirshtein, J. D., H. W. Paerl & J. Zehr, 1991. Amplification, cloning and sequencing of a *nifH* segment from aquatic microorganisms and natural communities. *Appl. Envir. Microbiol.* 57, 2645-2650.
- Krumbein, W. E., 1978. Algal mats and their lithification. In W. E. Krumbein (ed.), *Environmental biogeochemistry and geomicrobiology*. Ann Arbor Science Publishers Inc. pp. 209-227.

- Larkum, A. W. D., I. R. Kennedy, W. J. Muller, 1988. Nitrogen fixation on a coral reef. *Mar. Biol.* 95, 143-155.
- Larkum, A. W. D., 1999. The cyanobacteria of coral reefs. In L. Charpy & A. W. D. Larkum (eds.), *Marine Cyanobacteria*. Bull. Inst. Oceano. Monaco. 19, 149-167.
- Libes, S. M., 1992. *An Introduction to Marine Biogeochemistry*. John Wiley & Sons, Inc. Canada, 734 pp.
- Lugo, A., J. Alcocer, M. Sanchez & E. Escobar, 1993. Trophic status of tropical lakes indicated by littoral protozoan assemblages. *Verh. Internat. Verein. Limnol.* 25, 441-443.
- Mayne, B. C., 1984. Photosynthesis and the biochemistry of nitrogen fixation. In M. Alexander (ed.), *Biological nitrogen fixation*. Plenum Press, N.Y. pp. 225-242.
- Mitchell, D. L. & D. Karentz, 1993. The induction and repair of DNA photodamage in the environment. In Young, A. R., L. O. Björn, J. Moan & W. Nultsch (eds.), *Environmental UV photobiology*. Plenum Press, N.Y. pp. 345-377.
- Moore, L. S. & R. V. Burne, 1995. The modern thrombolites of Lake Clifton, Australia. In J. Bertrand-Sarfati & C. Monty (eds.), *Phanerozoic Stromatolites II*. Crown Copyright, Holanda. pp. 3-29.
- Mulder, E. G., 1975. Physiology and ecology of free-living, nitrogen-fixing bacteria. In W. D. P. Stewart (ed.), *Nitrogen fixation by free-living micro-organisms*. Cambridge University Press, Gran Bretaña. pp. 3-28.
- Olson, J. B., R. W. Litaker, H. W. Paerl, 1999. Ubiquity of heterotrophic diazotrophs in marine microbial mats. *Aquat. Microb. Ecol.* 19, 29-36.
- Paerl, H.W., B. M. Bebut & L. E. Prufert, 1989. Naturally occurring patterns of oxygenic photosynthesis and N<sub>2</sub> fixation in a marine microbial mat: physiological and ecological ramifications. In Y. Cohen & E. Rosenberg (eds.), *Microbial mats: physiological ecology of benthic*

- microbial communities. *Am. Soc. Microbiol.*, Washington, D.C. pp. 326-341.
- Paerl, H. W., J. M. Pinckney & T. F. Stegge, 2000. Cyanobacterial-bacterial mat consortia: examining the functional unit of microbial survival and growth in extreme environments. *Env. Microb.* 2 (1), 11-26.
- Postgate, J., 1978. Nitrogen fixation. *The Institute of Biology studies in biology*, 92. Edward Arnold Limited, Gran Bretaña, 67 pp.
- Rastettler, E. B., R. B. McKane, G. R. Shaver & J. B. Melillo, 1992. Changes in C storage by terrestrial ecosystems: How C-N interactions restrict responses to CO<sub>2</sub> and temperature. In J. Wisniewski & A. Lugo (eds.), *Natural sinks of CO<sub>2</sub>*. Kluwer Academic Press, London. pp. 45-61.
- Rouessac, F., 1992. *Analyse chimique*. Masson, Paris, 295 pp.
- Shahak, Y., M. Schütz, M. Bronstein, C. Griesbeck, G. Hauska & E. Padan, 1999. Sulfide-dependent anoxygenic photosynthesis in prokaryotes. In L.I. Peschek (ed.), *The phototrophic prokaryotes*. Kluwer Academic Press, N.Y. pp. 217-228.
- Shilo, M., 1989. The unique characteristics of benthic cyanobacteria. In Y. Cohen & E. Rosenberg (eds.), *Microbial mats: physiological ecology of benthic microbial communities*. *Am. Soc. Microbiol.*, Washington, D.C. pp. 207-213.
- Smith, S. V., 1984. Phosphorus versus nitrogen limitation in the marine environment. *Limnol. Oceanogr.* 29, 1149-1160.
- Smith, R. C., B. B. Prezelin, K. S. Baker, R. R. Bidigare, N. P. Boucher, T. Coley, D. Karentz, S. MacIntyre, H. A. Matlick, D. Menzies, M. Ondrusek, Z. Wan & K. J. Waters, 1992. Ozone depletion: ultraviolet radiation and phytoplankton biology in Antarctic waters. *Science*. 255, 952-959.
- Sprent, J. I. & P. Sprent, 1990. *Nitrogen-fixing organisms: Pure and applied aspects*. Chapman & Hall, London, 256 pp.

- Stal, L. J. 1985. Nitrogen-fixing cyanobacteria in a marine microbial mat. Ph.D. Thesis, Groningen University, The Netherlands, 174 pp.
- Stal, L. J., 1988. Nitrogen fixation in cyanobacterial mats. In L. Parker & A. N. Glazer (eds.), *Methods in Enzymology: Cyanobacteria*, 167. Academic Press, Inc. pp. 474-484.
- Stal, L. J., S. Grossberger & W. E. Krumbein, 1984. Nitrogen fixation associated with the cyanobacterial mat of a marine laminated microbial ecosystem. *Mar. Biol.* 82, 217-232.
- Stal, L. J., 1995. Physiological ecology of cyanobacteria in microbial mats and other communities. *Tans. Rev.* 84, 1-32.
- Stal, L. J., 1999. Nitrogen fixation in microbial mats and stromatolites. In L. Charpy & A. W. D. Larkum (eds.), *Marine Cyanobacteria*. *Bull. Inst. Océano. Monaco.* 19, 357-363.
- Steepe, T. F., J. B. Olson, H. W. Paerl, R. W. Littaker & J. Belnao, 1996. Consortial N<sub>2</sub> fixation: a strategy for meeting nitrogen requirements of marine and terrestrial cyanobacterial mats. *FEMS Micro. Ecol.* 21, 149-156.
- Stewart, W. D. P., T. Mague, G. P. Fitzgerald & R. H. Burris, 1971. Nitrogenase activity in Wisconsin lakes of differing degrees of eutrophication. *New Phytol.* 70, 497-509.
- Stewart, W. D. P., A. Haystead & M. W. N. Dharmawardene, 1975. Nitrogen assimilation and metabolism in blue-green algae. In W. D. P. Stewart (ed.), *Nitrogen fixation by free-living micro-organisms*. Cambridge University Press, London. pp. 129-158.
- Suttle, C., 1999. Do viruses control the oceans? *Nat. Hist.* 108 (1), 48-51.
- Szulc, J. & B. Smyk, 1994. Bacterial calcification in freshwater environments. In J. Bertrand-Sarfati & C. Monty (eds.), *Phanerozoic Stromatolites II*. Crown Copyright, Holanda. pp. 31-49.
- Tavera, R. & J. Komárek, 1996. Cyanoprokaryotes in the volcanic lake of Alchichica, Puebla state, Mexico. *Alg. Stud.* 83, 511-538.

- Thingstad, T. F., M. Heldal, G. Bratback & I. Dundas, 1993. Are viruses important partners in pelagic food webs? *Trds. Ecol. Evol.* 209-213.
- Vanderhoef, L. N., P. J. Leibson, R. J. Musil, C. Y., Huang, R. E. Fiehweg, J. W. Wiliamns, D. L. Wackwitz & K. T. Mason, 1975. Diurnal variation in algal acetylene reduction (nitrogen fixation) *in situ*. *Plant Physiol.* 55, 273-276.
- Van Gernerden, H. 1983. Microbial mats: a joint venture. *Mar. Geol.* 113, 3-25.
- Verschuren, D., C. Cocquyt, J. Tibby, C. N. Roberts & P. R. Leavitt, 1999. Long-term dynamics of algal and invertebrate communities in a small, fluctuating tropical soda lake. *Limnol. Oceanogr.* 44 (5), 1216-1231.
- Villbrandt, M. & L. J. Stal, 1996. The effect of sulfide on nitrogen fixation in heterocystous and non-heterocystous cyanobacterial mat communities. *Algol. Stud.* 83, 549-563.
- Walter, M. R., J. P. Grotzinger & J. W. Schopf, 1992. Proterozoic stromatolites. In J. W. Schopf & C. Klein (eds.), *The proterozoic biosphere: A multidisciplinary study*. Cambridge University Press, N. Y. pp. 253-260.
- Wharton, R. A., 1994. Microbial stromatolites in Antarctica. In J. Bertrand-Sarfati & C. Monty (eds.), *Phanerozoic Stromatolites II*. Crown Copyright, Holanda. pp. 53-69.
- Whitton, B. A., 1987. Survival and dormancy of blue-green algae. In Y. Henis (ed.), *Survival and dormancy of microorganisms*. John Wiley and Sons, N. Y. pp. 109-167.
- Zehr, J. P., 1992. Molecular biology of nitrogen fixation in natural populations of marine cyanobacteria. In E. J. Carpenter, D. G. Capone & J. G. Reuter (eds.), *Marine pelagic cyanobacteria: Trichodesmium and other diazotrophs*. Kluwer Academic Publishers, London. pp. 249-264.

### Anexo 1

1a. Area bajo la curva ( $\mu\text{V}$ ) de etileno para experimentos realizados durante el mes de marzo de 1999.

Hora	Réplicas	Estromatolito 1			Estromatolito 2			Blancos Agua
		UV	sin UV	sin $\text{C}_2\text{H}_2$	UV	sin UV	sin $\text{C}_2\text{H}_2$	
24-6	1	2001	4212	1122	1440	1741	516	443
24-6	2	1882	2305	1601	1991	1072	499	417
24-6	3	1327	2703	1910	753	1865	519	557
24-6	4	2610	3163		1262	1277		
6-12	1	1933	5378	521	2264	1756	511	562
6-12	2	6740	4824	756	2534	2361	503	602
6-12	3	7467	7057	562	4821	2707	478	586
6-12	4	6512	3483		2765	3333		
12-18	1	5006	5594	491	3898	6829	448	873
12-18	2	6576	8190	336	2437	5103	486	908
12-18	3	4477	12318	450	6044	12591	373	493
12-18	4	5761	15283		5555	13061		
18-24	1	1030	1376	514	987	904	545	908
18-24	2	1196	1324	550	977	1032	438	793
18-24	3	1055	2556	377	826	899	603	407
18-24	4	929	1370		1378	963		

1b. Area bajo la curva ( $\mu\text{V}$ ) de etileno para experimentos realizados durante el mes de mayo de 1999.

Hora	Réplicas	Estromatolito 1			Estromatolito 2			<i>N. cf. spumigena</i>			Blancos Agua
		UV	sin UV	sin $\text{C}_2\text{H}_2$	UV	sin UV	sin $\text{C}_2\text{H}_2$	UV	sin UV	sin $\text{C}_2\text{H}_2$	
24-6	1							2191	4721	0	280
24-6	2							1993	4013	0	351
24-6	3							2291	4907	0	232
24-6	4							2241	5077		
6-12	1	1653	se abrió	0	1648	2908	0	5653	7533	267	0
6-12	2	2221	5660	0	1392	2480	0	4756	7663	0	150
6-12	3	1766	4538	0	2025	3984	0	4860	6746	0	0
6-12	4	1923	5430		1208	3048		3384	6361		
12-18	1	3295	8392	0	4631	4721	0	3724	11152	0	237
12-18	2	2045	5256	0	3739	7251	0	3371	15112	0	166
12-18	3	2566	7162	0	4773	5687	0	4306	14552	0	186
12-18	4	3939	5182		3885	6135		2994	13570		
18-24	1							12738	17998	455	335
18-24	2							8629	22816	146	477
18-24	3							11746	19521	0	405
18-24	4							7640	24976		

1c. Area bajo la curva ( $\mu\text{V}$ ) de etileno para experimentos realizados durante el mes de julio de 1999.

Hora	Réplicas	Estromatolito 1			Estromatolito 2			Blancos Agua
		UV	sin UV	Sin C2H2	UV	sin UV	sin C2H2	
24-6	1							
24-6	2							
24-6	3							
24-6	4							
6-12	1	5758	4238	0	3122	1188	0	182
6-12	2	1213	1907	0	3711	1554	0	130
6-12	3	1684	2717	0	2186	1691	0	166
6-12	4	2319	2264		4330	1186		
12-18	1	1392	1717	0	2142	1333	0	185
12-18	2	2008	2707	176	1579	2087	0	270
12-18	3	2938	2810	0	2640	1512	159	228
12-18	4	1265	6438		2742	1268		
18-24	1							
18-24	2							
18-24	3							
18-24	4							



Anexo 2

2a. Tasas de producción de C<sub>2</sub>H<sub>4</sub> en  $\mu\text{moles m}^{-2} \text{h}^{-1}$  calculados de los experimentos realizados durante el mes de marzo de 1999.

Hora	Réplicas	Estromatolito 1			Estromatolito 2			Blancos Agua
		UV	sin UV	sin C <sub>2</sub> H <sub>2</sub>	UV	sin UV	sin C <sub>2</sub> H <sub>2</sub>	
24-6	1	4.75	13.23	1.37	2.59	3.75	0	0
24-6	2	4.29	5.91	3.21	4.71	1.18	0	0
24-6	3	2.16	7.44	4.40	-0.04	4.22	0	0
24-6	4	7.08	9.21		1.91	1.97		
6-12	1	4.49	17.71	0	5.76	3.81	0	0
6-12	2	22.93	15.58	0	6.79	6.13	0	0
6-12	3	25.72	24.15	0	15.57	7.46	0	0
6-12	4	22.06	10.43		7.68	9.86		
12-18	1	16.28	18.53	0	12.03	23.27	0	0.42
12-18	2	22.30	28.50	0	6.42	16.65	0	0.55
12-18	3	14.25	44.34	0	20.26	45.38	0	0
12-18	4	19.17	55.71		18.38	47.19		
18-24	1	1.02	2.35	0	0.86	0.54	0	0
18-24	2	1.66	2.15	0	0.82	1.03	0	0
18-24	3	1.12	6.88	0	0.24	0.52	0	0
18-24	4	0.63	2.33		2.36	0.76		

2b. Tasas de producción de C<sub>2</sub>H<sub>4</sub> en  $\mu\text{moles m}^{-2} \text{h}^{-1}$  calculados de los experimentos realizados durante el mes de mayo de 1999.

Hora	Réplicas	Estromatolito 1			Estromatolito 2			<i>N. cf. spumigena</i>			Blancos Agua
		UV	sin UV	sin C <sub>2</sub> H <sub>2</sub>	UV	sin UV	sin C <sub>2</sub> H <sub>2</sub>	UV	sin UV	Sin C <sub>2</sub> H <sub>2</sub>	
24-6	1							5.48	15.18	0	0
24-6	2							4.72	12.47	0	0
24-6	3							5.86	15.90	0	0
24-6	4							5.67	16.55		
6-12	1	9.71	-----	0	14.84	15.18	0	18.76	25.97	0	0
6-12	2	4.92	17.24	0	11.42	24.89	0	15.32	26.47	0	0
6-12	3	6.91	24.55	0	15.38	18.89	0	15.72	22.95	0	0
6-12	4	12.18	16.95		11.98	20.61		10.05	21.48		
12-18	1	13.22	23.58	0	11.36	29.56	0	11.36	39.86	0	0
12-18	2	12.65	21.34	0	13.46	21.33	0	10.00	55.06	0	0
12-18	3	21.43	19.67	0	10.87	15.65	0	13.59	52.91	0	0
12-18	4	16.75	18.78		19.65	22.25		8.56	49.14		
18-24	1							45.95	66.13	0	0
18-24	2							30.18	84.62	0	0
18-24	3							42.14	71.98	0	0
18-24	4							26.39	92.91		

2005 MAY 20 10:30 AM

2c. Tasas de producción de C<sub>2</sub>H<sub>4</sub> en  $\mu\text{moles m}^{-2} \text{h}^{-1}$  calculados de los experimentos realizados durante el mes de julio de 1999.

Hora	Réplicas	Estromatolito 1			Estromatolito 2			Blancos Agua
		UV	sin UV	sin C <sub>2</sub> H <sub>2</sub>	UV	sin UV	sin C <sub>2</sub> H <sub>2</sub>	
24-6	1							
24-6	2							
24-6	3							
24-6	4							
6-12	1	19.16	13.33	0	9.05	1.63	0	0
6-12	2	1.72	4.39	0	11.31	3.03	0	0
6-12	3	3.53	7.49	0	5.46	3.56	0	0
6-12	4	5.97	5.76		13.68	1.62		
12-18	1	2.41	3.66	0	5.29	2.18	0	0
12-18	2	4.77	7.46	0	3.13	5.08	0	0
12-18	3	8.34	7.85	0	7.20	2.87	0	0
12-18	4	1.92	21.77		7.59	1.93		
18-24	1							
18-24	2							
18-24	3							
18-24	4							

### Anexo 3

3a. Tasas de producción de C<sub>2</sub>H<sub>4</sub> en  $\mu\text{moles m}^{-2} \text{h}^{-1}$  calculados de los experimentos realizados durante el mes de diciembre de 1998.

<i>Lyngbya</i> sp.		<i>Calothrix</i> sp.	
UV	sin UV	UV	sin UV
38.47	67.46	0.0	0.18
31.30	140.96	0.63	3.18
57.58	112.98	0.0	0.20

2c. Tasas de producción de C<sub>2</sub>H<sub>4</sub> en  $\mu\text{moles m}^{-2} \text{ h}^{-1}$  calculados de los experimentos realizados durante el mes de julio de 1999.

Hora	Réplicas	Estromatolito 1			Estromatolito 2			Blancos Agua
		UV	sin UV	sin C <sub>2</sub> H <sub>2</sub>	UV	sin UV	sin C <sub>2</sub> H <sub>2</sub>	
24-6	1							
24-6	2							
24-6	3							
24-6	4							
6-12	1	19.16	13.33	0	9.05	1.63	0	0
6-12	2	1.72	4.39	0	11.31	3.03	0	0
6-12	3	3.53	7.49	0	5.46	3.56	0	0
6-12	4	5.97	5.76		13.68	1.62		
12-18	1	2.41	3.66	0	5.29	2.18	0	0
12-18	2	4.77	7.46	0	3.13	5.08	0	0
12-18	3	8.34	7.85	0	7.20	2.87	0	0
12-18	4	1.92	21.77		7.59	1.93		
18-24	1							
18-24	2							
18-24	3							
18-24	4							

### Anexo 3

3a. Tasas de producción de C<sub>2</sub>H<sub>4</sub> en  $\mu\text{moles m}^{-2} \text{ h}^{-1}$  calculados de los experimentos realizados durante el mes de diciembre de 1998.

<i>Lyngbya</i> sp.		<i>Calothrix</i> sp.	
UV	sin UV	UV	sin UV
38.47	67.46	0.0	0.18
31.30	140.96	0.63	3.18
57.58	112.98	0.0	0.20