



UNIVERSIDAD DEL MAR

Campus Puerto Ángel

Composición de cianofitas y su relación con parámetros físicoquímicos de suelo en los ecosistemas de manglar de Bahías de Huatulco

TESIS

Que como parte de los requisitos para obtener el grado de
Maestro en Ciencias en Ecología Marina

Presenta:

Gabriela Hernández Enríquez

Director de tesis:

M. en C. Ma. Nieves Trujillo Tapia

Co-Director de tesis:

Dr. Rafael Antonio Rojas Herrera

Puerto Ángel Oaxaca, 2012

Puerto Ángel Oaxaca, Noviembre del 2012

DR. EDGAR ROBLES ZAVALA
JEFE DE POSTGRADO
DE LA UNIVERSIDAD DEL MAR
PRESENTE

ACTA DE REVISIÓN DE TESIS

Después de realizar una revisión detallada del trabajo de tesis: **Composición de cianofitas y su relación con parámetros fisicoquímicos de suelo en los ecosistemas de manglar, de Bahías de Huatulco.** Presentada por la Bióloga Marina Gabriela Hernández Enríquez, se considera que cumple con los requisitos y la calidad necesaria para ser defendida en el examen profesional.

COMISIÓN REVISORA

M. en C. Ma. Nieves Trujillo Tapia
Universidad del Mar
Director



Dr. Rafael Antonio Rojas Herrera
Universidad Autónoma de Yucatán
Co-Director

Dr. Eustacio Ramírez Fuentes
Universidad del Mar
Sinodal



Dra. Hilda Patricia León Tejera
Facultad de Ciencias (UNAM)
Sinodal

Dr. Edgar Francisco Rosas Alquicira
Universidad del Mar
Sinodal

RESUMEN

El manglar es considerado un grupo ecológico de vegetación dominante, representa el entorno propicio para la actividad microbiana en suelo. Entre los microorganismos que destacan se encuentran a las cianobacterias por su capacidad de fijar nitrógeno atmosférico y convertirlo en amonio. Se tomaron muestras para la identificación, aislamiento y purificación de cianobacterias en las bahías de San Agustín, Tangolunda, Conejos, Mojón y Cuatunalco. Se analizaron los parámetros fisicoquímicos de textura, CRA, pH, CIC, CE, nitrógeno total, fósforo disponible y materia orgánica. Se obtuvo un sobrenadante que fue sembrado en medios selectivos para cianobacterias como el BG-11 (con nitrógeno) y BG-11₀ (sin nitrógeno). Se extrajo el ADN de los suelos y las muestras de cultivo de las cinco bahías, posteriormente se amplificaron con los iniciadores universales 16SS-16SR, consecutivamente se realizó una PCR anidada con los iniciadores específicos (CYA). Se hizo un DGGE, del cual se generaron curvas densitométricas y de acuerdo a las intensidades de cada banda, se realizó una matriz de presencia-ausencia para determinar el índice de diversidad de Shannon-Weaver. Por último se hizo un análisis de cluster para conocer las distancias de similitud entre los géneros identificados y sitios de muestreo, así mismo pruebas no paramétricas de Kruskal-Wallis para determinar diferencias significativas entre géneros encontrados y parámetros fisicoquímicos.

Se identificaron los géneros de: *Anabaena*, *Aphanothece*, *Aphanizomenon*, *Calothrix*, *Chroococcus*, *Fischerella*, *Gloeocapsa*, *Microcystis*, *Nostoc*, *Oscillatoria*, *Phormidium*, *Rivularia* y *Synechococcus*.

Los suelos se clasificaron en francos arenosos y arenosos, la capacidad de retención de agua fue de 50-80%, el pH registrado osciló en 6.5 a 7.8 considerando a los suelos moderadamente ácidos a ligeramente alcalinos, el nitrógeno total fue de 0.11% y 0.16%, el fósforo se encontró disponible entre 30 y 158mg/kg, la capacidad de intercambio catiónico se mantuvo en 21 a 24 Cmol/kg⁻¹ y la conductividad eléctrica osciló entre 900 a 1100 dS/m. En el análisis de cluster se observaron tres grupos formados con similitudes de más del 60%. El análisis no paramétrico de Kruskal-Wallis indicó que no existieron diferencias significativas entre las medianas de los parámetros fisicoquímicos.

Se contabilizaron un total de 157 géneros con el DGGE, el índice de Shannon-Weaver (H') obtenido fluctuó entre 2.3 y 3.08, lo que indicó que la diversidad de géneros en las cinco bahías fue de media a alta.

Palabras claves: índice de Shannon-Weaver, cluster DGGE.

ABSTRACT

The mangrove is considered an ecological group of dominant vegetation represents the environment for microbial activity in soil, including microorganisms that stand out are the cyanobacteria for their ability to fix atmospheric nitrogen and convert it into ammonium. In this study, samples were taken for identification, isolation and purification of cyanobacteria in the bays of San Agustín, Tangolunda, Conejos, Mojon and Cuatunulco, physicochemical parameters were analyzed for texture, CRA, pH, CEC, EC, total nitrogen, phosphorus available and organic matter. Supernatant was obtained which was shown on selective media for cyanobacteria as BG-11 (nitrogen) and BG-11₀ (without nitrogen). DNA was extracted from soil samples and culture of five bays subsequently amplified with the universal primers 16SS-16SR, successively nested PCR was performed with specific primers (CYA). There was a DGGE, which densitometric curves were generated and according to the intensities of each band, there was a presence-absence matrix to determine the diversity index of Shannon-Weaver. Finally there was a cluster analysis to know the distances of similarity identified gender and sample sites, also non-parametric Kruskal-Wallis test to determine significant differences found between genders and physicochemical parameters. We identified genres: *Anabaena*, *Aphanothece*, *Aphanizomenon*, *Calothrix*, *Chroococcus*, *Fischerella*, *Gloeocapsa*, *Microcystis*, *Nostoc*, *Oscillatoria*, *Phormidium*, *Rivularia* and *Synechococcus*. Soils are classified into sandy loam and sand, the water holding capacity was 50-80%, the pH ranged registered in 6.5 to 7.8 considering the moderately acid to slightly alkaline, total nitrogen was 0.11% and 0.16 %, available phosphorus is found between 30 and 158mg/kg, the cation exchange capacity was maintained at 21 to 24 Cmol/kg-1 and electrical conductivity ranged from 900 to 1100 dS / m. In cluster analysis, there were three groups formed with similarities of over 60%. Analysis nonparametric Kruskal-Wallis test indicated that no significant differences between the medians of the physicochemical parameters. There were a total of 157 genera with DGGE, the Shannon-Weaver index (H') obtained ranged between 2.3 and 3.08, indicating that gender diversity in the five bays was medium to high.

Keywords: Shannon-Weaver index, cluster, DGGE.

DEDICATORIA

A Miranda

Mi crayola mágica, la que va coloreando mis días con sus sonrisas y travesuras. Eres mi luz de vida y la personita que me ha demostrado mayor entereza, el mejor ejemplo de que cuando algo se quiere en la vida lo mejor que puedes hacer es aferrarse a ello hasta conseguirlo.

TE AMO MI PRINCESA

A Miguel Ángel

A ti pá, por el apoyo infinito y las palabras de aliento para llevar a cabo este trabajo, no ha sido tarea fácil, pero podemos decir que es una prueba superada de las muchas que nos faltan. Gracias por la familia que hemos formado.

TE AMO

A mis padres

A ustedes por la confianza que me han tenido y por nunca abandonarme aún en la distancia.

Los amo

A mis hermanos y a Miguel Alejandro

Marcela y Martín, porque aunque estamos tocándonos las narices todo el tiempo, son los mejores tíos que mi niña podría tener, a ti mi niño porque siempre estaré cuando tú me necesites.

Los amo

AGRADECIMIENTOS

A la maestra Nieves un agradecimiento muy especial, por haber confiado en mí y darme la oportunidad para realizar este tema de tesis, por hallarla en el camino y brindarme su amistad en un momento decisivo de mi vida, *“porque por algo pasan las cosas y siempre es por algo bueno”*, gracias por su tiempo y su dedicación.

A mis sinodales: Dr. Rafael Rojas Herrera, no tengo palabras para agradecerle por todo el apoyo brindado durante mi estancia en la (Universidad Autónoma de Yucatán), por su generosidad y transmisión de conocimiento en un área que yo creí estar pérdida, pero sobre todo gracias por brindarme su amistad y confianza. Dr. Eustacio Ramírez Fuentes (profe Tacho), le agradezco infinitamente sus comentarios y sugerencias, así mismo por el tiempo dedicado a esta tesis y por su valiosa amistad. Dra. Hilda León Tejera, por sus sugerencias y por el apoyo bibliográfico, también por esos momentos casuales que sin proponérselos se han originado. Dr. Edgar Rosas Alquicira por sus comentarios acertados para mejorar la calidad del documento. A todos ustedes muchas gracias.

A mis queridas compañeras del Laboratorio de Biotecnología Ambiental. Zen, Laurita, Gaby Santiago, Esmeralda, Coral y Ada.

Con cariño muy especial al Laboratorio de Biotecnología de la UADY, a Marianita, Michel, Aracely, Tania, Joaquín, Isela, Magui, a todos los recuerdo, gracias por el apoyo su ayuda fue muy valiosa.

Índice

1. Introducción	1
1.1 Generalidades del manglar	1
1.2 Suelo: definición, componentes y características.....	2
1.3 Diversidad microbiana y la genética	5
1.4 Generalidades de las cianofitas.....	6
1.5 Características morfológicas de las cianobacterias	7
1.6 Fijación biológica de nitrógeno.....	9
1.7 Metabolismo en las cianobacterias.....	11
1.8 Importancia ecológica	12
2. Antecedentes	13
2.1 Suelos agrícolas	13
2.2 Mangle.....	14
2.3 Diversidad filogenética	17
3. Justificación	19
4. Hipótesis.....	20
5. Objetivo general.....	20
5.1 Objetivos específicos.....	20
6. Material y Método	21
6.1 Zona de muestreo	22
6.2 Recolecta.....	23
6.3 Trabajo en laboratorio.....	24
6.4 Caracterización y aislamiento de cianobacterias.....	24
6.4.1 Siembra de cianobacterias	24
6.4.2 Resiembra	25
6.4.3 Identificación de cianobacterias cultivadas.....	26
6.5 Purificación.....	26

Composición de cianofitas y su relación con parámetros fisicoquímicos de suelo en los ecosistemas de manglar de Bahías de Huatulco

Gabriela Hernández Enríquez

6.5.1 Dilución seriada.....	26
6.5.2 Placas de agar.....	26
6.6 Variables fisicoquímicas de los suelos de mangle	27
6.7 Análisis Físico.....	28
6.7.1 Textura (Richards, 1993)	28
6.7.2 Capacidad de retención del agua (CRA) (Danielson <i>et al.</i> 1986)	29
6.8 Análisis Químico.....	29
6.8.1 pH (Yúfera y Carrasco, 1973)	29
6.8.2 Capacidad de intercambio catiónico (CIC) (Gee y Bauder, 1986)	30
6.8.3 Conductividad eléctrica (Richards, 1993).....	31
6.8.4 Nitrógeno total (Bremner, 1996)	31
6.8.5 Fósforo disponible (Watanabe y Olsen, 1965)	32
6.8.6 Materia orgánica (Kalembasa y Jenkinson, 1973)	33
6.9 Tinción con naranja de acridina	34
6.10 Extracción de ADN de sedimentos y muestras complejas	35
6.10.1 Determinación del ADN por electroforesis	36
6.10.2 Cuantificación del ADN.....	36
6.10.3 Amplificación por PCR.....	37
6.10.4 Gel de gradiente de desnaturalización (DGGE)	39
6.10.5 Digitalización del DGGE	40
6.11 Análisis estadísticos	41
7. Resultados.....	42
7.1 Identificación taxonómica de cianobacterias	42
7.2 Parámetros fisicoquímicos de los suelos	53
7.3 Cluster de los géneros.	57
7.4 Parámetros fisicoquímicos y la presencia de cianobacterias	59
7.5 Tinción de naranja de acridina y exopolisácaridos	61
7.6 Extracción y purificación del ADN	63

Composición de cianofitas y su relación con parámetros fisicoquímicos de suelo en los ecosistemas de manglar de Bahías de Huatulco

Gabriela Hernández Enríquez

7.6.1 Amplificación por PCR	64
7.6.2 Electroforesis en gel de gradiente desnaturizante (DGGE)	66
7.6.3 Diversidad microbiana por el índice de Shannon-Weaver (H').....	67
8. Discusión	68
8.1 Identificación de cianobacterias.....	68
8.2 Presencia de exopolisacáridos con la tinción de naranja de acridina	69
8.3 Propiedades fisicoquímicos de los suelos y su relación con cianobacterias.....	70
8.4 DGGE e índices de diversidad.....	74
9. Conclusiones	77
10. Recomendaciones.....	78
11. Bibliografía	79

Índice de figuras

Figura 1. Diagrama de flujo de la secuencia que se llevó en el experimento.	21
Figura 2. Sitios de muestreo	23
Figura 3. Cultivos de cianobacterias en medio sólido y medio de cultivo BG- 110.....	42
Figura 4. (a) Cianobacteria filamentosa <i>Oscillatoria</i> . (b) Células reproductoras conocidas como hormogonios.	44
Figura 5. (a) Cianobacteria filamentosa <i>Nostoc</i> formando colonias con mucilago. (b) y (c) Filamentos desnucados del mismo género. (d) Heterocitos intercalares en <i>Nostoc</i>	45
Figura 6. (a) Cianobacteria unicelular <i>Microcystis</i>	46
Figura 7. Cianobacteria unicelular <i>Synechococcus</i>	47
Figura 8. Colonias de cianobacterias del género <i>Gloecapsa</i>	48
Figura 9. Género unicelular <i>Chroococcus</i>	49
Figura 10. Cianobacteria unicelular del género <i>Aphanothece</i>	49
Figura 11. Cianobacteria <i>Anabaena</i> . (a) Filamentos con acinetos y heterocitos intercalares. (b) Género de <i>Anabaena</i> con heterocitos terminales. (c) Forma de acinetos. (d). Filamentos conglomerados del mismo género.	50
Figura 12 (a) Género <i>Calothrix</i> con vainas de mucilago presentes. (b) En algunos géneros de <i>Calothrix</i> por carecer de fósforo desarrolla acinetos basales. (c) y (d) Heterocitos presentes.	51
Figura 13. Género <i>Fischerella</i> (a) Con ramificaciones iniciales. (b) <i>Fischerella</i> con ramificaciones iniciales y terminales y la presencia de heterocitos. (c) y (d) Filamentos conglomerados.	52
Figura 14. Diagrama de similitud de géneros. El círculo rojo representa al primer grupo de cianobacterias identificadas con 100% de similitud. El círculo azul representa el segundo grupo encontrado en las cinco bahías, con un 90% y 70% de similitud. Y el círculo verde representa el tercer grupo teniendo una menor similitud del 60%.	58

**Composición de cianofitas y su relación con parámetros fisicoquímicos de suelo en los
ecosistemas de manglar de Bahías de Huatulco**
Gabriela Hernández Enríquez

Figura 15. Diagrama de cajas y bigotes de los parámetros de pH, CRA, Nt, P, CIC y CE y la presencia de géneros.



.....59

Figura 16. Fotomicrografías en microscopio de fluorescencia con tinción de naranja de acridina, se observó producción de exopolisacáridos y presencia de vainas de algunos de los géneros identificados.62

Figura 17. Electroforesis en gel de gradiente desnaturalizante perpendicular.....64

Figura 18 (A) ADN obtenido de muestras en sólido y medio de cultivo por el método de sílice. (B) Productos de PCR obtenidos al variar las concentraciones de MgCl₂. (C) Productos amplificados por PCR con iniciadores universales 16SS-16SR. (D) PCR con iniciadores específicos para cianobacterias CYA 781a, CYA 781b y CYA 359F, y colocado en gel de agarosa al 2% con bromuro de etidio en 1X buffer TBE.65

Figura 19. DGGE de muestras de ADN extraído de suelo (SAs, Ms, Ts, Cu y Cos) y medio de cultivo (Sal, MI, TI, Cual y ConI) de las cinco bahías de Huatulco, por el método de sílice y amplificadas con primers específicos para cianobacterias. Cada una de las líneas marcadas en los tres geles significa las bandas generadas o productos amplificados.66

Índice de cuadros

Cuadro I. Características morfológicas de las cianobacterias.	9
Cuadro II Secuencias de los iniciadores utilizados para la PCR	37
Cuadro III Mezcla maestra para la PCR	38
Cuadro IV. Características de los órdenes de cianobacterias	43
Cuadro V. Parámetros fisicoquímicos de los suelos de las cinco bahías	56
Cuadro VI. Presencia-ausencia de cianobacterias por sitio de muestreo ...	57
Cuadro VII. Valores del p- estadístico	60
Cuadro VIII. Valores obtenidos de la pureza de ADN	63
Cuadro IX. Índices de Shannon Weaver por matriz obtenida de los DGGE.	67

1. Introducción

1.1 Generalidades del manglar

El manglar es considerado un grupo ecológico de vegetación dominante en estuarios, deltas de ríos, lagunas costeras y bahías de los trópicos y subtropicos del mundo (Tomlinson, 1986). Funciona como un gran reservorio de agua en las zonas costeras, permite la recarga de los acuíferos y evita la salinización de las tierras de cultivo. También actúa como filtro biológico sedimentando el exceso de nutrientes, agroquímicos e incluso hidrocarburos que traen las aguas continentales (Ezcurra *et al.* 2009).

Las características morfológicas y funcionales que poseen los manglares les confieren un carácter colonizador, por lo que son considerados sistemas abiertos al importar y exportar materiales, y su alta productividad los vuelve importantes en la ecología de las zonas costeras.

Esto permite que el manglar se enlace con los sistemas terrestres a través de ríos, los cuales le proveen nutrientes que el sistema convierte en detritus (Menéndez y Guzmán, 2002).

Sin embargo la constante alteración del flujo de energía y materia causada por los disturbios climáticos pueden presentarse de forma espacial o temporal, ocasionando que algunos sistemas de manglar sean considerados como sistemas cerrados debido al intercambio de energía y materia disponible que continuamente se esta transformando (Mera, 1999).

En el 2009, México ocupaba el quinto lugar a nivel mundial en cobertura de manglares aproximadamente 770,057 ha, actualmente esta

cobertura se ha reducido por los impactos directos e indirectos de las actividades humanas. El Pacífico Sur cuenta con un 11% de la cobertura de manglar, aproximadamente 66,374 ha.

Se han descrito 54 especies de mangle a nivel mundial, cuatro especies existen en México, las cuales se encuentran presentes en el estado de Oaxaca: el rojo (*Rhizophora mangle*), blanco (*Laguncularia racemosa*), negro (*Avicennia germinans*) y botoncillo (*Conocarpus erectus*) (Conabio, 2009).

1.2 Suelo: definición, componentes y características

Los suelos, son considerados sistemas dinámicos que continuamente evolucionan en el espacio y tiempo, hasta alcanzar el equilibrio con las condiciones ambientales; a partir de ese momento tienden a permanecer estables. Tanto la profundidad como sus propiedades fisicoquímicas varían de acuerdo al lugar, sin embargo, están compuestos de manera general por cinco elementos principales: 1) partículas minerales inorgánicas, 2) materia orgánica, 3) agua, 4) gases y 5) microorganismos (Escorza, 2007).

La fracción del suelo inorgánica a menudo se conoce como la fracción mineral, el material parental y porcentaje que presente, de acuerdo a su tamaño, se divide en tres clases: arena (0.02-2.00 mm), limo (0.02-0.002 mm) y arcilla (<0.002 mm); las cuales en conjunto definen las propiedades físicas del mismo, determinando en gran medida la rigidez y fuerza de sostén de vida, la facilidad de penetración a las raíces, aireación, su capacidad de drenaje y de almacenamiento de agua, así como la plasticidad y retención de nutrientes.

Por lo que respecta a la fracción orgánica, está formada por cuerpos en descomposición, materia orgánica descompuesta, humus y ácidos fúlvicos, formando parte de una población biológica viva que pertenece a la microbiología del suelo. Esta base biológica, también incluye las reacciones biogeoquímicas vitales, como los ciclos del carbono y nitrógeno entre otros (Brady, 1990).

La fase líquida del suelo es esencial y es donde se realiza la mayor parte de las reacciones químicas. En esta fracción, se encuentran las sustancias disueltas, iones y solutos, creando un sistema de raíz en el suelo estrechamente relacionados.

Entre las reacciones químicas que degradan a los suelos interviene el pH, cuya variación puede afectar la disponibilidad de nutrientes y el estado fisiológico de la vida presente en los mismos, los valores óptimos de crecimiento para la actividad microbiana oscila entre 6 y 8.5, otra característica es la conductividad eléctrica que se encuentra relacionada con el tipo y valencia de iones presentes, esta cualidad determina a los suelos por su extracto de saturación y su valor puede ser igual o superior a 4 dSm⁻¹. Otra propiedad importante es la capacidad de intercambio catiónico, la cual es capaz de retener o intercambiar diferentes elementos minerales, esta condición aumenta notablemente con la presencia de materia orgánica y podría decirse que es la base que determina la fertilidad de los suelos, una alta capacidad de intercambio presenta valores superiores de 25 a 40 Cmol/kg⁻¹ (Bautista *et al.* 2004).

En el caso de los gases presentes en los poros del suelo, influyen también en muchas reacciones químicas, por ejemplo el oxígeno disuelto que actúa como un potente oxidante disolviendo el CO₂ y afectando así

mismo la acidez del medio acuoso, juega un papel importante en la determinación del pH y constituye un lugar de intercambio de oxígeno por el CO₂ excedente producido por la respiración de microorganismos y raíces (Kim y Tan, 2011).

Por último, la fracción orgánica de los suelos, es originada por la biomasa característica de un suelo activo. El material muerto suele estar dividido en: 1) material degradado, el cual la anatomía de las plantas es todavía visible y 2) material totalmente descompuesto donde conviven todos los macro y microorganismos presentes, los cuales realizan reacciones bioquímicas importantes para mineralizar la materia orgánica.

Los microorganismos en su conjunto, realizan actividades metabólicas en cada uno de los ciclos presentes en los suelos; creando una interdependencia. De esta forma, la biomasa microbiana, está relacionada con los diversos microorganismos funcionales: amonificadores y nitrificadores así como con la diversidad microbiana y la actividad enzimática en el suelo (Matsuoka *et al.* 2003; Mendes *et al.* 2003; Balota *et al.* 2004) en una diversidad de procesos, incluyendo el almacenamiento de la materia orgánica y su descomposición, la solubilización de nutrientes (particularmente fosfatos), la degradación de compuestos xenobióticos y contaminantes, así como el control de la erosión biológica por los fitopatógenos; por lo que frecuentemente se usa como un componente importante para el mantenimiento y calidad del suelo.

Por lo anterior, la calidad del suelo se define como la capacidad continua para funcionar como un sistema vivo dentro de los ecosistemas, así como los límites de su uso y mantenimiento de la productividad biológica. Tanto su productividad como mantenimiento, incluyen las poblaciones bacterianas fotoautótrofas destacando las cianobacterias, las

cuales representan la proporción autótrofa del suelo aportando nitrógeno y carbono a este. Además de que presentan la capacidad de resistir los cambios de humedad (inundación y desecación), temperaturas y variación en el pH, lo que explica el interés por su estudio y uso en la práctica de inoculación de suelos (Tomaselli y Giovannetti, 1993).

1.3 Diversidad microbiana y la genética

La complejidad de la comunidad microbiana y su diversidad en el suelo, ha hecho que el conocimiento sea limitado, en parte por su interdependencia metabólica al aislar a los microorganismos; estimándose que en 1g de suelo hay por lo menos 4000 genomas diferentes (Kirk *et al.* 2004).

Para estudiar las poblaciones y la diversidad genómica bacteriana en general y en particular de cianobacterias se utiliza una amplia gama de métodos moleculares empleando genes funcionales, informativos filogenéticamente, o bien genes que son marcadores útiles a la presencia de estos microorganismos (Berrendero, 2008). Siendo el más utilizado, el análisis de secuencias del gen 16S ARNr; este gen es empleado como herramienta molecular para examinar la estructura y diversidad de comunidades de cianobacterias (Nübel *et al.* 1997).

El gen 16S es una herramienta utilizada en la identificación de bacterias, ya que es considerado una unidad evolutivamente conservada que tiene zonas comunes para microorganismos filogenéticamente semejantes, se trata de un gen relativamente corto de aproximadamente 1500 pb. Las secuencias nucleotídicas del 16S presentan la ventaja de proporcionar un sitio de iniciación adecuado para la elongación de los

iniciadores específicos y así aplicar de forma fácil la técnica de secuenciación (Rodicio y Mendoza, 2004).

Otro de los métodos frecuentemente usados es el DGGE que separa moléculas con distinta secuencia de bases, al presentar estas diferencias en sus propiedades de desnaturalización genera variaciones en las distancias de migración en los gradientes químicos o de temperatura (McCaing *et al.* 2001).

Actualmente, las cianobacterias al ser microorganismos fotosintéticos de primer orden son consideradas como los principales productores primarios (López de los Santos, 2008). Con el fin de avanzar en su conocimiento surge el interés del presente trabajo para determinar y caracterizar taxonómicamente y con técnicas moleculares las comunidades de cianobacterias presentes en cinco sistemas de manglar de Bahías de Huatulco.

1.4 Generalidades de las cianofitas

Las cianofitas o cianobacterias, representan uno de los más antiguos linajes bacterianos conocidos y con la evidencia fósil que existe se cree que aparecieron hace 3-3.5 mil millones de años. (Scanlan, 2001). Son microorganismos que presentan tanto características de bacterias como similares a células vegetales. También cuentan con una pared celular específica de las bacterias gram negativas y una membrana externa o vaina mucilaginosa constituida por polisacáridos, (Castenholz y Waterbury, 1989) y en el citoplasma se localizan los ribosomas de tipo bacteriano (70S).

Por otro lado poseen membranas tilacoidales aisladas donde se encuentran contenidos los dos fotosistemas (PSII y PSI) conectados en serie

junto con los pigmentos fotosintéticos como la clorofila "a", carotenoides y ficobiliproteínas con función protectora (Allen y Smith, 1969). Las características bioquímicas, fisiológicas y el crecimiento de las cianobacterias son influenciadas por los factores ambientales, uno de los más importantes es el pH del ambiente (Soltani *et al.* 2006). Su reproducción es por división celular (fisión binaria) (Golubic y Knoll, 1993).

Las cianobacterias habitan una gran variedad de ambientes en donde las podemos encontrar a temperaturas de -5 a 5°C (psicrofilas), de 22 a 40°C (mesófilas) y superiores a 75°C (termófilas). Esta plasticidad fisiológica, las ubica en lagos y océanos tropicales; aunque también en ríos, fuentes termales, etc. Al igual que en los ecosistemas acuáticos, también se encuentran adaptadas en los ambientes terrestres, donde forman parte importante de la microflora, predominan en ambientes microaerobios donde el pH va de neutro o alcalinos, en suelos anegados de arrozales o secos en forma de costras en los desiertos (Benlap y Gardner, 1993).

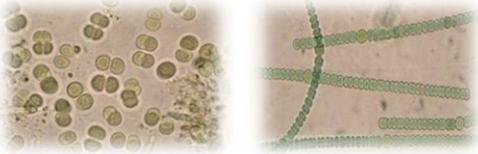
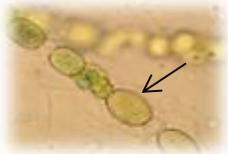
1.5 Características morfológicas de las cianobacterias

Las cianobacterias presentan una gran variedad de morfologías; estas pueden ser unicelulares o filamentosas, mientras que otras pueden desarrollar ramificaciones multicelulares o agruparse formando cenobios para asociarse con distintos organismos formando tapetes o consorcios microbianos. Esta complejidad en células, aparentemente simples, es fundamental para lograr su adaptación a los sistemas de manglar; proporcionándoles ventajas en algunos grupos con la presencia de células especializadas como los heterocitos, acinetos y hormogonios (Cuadro I).

Composición de cianofitas y su relación con parámetros fisicoquímicos de suelo en los ecosistemas de manglar de Bahías de Huatulco
Gabriela Hernández Enríquez

La diversidad de las cianobacterias, se aprecia en las formas estructurales y funcionales, así como aspectos de su morfología celular y variaciones en las estrategias metabólicas, motilidad, división celular y biología de desarrollo, sin embargo, clasificarlas ha sido un problema en el momento de identificarlas, debido a las diferencias en sus características morfológicas y fisiológicas; existiendo dos sistemas distintos que las separan: el taxonómico y el bacteriológico. Recientemente y con ayuda de herramientas moleculares se intenta unificar dichas clasificaciones.

Cuadro I. Características morfológicas de las cianobacterias.
(Komárek y Anagnostidis, 1999).

<p align="center">Células vegetativas</p> <p>Constituyen el tipo celular básico de todas las cianobacterias. Pueden ser unicelulares o filamentosas.</p>	
<p align="center">Heterocitos intercalares y terminales</p> <p>Células especializadas en donde tiene lugar la fijación del Nitrógeno, poseen gránulos polares denominados de cianoficina.</p>	
<p align="center">Acinetos</p> <p>Formas esporuladas se diferencian de las células vegetativas cuando las condiciones ambientales son desfavorables.</p>	
<p align="center">Hormogonios</p> <p>Una o más células cuya función principal es la reproducción</p>	

1.6 Fijación biológica de nitrógeno

El nitrógeno, es un elemento necesario en la composición de biomoléculas como proteínas, ácidos nucleicos y otros componentes celulares, haciéndolo esencial para el crecimiento de todos los organismos. Constituye un 78% del volumen del aire, por lo que es considerado un gas inerte, para poder ser incorporado en las moléculas biológicas debe ser

químicamente reducido al equivalente de amonio (NH_4^+). Debido a su triple enlace entre los dos átomos de nitrógeno ($\text{N}\equiv\text{N}$) lo hace una molécula no reactiva, por lo que es aprovechado solo por un grupo de microorganismos altamente especializados, que incluye a las cianobacterias y microorganismos de vida libre o simbioses diazotróficos asociados con plantas.

Las cianobacterias, al igual que algunas bacterias de vida libre como *Azospirillum*, *Azotobacter* y simbioses como *Rhizobium* y *Actinomicetos*, tienen la capacidad de fijar N_2 de la atmósfera, mediante una serie de procesos realizados por un complejo enzimático multimérico denominado Nitrogenasa (EC.1.18.6.1), el cual reduce el nitrógeno a amonio, dejándolo en una forma biológicamente disponible en los ecosistemas (Vitousek *et al.* 2002). De manera general, la ecuación de la reacción enzimática es la siguiente:



La actividad del complejo enzimático Nitrogenasa puede ser inhibida por el oxígeno, por lo que los microorganismos fijadores poseen mecanismos que les permiten mantener bajas concentraciones de este elemento en los heterocitos de las cianobacterias a fin de mantener la enzima activa. Por lo que, las cianobacterias son consideradas un componente particularmente importante de la microbiota del suelo, ya que constituyen una fuente de nitrógeno alternativa y trascendental para muchos sistemas pobres en nitrógeno, entre los que destacan los ecosistemas de manglares.

1.7 Metabolismo en las cianobacterias

Las cianobacterias, poseen un metabolismo que les ha permitido ser cruciales en la evolución de los seres vivos en la tierra por ser los primeros proveedores de oxígeno, desempeñar un papel relevante como productores primarios a gran escala, y contribuir en la biosfera dentro de los ciclos de carbono y nitrógeno. En el ciclo del carbono contribuyen un gran número de cianobacterias, se caracterizan por segregar polisacáridos, los cuales se definen principalmente por su naturaleza aniónica, ya que secuestran o inmovilizan a los iones metálicos.

Los diferentes roles que presentan los polisacáridos de las cianobacterias dependen de la cepa y sus características, así como del hábitat natural donde prosperan los microorganismos (De Philippis y Vincenzini, 1998). Presentan un papel estructural muy importante en el suelo, ya que se establecen con una película flexible, pero estable, reduciendo la erosión, proveyendo las condiciones óptimas de humedad y nutrientes para la germinación de plantas superiores. Además, le confiere resistencia a las adversidades climáticas, como el estrés por desecación o baja actividad del agua en algunos ambientes salinos.

El proceso de fijación del nitrógeno se da en el citoplasma por difusión de las membranas biológicas, en el interior la enzima nitrogenasa cataliza la reducción del nitrógeno molecular a amonio, molécula nitrogenada que puede ser incorporada en las células a compuestos orgánicos (Carrasco, 2007).

1.8 Importancia ecológica

La importancia de las cianobacterias radica en el aporte de carbono y nitrógeno a los suelos, con lo que incrementa su estabilidad y los protege de la acción erosiva; debido a la plasticidad ecológica que estas presentan, se adaptan a sistemas acuáticos dulceacuícolas y marinos, así como a sistemas terrestres; siendo principalmente abundantes en suelos tropicales (García-Pichel *et al.* 2003). Sin embargo, se sabe poco sobre la ecología de las cianobacterias, otra característica, es que son capaces de formar relaciones simbióticas con organismos como los hongos, musgos y diatomeas los cuales les proveen un sustrato para establecerse y crecer (Carrasco, 2007).

2. Antecedentes

La mayoría de las investigaciones que relacionan las propiedades de los suelos con la presencia y diversidad de cianobacterias se han hecho en el área agronómica, predominando en cultivos de arroz bajo el sistema de inundación. Por lo que respecta a los suelos de mangle, los trabajos realizados con cianobacterias están referidos principalmente a la importancia que estas tienen en los ciclos del nitrógeno, fósforo y carbono, así como al estudio de sus comunidades utilizando herramientas moleculares.

2.1 Suelos agrícolas

Los suelos cultivados, son suelos degradados y erosionados, debido a la continua actividad agrícola, por lo que se tiene un mayor interés en buscar alternativas para recuperar su calidad biológica. A este respecto las investigaciones más recientes son las de Zancan *et al.* (2006), quienes evaluaron la composición microbiana establecida en cuatro diferentes suelos de cultivo en Italia: 1) un campo abandonado durante 6 años, 2) un suelo de pastoreo y cultivo continuo considerado perturbado, 3) un viñedo cultivado desde hace 30 años y 4) un campo de maíz. Concluyeron que los suelos menos perturbados presentaron comunidades de microorganismos más diversos y abundantes comparados con los perturbados, siendo las cianobacterias el grupo más adecuado para adoptarse como bioindicador del uso del suelo.

Posteriormente, Nayak y Prasanna (2007) evaluaron la influencia del pH del suelo de nueve regiones agroecológicas de la India, determinando la abundancia y diversidad genérica de cianobacterias se encontraron en

intervalos de pH 7.5 a 8.0, registrando 166 géneros de cianobacterias; de las cuales 130 son con heterocitos (*Nostoc*, *Anabaena*, *Tolypothrix*) y 36 sin heterocitos (*Phormidium*, *Oscillatoria* y *Lyngbya*); concluyeron que los suelos ácidos no son propicios para el establecimiento de estos microorganismos.

Por último, Thamizh y Sivakumar (2011) realizaron un modelo sistemático de distribución de algas verde azules en campos de arroz de la India, con respecto a los parámetros fisicoquímicos: pH, salinidad, oxígeno disuelto total y sólidos disueltos. Identificaron 35 especies, 14 con heterocitos de los géneros *Anabaena*, *Cylindrospermum*, *Calothrix* y *Nostoc*, 21 especies sin heterocitos de los géneros *Arthrospira*, *Gloeocapsa*, *Gloethece*, *Lyngbya*, *Merismopedia*, *Oscillatoria* y *Phormidium*.

2.2 Mangle

Por lo que respecta al mangle, los estudios que se han hecho están relacionados con bacterias, entre ellos destaca el de Alongi (1994) donde menciona que las bacterias han sido generalmente reconocidas como alimento esencial para los protistas e invertebrados, estas bacterias son importantes por ser recicladoras de nutrientes esenciales como el carbono, nitrógeno y fósforo especialmente en los manglares tropicales y en los sedimentos costeros.

Por otro lado, Sherman *et al.* (1998) analizaron el papel de los procesos biogeoquímicos, su influencia en la vegetación y la química del suelo de manglar en República Dominicana donde dominan los ecosistemas de manglar rojo, blanco y negro, evaluaron variables como el hierro, fósforo y azufre en suelo y agua intersticial a través de la zona

intermareal de los manglares, encontraron que la dinámica del hierro y fósforo están estrechamente ligadas a la actividad de bacterias reductoras de sulfato consideradas las desintegradoras primarias en suelos anóxicos, presentes en estos mangles.

Sin embargo, Holguín *et al.* (2001) mencionaron que las comunidades bacterianas asociadas a los manglares de los trópicos y subtropicos del mundo son ecosistemas altamente productivos ya que proporcionan grandes cantidades de materia orgánica en forma de detritus a las aguas costeras adyacentes, por lo que, la actividad microbiana es la encargada de la transformación de los nutrientes mayores dentro de los sistemas de manglar, siendo las bacterias y hongos los que constituyen el 91% de la biomasa microbiana total.

Balasubramanian (2002) menciona que los manglares proporcionan un nicho ecológico único a una variedad de microorganismos, entre los que destacan las cianobacterias que pueden sobrevivir a bajas condiciones de luz o bien utilizando la materia orgánica que está disponible en el manglar. Describe a cianobacterias fijadoras de nitrógeno tales como *Aphanocapsa sp.*, *Nodularia sp.*, y *Trichodesmium sp.*, que han sido aisladas de manglares en Pichavaram, India. Así como el reporte de la cianobacteria *Phormidium* que tiene la capacidad de desalinizar el agua de mar.

Por su parte, Sánchez-Arias *et al.* (2010) evaluaron la actividad microbiana y enzimática de suelos de manglar, en la Isla de Margarita en Venezuela donde predomina el mangle rojo, mencionan que la biomasa microbiana analizada en dichos suelos posee poblaciones halotolerantes estables y se han adaptado a las condiciones presentes locales brindando un ambiente propicio principalmente para el crecimiento bacteriano.

Recalcan que se requerirán estudios adicionales que determinen las relaciones entre las poblaciones microbianas del suelo y su actividad, así como el estado de salud de los manglares.

En la India Pramanik *et al.* (2011) realizaron estudios antimicrobianos en cianobacterias halófilas de los géneros *Lyngbya*, *Phormidium*, *Plectonema*, *Oscillatoria* y *Synechocystis*, de suelos intermareales de mangles, analizaron secuencias con el gen 16S y determinaron las concentraciones mínimas inhibitorias de los extractos en cepas de bacterias como *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis* y *Pseudomonas aeruginosa*. Todas las cepas mostraron un crecimiento máximo y produjeron antimicrobianos ante la variable salinidad de 32 ‰ a 82 ‰. El análisis filogenético molecular basado en 16S ARNr de las cepas dio validez a las afiliaciones taxonómicas establecidas en las características morfológicas.

Por su parte León-Tejera *et al.* (2011) realizaron el primer informe sobre biodiversidad de cianobacterias en el estuario Zacatecas, en Baja California Sur, México, hacen una descripción morfológica principalmente del orden *Chroococcales* y las especies *Aphanocapsa*, *Chroococcus*, *Hydrococcus*, *Chamaecalyx*, *Dermocarpella* y *Xenococcus*, las cuales crecen en los neumatóforos de mangle negro. Los resultados obtenidos mostraron un nuevo registro para el Golfo de California, mencionan que probablemente después se caractericen como nuevas especies para la ciencia siendo necesario hacer estudios más detallados para poder confirmarlo.

Silambarasan *et al.* (2012) aislaron cianobacterias marinas de la rizosfera de suelo de tres manglares en la costa sureste de la India. Identificaron 39 cianobacterias, pertenecientes a 12 familias en donde

destaco *Oscillatoriaceae* con 11 géneros (*Oscillatoria cortiana*, *Oscillatoria salina*, *Oscillatoria tenuis*, *Oscillatoria formosa*, *Lyngbya major*, *Lyngbya confervoides*, *Lyngbya majuscula*, *Lyngbya mesotricha*, *Phormidium stagnina*, *Plectonema terebrans* y *Plectonema putuale*) y *Synechococcaceae* solo con uno (*Synechococcus elongatus*), mencionan la influencia de factores bióticos y abióticos en la distribución de las cianobacterias en dichos ambientes marinos.

2.3 Diversidad filogenética

Por lo que respecta a la diversidad filogenética en la península de Baja California, México, López de los Santos (2008) mediante la técnica en gel con gradiente desnaturante (DGGE), caracterizó comunidades de cianobacterias y bacterias de tapetes microbianos laminados, en ambientes hipersalinos intermareales e inundados. Estimó la riqueza y diversidad de la comunidad de cianobacterias del género *Aphanothece bullosa*, *Synechocystis pevalekki*, *Leptolyngbya thermalis* y *Microcoleus chthonoplastes*, respecto a la macro-estructura de los tapetes laminados y registró un 92% de los patrones de bandas de 21 submuestras, obteniendo una mayor riqueza y diversidad en la Laguna de San Ignacio que en las comunidades de Guerrero Negro, esto porque comparó las dos localidades utilizando el índice de Shannon-Weaver y obtuvo una media por localidad e identificó que la población de cianobacterias en su totalidad exhibieron una mayor diversidad en San Ignacio.

López *et al.* (2010) evaluaron la estructura de comunidades de cianobacterias en costras biológicas de 10 localidades situadas a lo largo la península de Baja California en México. En este estudio se realizaron análisis microscópicos y patrones de bandeo de secuencias del 16S ARNr

obtenidos por electroforesis en gel con gradiente desnaturalizante (DGGE), y combinaron los análisis morfológicos y filogenéticos con base en el alineamiento de los patrones de bandeo obtenidos de las muestras naturales con los cultivos de cianobacterias de referencia y determinaron la presencia o ausencia de 4 especies del género *Microcoleus*.

Castell (2010) analizó las comunidades microbianas involucradas en tapetes hipersalinos de la Laguna Rosada de Uaymitún Yucatán, en época de secas y lluvias, utilizó métodos moleculares metagenómicos como la técnica de DGGE y el análisis de amplicotecas de ADN_r, indicó una mayor diversidad por métodos indirectos, de los dos grupos más abundantes que persistieron, estos se vieron afectados principalmente por los factores ambientales como salinidad y temperatura.

Por lo que respecta a la zona de estudio establecida en este trabajo no existen antecedentes que aporten información relacionada con el estudio de parámetros fisicoquímicos en suelos de manglar y la presencia de cianobacterias en los mismos.

3. Justificación

El ecosistema de manglar es considerado de gran importancia ecológica y por su alta productividad es el sostén de una enorme variedad de organismos. Su éxito ecológico está determinado por el equilibrio nutrimental entre los diferentes ciclos biogeoquímicos, destacando la importancia del ciclo de nitrógeno, en el cual intervienen una gran cantidad de microorganismos, entre los que sobresalen las cianobacterias, la caracterización de estos microorganismos sigue siendo complicada; debido a que no todos son cultivables o bien las condiciones de cultivo son específicas, por lo que se han desarrollado estrategias moleculares, que permiten identificar a los grupos taxonómicos de las cianobacterias.

En el presente estudio se plantea caracterizar por sistemas taxonómicos convencionales y con herramientas moleculares a las comunidades de cianobacterias asociadas a sistemas de manglares, así como determinar la influencia de los parámetros fisicoquímicos que contribuyen a la diversidad de estos microorganismos presentes en dichos suelos los cuales permiten la fertilidad de los mismos y las interacciones ecológicas.

4. Hipótesis

De acuerdo a los parámetros fisicoquímicos de un suelo de manglar de un sistema cerrado, la diversidad de cianobacterias es mayor con respecto a un suelo de manglar de un sistema abierto.

5. Objetivo general

Caracterizar la diversidad de las comunidades de cianobacterias fijadoras de nitrógeno, asociadas a los suelos de manglar en Bahías de Huatulco.

5.1 Objetivos específicos

1. Caracterizar y comparar la diversidad de cianobacterias de suelo presentes entre un sistema abierto (Cuatunalco, San Agustín y Tangolunda) y cerrado (Conejos y Mojón) de manglar.
2. Determinar la relación entre las variables fisicoquímicas de los suelos (textura, CRA, pH, CIC, CE, Nt, F, materia orgánica) de mangle con la riqueza de géneros de las cianobacterias presentes.
3. Determinar el número de géneros de cianobacterias por la técnica molecular DGGE.

6. Material y Método

La parte experimental de este trabajo se desarrollo como se observa en el siguiente diagrama de flujo (Fig. 1).

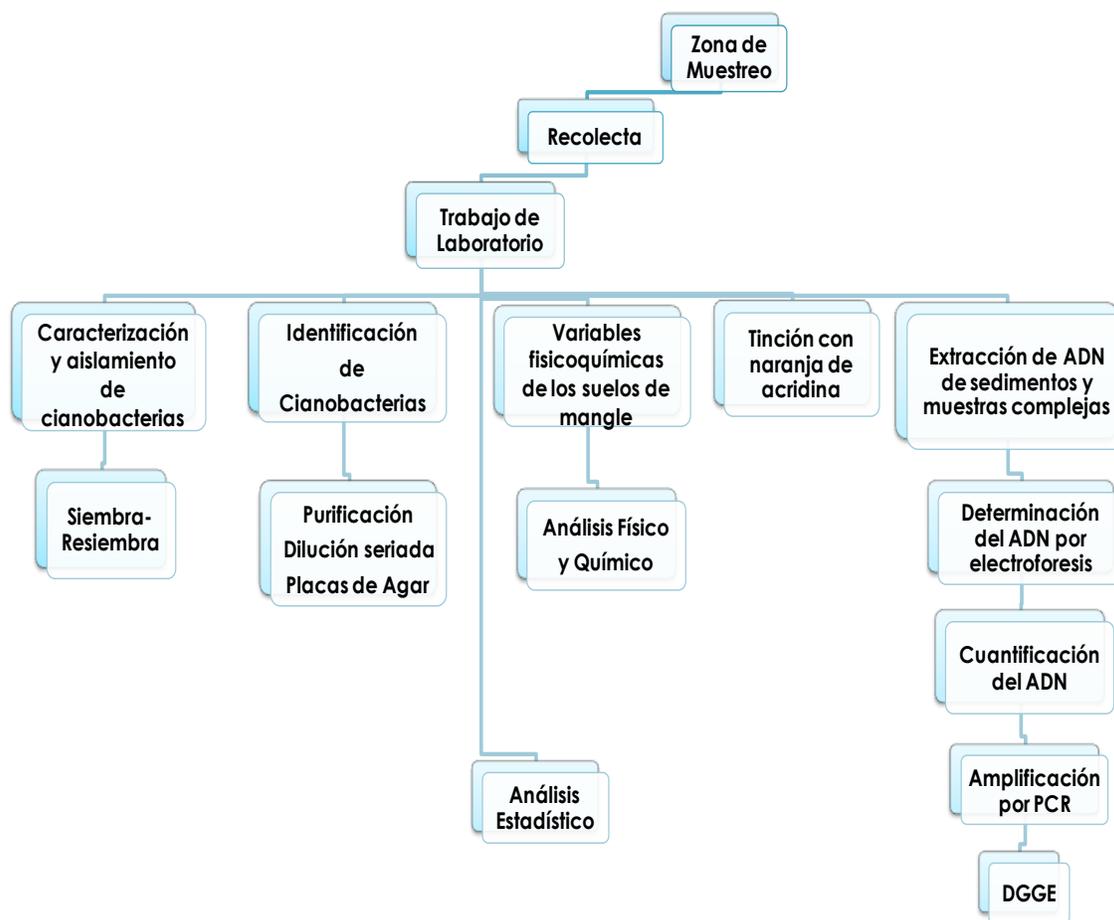


Figura 1. Diagrama de flujo de la secuencia que se llevó en el experimento.

6.1 Zona de muestreo

Las Bahías de Huatulco se localizan en el estado de Oaxaca entre la desembocadura de los ríos Copalita y Coyula. Comprenden aproximadamente 35 km de litoral del Pacífico Mexicano, donde se alternan bahías entre las que se encuentran San Agustín, Conejos, Cuatunalco, Mojón y Tangolunda, así como playas abiertas y acantilados (Ramos, 2004).

El clima es de tipo cálido subhúmedo con lluvias en verano, correspondiente al tipo Aw'' (w) ig según Köppen y modificado por García (1973). La temperatura media anual es de 27.6°C. Presenta dos temporadas climáticas bien marcadas: secas (noviembre a abril) y la de lluvias (mayo-octubre).

En temporada de secas se presentan vientos o "nortes" provenientes del Golfo de México denominados "Tehuano", son resultado de fenómenos meteorológicos a gran escala y características topográficas locales (Monreal-Gómez y Salas de León, 1998). El régimen pluvial que se ha registrado va de una media anual entre 800 y 1500 mm (García, 1973), las características oceanográficas están determinadas por eventos locales de viento.

El agua tropical superficial baña regularmente la costa de Oaxaca; y se caracteriza por su temperatura mayor a 25°C, así como salinidades menores a 34 o/oo, mientras que; en condiciones invernales el agua superficial de la Corriente de California alcanza el Golfo de Tehuantepec con salinidades de 34 o/oo y temperaturas de 12 a 18°C (Fiedler, 1992).

De acuerdo a Valdés, 2010, la estructura geológica de cada sistema de manglar y los diversos factores ambientales son las características que definen a cada sitio, en este estudio se clasificó a las Bahías de Conejos y Mojón como sistemas cerrados por variables como la disponibilidad de agua dulce, nutrientes, tasa de reciclado y parámetros fisicoquímicos del suelo. Así mismo estas variables, más el flujo de mareas, períodos de inundación por agua salada, la energía del oleaje y la influencia de actividades humanas definieron a los otros sistemas como abiertos (Cuatunalco, San Agustín y Tangolunda).

6.2 Recolecta

Los muestreos se realizaron en época de lluvias entre los meses de agosto y septiembre de 2010, en zonas de manglares de cinco bahías: Cuatunalco, San Agustín, Tangolunda, Conejos, y Mojón (Fig. 2).

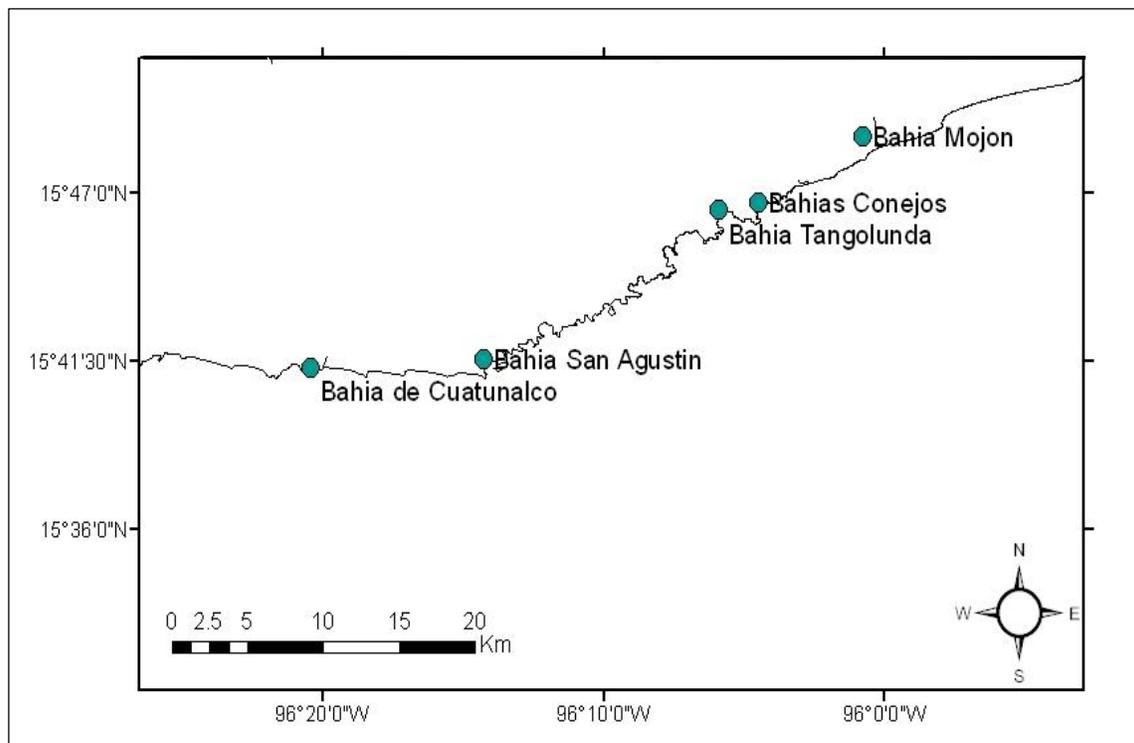


Figura 2. Sitios de muestreo

Se tomaron dos tipos de muestras: 1) Para la identificación, aislamiento y purificación de cianobacterias, 2) para los análisis fisicoquímicos de los suelos. Las primeras se tomaron directamente sobre los tapetes laminares de la capa superficial del suelo entre 0-10 cm de cada uno de los sistemas de manglar, se hicieron cinco recolectas (~50 g) por triplicado, se utilizó una espátula por sitio y se colocaron en frascos de vidrio estériles de 250 ml. Para los análisis fisicoquímicos del suelo se tomó aproximadamente kilo y medio de cada suelo por triplicado y se utilizó una cuchara por sitio, se colocaron en bolsas de plástico de 2 kg perfectamente selladas y etiquetadas.

Todas las muestras se transportaron al laboratorio de Microbiología de la UMAR Campus Puerto Ángel y se mantuvieron a 22°C por 24 horas hasta iniciar su cultivo.

6.3 Trabajo en laboratorio

La parte experimental se llevó a cabo en los laboratorios de Microbiología, Biotecnología de Microalgas y Ambiental en la Universidad del Mar campus Puerto Ángel, Oaxaca y en el laboratorio de Biotecnología de la Facultad de Ingeniería Química de la Universidad Autónoma de Yucatán.

6.4 Caracterización y aislamiento de cianobacterias

6.4.1 Siembra de cianobacterias

Con la finalidad de caracterizar la población de cianobacterias presentes en los suelos de cada una de las bahías, se tomaron 10 gr de los tapetes laminares de cada suelo recolectado y se les agregó 20 ml de

agua destilada, se filtró obteniendo un sobrenadante y se tomaron 4 ml, el cual se sembró en matraces con 200 ml de los medios de cultivo selectivos para cianobacterias BG-11 (con nitrógeno) y BG-11₀ (sin nitrógeno) de acuerdo a Rippka *et al.* (1979), bajo condiciones de esterilidad y en una campana de flujo laminar horizontal (Alder CFH-13).

Las siembras de cianobacterias fueron por triplicado y se incubaron a una temperatura de $25 \pm 1^\circ\text{C}$, con un fotoperiodo de 12:12 (luz-oscuridad) y un pH de 7.5 durante 21 días, en el Laboratorio de Biotecnología Ambiental.

A partir del día 15 después de la siembra se inició con las observaciones en un microscopio de contraste de fases (Olympus BX51), con diferentes objetivos (20, 40, 60 y 100 X) para identificar las características morfológicas de las cianobacterias.

6.4.2 Resiembra

La resiembra de los cultivos se realizó después de 21 días de crecimiento, se colocaron 12 matraces de 150 ml estériles, cada uno con 100 ml de los medios selectivos, se inocularon 4 ml de inóculo por matraz y se dejaron por 30 días con una temperatura de $25 \pm 1^\circ\text{C}$ y luz constante; para las muestras de medio sólido se les agregó 12 g de gelrite a cada litro de medio selectivo, y con una asa bacteriológica se tomó una pequeña cantidad de muestra que fue colocada en forma de barrido; la resiembra se realizó en una campana de flujo laminar (Alder), y se incubó en las mismas condiciones que los matraces con medio líquido.

6.4.3 Identificación de cianobacterias cultivadas

La identificación de las cianobacterias en cultivo de cada uno de los suelos muestreados se realizó de acuerdo a las claves taxonómicas propuestas por Komárek y Anagnostidis (1999), para lo cual se consideraron: células vegetativas, tamaño, acinetos, presencia o ausencia de heterocitos u hormogonios, así como el tipo de crecimiento de la colonia.

6.5 Purificación

Las muestras identificadas, tanto en medio líquido como sólido fueron purificadas por medio de las técnicas de Rippka, (1988). Como se describen a continuación:

6.5.1 Dilución seriada

La técnica de dilución seriada, fue empleada para aislar organismos menores a 10 μm de diámetro y es muy útil para especies que son más abundantes en la muestra. Se utilizó 1 ml del sobrenadante y se agregó en tubos de ensaye, con 9 ml de cada medio selectivo estéril, se homogeneizó y posteriormente se agregó 1 ml a un segundo tubo con 9 ml de medio, así sucesivamente hasta obtener 5 transferencias de cultivo.

6.5.2 Placas de agar

El método en placas se utilizó para separar y purificar a las cianobacterias cultivadas empleando la forma de rayado y estriado; se prepararon 250 ml del cultivo selectivo BG-11₀ (sin nitrógeno) al cual se le agregó 3 gr de gelrite, se esterilizó en una autoclave (Sterile Max Harvey

ST75925), se vaciaron aproximadamente 25 ml de medio en cajas de petri estériles de 25 cm de diámetro. Posteriormente, se le agregó a cada caja de una a dos gotas de los cultivos y se esparcieron con un asa bacteriológica. Se incubaron de 5 a 8 días. Este método también se empleó para purificar cultivos contaminados con otros microorganismos.

Para la transferencia en medio sólido se tomaron muestras de la resiembra, ocupando solamente los cultivos que presentaron diferentes coloraciones, se colocaron de forma invertida, para quedar expuestas a una fuente de luz para su crecimiento.

6.6 Variables fisicoquímicas de los suelos de mangle

Para determinar las variables fisicoquímicas de las muestras de suelos obtenidas de las cinco bahías se utilizaron las metodologías de fertilidad, salinidad y clasificación de suelos establecidas en la Norma Oficial Mexicana NOM-021-Semarnat-2000.

Para el análisis del suelo, se tomaron submuestras para obtener al final una muestra compuesta (aproximadamente 2 kg) de cada una de las bahías. Las muestras se secaron al sol durante 24 horas, se trituraron con un martillo, se tamizaron a través de una malla de 2 mm y se determinaron las siguientes características fisicoquímicas: textura, capacidad de retención del agua (CRA), pH, capacidad de intercambio catiónico (CIC), conductividad eléctrica (CE), nitrógeno total (NT), fósforo disponible (F) y materia orgánica (MO).

6.7 Análisis Físico

6.7.1 Textura (Richards, 1993)

Para conocer la proporción relativa de partículas de arena, limo y arcilla, las cuales al combinarse se obtuvieron las clases texturales de cada uno de los suelos. Se pesaron 50 g de cada suelo seco por triplicado, y se colocaron en una mezcladora (Hamilton Beach Classic, 727 WM), a cada muestra se le añadieron 10 ml de solución dispersante (Hexametáfosfato sódico + agua destilada) hasta que la superficie quedó unos 6 cm sobre el fondo de la copa, se mezcló por 3 minutos y se vertió el contenido a una probeta de 1000 ml arrastrando con una piseta todas las partículas, se cubrió con parafilm y durante un minuto se homogeneizó. Posteriormente, se introdujo el hidrómetro de Bouyoucos (Fisher Brand ERTCO, 2152H-BF), se tomó la temperatura y a los 40 segundos del cese de la agitación se anotó la medida que registró el aparato (Ec. 2) y se dejó sedimentar por 120 minutos, tiempo en el cual se volvió a introducir el hidrómetro y nuevamente se tomó la temperatura (Ec. 3).

$$\% \text{ Limo} + \% \text{ Arcilla} = \left[\rho_{\text{inicial}} + t_{\text{inicial}} - 20^{\circ}\text{C} \frac{0.36}{\text{g}} \text{ de suelos} \right] 100 \quad (\text{Ec.2})$$

$$\% \text{ Arcilla} = \left[\rho_{\text{final}} + t_{\text{final}} - 20^{\circ}\text{C} \frac{0.36}{\text{g}} \text{ de suelos} \right] 100 \quad (\text{Ec.3})$$

$$\% \text{ Arena} = 100 - (\% \text{ Limo} + \% \text{ Arcilla}) \quad (\text{Ec.4})$$

$$\% \text{ Limo} = (\% \text{ Limo} + \% \text{ Arcilla}) - (\% \text{ Arcilla}) \quad (\text{Ec.5})$$

6.7.2 Capacidad de retención del agua (CRA) (Danielson *et al.* 1986)

La capacidad de retención del agua (CRA) se determinó colocando 20 g de suelo seco por triplicados, en embudos de 6.5 cm de diámetro con papel filtro previamente pesado, se colocó un blanco (papel filtro pesado) y se saturaron con 100 ml de agua destilada, se cubrieron con papel aluminio durante 24 h. Posteriormente se retiró el papel filtro con los suelos saturados, el blanco y se pesaron. Los datos obtenidos se sustituyeron en la ecuación 6.

$$CRA = (ar/ps)*100 \text{ (Ec.6)}$$

Agua retenida (ar) = (peso del papel filtro con suelo saturado de agua – peso del papel filtro húmedo + peso del suelo seco)

ps = peso seco del suelo

6.8 Análisis Químico

6.8.1 pH (Yúfera y Carrasco, 1973)

Para la determinación del pH, se pesaron por triplicado 10 g de cada suelo y se colocaron en vasos de precipitado de 50 ml, se les añadió 25 ml de agua destilada, se agitaron mecánicamente por 5 minutos y se dejaron reposar por 15 minutos. Posteriormente, se tomaron las lecturas de pH directamente con un potenciómetro (OAKTON-88066) previamente calibrado.

6.8.2 Capacidad de intercambio catiónico (CIC) (Gee y Bauder, 1986)

La capacidad de intercambio catiónico (CIC) se determinó por el método de cloruro de bario-trietanolamina en meq/100 g. Se pesaron 2 g de cada suelo por triplicado y se colocaron en tubos de centrifuga de 50 ml, a los que se les añadió 25 ml de acetato de bario ($C_4H_6BaO_4$) al 10%, se centrifugaron por 5 minutos a 3000 rpm (centrifuga Hettich MIKRO 22R).

Posteriormente se separó el sobrenadante dejando en el tubo la muestra del suelo al cual se le añadieron 25 ml de solución de sulfato magnésico ($MgSO_4$ 0.1N), se agitó durante 1 minuto y se volvió a centrifugar a las mismas condiciones, se agregaron 10 ml del sobrenadante a un matraz Erlenmeyer de 250 ml y se adicionaron 90 ml de agua destilada, al mismo tiempo se preparó un blanco a partir de 10 ml de la solución de sulfato de magnesio y se diluyó con 100 ml de agua destilada.

A cada uno de las muestras se les añadieron 10 ml de la solución tampón (NH_4Cl 1N, NH_4OH 1N) más 6 gotas de indicador negro de eriocromo T y se valoró con la solución acomplejante ($C_{10}H_{14}N_2Na_2O_8 \cdot 2H_2O$, H_2O) hasta tornarse un color azul. Para obtener la CIC, los datos obtenidos se sustituyeron en la ecuación 7.

$$CIC = (M - N \cdot 0.05 \cdot 2.5) \cdot 100 / P \quad (Ec.7)$$

Donde:

M= ml de la solución acomplejante para valorar el blanco

N= ml de la solución acomplejante para valorar la muestra

P= peso en g de la muestra de suelo

2.5= factor de dilución

6.8.3 Conductividad eléctrica (Richards, 1993)

Para la determinación de la conductividad eléctrica (CE) (ds/m), se pesaron 100 g de cada suelo por duplicado y se colocaron en vasos desechables de 200 ml, se les agregó agua destilada (aproximadamente 100 ml c/u) hasta conseguir una pasta, se taparon con papel aluminio y se refrigeraron a 4°C durante 24 horas. Posteriormente se filtró el sobrenadante con una bomba de vacío y se leyeron las muestras con un conductímetro (OAKTON CON 110).

6.8.4 Nitrógeno total (Bremner, 1996)

Para la determinación de nitrógeno total (%) se pesaron por triplicado 0.5 g de cada suelo, se les agregó 2 ml de ácido sulfúrico concentrado (H_2SO_4) y 1g de sulfato de potasio (K_2SO_4), con la punta de una espátula se les colocó una pizca de óxido de mercurio (Hg_2SO_4) y con una varilla de vidrio se homogeneizaron las muestras para digerirlas en un equipo de digestión (BUCHI k-424) durante 3 horas aproximadamente. Una vez terminada la digestión, las muestras se enfriaron y se procedió a preparar cada muestra con su respectivo blanco con 10 ml de H_2O destilada y 5 ml de hidróxido de sodio (NaOH) al 32%, se destilaron en un equipo de destilación (BUCHI k-314) la destilación para la determinación de nitrógeno total, se utilizó un equipo de destilación BUCHI k-314.

El destilado de la muestra se colectó hasta alcanzar un volumen de 100 ml, en un matraz Erlenmeyer donde previamente se habían agregado 50 ml de ácido bórico (H_3BO_3) más unas gotas de los indicadores verde de bromocresol y rojo de metilo.

Para determinar el nitrógeno total presente en cada una de las muestras, se tituló el contenido del matraz Erlenmeyer con ácido sulfúrico (H_2SO_4) 0.5 N hasta obtener el vire de color verde a rosado intenso. Por separado se prepararon tres blancos siguiendo el mismo procedimiento que en las muestras (pero sin adición de suelo). El porcentaje de nitrógeno total se obtuvo con la ecuación 8.

$$\%N = (V_m - V_b) * N * 1.4 / P \quad (Ec.8)$$

Donde:

V_m = es el volumen de H_2SO_4 empleado en titular la muestra

V_b = el volumen de H_2SO_4 empleado en titular el blanco

N = es la normalidad exacta del H_2SO_4

P = es el peso de la muestra de suelo en gramos.

6.8.5 Fósforo disponible (Watanabe y Olsen, 1965)

Para la determinación de fósforo disponible se pesaron 2.5 g de cada suelo tamizado por triplicado y se colocaron en tubos de polietileno, se adicionaron 50 ml de solución extractora de bicarbonato de sodio ($NaHCO_3$), 0.5M, los tubos se taparon y agitaron durante 30 minutos a 180 rpm (agitador EBERBACH), se filtraron con papel Whatman 42. Posteriormente se tomaron 5 ml de cada filtrado y se colocaron en un matraz aforado de 50 ml, a los cuales se les agregó 5 ml de la solución reductora (ácido ascórbico), se agitaron manualmente y se aforaron con agua destilada, después de 30 minutos se tomaron las lecturas de absorbancia a una longitud de onda 882 nm en un espectrofotómetro UV visible (Beckman Du 530).

6.8.6 Materia orgánica (Kalembasa y Jenkinson, 1973)

La determinación de materia orgánica se evaluó a través del contenido de carbono orgánico con el método de Walkley y Black (1934), se pesaron por triplicado 0.5 g de cada suelo, se colocaron en matraces Erlenmeyer de 500 ml y se les adicionó 10 ml de dicromato de potasio 1N, girando cada matraz con precaución para cubrir el suelo totalmente. Posteriormente se les agregó 20 ml de ácido sulfúrico concentrado con una bureta, se giraron nuevamente los matraces y se agitaron por un minuto, dejándolos reposar por 30 minutos. Transcurrido este tiempo se les añadió 200 ml de agua destilada, 5 ml de ácido fosfórico concentrado y de 5 a 10 gotas del indicador de difenilamina. Se titularon con una solución de sulfato ferroso 1 M ($\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$) hasta virar a un color verde claro, de igual manera se procesaron por triplicado los blancos. Para obtener el porcentaje de materia orgánica se utilizó la siguiente ecuación:

$$\% \text{ C orgánico} = [B-T/g] * N * 0.39 \text{ m. c. f} \quad (\text{Ec.9})$$

Donde:

B= volumen de sulfato ferroso gastado para valorar el blanco de reactivos (ml)

T= volumen de sulfato ferroso gastado para valorar la muestra (ml)

N= normalidad exacta del sulfato ferroso

g = peso de la muestra empleada (g)

m.c.f = factor de corrección de humedad

6.9 Tinción con naranja de acridina

Esta técnica se empleó para visualizar la viabilidad del ADN en las cianobacterias a través de la estimulación de un fluorocromo con alta energía o con una longitud de onda corta. Se colocaron los frotis por cada muestra y se les agregó una gota de naranja de acridina la cual se secó por 2 minutos a temperatura ambiente. Posteriormente, se enjuagaron los frotis con agua destilada y se observaron las células que se tiñeron con dicha coloración en el microscopio de epifluorescencia (MOTIC 107M).

6.10 Extracción de ADN de sedimentos y muestras complejas

De acuerdo al protocolo de Rojas-Herrera *et al.* (2008), se pesaron 0.5 g de los cinco suelos secos y se tomó 1 ml de la muestra de cultivo de los cinco sitios, los cuales se mantuvieron en refrigeración a 4°C. Cada una de las muestras fueron colocadas en tubos de microcentrífuga de 1.5 ml, a las que se les agregó 1 ml de solución buffer amortiguadora TEN (Tris-HCl 100 mM, pH 8.0, NaCl 500 mM, EDTA 50 mM, pH 8.0) y se homogeneizó en vortex por 1 minuto, esto con el fin de eliminar la mayor cantidad de impurezas. La mezcla resultante se centrifugó a 10,000 rpm por 10 min a 4°C, se descartó el sobrenadante y se repitió el lavado seis veces para las muestras de suelo y cuatro para las muestras de cultivo. Terminados los lavados se resuspendieron las pastillas en 1 ml de buffer TEN y se agitó en vortex por 30 segundos, se le añadieron 20 µl de la solución de lisozima (10 mg/ml de TE: Tris-HCl 100 mM pH 8.0, EDTA 50 mM pH 8.0) y se incubaron en baño de agua a 37°C por 1 h con agitación moderada. Nuevamente se incubaron por 10 minutos en un baño de hielo/alcohol (-10°C), se dejaron 5 minutos en baño de agua a 65°C y se repitió tres veces este ciclo. Posteriormente, se les añadió 100 µl de dodecilsulfato sódico (SDS) al 20% y se agitó en vortex por 1 minuto. Las muestras se incubaron por 30 minutos a 30°C y se centrifugaron a 10,000 rpm por 10 minutos a temperatura ambiente. El sobrenadante obtenido de cada muestra se transfirió a un tubo de microcentrífuga nuevo, se le agregaron 500 µl de acetato de potasio 5M y se incubó a 65°C por 5 minutos. Posteriormente, se colocaron en hielo por 20 minutos y se centrifugaron a 4°C por 30 min a 10,000 rpm. El sobrenadante se transfirió a un tubo de microcentrífuga nuevo agregándole una suspensión de sílice (SiO₂) mezclándola ligeramente en vortex. Se agitaron por inversión durante 3 minutos, y se centrifugaron por 2

minutos más a 10,000 rpm a temperatura ambiente, se descartó el sobrenadante; se lavó la pastilla dos veces con 1ml de etanol frío al 70% (sin agitación) y se centrifugó a 10,000 rpm por 2 minutos a temperatura ambiente. Se dejó evaporar el alcohol manteniendo los tubos abiertos por 2 minutos sobre la mesa. Finalmente, se resuspendió la pastilla en 50 µl de agua destilada estéril y se incubó a 55°C por 5 minutos para después centrifugarlo a 10,000 rpm por 5 minutos a temperatura ambiente; recuperando el sobrenadante en un tubo nuevo sin tomar sílice y se guardaron los tubos en congelación (-20°C) para análisis posteriores.

6.10.1 Determinación del ADN por electroforesis

La calidad del ADN extraído de las muestras se comprobó cualitativamente mediante electroforesis en gel de agarosa al 1% en buffer TAE 1X (2M trizma base, 1M ácido acético glacial, 50 mM EDTA [pH 8.0]) y se tiñó con bromuro de etidio (0.5 µg/ml), fueron documentados en un transiluminador UV (Biorad) con el software Quantity One® (*BioRad Imaging System*).

6.10.2 Cuantificación del ADN

Para conocer la pureza del ADN extraído de cada muestra se tomó una alícuota de 5 µl y se diluyó con 3 ml de agua destilada estéril. Se leyeron las absorbancias en el espectrofotómetro UVI VIS (Perkin Elmer), a una longitud de onda 260 nm (ácidos nucleicos) y se aplicó la siguiente fórmula para determinar la concentración del ADN extraído:

$$ADN_{mg} = ABS_{260nm} \times 50 \mu g. ml^{-1} \times \text{factor de dilución} \quad (\text{Ec.10})$$

Posteriormente se tomó una segunda lectura a 280 nm (proteínas), para obtener la relación $\lambda_{260/280}$, y de ésta manera se determinó la pureza del ADN. Valores mayores a 1.7 indican pureza en el ADN extraído, valores menores indican contaminación por sustancias húmicas o proteínas.

6.10.3 Amplificación por PCR

La reacción en cadena de la polimerasa permitió obtener un número de copias de cada fragmento de ADN extraído, los iniciadores utilizados para este estudio se describen en el cuadro II. Se realizó una primera amplificación de las muestras de suelo y medio de cultivo con los iniciadores 16SS y 16SR. Para el estudio de las cianobacterias se amplificó con los iniciadores específicos CYA 359 F y 781 R (a y b).

Se corrió una PCR anidada, utilizando los productos de la primera amplificación y agregando los iniciadores CYA.

Cuadro II Secuencias de los iniciadores utilizados para la PCR

Iniciadores	Secuencia (5' - 3')
16SS	AGAGTTTGATCCTGGCTCAG
16SR	CGGGAACGTATTCACCG
CYA 359F	GGGGAATYTTCCGCAATGGG
CYA 781R (a)	GACTACTGGGGTATCTAATCCCAT T
CYA 781R (b)	GACTACAGGGGTATCTAATCCCTTT

Nübel *et al.* 1997 (CYA)

Para las dos amplificaciones se empleó la misma mezcla de reacción (Cuadro III), incluyéndose en cada amplificación distintos iniciadores, variando los volúmenes finales de los iniciadores universales 16S, así como de los iniciadores específicos CYA(*).

Composición de cianofitas y su relación con parámetros fisicoquímicos de suelo en los ecosistemas de manglar de Bahías de Huatulco
Gabriela Hernández Enríquez

Cuadro III Mezcla maestra para la PCR

Reactivo	Concentración inicial	Volumen final (µl)
Buffer	10 X	2.5
MgCl ₂	50 mM	2.5
dNTP's	10 mM	0.5
16SS*	5 µM	1
16SR*	5 µM	1
CYA 359** F	10 µM	1
CYA 781** R(a)	5 µM	0.5
CYA 781** R(b)	5 µM	0.5
Taq	5 U	0.2
BSA	10 %	0.75
ADN _{muestra}	200 µg/ml	2
Agua	-	14.55

* Iniciadores utilizados en la primera amplificación y ** iniciadores usados en la segunda amplificación que es más específica.

Las condiciones de amplificación fueron las siguientes: Para la primera PCR consistieron en una desnaturalización a 94°C por 5 minutos (1 ciclo), la amplificación inició a 94°C por 30 segundos, alineación a 49°C por 1 minuto y una extensión a 72°C por 1 minuto 30 segundos (30 ciclos) y se finalizó con una extensión de 72°C por 7 minutos. Todas las amplificaciones se realizaron en un termociclador BioRad MyCycle.

Se realizó una electroforesis en placa con gel de agarosa al 2 % con 100 ml de TBE (40 mM TRIS borato al 0.6% y 2 mM de EDTA); se tiñó con Bromuro de Etidio (1 µl/100 ml). Se colocaron 5 µl de cada muestra, 3 µl de amortiguador de carga por carril (glicerol, azul de bromofenol y agua), y 3 µl del marcador molecular de 100 pb, se corrió a 70 V durante 1 hora, con

amortiguador TBE (0.5X), y el gel se visualizó en un transiluminador de radiación UV, la imagen fue guardada en un equipo foto-documentador Gel Doc XR System de BIO-RAD, utilizando el programa Quantity One.

6.10.4 Gel de gradiente de desnaturalización (DGGE)

Para conocer el rango de concentración desnaturalizante y saber dónde se separaron mejor los productos de PCR obtenidos con los iniciadores CYA, se hizo un gel perpendicular al 6% de poliacrilamida, con un gradiente desnaturalizante de 0 a 100% de urea y formamida. Las condiciones que se emplearon fueron: una desionización del gel a 120 V 60°C por 1 hora y se agregó 125 µl del producto de la PCR anidada se corrió con un voltaje de 120 V a 60°C por 1 hora.

La electroforesis en gel de gradiente de desnaturalización se realizó utilizando amplicones de 600 pb, las soluciones utilizadas se prepararon con acrilamida/bisacrilamida al 40 %. Los gradientes de desnaturalización utilizados fueron del 20% al 60% de urea y formamida respectivamente, se montó un juego de vidrios limpios en la base del DCode Universal Mutation Detection System de BIORAD y se dejó polimerizar por 1 hora.

Se retiró con agua destilada el exceso de acrilamida en los pozos, posteriormente el volumen de carga de cada muestra fue de 50 ng y se mezcló con 5 µl de amortiguador de carga (azul de bromofenol 0.05 g, xileno cianol 0.05 g, TAE 1X), se realizó la carga de la mezcla en los carriles y la electroforesis se corrió en amortiguador TAE (1X) a 60 V por 18 horas a 60 °C. Los geles obtenidos fueron teñidos en solución SYBER (5 µl/100 ml de amortiguador TAE al 1x) por 15 minutos y se observaron en el transiluminador UV Gel Doc XR system (BIO RAD).

Posteriormente, se cortaron las bandas presentes, las cuales se diluyeron en 50 µl de agua destilada estéril durante 24 h a 4°C.

6.10.5 Digitalización del DGGE

El análisis digital de los DGGE se llevó a cabo con el programa *Quantity One* (BIO RAD), se generaron curvas densitométricas y con base a las intensidades relativas del área de los picos de cada banda observada, se realizó una matriz de presencia/ausencia por cada gel, se determinó el índice de diversidad de Shannon-Weaver con la función (Ec.11):

$$H = -\sum (P_i) \ln(P_i) \quad (\text{Ec.11})$$

Donde:

P_i = Probabilidad de encontrar un género por banda

$$P_i = n_i / n_t \quad (\text{Ec.12})$$

Donde:

n_i = Altura de un pico determinado

n_t = Sumatoria de todos los picos de una curva densitométrica obtenida del programa *Quantity One*.

El valor final del índice de Shannon-Weaver fue generado a partir del promedio del índice de cada muestra con el programa *Species Diversity & Richness 3.03*.

6.11 Análisis estadísticos

Se realizó un análisis de cluster con una matriz de presencia/ausencia para conocer las distancias de similitud entre los géneros identificados y sitios de muestreo con el programa Primer 6.

Así mismo, se realizaron pruebas no paramétricas de Kruskal–Wallis (Zar, 1999), debido a que los datos no presentaron normalidad (Kolmogorov-Smirnov) ni homocedasticidad (Prueba de Levene) y para determinar diferencias significativas entre géneros encontrados con los parámetros fisicoquímicos de pH, capacidad de retención del agua, nitrógeno total, fósforo, capacidad de intercambio catiónico y conductividad eléctrica, utilizando el programa Statistica 7.0.

Para corroborar posibles diferencias en la prueba de rangos de Kruskal-Wallis, se realizó una prueba de Wilcoxon (Zar, 1999) en el Statistica 7.0.

7. Resultados

De acuerdo a los objetivos planeados en este estudio, a continuación se describen los resultados obtenidos.

7.1 Identificación taxonómica de cianobacterias

El método utilizado para la identificación por taxonomía convencional permitió reconocer 13 géneros de cianobacterias en las cinco bahías muestreadas, considerando el tamaño de las células vegetativas, la presencia o ausencia de heterocitos, acinetos y hormogonios (células reproductivas), los géneros identificados fueron: *Anabaena*, *Calothrix*, *Fischerella*, *Nostoc*, *Rivularia* así como *Aphanizomenon*, *Oscillatoria*, *Phormidium* y las unicelulares *Aphanothece*, *Chroococcus*, *Gloeocapsa*, *Microcystis*, y *Synechococcus*.

En la figura 3, se observa 1) cultivos de cianobacterias en medio sólido, 2) Formación de colonias de cianobacterias en medio líquido BG-110, 3) tubo de ensaye con cianobacterias filamentosas del género *Anabaena*, y 4) Tapete laminar formado por cianobacterias filamentosas, estos cultivos fueron utilizados para aislar, caracterizar y purificar los géneros identificados .

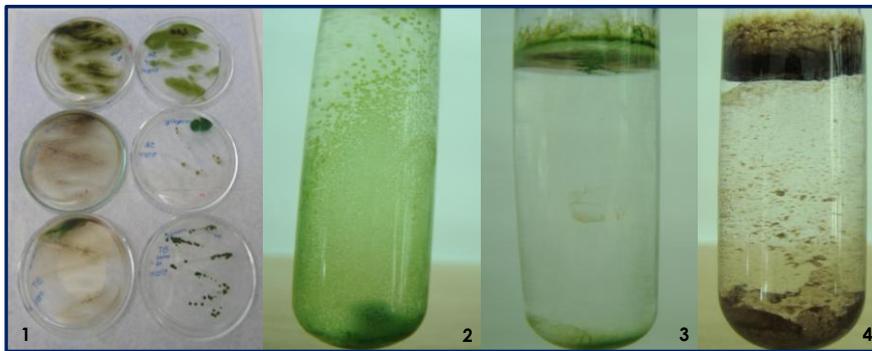


Figura 3. Cultivos de cianobacterias en medio sólido y medio de cultivo BG-110.

Composición de cianofitas y su relación con parámetros fisicoquímicos de suelo en los ecosistemas de manglar de Bahías de Huatulco
Gabriela Hernández Enríquez

En el cuadro IV se enlistan los órdenes a los que pertenecen los diferentes géneros encontrados de las cinco diferentes bahías.

Cuadro IV. Características de los órdenes de cianobacterias

Orden	Morfología	Características
Chroococales	Organismos unicelulares o coloniales	Células circulares u ovales, presentan o no vaina mucilaginosa, se pueden dividir en dos o más planos
Oscillatoriales	Organismos filamentosos	Fragmentación del tricoma (hormogonios), no posee heterocitos ni acinetos, puede o no presentar vaina mucilaginosa
Nostocales	Organismos filamentosos	Poseen acinetos y heterocitos, estos últimos pueden ser terminales o intercalares, forman colonias mucilaginosas, o tricomas solitarios uniseriados, isopolareso heteropolares, terminaciones atenuadas o células cilíndricas.
Stigonematales	Organismos filamentosos	Morfológicamente complicados, presentan heterocitos y su principal diferenciación está en la presencia de ramas verdaderas en los filamentos.

Las cianobacterias identificadas en los suelos de las bahías se observan de la figura 4 a la 13.

En el caso de *Oscillatoria* 4(a) se observaron filamentos simples, no ramificados, no presentó vainas y careció de acinetos y heterocitos, presentó hormogonios (células reproductoras) y las células de los filamentos en los extremos se observaron redondeadas 4(b), se localizó en las Bahías Conejos y Tangolunda, este género pertenece a la:

Clase: Cyanophyceae

Orden: Oscillatoriales

Familia: Oscillatoriaceae

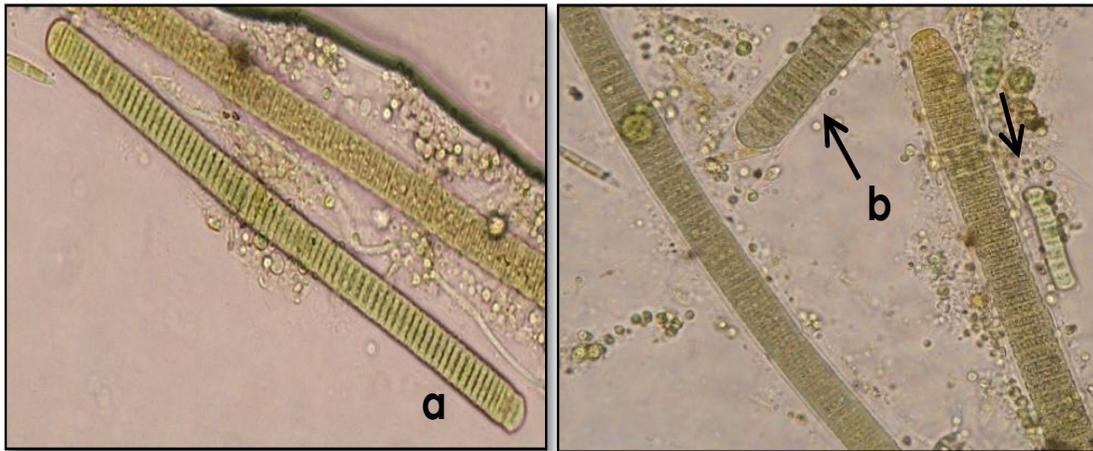


Figura 4. (a) Cianobacteria filamentosa *Oscillatoria*. (b) Células reproductoras conocidas como hormogonios.

Se identificaron filamentos de *Nostoc*, (Fig. 5) dentro de una colonia irregular enrollada y cubierta de mucilago, se observaron filamentos desenvainados, así como la presencia de heterocitos intercalares claramente marcados, que son las células donde se fija el nitrógeno, se

Composición de cianofitas y su relación con parámetros fisicoquímicos de suelo en los ecosistemas de manglar de Bahías de Huatulco
Gabriela Hernández Enríquez

ubico a este género en las Bahías de Cuatunulco, Mojón y San Agustín, pertenece a la:

Clase: Cyanophyceae

Orden: Nostocales

Familia: Nostocaceae

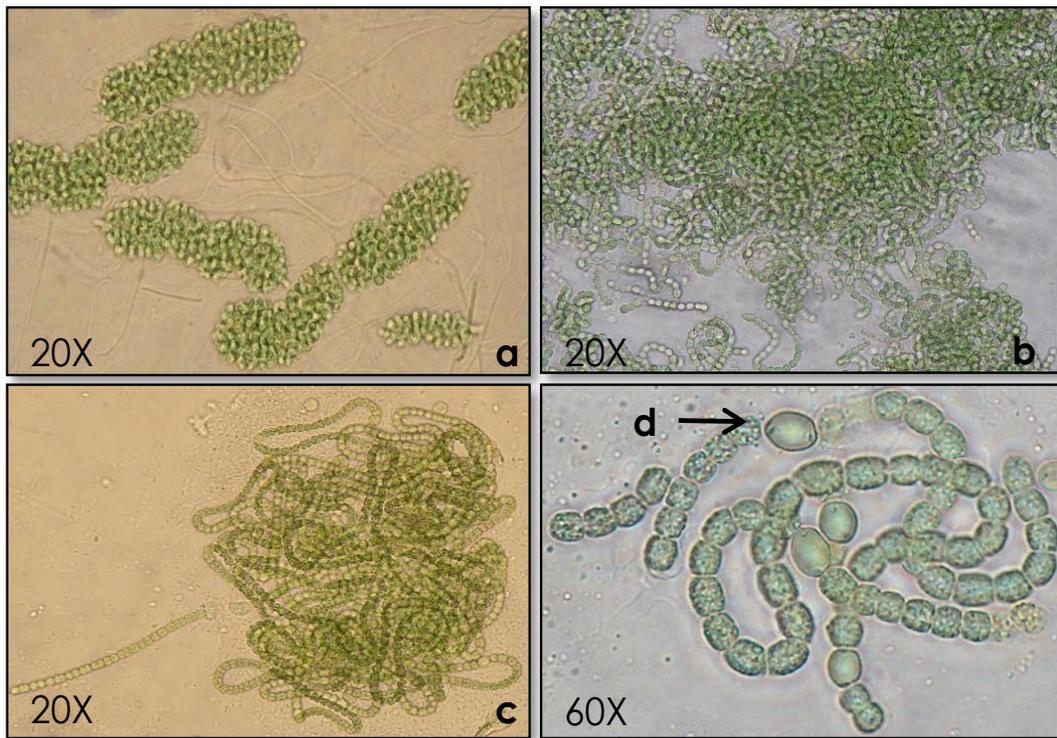


Figura 5. (a) Cianobacteria filamentosas *Nostoc* formando colonias con mucilago. (b) y (c) Filamentos desnucados del mismo género. (d) Heterocitos intercalares en *Nostoc*.

Se observó a la cianobacteria unicelular *Microcystis*, la cual se vio cubierta por una vaina de mucilago y acompañada de otra cianobacteria filamentosas (Fig. 6), las colonias pueden observarse de forma irregular, sus células pueden ser esféricas y pueden presentar cierta

flotación libre. Este género se encontró en las Bahías de Conejos, Mojón, San Agustín y Tangolunda y *Microcystis* corresponde a la:

Clase: Cyanophyceae

Orden: Chroococcales

Familia: Microcystaceae

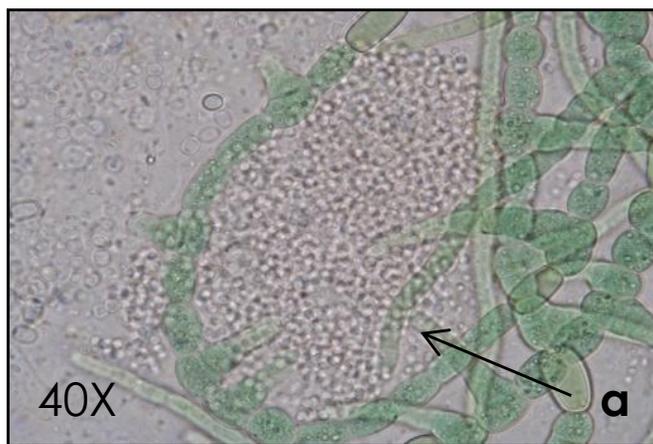


Figura 6. (a) Cianobacteria unicelular *Microcystis*

En la identificación de la cianobacteria unicelular *Synechococcus*, está presentó células ovales en grupo de dos a cuatro células, no se observó la presencia de mucilago y presentaron una coloración verde oliva, se localizó en Conejos y Cuatunalco (Fig. 7). El género pertenece a:

Clase: Cyanophyceae

Orden: Chroococcales

Familia: Synechococcaceae

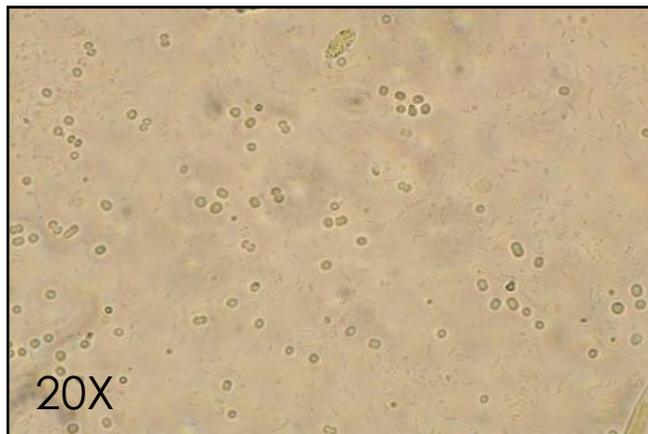


Figura 7. Cianobacteria unicelular *Synechococcus*.

Las colonias identificadas del género *Gloeocapsa* (Fig. 8) se observaron integradas en pequeños grupos de células, envueltas en una vaina mucilaginosa, de formas amorfas y coloración amarillo marrón, fue ubicada en Bahía de Cuatunulco y este género se coloca dentro de la:

Clase: Cyanophyceae

Orden: Chroococcales

Familia: Microcystaceae

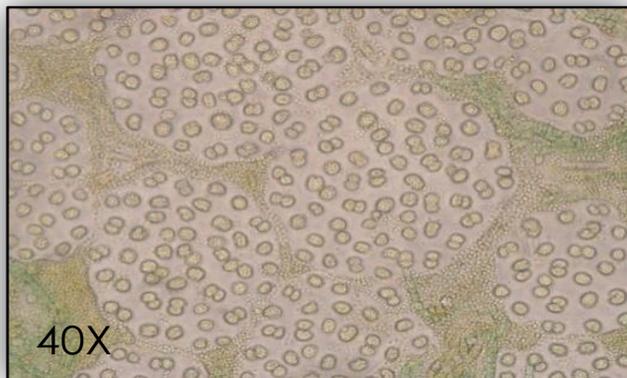


Figura 8. Colonias de cianobacterias del género *Gloeocapsa*

En el caso de la cianobacteria unicelular *Chroococcus* (Fig. 9), va de dos a cuatro células, se observaron embebidas en una vaina mucilaginosa o bien formando colonias, presentaron una coloración verde amarillo y se localizó en Bahía Tangolunda. El género *Chroococcus* pertenece a:

Clase: Cyanophyceae

Orden: Chroococcales

Familia: Chroococcaceae



Figura 9. Género unicelular *Chroococcus*

La cianobacteria unicelular *Aphanothece*, se observó formando colonias, presentó formas elípticas o esféricas, sus células dispuestas irregularmente, y tenían un color verde azulado ubicada en Bahía Tangolunda (Fig. 10). Pertenece a:

Clase: Cyanophyceae

Orden: Chroococcales

Familia: Synechococcaceae



Figura 10. Cianobacteria unicelular del género *Aphanothece*

Composición de cianofitas y su relación con parámetros fisicoquímicos de suelo en los ecosistemas de manglar de Bahías de Huatulco
Gabriela Hernández Enríquez

El género *Anabaena*, presenta filamentos solitarios o en grupo, sus células pueden ser de forma cilíndrica, de barril o esféricas, los filamentos presentan una coloración verde oliva, y poseen heterocitos intercalares o terminales, se observaron también los dos gránulos de cianoficina en los polos del heterocito, así como la presencia de acinetos, esta cianobacteria estuvo presente en las cinco bahías. (Fig. 11)

Clase: Cyanophyceae

Orden: Nostocales

Familia: Nostocaceae

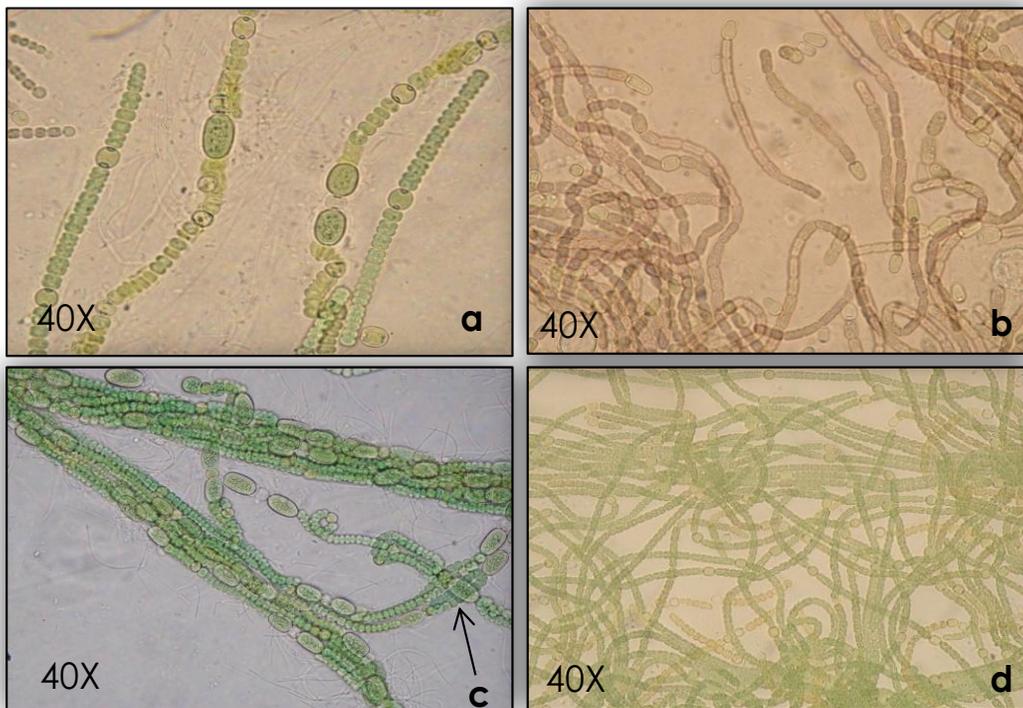


Figura 11. Cianobacteria *Anabaena*. (a) Filamentos con acinetos y heterocitos intercalares. (b) Género de *Anabaena* con heterocitos terminales. (c) Forma de acinetos. (d). Filamentos conglomerados del mismo género.

Composición de cianofitas y su relación con parámetros fisicoquímicos de suelo en los ecosistemas de manglar de Bahías de Huatulco
Gabriela Hernández Enríquez

En el caso de *Calothrix* presentó filamentos con heterocitos basales, estos raramente con acinetos en la parte basal, vainas de mucilago visibles y así como células de hormogonios, este género se localizó en Bahía Tangolunda San Agustín y Conejos, (Fig.12). *Calothrix* pertenece a:

Clase: Cyanophyceae

Orden: Nostocales

Familia: Rivulariaceae

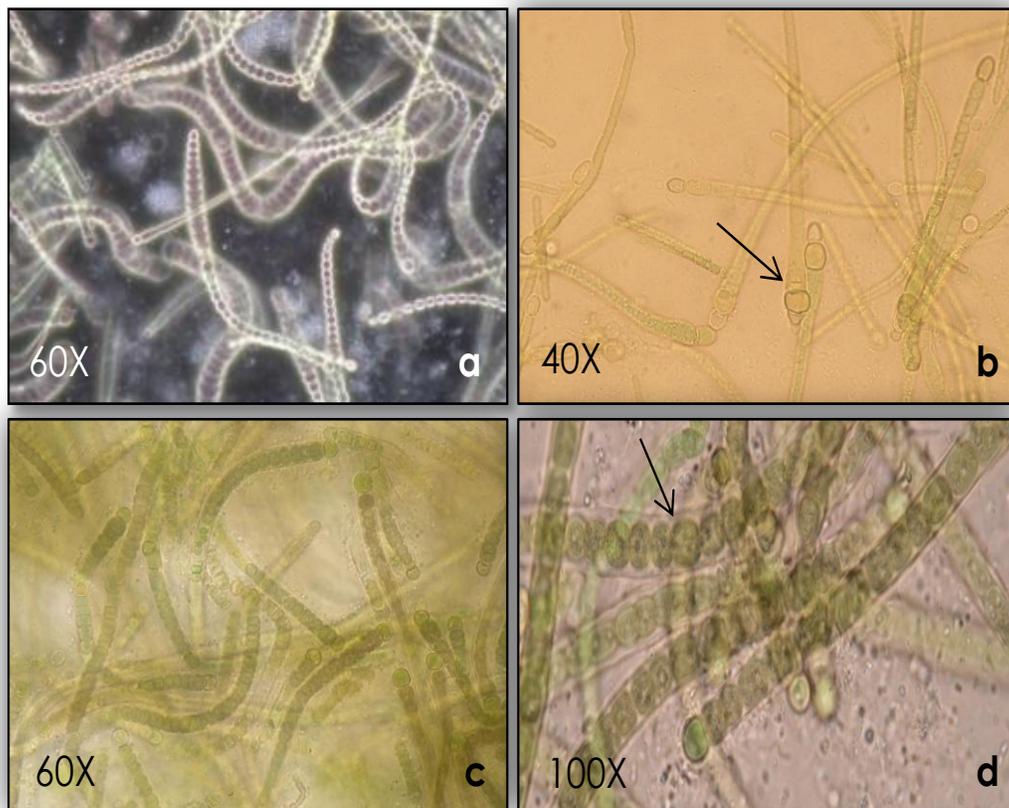


Figura 12 (a) Género *Calothrix* con vainas de mucilago presentes. (b) En algunos géneros de *Calothrix* por carecer de fósforo desarrolla acinetos basales. (c) y (d) Heterocitos presentes.

Se identificaron filamentos del género *Fischerella* con heterocitos (Fig. 13), y ramificaciones iniciales verdaderas en forma de T que sugieren un cambio en la división del plano, así como filamentos formando conglomerados, también se apreció ramificaciones multiseriadas, se ubicó en la Bahía Tangolunda, y este género se encuentra dentro de la:

Clase: Cyanophyceae

Orden: Stigonematales

Familia: Fischerellaceae

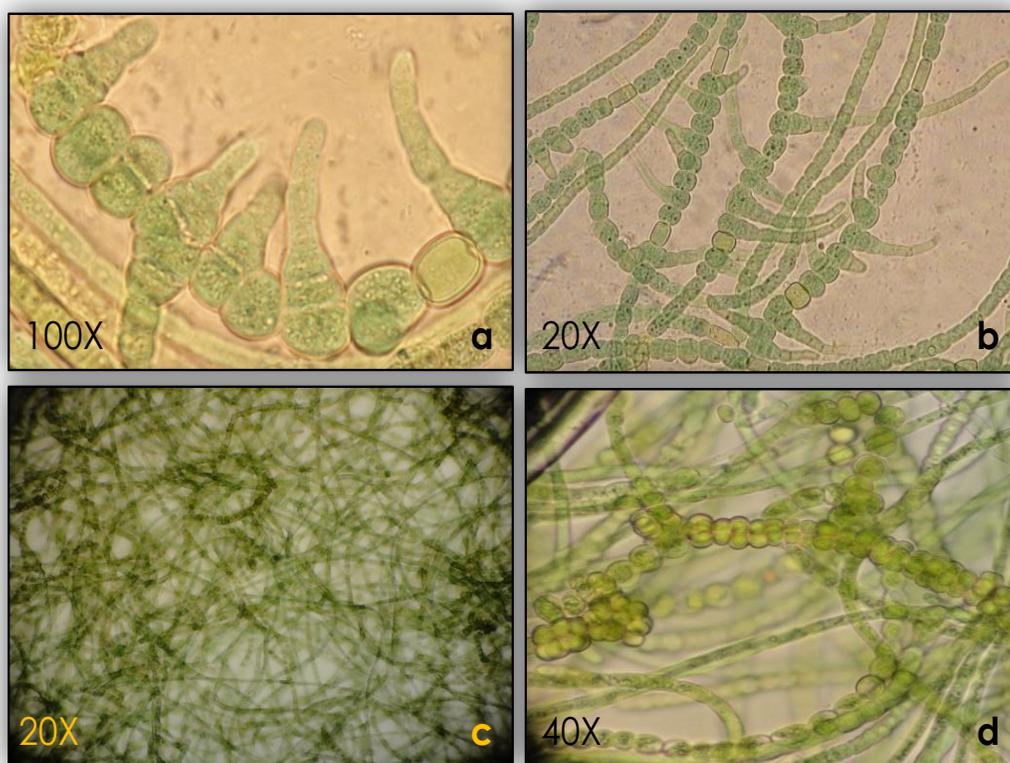


Figura 13. Género *Fischerella* (a) Con ramificaciones iniciales. (b) *Fischerella* con ramificaciones iniciales y terminales y la presencia de heterocitos. (c) y (d) Filamentos conglomerados.

7.2 Parámetros fisicoquímicos de los suelos

Los parámetros fisicoquímicos obtenidos de los suelos de las cinco bahías muestreados fueron: pH, CRA, CE, CIC, nitrógeno total, fósforo disponible, materia orgánica, arenas, arcillas, limos y clase textural, (Cuadro V).

Como se observa en el cuadro V y de acuerdo con la NOM-021-SEMARNAT-2000, las texturas de los suelos de cada una de las bahías presenta diferencias en el contenido de arenas, limos y arcillas, siendo Cuatunalco la bahía que presentó una textura franco, con el 53% de arenas, 35% de limos y 12% arcillas, mientras que el suelo de Tangolunda, presentó una textura arenoso franco con 14% más de arenas y 10% menos de limos que el suelo de Cuatunalco y solo un 4% de arcillas. El suelo de Mojón, no presenta diferencias significativas en arenas y limos, pero sí un aumento del 3% de arcillas con respecto a Tangolunda y de acuerdo a su textura se clasificó en franco arenoso. El suelo de bahía Conejos presentó ligeramente un incremento en arenas, y mantiene equilibrados los limos y arcillas clasificándose con una textura arenoso franco. Finalmente, el suelo de San Agustín fue el que presentó 92% de arenas, 4% limos y 4% de arcillas.

La capacidad de retención de agua (CRA) que tienen los suelos, está en función al contenido de arenas, limos y arcillas principalmente. Por lo que la CRA de cada uno fue diferente, siendo San Agustín la bahía que presenta la menor capacidad de retención de agua con un 45%, el suelo de bahía Conejos presentó una CRA de 47%, sin embargo bahía de Tangolunda y Mojón tuvieron una capacidad de retención del agua de 61% y 64% respectivamente, mientras que Cuatunalco presentó la capacidad de retención de agua más alta con 81% que las otras bahías.

**Composición de cianofitas y su relación con parámetros fisicoquímicos de suelo en los
ecosistemas de manglar de Bahías de Huatulco
Gabriela Hernández Enríquez**

Los valores de pH para los cinco suelos de las bahías fueron diferentes, siendo el suelo de Mojón, el que presentó un pH de 5.9 considerado moderadamente ácido; mientras que, el pH de San Agustín es 6.7 y el de Conejos de 7.3 y son neutros. Sin embargo los suelos de Tangolunda y Cuatunalco, son los que tienen el pH medianamente alcalinos (7.5 y 7.8, respectivamente) (Norma Oficial Mexicana NOM-021-SEMARNAT-2000).

La capacidad de intercambio catiónico es la concentración de iones intercambiables en el suelo principalmente de Ca^{2+} , Mg^{2+} , Na^+ y K^+ , la bahía de Mojón presenta 8 unidades más de capacidad de intercambio catiónico con respecto a San Agustín y Tangolunda que tuvieron menos CIC, con lo que respecta a Cuatunalco, presentó 24 Cmol/kg^{-1} y Conejos 22 Cmol/kg^{-1} , lo que es considerado por la NOM-021-SEMARNAT-2000 entre una media y alta concentración de iones para los cinco sitios.

Los valores obtenidos de la conductividad eléctrica (CE) de las cinco bahías registraron diferencias, debido al contenido de sales solubles totales del suelo. La que presentó una menor CE fue la bahía de Cuatunalco con un valor de 7.2 dSm^{-1} , seguida de San Agustín con 8.1 dSm^{-1} , el suelo de la bahía de Tangolunda presentó 9.3 dSm^{-1} , Mojón registró 12.0 dSm^{-1} y Conejos tuvo la conductividad más alta (13.7 dSm^{-1}) de las cinco bahías aumentando hasta 53% más que la bahía de Cuatunalco (NOM-021-SEMARNAT-2000).

El nitrógeno total de un suelo es el contenido del mismo, en sus diferentes formas (N-NH_4 , N-NO_3 , N-NO_2), y es un parámetro importante para medir la fertilidad de los suelos. De acuerdo a los valores obtenidos la concentración de nitrógeno total para cada una de las bahías fue diferente. El suelo de San Agustín presentó 0.03% de nitrógeno y de

**Composición de cianofitas y su relación con parámetros fisicoquímicos de suelo en los
ecosistemas de manglar de Bahías de Huatulco
Gabriela Hernández Enríquez**

acuerdo a lo establecido por la NOM-021-SEMARNAT-2000 es considerada una concentración muy baja, con respecto a las bahías de Conejos y Tangolunda el porcentaje de nitrógeno fue 28% más que en San Agustín, mientras que Cuatunalco y Mojón presentaron un 69% más con respecto a las otras bahías.

Las concentraciones de fósforo disponible en cada una de las bahías, también variaron significativamente como se observa en el cuadro V, el suelo de San Agustín presentó el menor contenido de fósforo con 5 mg/kg, Mojón tuvo un contenido de 33 mg/kg, casi siete veces más que San Agustín, mientras que Conejos tuvo una concentración de 76 mg/kg, Cuatunalco de 116 mg/kg y la mayor concentración fue para Tangolunda con 157 mg/kg, treinta veces más que San Agustín; sin embargo, de acuerdo a la NOM-021-SEMARNAT-2000, los porcentajes obtenidos en estas bahías son consideradas concentraciones altas de fósforo.

Los valores presentados para la materia orgánica mostraron diferencias en los cinco sitios. Bahía San Agustín presentó el menor contenido de materia orgánica con 0.25%. El suelo de Conejos registró 1.6%, Tangolunda presentó 2.5% y Cuatunalco tuvo 3.2% todos ellos considerados por la NOM-021-SEMARNAT-2000 como suelos con contenidos medios de materia orgánica, el suelo de Mojón tuvo 8.3% de materia orgánica y es el suelo con más contenido registrado.

Composición de cianofitas y su relación con parámetros fisicoquímicos de suelo en los ecosistemas de manglar de Bahías de Huatulco
Gabriela Hernández Enríquez

Cuadro V. Parámetros fisicoquímicos de los suelos de las cinco bahías

Bahía	Sistema	pH	CRA %	CE dS/m⁻¹	CIC Cmol/Kg⁻¹	Nt%	P mg/Kg	MO%	Arenas %	Arcillas %	Limos %	Clase Textural
Conejos	cerrado	7.3 _a	47	13.7	22	0.11 _e	76 _h	1.6 _j	71	9	20	arenoso franco
Cuatunalco	abierto	7.8 _c	81	7.2	24	0.16 _f	116 _h	3.2 _j	53	12	35	franco
Mojón	cerrado	5.9 _b	64	12.0	27	0.16 _f	33 _h	8.3 _k	68	11	21	franco arenoso
San Agustín	abierto	6.7 _a	45	8.1	21	0.03 _d	5 _g	0.25 _i	92	4	4	arena
Tangolunda	abierto	7.5 _c	61	9.3	21	0.11 _e	157 _h	2.5 _j	67	8	25	arenoso franco

pH	N total	P disponible	Materia orgánica (MO)
a= neutro	d= muy bajo	g= bajo	i= muy bajo
b= moderadamente ácido	e= medio	h= alto	j= medio
c= moderadamente alcalino	f= alto		k=muy alto

Composición de cianofitas y su relación con parámetros fisicoquímicos de suelo en los ecosistemas de manglar de Bahías de Huatulco
Gabriela Hernández Enríquez

7.3 Cluster de los géneros.

La distribución de los géneros identificados por sitio se observa en el cuadro VI.

Cuadro VI. Presencia-ausencia de cianobacterias por sitio de muestreo

Género	Conejos	Cuatunalco	Mojón	San Agustín	Tangolunda
<i>Anabaena</i>	+	+	+	+	+
<i>Aphanizomenon</i>	-	-	-	-	+
<i>Aphanothece</i>	-	-	-	-	+
<i>Calothrix</i>	+	-	-	+	+
<i>Chroococcus</i>	-	-	-	-	+
<i>Fischerella</i>	-	-	-	-	+
<i>Gloeocapsa</i>	-	+	-	-	-
<i>Microcystis</i>	+	-	+	+	+
<i>Nostoc</i>	-	+	+	+	-
<i>Oscillatoria</i>	+	-	-	-	+
<i>Phormidium</i>	-	-	-	-	+
<i>Rivularia</i>	-	-	-	-	+
<i>Synechococcus</i>	+	+	-	-	-

Posteriormente se realizó un análisis de cluster utilizando una matriz de semejanza de Bray Curtis, esta matriz permitió conocer las distancias de similitud entre los géneros identificados y los sitios de muestreo. El análisis arrojó un cluster (Fig. 14) en el cual se observaron tres grupos con una similitud de más del 60% entre ellos. El primer grupo está representado por los géneros de *Fischerella*, *Rivularia*, *Chroococcus*, *Aphanothece*, *Aphanizomenon* y *Phormidium*, con 100% de similitud entre ellos y solo se encontraron presentes en la bahía de Tangolunda. El segundo grupo engloba géneros con un 90, 80 y 70% de similitud entre ellos y lo conforman *Microcystis* y *Anabaena* ambos géneros con un 90% de similitud. El primer

Composición de cianofitas y su relación con parámetros fisicoquímicos de suelo en los ecosistemas de manglar de Bahías de Huatulco
Gabriela Hernández Enríquez

género se encontró en cuatro de las cinco bahías, mientras que el segundo género se encontró en las cinco bahías muestreadas, con un 80% de similitud se encontró el género *Calothrix* y solo se ubicó en tres bahías (Tangolunda, Conejos y San Agustín), encadenado a este grupo con 70% de similitud se ubicó el género *Oscillatoria* localizado en las bahías de Conejos y Tangolunda.

El último grupo observado fue el de los géneros *Synechococcus* y *Gloeocapsa* ubicados en las bahías Conejos y Cuatunalco con 70% de similitud, por lo que respecta al género *Nostoc*, este se localizó entre las bahías de Cuatunalco, Mojón y San Agustín con una similitud menor del 60% con relación del resto de los grupos.

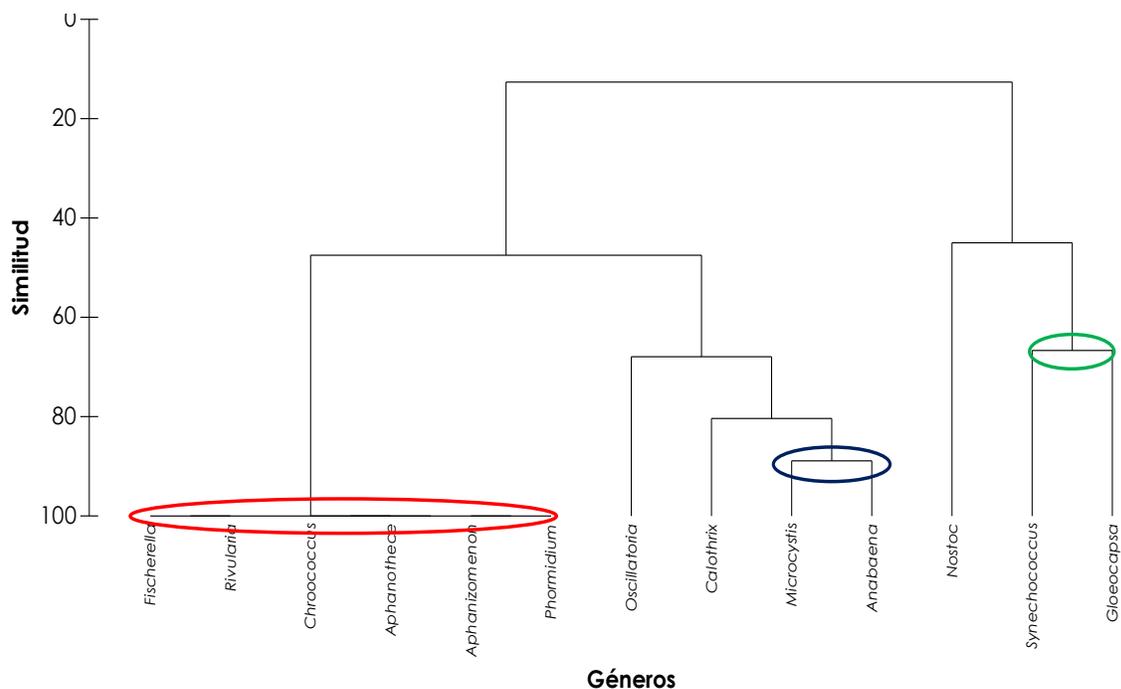


Figura 14. Diagrama de similitud de géneros. El círculo rojo representa al primer grupo de cianobacterias identificadas con 100% de similitud. El círculo azul representa el segundo grupo encontrado en las cinco bahías, con un 90% y 70% de similitud. Y el círculo verde representa el tercer grupo teniendo una menor similitud del 60%.

7.4 Parámetros fisicoquímicos y la presencia de cianobacterias

De acuerdo al análisis no paramétrico de Kruskal-Wallis no existen diferencias significativas entre las medianas de los parámetros fisicoquímicos de pH, CRA, Nt y CE (Fig. 15).

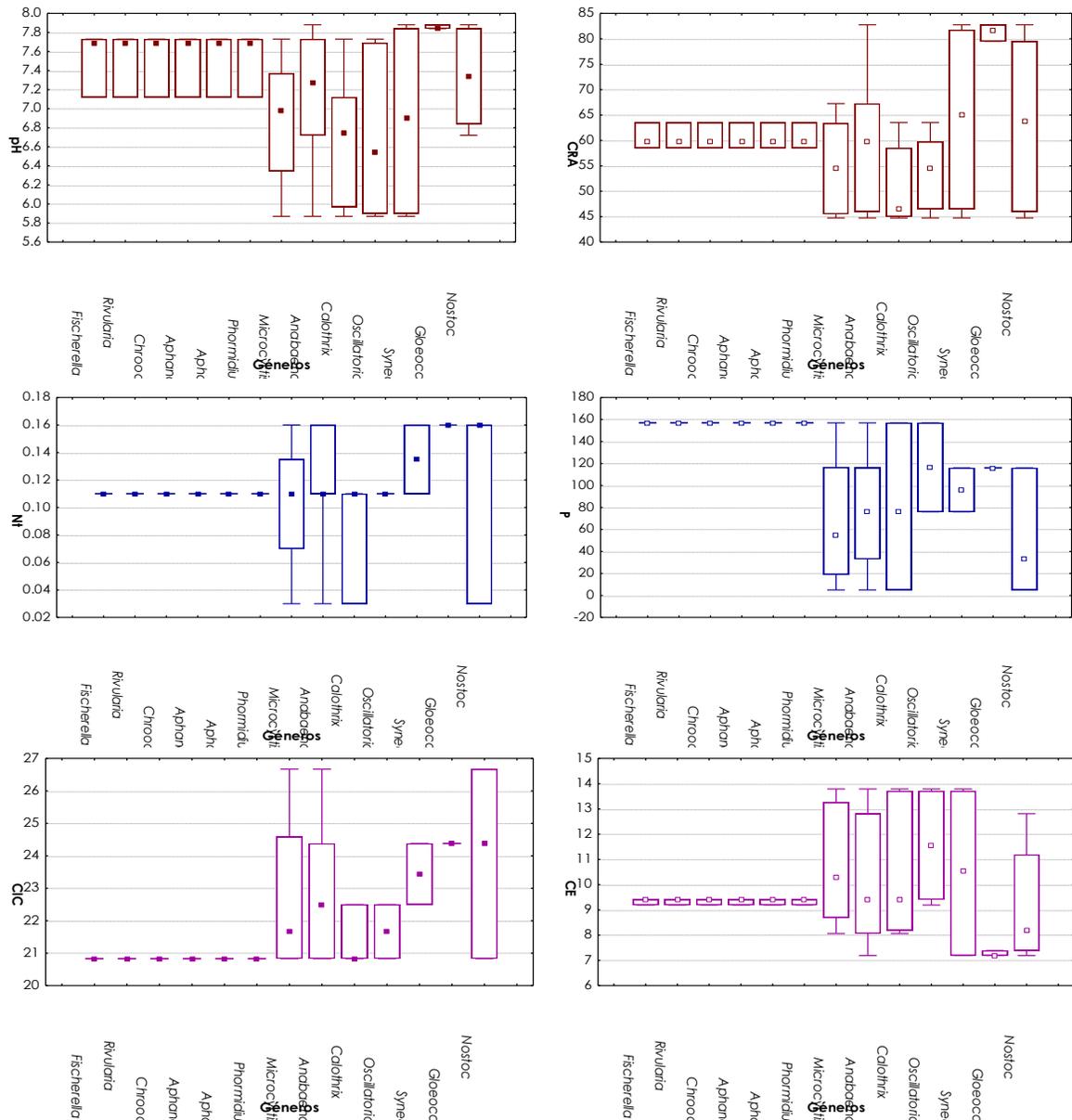


Figura 15. Diagrama de cajas y bigotes de los parámetros de pH, CRA, Nt, P, CIC y CE y la presencia de géneros.

**Composición de cianofitas y su relación con parámetros fisicoquímicos de suelo en los
ecosistemas de manglar de Bahías de Huatulco
Gabriela Hernández Enríquez**

Los valores de p-estadístico de los parámetros fisicoquímicos analizados se muestran en el cuadro VII.

Cuadro VII. Valores del p- estadístico

Parámetro	p-estadístico
pH	(H=12, p=0.15>0.05)
CRA	(H=12, p=0.23>0.05)
Nt	(H=12, p=0.19>0.05)
P	(H=12, p=0.0007<0.05)
CIC	(H=12, p=0.0038<0.05)
CE	(H=12, p=0.33>0.05)

Las variables de fósforo disponible y capacidad de intercambio catiónico (CIC) presentaron diferencias estadísticas como lo arrojó a *posteriori* la prueba de Wilcoxon, reportando que si hay diferencia estadísticamente significativa entre dichos parámetros fisicoquímicos.

Para determinar la relación entre los parámetros establecidos de los suelos y la presencia de los grupos formados de cianobacterias, se compararon los resultados obtenidos con los tres grupos de cianobacterias. El intervalo de pH donde se encontraron establecidos los géneros van de 6.5 a 7.8, son suelos moderadamente ácidos a ligeramente alcalinos; el contenido de agua requerida en los suelos de mangle estuvo entre 45% a 80%, el nitrógeno total presente en los suelos fue de 0.11% y 0.16%, al igual que el fósforo disponible osciló entre 30 y 158 mg/kg, la capacidad de intercambio catiónico se mantuvo en 21 a 24 Cmol/kg⁻¹ y la conductividad eléctrica entre 7.0 a 13.0 dS/m⁻¹.

7.5 Tinción de naranja de acridina y exopolisacáridos

La identificación de las cianobacterias en los cinco suelos de mangles con la tinción de naranja de acridina permitió observar la acumulación de exopolisacáridos presentes dentro del tapete laminar (Fig. 16a); en (b) se distinguen pseudofilamentos de *Leptolyngbya*, *Phormidium* y *Plectonema* (LPP), en (c) se observa a *Microcystis* con mucilago que cubre a las colonias y acompañada de *Fischerella*, (d) *Anabaena* observándose claramente sus células especializadas conocidas como acinetos y heterocitos, (e) *Calothrix* se observa cubierta de polisacáridos y claramente su heterocito, (g y h) *Anabaena* y *Nostoc* consideradas promotoras de la producción de exopolisacáridos así mismo se identificaron sus vainas.

Composición de cianofitas y su relación con parámetros fisicoquímicos de suelo en los ecosistemas de manglar de Bahías de Huatulco
Gabriela Hernández Enríquez

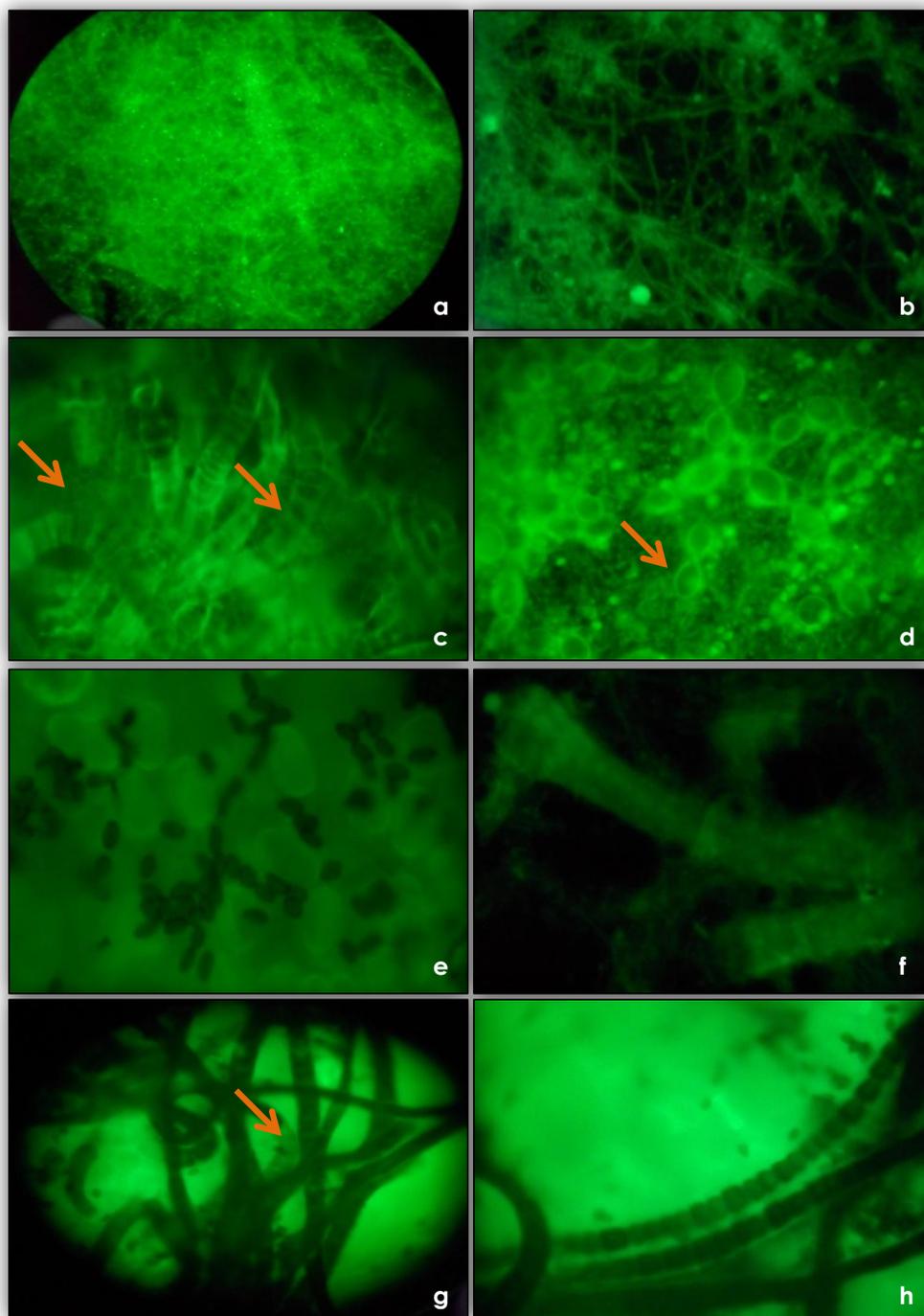


Figura 16. Fotomicrografías en microscopio de fluorescencia con tinción de naranja de acridina, se observó producción de exopolisacáridos y presencia de vainas de algunos de los géneros identificados.

7.6 Extracción y purificación del ADN

Del ADN extraído de las muestras de suelos y medio líquido de las cinco bahías, se determinó la pureza de cada uno de ellos. De acuerdo a la relación de absorbancia considerada, los valores obtenidos indicaron una baja calidad en su pureza (cuadro VIII).

Cuadro VIII. Valores obtenidos de la pureza de ADN

	Líquido	Suelo	Líquido	Suelo	Líquido	Suelo
Sitio	λ_{260}		λ_{280}		$\lambda_{260/280}$	
Tangolunda	0.0713	0.0283	0.0612	0.0249	1.165	1.136
Mojón	0.0772	0.0557	0.0653	0.0395	1.182	1.410
Cuatunalco	0.0133	0.0432	0.0107	0.0355	1.242	1.216
Conejos	0.0758	0.0454	0.0644	0.0398	1.177	1.140
San Agustín	0.0050	0.0208	0.0029	0.0158	1.724	1.316

Posteriormente, se determinaron las concentraciones del agente desnaturante al emplear los iniciadores CYA, se realizó un DGGE perpendicular. En la figura 17 se observa la separación de los amplicones, los rangos determinados fueron para una concentración baja y alta de agentes desnaturantes al 20% y 60%, respectivamente (el 100% de agentes desnaturantes corresponde a 8 M de urea y 30% de formamida), lo anterior indica que a una mayor concentración del desnaturante se forman dos líneas como resultado de la fragmentación del ADN a una velocidad mayor.

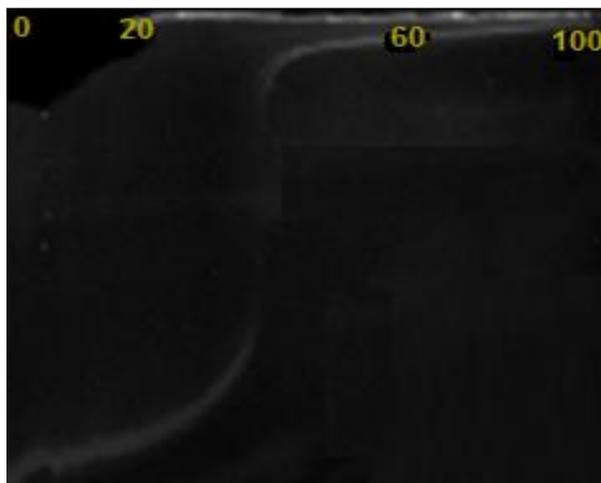


Figura 17. Electroforesis en gel de gradiente desnaturizante perpendicular.

7.6.1 Amplificación por PCR

Para iniciar la amplificación del ADN extraído de suelo y medio líquido se verificó la viabilidad de ellos, revelándolos en gel de agarosa, debido a que algunas de las muestras de suelo seguían presentando una coloración café, por lo que fue necesario repetir el paso de extracción hasta seis veces y una vez descartada la posibilidad de contaminación ya sea por proteínas o la presencia de ácidos húmicos se procedió a amplificarlos. Se realizó una estandarización de la concentración de $MgCl_2$, y se determinó que a una concentración de 3 mM se podían amplificar mejor las muestras debido a la intensidad y definición de las bandas presentes. Así mismo, ya con los productos amplificados se corrió una PCR anidada, utilizando en la primera etapa una mezcla los iniciadores universales 16SS-16SR con los específicos para cianobacterias CYA (781a, 781b y 359 F), obteniendo los geles como se observan en la figura 18.

Composición de cianofitas y su relación con parámetros fisicoquímicos de suelo en los ecosistemas de manglar de Bahías de Huatulco
Gabriela Hernández Enríquez

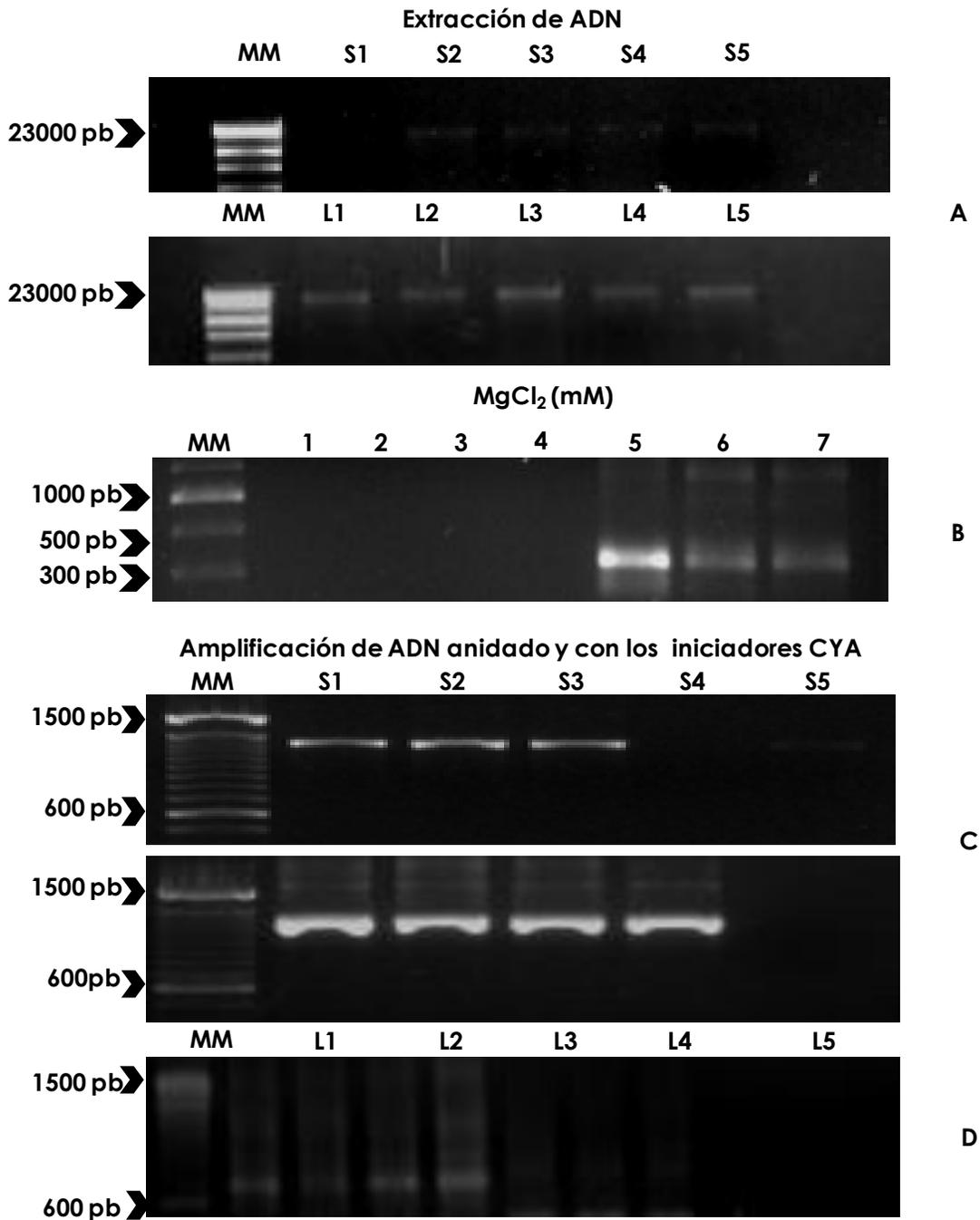


Figura 18 (A) ADN obtenido de muestras en sólido y medio de cultivo por el método de sílice. (B) Productos de PCR obtenidos al variar las concentraciones de MgCl₂. (C) Productos amplificados por PCR con iniciadores universales 16SS-16SR. (D) PCR con iniciadores específicos para cianobacterias CYA 781a, CYA 781b y CYA 359F, y colocado en gel de agarosa al 2% con bromuro de etidio en 1X buffer TBE.

7.6.2 Electroforesis en gel de gradiente desnaturalizante (DGGE)

Los productos de la PCR anidada fueron analizados por la técnica de DGGE. Se obtuvieron tres geles desnaturalizantes de los cuales se pudo estimar la diversidad de géneros encontrados en las muestras de suelo y medio de cultivo, contabilizando un total de 94 bandas generadas, asumiendo que cada banda en dichos geles corresponde a un producto único de amplificación (Fig. 19), posteriormente se realizó una digitalización de la imagen del DGGE con el programa *Quantity One* donde se generaron curvas densitométricas con base a las intensidades relativas de los picos de cada banda.

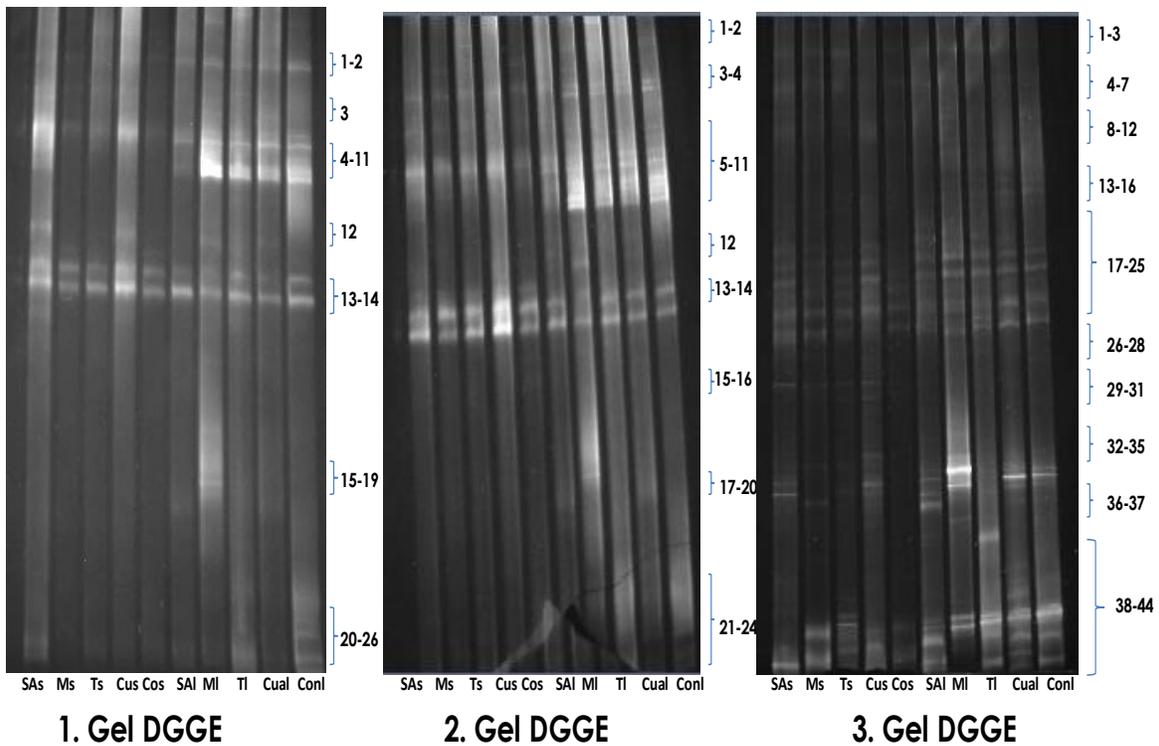


Figura 19. DGGE de muestras de ADN extraído de suelo (SAs, Ms, Ts, Cu y Cos) y medio de cultivo (Sal, MI, TI, Cual y Conl) de las cinco bahías de Huatulco, por el método de sílice y amplificadas con primers específicos para cianobacterias. Cada una de las líneas marcadas en los tres geles significa las bandas generadas o productos amplificados.

7.6.3 Diversidad microbiana por el índice de Shannon-Weaver (H')

El análisis de los tres geles DGGE con el programa *Species Diversity & Richness* 3.03 (cuadro IX) arrojó un total de 189 géneros para las muestras de medio de cultivo con un índice de Shannon-Weaver (H') que fluctuó entre 1.75 a 2.97; mientras que, para las muestras de suelo se contabilizó un total de 139 géneros con un índice de 1.09 a 3.08; lo anterior indica que la diversidad de géneros fue de media a alta.

Cuadro IX. Índices de Shannon Weaver por matriz obtenida de los DGGE.

Bahías	1°DGGE		2°DGGE		3°DGGE	
	H'1	Géneros	H'2	Géneros	H'3	Géneros
SA s	2.04	8	2.04	8	2.87	18
SAI	2.55	13	1.75	6	2.97	20
Ms	1.75	6	1.37	4	2.60	14
MI	2.68	15	2.35	11	2.39	12
Ts	1.93	7	1.09	3	2.56	13
TI	2.48	12	2.17	9	2.59	14
Cuats	1.37	4	1.93	7	3.08	22
Cuatl	2.29	10	2.06	8	2.83	18
Cons	2.16	9	1.58	5	2.39	11
Conl	2.72	16	2.27	10	2.67	15

Las abreviaturas SAs, Ms, Ts, Cuats y Cons son las muestras de los suelos de las cinco bahías, mientras que Sal, MI, TI, Cual y Conl son de los medio de cultivo.

8. Discusión

8.1 Identificación de cianobacterias

De acuerdo a sus características morfológicas los 13 géneros identificados en las cinco bahías de Huatulco, concuerdan con los trabajos de Komárek y Anagnostidis (1999) los cuales se basan en las características citadas en el Código Internacional Botánico destacando la formación de sus colonias, células especializadas, pigmentación, producción de exopolisacáridos y reproducción.

Es importante recalcar que existe el Código Internacional Bacteriológico de Castenholz y Waterbury (1989), que puede ser citado principalmente para la identificación de géneros cultivados en el laboratorio. Ambos códigos emplean propiedades fenotípicas para clasificar a las cianobacterias, lo que ocasiona muchas veces confusiones inevitables al nombrarlas, esta confusión ha generado que se proponga el uso de marcadores moleculares como un criterio adicional para llevar a cabo la identificación de estos microorganismos a nivel de género y especie.

Cabe mencionar que existió la presencia de cianobacterias en estos suelos de manglar de Bahías de Huatulco, particularmente del orden *Chroococcales*, destacando los géneros *Aphanothece*, *Chroococcus*, *Gloeocapsa*, *Microcystis* y *Synechococcus*, León-Tejera *et al.* (2011) mencionaron para mangles de Baja California Sur, al mismo orden al que pertenecen las cianobacterias, pero identificando diferentes géneros, así mismo en estos suelos estuvieron presentes *Oscillatoria* y *Phormidium* que son cianobacterias filamentosas, también identificadas en los suelos de

mangle en la India como lo menciona Pramanik *et al.* (2011) y Silambarasan *et al.* (2012).

8.2 Presencia de exopolisacáridos con la tinción de naranja de acridina

Las constantes fluctuaciones en la temperatura, concentración de iones, desecación, radiación UV y acción de las olas, propone desafíos tanto físicos como bioquímicos a los microorganismos que habitan determinado ambiente. En particular las cianobacterias que habitan en los suelos de manglar éstas características y tensiones pueden variar substancialmente afectando en gran medida el rol que desempeñan en dichos ecosistemas ya sea en las transformaciones de los ciclos biogeoquímicos como el de carbono, nitrógeno y fósforo, así como la captación de nutrientes.

Dichos microorganismos tienen la capacidad de secretar mucilago extracelular con el cual forman una biopelícula microbiana que al mismo tiempo funciona como una matriz cohesiva que rodea las demás partículas presentes, esta biopelícula puede representar una fase de vida dentro de los sistemas naturales (De Philippis y Vincenzini 1998).

Los géneros de *Anabaena* y *Nostoc* son considerados promotores en la producción de exopolisacáridos, se han caracterizado porque pueden utilizar estos polisacáridos como una barrera de protección con su entorno inmediato, y ser liberados en forma de heteropolímeros complejos donde aproximadamente el 80% de los casos están compuestos de 6 a 10 monosacáridos diferentes entre hexosas como la glucosa, galactosa y manosa, así como las pentosas ribosa, arabinosa y xilosa, otra característica importante es su carácter aniónico debido al 90% de los

polímeros que presentan ácidos urónicos, cuya función es mantener las moléculas de agua en las células de los géneros (De Philippis y Vincenzini 1998).

8.3 Propiedades fisicoquímicos de los suelos y su relación con cianobacterias

Los suelos de manglar están expuestos a perturbaciones naturales y antropogénicas, las cuales influyen en gran medida en la biomasa y actividad microbiana del mismo (Valdés, 2010).

De esta actividad destacan las comunidades de cianobacterias las cuales juegan un papel fundamental al contribuir a la fertilidad del suelo. El establecimiento y la presencia de estos microorganismos están influenciados por parámetros fisicoquímicos como los estudiados en este trabajo.

La textura del suelo de las cinco bahías se clasificó en arenosa-franco y arenosa, muy similar a lo reportado por Bojórquez *et al.* (2008) y Valdés (2010) en suelos de mangle en Nayarit donde la clase textural que registraron fue de arcilloso-arenoso, arenosa-franco y arenosa.

Los intervalos de pH que presentaron los cinco suelos de mangle fueron de 6.5 a 7.8 considerados moderadamente ácidos a ligeramente alcalinos. De acuerdo a Nayak y Prasanna (2007) las cianobacterias crecen en intervalos de pH que van de neutros a ligeramente alcalinos, muy similar a los registrados en estos suelos de manglar donde estos microorganismos encontraron las condiciones favorables para crecer y presentar diversidad de géneros. Estos mismos autores también mencionan que los suelos ácidos pueden ser ambientes estresantes para el

establecimiento de las cianobacterias, sin embargo se ha registrado presencia de ellas en suelos con pH de 5.

El suelo de Mojón se clasificó como moderadamente ácido, sin embargo la presencia de cianobacterias filamentosas con heterocitos y unicelulares estuvieron presentes al igual que en los otros suelos.

La humedad retenida del suelo depende de la cantidad de agua que se pierda y la velocidad con que está se desplace, en los cinco suelos de manglar el contenido de agua retenida varió para cada uno de ellos de un 45% a 80%. Las arenas fueron las partículas con mayor porcentaje, lo que originó una mayor filtración y baja retención de agua debido a que son partículas que poseen un mayor espacio poroso, lo que suscitó que el aire y agua fluyeran por los suelos, le siguieron las partículas de limos y las arcillas (Enger y Smith, 2004).

La conductividad eléctrica (CE) indica la cantidad de sales solubles presentes en los suelos, la disponibilidad de dichas sales está condicionada por procesos geoquímicos que intervienen en la salinización ya sea de origen primario (procesos naturales) o secundarios (intervención del hombre) como lo mencionan Rodríguez *et al.* (2006). Los sistemas de manglar de Cuatunalco, San Agustín y Tangolunda, considerados sistemas abiertos presentaron valores de 7.0 dS/m⁻¹ a 9.0 dS/m⁻¹, siendo menores a los registrados para los sistemas cerrados de Conejos y Mojón que fueron de 10.0 dS/m⁻¹ a 13.0 dS/m⁻¹, de acuerdo a esta condición los cinco suelos son considerados salinos, este aporte de sales solubles pudo originarse por la inundación periódica de agua marina, o bien por la existencia de capas freáticas (Jordán, 2006).

Soltani *et al.* (2006) y Kshatriya *et al.* (2009) mencionan que el incremento en la salinidad afecta el crecimiento celular ocasionando interferencia iónica en la absorción de nutrientes y como inhibidor del crecimiento microbiano, sin embargo las cianobacterias identificadas *Fischerella* y *Anabaena* han sido reportadas por ser halotolerantes al incrementarse la concentración de NaCl.

La capacidad de intercambio catiónico (CIC), está estrechamente relacionada con la fertilidad del suelo, regula la disponibilidad de nutrientes e interviene en los procesos de floculación, así mismo es una propiedad que posee una fuerte dependencia con el pH del suelo, en este caso la CIC de Cuatunulco y Mojón fue alta registrando valores de 24 y 27 Cmol/kg⁻¹, presentando una reacción entre ligeramente ácida y alcalina muy adecuada para suelos con cargas permanentes, esto dado por el alto contenido de arcillas, limos y materia orgánica que se encontraba disponible, las bahías de Conejos, San Agustín y Tangolunda mantuvieron un intercambio catiónico similar.

Las concentraciones de nitrógeno total fueron consideradas de bajas a altas de 0.03% a 0.16% en los cinco suelos, por lo que se consideró el hecho de que se encontraran cianobacterias del género *Anabaena*, *Nostoc*, *Calothrix*, y *Rivularia*, indicando posiblemente el aporte a dichos sistemas el N₂ atmosférico reduciéndolo biológicamente mediante la acción de la enzima nitrogenasa, localizada en sus células especializadas llamadas heterocitos. La importancia ecológica de las cianobacterias al fijar nitrógeno es que lo hacen en condiciones tanto aerobias como anaerobias. *Nostoc* y *Anabaena*, son géneros que pueden hacerlo en vida libre pero al mismo tiempo pueden establecer simbiosis con un amplio espectro de plantas entre los que destacan los mangles; Berrendero (2008)

menciona que las cianobacterias filamentosas sin heterocitos y unicelulares pueden realizar altas tasas de fijación de nitrógeno en la oscuridad empleando la energía fotosintética generada durante el día, como las localizadas e identificadas también en este estudio *Oscillatoria*, *Aphanizomenon*, *Microcystis*, *Gloeocapsa*, *Synechococcus* y *Chroococcus*.

Las cianobacterias captan el fósforo inorgánico que se encuentra disponible en el ambiente en forma de ortofosfatos; cuando las concentraciones son altas, el fósforo entra en el interior de las células por transporte pasivo, incorporándose después a las distintas rutas metabólicas. Cuando las reservas de fósforo son escasas o limitantes, las cianobacterias como *Nostoc*, ubicada en San Agustín y Mojón, adopta estrategias de protección formando cápsulas de mucilago, en el caso de *Anabaena* ubicada en las cinco bahías realizó la producción de acinetos intercalares en sus filamentos generalmente por la limitación de dicho elemento, similar a lo que menciona Berrendero (2008).

El contenido de materia orgánica en los cinco suelos de las bahías fueron altos, estos valores dependieron principalmente del aporte de hojas, tallos, raíces, flores y frutos de los manglares, así como la velocidad con la cual tardaron en descomponerse aportando energía y alimento a otros organismos. El incremento de materia orgánica suele aumentar debido a la mineralización y humificación, en particular los dos factores están íntimamente ligados a la fertilidad del suelo y el desarrollo vegetal. La determinación de la clase textural de los cinco suelos indicó que fueron arenosos y franco arenoso por lo tanto el contenido de materia orgánica disponible en este tipo de suelo es aproximadamente de 1%, comparados con suelos de pradera que van de 5 a 6%. Los procesos naturales que

involucran el desarrollo de los suelos como la erosión origina muchas veces que la arena se acumule hacia la parte interior de los sistemas, ocasionando que los mangles se sofoquen y no haya una alta producción de materia orgánica como se reporta generalmente en estos sistemas, también la magnitud de la materia orgánica puede depender de procesos geofísicos como extensión del manglar, frecuencia y duración de las mareas o descargas de agua de origen continental que varían considerablemente de manglar a manglar, según Holguín y Bashan (2007).

Las cianobacterias asociadas a los suelos de manglar de las bahías de Huatulco, como *Nostoc sp.*, *Anabaena sp.* y *Calothrix sp.*, presentan cierta similitud con lo reportado en mangles de Cartagena de Indias en Colombia por Díaz *et al.* (2010) debido a la influencia en la fijación del carbono y al mismo tiempo por la mineralización de la materia orgánica.

8.4 DGGE e índices de diversidad

En este trabajo la técnica molecular empleada fue el DGGE donde se visualizaron los patrones de bandas que permitieron identificar y cuantificar la diversidad genética en las muestras de suelo y medio de cultivo. Los patrones de bandeo resultaron a simple vista muy similares, pero al visualizar las imágenes obtenidas se evidenciaron bandas no tan claras que pudieron ser descartadas y no cuantificadas, sin embargo se obtuvo la cuantificación por completo de la mayoría de bandas.

Existe una gran discrepancia en las evaluaciones de la diversidad microbiana, en particular del suelo ya que representa uno de los hábitats más diversos para microorganismos, como lo mencionan Kirk *et al.* (2004) que aproximadamente el 1% de la población puede ser cultivada en laboratorio pero no necesariamente este 1% sea la muestra representativa

de toda la población debido a que el 99% posiblemente esté en un estado fisiológico de latencia originado por un gradiente de estrés, perturbación u diferencia biótica o abiótica.

De acuerdo al tercer gel DGGE obtenido y analizado por contener mayor número de bandas, podemos decir que la diversidad de los géneros encontrados está en función de su abundancia, registrando una mayor diversidad en los sistemas abiertos de manglar; principalmente en el suelo de Cuatunulco que presentó una abundancia de 22 géneros, en las muestras de medio de cultivo la mayor abundancia registrada fue en San Agustín con 20 géneros, tomando en cuenta las características que definieron a los sistemas abiertos como áreas donde constantemente cambian los flujos de materia y energía se establecieron y crecieron las cianobacterias. Otra característica importante a considerar es la producción de exopolisacáridos, con lo cual las cianobacterias forman una capa de protección y cuya función es resguardarse contra los factores bióticos y abióticos dentro de cualquier sistema.

De acuerdo con Muyzer *et al.* (1993) es importante tener en cuenta que las técnicas basadas en análisis de genes amplificados por PCR pueden no representar una imagen completa o precisa de una comunidad. En este caso la estimación de la diversidad genética por la técnica de DGGE está limitada muy posiblemente a los miembros dominantes de las comunidades microbianas, los cuales al representar solo el 1% de la población microbiana total pueden dar solo una banda visible en un gel de DGGE.

Composición de cianofitas y su relación con parámetros fisicoquímicos de suelo en los ecosistemas de manglar de Bahías de Huatulco
Gabriela Hernández Enríquez

La diversidad de las cianobacterias registrada en los suelos de mangle y las muestras de medio de cultivo fue de media a alta; lo que nos lleva a rechazar la hipótesis planteada, encontrando mayor diversidad y abundancia en los sistemas abiertos que en los cerrados.

Lo que nos permite concluir que aún bajo condiciones desfavorables, las cianobacterias encuentran o generan sus propias condiciones ideales para soportar condiciones adversas climáticas.

9. Conclusiones

1. Con respecto a las características morfológicas, fisiológicas y de crecimiento de las cianobacterias en suelo y medio de cultivo se identificaron 13 géneros en los cinco suelos de manglar.

2. De acuerdo a la Norma Oficial Mexicana NOM-021-Semarnat-2000, los parámetros fisicoquímicos de los suelos analizados como materia orgánica, nitrógeno total, fósforo disponible y pH presentaron valores altos, encontrándose en dichos suelos el establecimiento de cianobacterias filamentosas y unicelulares como los géneros *Anabaena*, *Nostoc* y *Microcystis*.

3. El uso de herramientas moleculares como el DGGE permitió determinar a través de patrones de bandas la diversidad registrada tanto en muestras de suelo como en medio líquido, esto para superar el sesgo que proviene de información por métodos taxonómicos tradicionales.

4. La mayor diversidad obtenida del DGGE se registró en Cuatunalco y San Agustín tanto para las muestras de suelo como las de medio líquido, pero también se mantuvo una diversidad media en los sistemas cerrados de Mojón en muestras de suelo y Conejos en las de medio líquido. Esto debido a que la caracterización de estos microorganismos sigue siendo complicada, ya que no todos son cultivables o bien porque no están definidas las condiciones de cultivo específicas.

10. Recomendaciones

1. Realizar estudios de secuenciación molecular a las bandas obtenidas de los geles DGGE.
2. Realizar filogenia molecular para comparar las secuencias con base de datos registrados o bien generar nuevos datos para formar bibliotecas genómicas.
3. Evaluar el potencial biotecnológico de cada uno de los géneros identificados.

11. Bibliografía

- Allen, M. M. y Smith, A. J. 1969. Nitrogen chlorosis in blue-green algae. Arch. Microbiol. 69: 11-120.
- Alongi, D.M. 1994. The role of bacteria in nutrient recycling in tropical mangrove and other coastal benthic ecosystems. Hydrobiology. 285: 19-32.
- Balasubramanian, T. 2002. Mangroves of India. Environmental Information System Centre. Centre of Advanced Study in Marine Biology, Annamalai University Parangipettai-608502, Tamil Nadu, India. 140 p.
- Balota E.L., Kanashiro M., Colozzi-Filho A., Andrade, D.S. y Dick, R.P. 2004. Soil enzyme activities under long-term tillage and crop rotation systems in subtropical agro-ecosystems. Brazilian Journal of Microbiology. 35: 300-306.
- Bautista, C. A., Etchevers J. B., Del Castillo, R. F y Gutiérrez C. 2004. La calidad del suelo y sus indicadores. *Ecosistemas*
- Belnap, J. y Gardner, J.S. 1993. Soil microestructure in soils of the Colorado Plateau: the role of the cyanobacterium *Microcoleus vaginatus*. Great Basin Nat. 53: 40-47
- Berrendero, E. 2008. Caracterización morfológica, genética y fisiológica de cianobacterias dominantes en sistemas fluviales. Tesis Doctoral. Universidad Autónoma de Madrid. 262 p.
- Brady N.C. 1990. The nature and properties of soils. 10ª Ed. Macmillan, New York
- Bremner, J. M. 1996. Methods of soil analysis. Part 3-Chemical Methods. Nitrogen-Total, In: D.L. Sparks (Ed). Soil Science Society of America, Inc. 1085-1121 p.

- Bojórquez, I., Hernández, A., García, D., Nájera, O., Flores, F., Madueño, A. y Bugarín, R. 2008. Características de los suelos de las barras paralelas, playas y dunas de la llanura costera norte del estado de Nayarit, México. *Cultivos Tropicales*. 29(1): 37-42.
- Carrasco, G. D. 2007. Cianobacterias planctónicas y cianotoxinas en embalses españoles. Memoria presentada para optar al Grado de Doctor en Ciencias Biológicas. Universidad Autónoma de Madrid. 320 p.
- Castell, G. S. E. 2010. Análisis de las comunidades microbianas asociadas a tapetes hipersalinos de la Laguna Rosada de Uaymitun, Yucatán, México. Tesis que para obtener el título de Maestro en Ciencias en Biotecnología Genómica. Instituto Politécnico Nacional. Centro de Biotecnología Genómica. 132 p.
- Castenholz, R. W. y Waterbury, J. B. 1989. Group 1. Cyanobacteria. Preface. En: *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, 2ª ed. 3. 1710-1727.
- Conabio. 2009. Manglares de México: Extensión y distribución. 99 p.
- Danielson, R. E. y Sutherland, P.L. 1986. Methods of soil analysis Part 1- Physical and Mineralogical Methods, Soil. Pososity. In: A. Klute (Editor). Soil Science Society of America, Inc. 443-460 p.
- De Philippis, R. y Vincenzini, M. 1998. Exocellular polysaccharides from cyanobacteria and their possible applications. *FEMS Microbiology Reviews* 22: 151-175.
- Díaz, M. C., Castro, A. I. y Manjarrez, P. G. 2010. Mangles de Cartagena de Indias: "Patrimonio biológico y fuente de biodiversidad". Fundación Universitaria Tecnológico Comfenalco. Facultad de Ingenierías, Cartagena. 72 p.

- Enger, D.E. y Smith, F.B. 2004. *Ciencia Ambiental. Un estudio de interrelaciones*. Décima edición. Mc Graw Hill.
- Escorza, N. J.G. 2007. *Estudios de inóculos bacterianos como biorremediadores de suelos contaminados con petróleo*. Tesis de Grado para la obtención del título en Ingeniero en Biotecnología. Riobamba- Ecuador. 117 p.
- Ezcurra, E., Aburto, O. y Rosenzweig, L. 2009. Los riñones del mundo: ¿por qué debemos proteger los manglares de México? *Investigación Ambiental*. 1: 202-206.
- Fiedler, P.C. 1992. Seasonal climatologies and variability of eastern tropical Pacific surface waters. NOAA Tech. Rep. NMFS. 109: 1-65.
- García, E. 1973. *Modificaciones al sistema de clasificación climática de Kôpen para adaptarla a las condiciones de la República Mexicana*. Instituto de Geografía, UNAM, México.
- García-Pichel, F., Johnson, S. L. Youngkin, D. y Belnap, J. 2003. Small-Scale vertical distribution of bacterial biomass and diversity in biological soil crusts from arid lands in the Colorado Plateau. *Microb. Ecol.* 46: 312–321.
- Gee, G.W. y Bauder, J. W. 1986. *Methods of soil Analysis, Part 1- Physical and Mineralogical Methods. Particle-size analysis*. In A. Klute (Ed). Soil Science Society of America, Inc. 383-411 p.
- Golubic, S. y Knoll. A.A.H. 1993. "Fossil Prokaryotes". In: Lipps, J.H. (Ed.). *Fossil prokaryotes and protists*. Blackwell Scientific Publications. 51-76.
- Holguín, G., Vázquez, P. y Bashan, Y. 2001. The role of sediment microorganisms in the productivity, conservation, and

- rehabilitation of mangrove ecosystems: an overview. *Biol Fertil Soils* 33:265–278.
- Holguín, G. y Bashan, Y. 2007. La importancia de los manglares y su microbiología para el sostenimiento de las pesquerías costeras. *In: Microbiología agrícola: hongos, bacterias, micro y macrofauna, control biológico, planta-microorganismo*. Ferrera-Cerrato. México. 239-253.
- Kalembasa, S. J. y Jenkinson, D. S. 1973. A comparative study of titrimetric and gravimetric methods for the determination of organic carbon in soil. *Journal Science Food Agriculture*. 24: 1085-1090 p.
- Kim H. y Tan. 2011. *Principles of soil chemistry*. 4ª Ed. CRC, press. Taylor & Francis Group
- Kirk, J.L., Beaudette L.A., Hart M., Moutoglis P., Klironomos, J.N., Lee, H. y Trevors, J. T. 2004. Methods of studying soil microbial diversity. *Journal of Microbiological Methods*. 58, 169-188.
- Komárek, J. y Anagnostidis, K. 1999. Cyanoprokariota: Chroococcales. *En: Süßwasserflora von Mitteleuropa* 1ª edición 19/1 Jena Stuttgart Lübeck Ulm, Germany. 545 p.
- Kshatriya, K., Singh, J. S. y Singh, D. P. 2009. Salt tolerant mutant of *Anabaena doliolum* exhibiting efficient ammonium uptake and assimilation. *Physiology Molecular Biology Plants*. 15 (4) 376-381.
- Jórdan, L. A. 2006. *Manual de Edafología*. Departamento de Cristalografía, Mineralogía y Química Agrícola. Universidad de Sevilla. 143 p.
- León-Tejera, H., Pérez-Estrada, C., Montejano, G y Serviere-Zaragoza, E. 2011. Biodiversity and temporal distribution of Chroococcales

- (Cyanoprokaryota) of an arid mangrove on the east coast of Baja California Sur, Mexico. *Fottea* 11(1): 235-244.
- López, C. A., Maya, Y. y García, M. J.Q. 2010. Diversidad filogenética de especies de *Microcoleus* de costras biológicas de suelo de la península de Baja California, México. *Revista Mexicana de Biodiversidad* 81: 1-7.
- López de los Santos, Y. 2008. Análisis de las comunidades microbianas de tapetes laminados de los ambientes hipersalinos de Laguna San Ignacio y Guerrero Negro Baja California Sur, México. Tesis que para obtener el grado en Maestro en Ciencias con Orientación Biología Marina. Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, S.C. 170 p.
- Mantelin, S. y Touraine, B. 2004. Plant growth- promoting bacteria and nitrate availability: impacts on root development and nitrate uptake. *Journal of Experimental Botany*. 55: 27-34.
- Matsuoka, M., Mendes, I.C. y Loureiro, M.F. 2003. Biomassa microbiana e atividade enzimática em solos sob vegetação nativa e sistemas agrícolas anuais e perenes na Região de Primavera do Leste (MT). *Revista Brasileira de Ciência do Solo*. 27: 425-433.
- McCaig, A. E., Glover, L. A. y Prosser J. I. 2001. Numerical analysis of grassland bacterial community structure under different land management regimes by using 16S ribosomal DNA sequence data and denaturing gradient gel electrophoresis banding patterns. *Applied and Environmental Microbiology*. 47: 4554-4559.
- Mendes, I.C., Souza, L.V., Resck, D.V.S. y Gomes, A.C. 2003. Propiedades biológicas em agregados de un latos solo

- vermelho-escuro sob plantio convencional e direto no cerrado. Revista Brasileira de Ciência do Solo. 27: 435-443
- Menéndez, L. y Guzmán J. M. 2002. Ecosistemas de manglar en el archipiélago cubano. UNESCO. Editorial Academia Cuba. 471 p.
- Mera, O. V. 1999. Género, manglar y subsistencia. 1ª. Edición. Abya-Yala. 171 p.
- Monreal-Gómez, M. A. y Salas de León D. A. 1998. Dinámica y estructura termohalina, *In*: M. Tapia-García (ed.). El Golfo de Tehuantepec: el ecosistema y sus recursos. Universidad Autónoma Metropolitana, México. Vol: 13-26.
- Muyzer, G., De Wall, E. C. y Uitterlinden, A. G. 1993. Profiling of complex microbial populations by denaturing gradient gel electrophoresis analysis of polymerase chain reaction-amplified genes coding for 16S rRNA. Applied and Environmental Microbiology. 59: 695-700.
- Nayak, S. y Prasanna. 2007. Soil pH and its role in cyanobacterial abundance and diversity in rice field soils. Applied Ecology and Environmental Research 5: 103-113.
- Nübel, U., Garcia-Pichel, F. y Muyzer G. 1997. PCR Primers to Amplify 16S rRNA Genes from Cyanobacteria. Applied and Environmental Microbiology. 63: 3327-3332.
- Pramanik, A., Sundararaman, M., Das, S., Ghosh, U. y Mukherjee, J. 2011. Isolation and characterization of cyanobacteria possessing antimicrobial activity from the sundarnans the world's largest tidal mangrove forest. J. Phycol. 47. 731-743.
- Ramos E. 2004. Estructura de la comunidad de peces en la Bahía La Entrega, Huatulco, Oaxaca. Tesis que para obtener el grado de

- Maestro en Biología. Universidad Autónoma Metropolitana. Unidad Iztapalapa. 130 p.
- Richards, L. A. 1993. Suelos salinos y sódicos: diagnóstico y rehabilitación. Noriega Editores. México. 2:8-17
- Rippka, R. 1988. Isolation and purification of cyanobacteria. En: *Methods in Enzimology*. Vol.167. *Cyanobacteria*. Academic Press, New York. 3-27 p.
- Rippka, R. B. J., Deruelles, B. J., Watebury, M., Herdman, y R. Stainer. 1979. "Generic assignments strain histories and properties of pure cultures of cyanobacteria". *J. of Gen. Microbiol.* 111:1-61.
- Rodicio y Mendoza. 2004 Identificación bacteriana mediante secuenciación del ARNr 16S: fundamento, metodología y aplicaciones en microbiología clínica. *Enferm. Infecc. Microbiol. Clin.* 22(4): 238-245.
- Rodríguez, R., Moreno, J. y Larreal, M. 2006. Comportamiento de la conductividad eléctrica en dos series de suelo del sector Caño San Miguel, municipio Mara, estado Zulia durante un período de dos años. Universidad del Zulia. Facultad de Agronomía. Departamento de Edafología. Maracaibo estado de Zulia. *Rev. Fac. Agron. (LUZ)*. 23: 394-404.
- Rojas-Herrera, R., Narváez-Zapata, J., Zamudio-Maya, M. y Mena-Martínez, M.E. 2008 A simple sílica-based method for metegenomic DNA Extraction from Soil and Sediments. *Molecular Biotechnonology*. 40: 13-17.
- Sánchez-Arias, L.E., Paolini, J. y Rodríguez, J.P. 2010. Dinámica de las propiedades del suelo en bosques de *Rhizophora mangle* L. (Rhizophoraceae) en Isla de Margarita, Venezuela. *Revista Biología Tropical*. 58: 547-564.

- Silambarasan, G., Ramanathan, T. y Kathiresan, K. 2012. Diversity of marine cyanobacteria from three mangrove environment in Tamil Nadu Coast, South East Coast of India. *Current Research Journal of Biological Sciences* 4(3): 235-238.
- Scanlan, D. 2001. Cyanobacteria: ecology, niche adaptation and genomics. *Microbiology Today*. 28: 128-130.
- Sherman, R.E., Timothy, J. F. y Howarth, R.W. 1998. Soil-plant interactions in a neotropical mangrove forest: iron, phosphorus and sulfur dynamics. *Oecologia*. 115: 553-563.
- Soltani, N., Ramezan A.K., Tabatabaei M. Y., Shokravi S. y Fernández-Valiente E. 2006. Variation of nitrogenase activity, photosynthesis and pigmentation of the cyanobacterium *Fischerella ambigua* Strain FS18 under different irradiance and pH values. *World Journal of Microbiology & Biotechnology*. 22: 571-576.
- Thamizh, S. K. y Sivakumar, K. 2011. Cyanobacterial diversity and related physico-chemical parameters in paddy fields of Cuddalore District, Tamilnadu. *International Journal of Research in Environmental Science and Technology*. 1: 7-15.
- Tomaselli, L. y Giovannetti L. 1993. Survival of diazotrophic cyanobacteria in soil. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*. 9: 113-116.
- Tomlinson, P. B. 1986. *The botany of mangroves*. Cambridge University Press. Cambridge 419 p.
- Valdés, V. E. 2010 Evaluación del Carbono y nutrientes edáficos por clase de geofoma y tipo de manglar en marismas nacionales, Nayarit. Tesis presentada como requisito parcial para obtener el grado de Doctor en Ciencias. Colegio de Postgraduados.

- Institución de enseñanza e investigación en ciencias agrícolas.
Campus Montecillo, Texcoco, México. 241 p.
- Vitousek, P.M., Cassman, K., Cleveland, C., Crews, T., Field, C. B., Grimm, N.B., Howarth, W. R., Marino, R., Martinelli, L., Rastetter, E. B. y Sprent J. I. 2002. Towards an ecological understanding of biological nitrogen fixation. *Biogeochemistry* 57/58. 1-45 p.
- Watanabe, F. S. y Olsen, S. R. 1965. Test of ascorbic acid for determining phosphates in water and sodium bicarbonate extracts from the soil. *Soil Sci. Soc. Am. Proc.* 29: 677-680.
- Yúfera, P., y Carrasco, D. 1973. *Química agrícola 1, Suelos y Fertilizantes*. Ed. Alhambra. 1ª. Edición. España. 22-23.
- Zancan, S., Trevisan, R. y Paoletti M.G. 2006. Soil algae composition under different agro-ecosystems in North-Eastern Italy. *Agriculture, Ecosystems and Environment* 112: 1-12.
- Zar, J. H. 1999. *Biostatistical Analysis*. Prentice Hall. New Jersey. 663 p.