

Informe final* del Proyecto G035
Diversidad de bacterias fotótrofas en comunidades microbianas bentónicas de Bahía
Concepción, BCS, México

Responsable: Dr. Alejandro López Cortés
Institución: Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste SC
División de Biología Experimental
Departamento de Microbiología
Dirección: Km 0.5 carretera a la telefónica terrenos El Conchalito, La Paz, BCS,
23000 , México
Correo electrónico: alopez@cibnor.mx
Teléfono/Fax: Tel:(52) (612) 123-8484 Fax:(52) (612) 125-3625
Fecha de inicio: Noviembre 30, 1995
Fecha de término: Febrero 17, 1997
Principales resultados: Base de datos, Informe final
Forma de citar el informe final y otros resultados:** López Cortés, A., 1998. Diversidad de bacterias fotótrofas en comunidades microbianas bentónicas de Bahía Concepción, BCS, México. Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste SC. **Informe final SNIB-CONABIO** proyecto No. G035. México D. F.

Resumen:

El objetivo de este proyecto fue caracterizar la diversidad de cianobacterias y bacterias fotótrofas anoxigénicas que construyen comunidades microbianas bentónicas (tapetes microbianos) u otro tipo de organizaciones microbianas donde participan cianobacterias en manantiales termales, planicies evaporíticas y fondos marinos de Bahía Concepción, B.C.S., México. El estudio contribuye al conocimiento de la ecología de las cianobacterias del Golfo de California por presentar la descripción de ocho especies (*Leptolyngbya thermalis*, *Limnothrix amphigranulata*, *Oscillatoria limnetica*, *Phormidium rubrum*, *Phormidium okeni*, *Synechococcus cedrorum*, *Synechococcus elongatus* y *Synechocystis aquatilis*) algunas de ellas probablemente nuevos biotipos, por proceder de ambientes singulares donde se combinan las altas temperaturas (51 C) y salinidad (30 o/oo), otros ricos en ficoeritrina, adaptados a las profundidades (25 metros) donde la radiación solar es el factor limitante y otros de planicies evaporíticas (ambientes hipersalinos). Se presentó una base de datos relacional en 8 entidades, TAXONOMIA, CURATO, FISIOLOGIA, BIBLIOGRAFIA, SINONIMIA, GEOGRAFIA, INSTITUCION y PERSONA. Las cepas están preservadas como cultivos monocianobacteriales en nitrógeno líquido (-196 C) y forman parte de la colección de microalgas del CIBNOR

-
- * El presente documento no necesariamente contiene los principales resultados del proyecto correspondiente o la descripción de los mismos. Los proyectos apoyados por la CONABIO así como información adicional sobre ellos, pueden consultarse en www.conabio.gob.mx
 - ** El usuario tiene la obligación, de conformidad con el artículo 57 de la LFDA, de citar a los autores de obras individuales, así como a los compiladores. De manera que deberán citarse todos los responsables de los proyectos, que proveyeron datos, así como a la CONABIO como depositaria, compiladora y proveedora de la información. En su caso, el usuario deberá obtener del proveedor la información complementaria sobre la autoría específica de los datos.

DIVERSIDAD DE BACTERIAS FOTOTROFAS EN COMUNIDADES MICROBIANAS
BENTONICAS DE BAHIA CONCEPCION, B.C.S., MEXICO.

INFORME FINAL PARA LA COMISION NACIONAL PARA EL
CONOCIMIENTO Y USO DE LA BIODIVERSIDAD (G035)

ENERO, 1997

ALEJANDRO LOPEZ CORTES*

INTRODUCCION

Se presenta una relación explícita de los gastos realizados con los recursos proporcionados por la Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad (CONABIO).

El estudio contribuye al conocimiento de la diversidad de bacterias fotótrofas bentónicas en manantiales termales, planicies evaporíticas y fondos marinos de Bahía Concepción, Baja California Sur, México. Se presenta una base de datos relaciona1 en 8 entidades, TAXONO, CURATO, FISIOL, BIBLIO, SINONI, GEOGRA, INSTIT y PERSON, con un total de nueve registros, correspondientes a 6 géneros y 8 especies (*Leptolyngbya thermalis*, *Limnothrix amphigranulata*, *Lyngbya limnetica*, *Phormidium rubrum*, *Phormidium okeni*, *Synechococcus cedrorum*, *Synechococcus elongatus* y *Synechocystis aquatilis*). La identificación del componente fotótrofo se basó en características ecológicas, morfológicas y ciclos de vida usadas por los botánicos (Geitler, 1925), pero también algunos de los empleados por los microbiólogos como son fijación de nitrógeno, anaerobiosis, tolerancia a la salinidad, pH (Rippka et al., 1979; Castenholz y Waterbury 1989; Anagnostidis y Komárek 1988).

Algunas cianobacterias, *Microcoleus chthonoplastes*, *Spirulina*, *Lyngbya*, *Calothrix* y bacterias fotótrofas anoxigénicas, *Chloroflexus*, *Thiocystis*, *Rhodospirillum*, *Chromatium* y *Chlorobium*, se consideraron no cultivables identificándose sólo a partir de muestras naturales y de las primeras transferencias, sin preservarse en nitrógeno líquido.

Actualmente las cepas de las ocho especies identificadas y registradas están preservadas a largo plazo (20 años) por quintuplicado en nitrógeno líquido, y forman parte de la Colección de Microalgas del CIBNOR. La información de la base de datos se considera de libre acceso.

* Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, S.C.
Laboratorio de Ecología y Biotecnología Microbiana, A.P.128
La Paz, 23000, B.C.S., México

MATERIAL Y METODOS

Relación de gastos realizados

1. Contenedor de nitrógeno líquido 25 lts TYLOR-WHARTON	\$14,229.50
1.1 Accesorios del contenedor:	
a) Gradilla para cinco cajas de plástico.	695.60
b) Paquete de 5 cajas de plástico para almacenar cepas.	384.80
c) Canastilla cilíndrica de acero inoxidable.	325.60
d) Caña de aluminio para el almacenamiento de cepas en ampollitas	355.20
e) Bastón para medir los niveles de nitrógeno líquido del contenedor.	39.26
f) Tapa de repuesto.	514.05
g) Base con ruedas para el contenedor.	1,868.50
2. Disruptor de células por ultrasonido VIRSONIC 60.	15,905.75
2.1 Accesorios para el disruptor de células:	
a) Micropunta de titanio de 1/8".	1,668.80
b) Microcopa y punta de ultrasonido de 22 mm	4,544.50
3. Geoposicionador Magellan Meridian XL	4,389.00
4. Viajes y viáticos	3,280.00
	48,200.56
-3% PECE	1,446.01
SUBTOTAL,	46,754.55
IVA 10%	4,675.45
TOTAL	\$ 51,430.00

Reconocimiento de comunidades microbianas bentónicas

Se realizaron tres salidas de campo en los meses de 1) Octubre de 1995; 2) Febrero-Marzo de 1996; y 3) Junio de 1996, realizándose inspecciones costeras y de los fondos a lo largo de un transecto marino.

La primer salida de campo oficial de este proyecto se realizó los días 27 al 29 de Febrero y 1° y 2 de Marzo de 1996.

Los sitios muestreados a lo largo del transecto marino y con respecto a la línea de costa fueron:

1. Isla San Ramón
2. Punta Cola de Ballena
3. Isla Blanca
4. Ensenada Los Mapachitos
5. Punta El Coloradito
6. Trampa de sedimentación a 18 metros de profundidad, frente a Las Huertitas.

Los sitios muestreados en los manantiales termales y planicies evaporíticas costeras fueron:

7. Mangle Santispac Charco 1 y 2)
8. Posada Concepción.
9. Los Pinos

Determinación de parámetros fisicoquímicos

De cada uno de los sitios donde se muestreo se determinaron los parámetros: temperatura y salinidad, con el equipo KAHLSICO modelo 140 E.U.A.; el p H con un potenciómetro portátil pHep3 uicropHepHANNA INSTRUMRNTS, E.U.A., y el contenido de azufre elemental por espectrofotometría.

Colecta de muestras

Las muestras de sedimento del transecto marino se obtuvieron con la ayuda de un buzo y de contenedores estériles de plástico de boca ancha de 4 onzas de capacidad. Los contenedores fueron completamente llenados con sedimento de cada sitio y almacenados a temperatura entre 10-15°C, en la obscuridad como lo reporta Rippka (1988).

Las muestras de la trampa de sedimentación se obtuvieron por buceo autónomo y con contenedores estériles de plástico de boca ancha. Las muestras de comunidades microbianas bentónicas de manantiales termales y de tapetes microbianos de la planicie evaporítica, también fueron manipuladas con material estéril. Los contenedores se almacenaron a 10-15°C, en la obscuridad como lo reporta Rippka (1988).

Para el trabajo de identificación se tomó nota del color y forma de las comunidades microbianas "talo",

De los mismos contenedores se tomaron submuestras *in situ* con la ayuda del laboratorio móvil del CIBNOR para los siguientes procedimientos:

- a) Núcleos de 0.5 mm x 25 mm para análisis de pigmentos.
- b) Plaqueo con asas calibradas de plástico estériles de, 10 pl en ASNIII
- c) fijación con glutaraldehído al, 2.5% de núcleos de 1 mm² para microscopía electrónica.

Otras submuestras se procesaron en el CIBNOR de La Paz, B.C.S. y fueron:

- a) Núcleos de 0.2 g para aislamiento de cianobacterias por vaciado en placa en ASNIII con ciclohexamida.
- b) Enriquecimiento de cianobacterias y bacterias fotosintéticas con la ayuda de medio Pfennig (Truper, 1970) y con columnas de Winogradsky (Krieg, 1981; Castenholz, 1972).
- c) Fijación con glutaraldehído al 2.5% de nucleos de 1 mm para microscopia electrónica.

Perfilde pigmentos fotosintéticos de muestras naturales.

Nucleos por triplicado de 0.5 mm x 25 mm se colocaron en tubos, con tapón de rosca estériles a los que se les adicionó 10 ml de metanol grado espectrofotométrico y 25 mg de carbonato de magnesio. La extracción de los pigmentos ocurrió a 4°C en la oscuridad entre 24 y 48 horas. Después de este tiempo se mezcló con la ayuda de un vortex, para posteriormente centrifugar a 4,000 rpm 25 min a 20°C. Se retiró 5 ml del sobrenadante que contenía los pigmentos y se adicionó 1.5 ml de solución de cloruro de sodio al 0.05%. Posteriormente se agregó 6.5 ml de n-hexano grado espectrofotométrico. La mezcla se agitó con un vortex. Nuevamente se centrifugó a 3,000 rpm durante 5 min a 20°C para favorecer la formación de las fases. Para la determinación de clorofila a se retiró la hiperfase de n-hexano, mientras que en la hipofase de metanol se detectó las bacterioclorofilas y contenido de azufre elemental realizando un barrido entre los 200 a 800 nm, con la ayuda de un espectrofotómetro ultravioleta-visible, y con estándares de referencia para clorofila a de *Anacystis nidulans* y de bacterioclorofila a de *Rhodospseudomonas sphaeroides* (Sigma, E.U.A.). (Modificado de Stal y col. 1984).

Aislamiento de cianobacterias

Submuestras por triplicado de 0.2 g de sedimento, tapetes microbianos y comunidades microbianas se colocaron en viales Eppendorf y se resuspendieron en 1.0 ml de medio sintético agua de mar para cianobacterias ASNIII cuya formulación se presenta en el apéndice anexo. Se obtuvo una suspensión homogénea con la ayuda del disruptor de células VIRSONIC 60 a 3 watts de poder durante 15 segundos. Los viales deben estar en la cámara fría para evitar el daño celular por el calentamiento generado por el ultrasonido.

El volumen de suspensión celular (1.0 ml) se colocó en tubos con tapón de rosca y se le añadió 9.0 ml de medio ASNIII diluido con agua destilada en una proporción de 1:3. A partir de estos tubos se realizó diluciones seriadas. De cada una de las diluciones se tomó 2.0 ml que se colocaron en tubos estériles de 30 ml de capacidad con tapón de rosca a los que se les añadió 18 ml de ASNIII con cicloheximida licuado a 45°C. La mezcla se llevó a cabo invirtiendo el tubo durante dos o tres ocasiones y vaciando en placas de petri estériles. El medio inoculado con muestras procedentes del transecto marino y tapetes microbianos se incubaron a 25°C y $50 \mu\text{Em}^{-2} \text{s}^{-1}$ de intensidad luminosa con lámparas fluorescentes de luz de día, mientras que las muestras de manantiales termales se incubaron a 50°C y $25 \mu\text{Em}^{-2} \text{s}^{-1}$ de intensidad luminosa con lámparas fluorescentes de luz de día. Las placas inoculadas se incubaron envueltas en bolsas de plástico para evitar la desecación prematura del cultivo (Modificado de Stal y Krumbein, 1985).

Enriquecimiento de cianobacterias y bacterias fotosintéticas

En aquellas muestras en las cuales no es evidente la presencia de bacterias fotosintéticas, se procedió a su enriquecimiento empleando columnas de Winogradsky.

Muestras por duplicado de sedimento de los manantiales termales se colocaron en columnas de vidrio o acrílico transparente (25 cm x 4.0 cm) a una altura de 3/4 y se llena con agua natural de la localidad, se cerraron y sellaron para evitar el intercambio de gases con la atmósfera. Las columnas empacadas se incuban durante dos semanas a 25°C en la obscuridad para favorecer el desarrollo de bacterias sulfato reductoras que producen los donadores de electrones que usan las bacterias fotosintéticas (compuestos reducidos del azufre v. gr. H_2S). Después de este tiempo se incuban a 50°C y $25 \mu Em^{-2} s^{-1}$ de intensidad luminosa con lámparas fluorescentes de luz de día, para intentar el desarrollo de bacterias fotosintéticas termófilas del tipo *Chloroflexus* (Krieg, 1981; Castenholtz, 1972) y cianobacterias termófilas.

Las muestras de tapetes microbianos laminados poseen crecimientos notables de bacterias fototróficas anoxigénicas, observándose como capas púrpuras rosadas por debajo de las capas verde de cianobacterias. De dichas capas púrpuras se toman submuestras por triplicado de 0.1 g que se usan para inocular botellas que contienen medio Pfennig, cuya formulación se presenta en el apéndice anexo. Las botellas inoculadas se incuban a 25°C y $25 \mu Em^{-2} s^{-1}$ de intensidad luminosa con lámparas incandescentes (Truper, 1970).

Submuestras por triplicado de 0.1 g de capas púrpuras de tapetes microbianos y de comunidades microbianas de los manantiales termales se usaron como inóculo para plaquear medio para miembros de la Familia Rhodospirillaceae. Las placas inoculadas se incubaron en una atmósfera de $H_2 + CO_2$ con la ayuda de una jarra de anaerobiosis BBL e incubadas a 25°C y $25 \mu Em^{-2} s^{-1}$ con una lámpara de luz incandescente (Truper y col. 1983).

Preparación de muestras para microscopía electrónica.

Submuestras por duplicado de comunidades microbianas y capas naranja, verde y púrpura de los tapetes microbianos laminados se fijaron en glutaraldehído al 2.5 % a partir de una solución concentrada al 50%, diluida en 20 ml de solución 0.2 M de citrato de sodio y 27.5 ml de agua natural de la localidad previamente filtrada. Núcleos por duplicado de 1 mm² o 0.1 g se colocaron en tubos estériles con tapón de rosca, a los que se les adicionó 2 ml del fijador al 2.5% para almacenarse a -4°C en la obscuridad (Stolz, 1983).

Actividad de la nitrogenasa por el ensayo de reducción del acetileno.

La actividad de nitrogenasa fue medida por medio del ensayo de reducción de acetileno en etileno (Postgate, 1972). Cultivos de 50 a 100 ml de cianobacterias en fase exponencial se cosechan por centrifugación a 10,000 g durante 10 min a 20°C. Los botones se lavan con medio ASNIII° sin fuente de nitrógeno. Se recuperan nuevamente las células por el mismo procedimiento de centrifugación y se resuspenden en 20 ml de ASNIII°. Cada frasco de suero de 60 ml de capacidad contenía 20 ml de ASNIII° y se les adicionó 3 ml de la suspensión celular. Los frascos fueron incubados a 25°C con 50 uEm-2s de iluminación durante 12 horas/12 horas oscuridad y 150 rpm. Los tratamientos fueron: 1) ASNIII° con cianobacterias sin acetileno, 2) ASNIII° con cianobacteria con acetileno al 10%, 3) ASNIII° sin cianobacteria con acetileno al 10%, 4) ASNIII° sin cianobacteria con etileno (1.5%), 5) ASNII° sin cianobacterias, sin acetileno, sin etileno. Cada uno de los tratamientos se realizó por triplicado. La detección de etileno se llevó a cabo con un cromatógrafo de gases VARIAN 6000 que posee un detector de ionización de flama de hidrógeno y un sistema de proceso de datos. Se usó una columna de acero de 3 m de longitud, empacada con Poropak N intervalo de abertura 80/100 mesh. El nitrógeno molecular fue usado como gas acarreador a una tasa de flujo de 25 ml/min. La tasa de flujo del hidrógeno y del aire en el detector fue de 25 ml/min y 300 ml/min respectivamente. El cromatógrafo de gases fue calibrado con el gas estándar de etileno de 97.7 ppm (Scott Specialty Gases, E.U.A.). Para llevar a cabo los análisis se empleó 1.0 ml de muestra proveniente de los frascos y del gas etileno y 0.5 ml de gas acetileno.

Preservación de cianobacterias en nitrógeno líquido

Cultivos de 50 a 100 ml de cianobacterias en ASNIII de la fase estacionaria, con alta densidad celular fueron seleccionados para su preservación. A los cultivos líquidos concentrados se les adicionó dimetilsulfoxido al 5% (vol/vol) y las alícuotas fueron colocadas en ampullas de plástico de 5 ml, que fueron almacenadas inmediatamente en nitrógeno líquido (-196°C) sin un precongelamiento inicial a -25°C (Rippka, et al., 1981).

Ensayo en ratón de la toxicidad causada por cianobacterias

Cultivos de 400 ml de cianobacterias en ASNIII de la fase estacionaria tardía son centrifugados. Los botones celulares son lavados. Extractos crudos de células son inoculados en ratones. Se evaluó la conducta y sobrevivencia de los ratones a las 24, 48 y 72 horas y después de la muerte se analizan lesiones en hígado.

RESULTADOS

Determinación de los parametros fisicoquimicos y tipos arquitectónicos de comunidades microbianas

La caracterización fisicoquímica de las localidades se resumen en la Tabla 1. Las determinaciones se realizaron entre las 9:00 a.m. a las 14:00 p.m.

Los valores altos de temperatura de Ensenada Los Mapachitos, Mangle Santispac y Posada Concepción se asocian con una disminución en los valores de salinidad que junto con las observaciones de campo sugieren que se trata de manantiales termales que emanan calor, vapor de agua y presumiblemente otros gases reducidos.

Durante la visita de Octubre de 1995, en el charco # 1 del Mangle de Santispac se observó un manantial termal (3.5 mts. de diámetro) con dos aberturas de 15 cm y temperatura de hasta 51°C en Octubre de 1995. De estas aberturas destacaban unas estructuras frágiles construidas por cianobacterias y bacterias fotosintéticas de aproximadamente 50 cm de alto con aspecto de columnas ramificadas de color verde y en otras partes del fondo de la charca columnas de 5 a 10 cm de altura. Estas estructuras fueron destruidas en el invierno de 1995-1996 por la actividad de turistas extranjeros que visitan el sitio. El charco #2 de 4.0 mts. de diámetro del Mangle Santispac no mostró aberturas, ni columnas microbianas, pero si comunidades microbianas flotantes de color verde oscuro y por debajo rojo-púrpura que aquí nombramos "natas" y tapetes en el fondo del charco con ramificaciones que formaban tramas. En comparación al charco # 1 la temperatura fue ligeramente menor y varió en función a la estación del año pero siempre con valores mayores a 28°C.

En Febrero de 1996 se observó en el charco #2 la desaparición de las natas microbianas y tapetes ramificados de los manantiales de Santispac, además de encontrar una caída en los valores de temperatura.

Para Junio del mismo año se observó la regeneración de la comunidad microbiana sin alcanzar el grado de desarrollo que se observó en Octubre de 1995.

En Junio de 1996 llamó nuestra atención la existencia de unas estructuras redondas de color negro (oncolitos u oncoides) con dimensiones que van de 0.5 a 4 cm presentes en el Charco 2 de los manantiales de Santispac a las que se les observó microcolonias de organismos fotosintéticos.

La localidad de Los Pinos corresponde a una planicie evaporítica costera en donde se localizó un charco (8 mts. de largo) que posee tapetes microbianos laminados. Secciones de estos tapetes mostrarán 15 cm de laminación. Estas estructuras están compuestas por capas de microorganismos y minerales evaporíticos que presumiblemente son formados por actividad microbiana. La parte viva de la estructura se localiza en los primeros 10 mm de la superficie.

Tabla 1. Parámetros fisicoquímicos de las localidades del transeco marino, manantiales termales y planicie evaporítica costera de Bahía Concepción.

Localidad	T°C	Salinidad (0/00)	pH
Isla San Ramón	19.9	35.4	7.6
Punta cola de Ballena	19.9	35.5	6.4
Isla Blanca	19.8	35.5	7.2
Ensenada Los Mapachitos	26.0	13.7	6.6
El Coloradito	20.1	35.6	7.5
Trampa de sedimentación	21.5	35.3	6.6
Mangle Santispac 1	41.0 44.1 49.0**	28.1 24.4* n.d.	6.7 6.7* 6.8**
Mangle Santispac 2	28.0 44.2* 45.0**	28.0 28.9* n.d.	7.1 6.9* 7.1**
Posada Concepción	40.0* 46.0**	n.d. 26.0**	n.d. n.d.
Los Pinos	21.0 23.0* 37.0**	23.5 25.0* n.d.	7.2 7.1* 6.9**

Los valores sin asterisco son de Febrero de 1996; (*)=Junio de 1996 y (**) = Octubre de-1995. ,

Los parámetros fisicoquímicos del resto de las localidades corresponden a las de un ambientes marinos convencional. Por el momento no se han reconocido comunidades microbianas que forman estructuras macroscópicas de las localidades del transecto marino. Sin embargo, las estructuras calcareas pigmentadas de color rojo asociadas a la arena pudiesen ser formadas por poblaciones de *Phormidium rubrum* y *Calothrix* sp.

Identificación d e morfotipos de cianobacterias y bacterias fototrófas de muestras naturales

La identificación morfológica de células procariontes fotótrofas de submuestras naturales y cultivos de los primoaislamientos se presentan en la Tabla 2.

Tabla '2. Diversidad de géneros y especies de procariontes fototrófos de comunidades de Bahía Concepción. ,

Localidad	Géneros y especies
Santispac (charco # 1)	<i>Leptolyngbya thermalis</i> , <i>Limnothrix amphigranulata</i> , <i>Synechococcus</i> , <i>cedrorum</i> , <i>Chloroflexus</i> ,* <i>Thiocystis</i> ,* <i>Rhodospirillum</i> *
Santispac(charco # 2)	<i>Leptolyngbya thermalis</i> , <i>Limnothrix amphigranulata</i> , <i>Synechococcus cedrorwn</i> , <i>S. elongatus</i> , <i>Chloroflexus</i> ,* <i>Thiocystis</i> ,* <i>Rhodospirillum</i> *
Posada Concepción (charco # 2)	<i>Leptolyngbya thermalis</i> , <i>Limnothrix amphigranulata</i> <i>Phormidium okeni</i> , <i>Synechococcus</i>
Punta Cola de Ballena	<i>Phormidium rubrum</i> , <i>Calothrix</i> , <i>Dermocarpa</i> , <i>Spirulina</i> ,
Los Pinos	<i>Microcoleus chthonoplastes</i> , <i>Spirulina</i> , <i>Oscillatoria</i> <i>limnetica</i> , <i>Synechocystis</i> <i>aquatilis</i> , <i>Limnotrix</i> <i>amphigranulata</i> , <i>Chromatium</i> ,* <i>Chlorobium</i> ,*

* Bacterias fotótrofas anoxigénicas

Perfil de pigmentos, fotosintéticos

La identificación cualitativa de pigmentos fotosintéticos de cada una de las localidades se resume en la Tabla 3.

Tabla 3. Perfil de pigmentos de muestras naturales.

Localidad	Pigmentos	Absorbancia hexano	máxima metanol
Isla San Ramón	clorofila a feofitina a bclorofila a	660nm	658nm 776nm
Punta Cola de Ballena	clorofila a bclorofila a	660nm	770nm
Isla Blanca	bclorofila a bclorofila c	666nm	770nm
Ensenada Los Mapachitos	clorofila a	660nm	
El Coloradito	clorofila a bclorofila a	660nm	770nm
Trampa de sedimentación	clorofila a bclorofila a	660 nm	770nm
Mangle Santispac 1	clorofila a feofitina a bclorofila a	660 nm	657nm 770nm
Mangle Santispac 2	clorofila a bclorofila a	660nm	770nm
Posada Concepción	clorofila a feofitina a bclorofila a bfeofitina e	660nm 658nm	657nm 770nm
Los Pinos	clorofila a bclorofila a bclorofila d bclorofila e	660nm	770nm 652nm 659nm

Prácticamente todas las localidades presentaron clorofila a (Chl a) en los extractos con hexano, excepto el caso de Isla Blanca que sólo mostró bacterioclorofila, a, característica de las bacterias fototrofasanoxigénicas.

Por otra parte, todas localidades mostraron la presencia de bacterioclorofila a (Bchl_a) y/o sus productos de degradación bacteriofeofitinas (Bfeo), con una diversidad de bacterioclorofilas significativa en las localidades de Isla Blanca, Santispac, Posada Concepción y la capa roja-púrpura de los tapetes laminados de la localidad Los Pinos.

Descripción de las especies de cianobacterias registradas.

Para la identificación a nivel de especie se empleó los criterios ecológicos, morfológicos y ciclos de vida usados por los botánicos (Geitler, 1925), pero también algunos de los empleados por los microbiólogos como son fijación de nitrógeno, anaerobiosis, tolerancia a la salinidad, pH (Rippka et al., 1979; Caetenholz y Waterbury 1989; Anagnostidis y Komárek 1988).

Mangle Santispac, charco, año, mes, número, género y especie:

1. SP2A9510-1 *Leptolyngbya thermalis*. Anagnostidis & Komárek 1988. Syn. *Oscillatoria limnetica*. Lemmermann, E 1907. Fisión binaria en un plano que resulta en filamentos rectos o ligeramente sinuosos, solitarios, 1.0 µm de ancho, con vainas tenues, sin color, hialinas, movilidad poco evidente, células terminales sin reducción del diámetro. Células cilíndricas más largas que anchas, raramente isodiamétricas, 1-5 µm de largo, células apicales redondeadas; talo azul-verde pálido. Fijación aeróbica de nitrógeno positiva, intervalo de temperatura de crecimiento 25°C a 55°C. Aislada de manantiales termales.
2. SP2A9510-2 *Limnothrix amphigranulata*. Meffert 1987. Syn. *Oscillatoria amphigranulata* van Goor 1918 (*Pseudanabaena bentónica*). Tricomas rectos, móviles, constricciones ausentes, solitarios de 2.0 a 2.5 µm de ancho. Células cilíndricas más largas que anchas de 2.5 a 5 µm de largo, células terminales sin reducción del diámetro y sin testera, con dos pseudovacúolas en los septos transversales. Fijación aeróbica de nitrógeno positiva, intervalo de temperatura de crecimiento 25°C a 55°C. Aislada de manantiales termales. Asociada a bacterias púrpuras fotosintéticas en sedimentos fangosos.
3. SP2B9510-3 *Synechococcus cedrorum*. Sauvageau, C. 1892. Unicelulares, reproducción por fisión binaria en un plano, células elipsoidales, rara vez casi cilíndricas, 3-4 µm de ancho, hasta 5.0 µm de largo. Células solitarias, o en pares una tras otra, azul-verde pálido. fijación aeróbica de nitrógeno positiva, intervalo de temperatura de crecimiento 25°C a 55°C. Producción presuntiva de neurotoxinas y hepatotoxina. Aislada de manantiales termales. Desarrollo sobre cortezas de árboles y en aguas estancadas entre otras algas.

4.SP2A9606-8 *Synechococcus elongatus*. Nageli, C. 1849. Unicelulares, reproducción por fisión binaria en un plano, células cilíndricas, 1.4 a 2.0 μm de ancho, hasta 5.0 μm de largo, células solitarias o en cadenas cortas de 2 a 4 una tras otra azul-verde pálidas. Temperatura de crecimiento 25°C. Aislada de oncolitos de manantiales termales, también se desarrollan sobre tierra húmeda.

Los Pinos, color de capa, año, mes, número, género y especie:

5. LPV9510-4 *Oscillatoria limnetica*. Lemmermann, E. '1907. Syn. *Lyngbya limnetica*. Anagnostidis, K. 1961. Filamentos rectos o ligeramente sinuosos, sin ramificaciones, solitarios, 1.0 μm de ancho con vaina tenue, sin color, hialina, células terminales sin reducción del diámetro. Células cilíndricas más largas que anchas, raramente isodiamétricas, 1-5 μm de largo, células apicales redondeadas; talo azul-verde pálido. Aislada de ambientes ricos en compuestos reducidos del azufre, tapetes microbianos laminados.

6.LPV9602-5 *Synechocystis aquatilis*. Sauvageau, C. 1892. Unicelulares, reproducción por fisión binaria en uno plano, células de 2.0 a 3.5 μm de ancho, azul-verdes claro. Aislada de pantano salino, tapetes microbianos laminados.

Punta Cola de Ballena, año, mes, número, género y especie:

7. PCB9602-6 *Phormidium rubrum*. Tilden, J. 1910. Talo pequeño, escarlata,. Filamentos generalmente rectos. Vaina apenas visible. Tricoma sin reducción de las dimensiones en la células terminales. Células casi cuadradas o un poco largas de 1.0 μm de ancho. Aislada de aguas termales.

Posada Concepcion, charco, año, mes, género y especie:

8.PCP2B9510-9 *Phormidium okeni*. Anagnostidis & Komarek 1988. Cyn. *Oscillatoria okeni*. Gomont, M. 1892. Talo azul-verde oscuro. Tricomas rectos, muy móviles, con septos transversales visibles, de 5.5 a 7 μm de ancho. Células 1/3 veces tan largas como anchas 2.7 a 4.5 μm de largas. Generalmente células apicales con diámetro reducido, curvas y redondeadas, sin testera ni caliptra. Fijación aeróbica de nitrógeno positiva, intervalo de temperatura de crecimiento 25°C a 55°C. Producción presuntiva de neurotoxinas y hepatotoxina. Aislada de manantiales termales.

DISCUSION

Los métodos de muestreo empleados son ampliamente usados en el campo de la microbiología y son rigurosos y formales, ya que consideran el uso de material estéril y las características fisiológicas de las cianobacterias marinas (Rippka, 1988; Truper, 1970; López-Cortés, 1990).

Se realizaron tres muestreos uno en el Otoño de 1995 (antes de recibir el apoyo de CONABIO), otro en Invierno, Febrero de 1996 y un último en Verano Junio de 1996, con el fin de contar con el material necesario para los ensayos que se reportan en la metodología. Las dimensiones de las muestras son pequeñas variando de 1 a 5 cm x 1 a 3 cm de profundidad con el fin de no alterar las comunidades microbianas encontradas.

Los rendimientos de muestreo y colecta se presentan a continuación, siendo variable en función a la disponibilidad de los organismos y localización de nuevos sitios.

ESTACION	AREA	MUESTRAS
OTOÑO 1995	75 km	39
INVIERNO 1996	50 km	42
VERANO 1996	80 km	50

En este tipo de estudio se considero de utilidad cuantificar el rendimiento de cepas aisladas,, preséntandose de la siguiente manera:

ESTACION	PARTICIPANTES	No. DE AISLAMIENTOS
OTOÑO 1995	2 7	
INVIERNO 1996	2	4
VERANO 1996	3	7

El rendimiento de la identificación a nivel de especies se realizó durante el último periodo debido a la falta de literatura, que fue obtenida hasta Diciembre de 1996 (Geitler, 1925). Ademasse presenta el rendimiento de la identificación a nivel de genero* (Castenholz y Waterbury, 1989).

ESTACION	PARTICIPANTES	No. DE CEPAS IDENTIFICADAS
OTOÑO 1995	1	11*
INVIERNO 1996	1	5*
INVIERNO 1997	1	8

Con el apoyo recibido por CONABIO, se fortaleció en el CIBNOR la capacidad de aislamiento, purificación, preservación e identificación de especies de cianobacterias marinas.

La colección de cianobacterias marinas de ambientes naturales mexicanos que se logró en esta investigación quizá es única en toda la República Mexicana, hasta donde me fue posible investigar, a través de entrevistas (Dr. Gustavo Montejano, Facultad de ciencias, UNAM; Biol.Ma. Guadalupe Oliva, ENEP Iztacala, UNAM; Dr. Jorge Romero, Instituto de Ciencias del Mar y Limnología UNAM y Dr. Jesús Paniagua, CICESE), e internet vía "homepage", de mis líneas de investigación.

Las cepas identificadas a nivel de especie se encuentran preservadas a largo plazo (20 años) en nitrógeno líquido por quintuplicado, y forman parte de la Colección de Microalgas del CIBNOR. Cada una de ellas con un registro escrito en forma de tarjeta.

Debido a que el Recurso Microbiano de Cianobacterias en las costas de Baja California es muy amplio y el tiempo y el personal involucrado fue mínimo, pongo a su consideración la posibilidad de poder aspirar a obtener un nuevo fondo para complementar la colección ya iniciada, pero atendiendo nuevas áreas ricas en este recurso como son: Exportadora de Sal en Guerrero Negro, Bahía Magdalena y la salina comercial de Pichilingue en Baja California Sur, México.

Actualmente, cuento con recursos fiscales para continuar con dichos estudios, no obstante, sería de gran beneficio tener nuevos fondos que fortalezcan esta línea de investigación que está poco desarrollada en México y que considero de importancia para el manejo sustentable de nuestros recursos bióticos. El conocimiento y comprensión del papel de las cianobacterias en nuestros ambientes nos permitiría incidir en el control de toxinas producidas por cianobacterias, la producción de B-carotenos y ficobiliproteínas para la industria, además de atender problemas ambientales como son el tratamiento de efluentes acuícolas contaminados con nutrientes y/o metales pesados.

AGRADECIMIENTOS

Este trabajo fue apoyado por la Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad (G035) y por el CIBNOR EDA-4, de SEP-CONACYT. El autor agradece a Iris Durán Rodríguez y a Juan Carlos Mejía por su asistencia en la elaboración de la base de datos. También, agradezco la asistencia técnica de Luis G. Bermúdez

REFERENCIAS

1. Anagnostidis, K. y Komárek, J. 1988. Modern approach to the classification system of cyanophytes. 3. Oscillatoriales. Arch. Hydrobiol. Suppl. 80:327-472.
2. Bielb, H. y Pfennig, N. 1981. Isolation of members of the Family Rhodospirillaceae. In: M.P. Starr et al., The Prokaryotes. Volumen I. Springer-Verlag. New York. pp. 267-273.
3. Castenholz, R.W. 1972. Hot spring microbial communities recreated in modified "Winogradski Columns". Limnol Oceanogr. 17 :767-772.
4. Castenholz, R.W. y Waterbury, J.B. 1989. Taxa of cyanobacteria. In: J. T. Staley, M.P. Bryant, N. Pfennig, y J.G. Holt, (eds.). Bergey's Manual of Systematic Bacteriology Vol. 3 Williams & Wilkins. Baltimore. pp. 1727-1728.
5. Geitler, L. 1925. Cyanophyceae. Pascher's Susswasserflora 12: 1-450. G. Fischer-Verlag. Jena.
6. Krieg, N. R. 1981. Enrichment and isolation. In P. Gerhardt y col. Manual of methods for general bacteriology. American Society for Microbiology. Washington, D.C. pp 118-119.
7. López-Cortés, A. 1990. Microbial mats in tidal channels at San Carlos, Baja California Sur, México. Geomicrobiol. J. 8: 69-85.
8. Postgate, J.R. 1972. The acetylene reduction test for nitrogen fixation. In P.R. Norris y N.E. Gibbons (eds.). Methods in Microbiology Vol. 6B, Academic Press, New York.
9. Rippka, R. 1988. Isolation and purification of cyanobacteria. Methods in Enzymology 167:3-30
10. Rippka, R., Deruelles, J., Waterbury, J.B. Herdman, M. y Stanier, R. Y. 1979. Generic assignments, strain histories and properties of pure cultures of cyanobacteria. J. Gen. Microbiol. 111: 1-61,
11. Rippka, R., Waterbury, J.B. y Stanier, R. Y. 1981. Isolation and purification of cyanobacteria: Some general principles. In: M.P. Starr et al., (eds.). The Prokaryotes. Volumen I. Springer Verlag. New York. pp. 212-223.
12. Stal, L.J., van Gernerden, H. y Krumbein, W.E. 1984. The simultaneous assay of chlorophyll and bacteriochlorophyll in natural microbial communities. J. Microbiol. Meth. 2: 295-306.

13. Stal, L.J. y Krumbein, W.E. 1985. Isolation and characterization of cyanobacteria from marine microbial mat. Bot. Mar. 28:351-365.
14. Truper, H.G. 1970. Culture and isolation of phototrophic sulfur bacteria from the marine environment. Helgolander wiss. Meeresunters 20:6-16.
15. Truper, H., Boon, J., Chanton, J., Lopez-Cortés, A., Grqven, S., Kneller, K. and Read, D. 1983. Anoxigenic Phototrophic Bacteria. In: L. Margulis, K. Nealson and I. Taylor (eds.). Planetary Biology and Microbial Ecology. Biogeochemistry of Carbon and Early Life. NASA Technical Memorandum 86043. Washington, D. C. 33-80 pp.
16. Staley, J.T., Bryant, M.P., Pfennig, N. and Holt, J.G., 1989. Bergey's Manual of Systematic Bacteriology Vol. 3 Williams & Wilkins. Baltimore. pp. 1635-1806.

APENDICE I I

MEDIO PARA CIANOBACTERIAS AGUA DE MAR ASN III

Rippka, R. y col. (1979)

Solución I (2.5) X

Reactivo	gramos
NaCl	125.00
MgCl ₂ .6H ₂ O	10.00
KCl	2.50
NaNO ₃	3.75
K ₂ HPO ₄ .3H ₂ O	0.10
MgSO ₄ .7H ₂ O	17.50
CaCl ₂ .2H ₂ O	2.50
Acido cítrico. H ₂ O	0.016
Citrato ferrico de amonio	0.015
EDTA (sal disodica)	0.0025
Na ₂ CO ₃	0.10
Agua deionizada	2000 ml
PH	7.5

Esterilizar por filtración y almacenar a 4°C

Solución I I Metales traza A5+Co

Reactivo	g/l
H ₃ BO ₃	2.86
MnCl ₂ .2H ₂ O	1.81
ZnSO ₄ .7H ₂ O	0.222
NaMoO ₄ .2H ₂ O	0.390
CuSO ₄ .5H ₂ O	0.079
CO(NO ₃) ₂ .6H ₂ O *	0.0494

*CoCl₂.6H₂O

Esterilizar por filtración y almacenar a 4° C

Solución III Vitamina B12 concentración final 10 g/l

Reactivo	mg/l
Cianocobalamina	20

Esterilizar por filtracion y almacenar a 4°C

Solución IV Cicloheximida 50 g/ml

Preaparar 50 mg/ml (0.05 g/ml) y añadir a 1000 ml de medio de cultivo volumen final.

Estérilizar por filtración.

Solución V Tiosulfato de sodiopentahidratado (F.W. 248.2) 1.0 M.
añadir 1 ml (0.248 g/ml) para un litro resultando una [final] de 1.0 mM

Para elaborar un litro (1000 ml) de medio de cultivo se mezclan en condiciones esteriles:

Sol. I (2.5x)	400.0 ml
Sol. II	1.0 ml
Sol. III	0.5 ml
Sol. IV	1.0 ml
Sol. V	1.0 ml
Agua destilada esteril	596.5 ml
Volumen final	1000 ml

Para elaborar medio sólido se agrega 10 g en los 596.5 ml de agua destilada y esterilizar por autoclave [final] 1.0 %

Nota: Colocar en un Baño Maria la mezcla de las soluciones I+II+III+IV a 55°C, en condiciones estériles o en un recipiente bien cerrado.

MEDIO DE PFENNIG PARA BACTERIAS FOTOTROFICAS ANOXIGENICAS

Truper, H. G. (1970)

Receta para 1.5 litros de medio.

En este caso se usaron botellas de tapón de rosca de 30 ml (1 oz).

El medio fue preparado por 4 soluciones diferentes.

Solución I

Agua destilada	1250.0 ml
CaCl ₂ ·2H ₂ O	0.65 g
NaCl	52.50 g

Vaciar 250 ml en un matraz pyrex (500 ml capacidad) y 1000 ml en botellas de 30 ml de capacidad depositar 20 ml c/u.

Se esterilizan por autoclave.

Nota: NO APRETAR LAS TAPAS DE ROSCA FUERTEMENTE.

Solución II (50 ml volumen total).

Agua, destilada	33.5 ml
Solución de elementos	
traza (Pfenning & Lippert, 1966)	15.0 ml
Vitamina B12 (20 mg/11 t.	1.5 ml
KH ₂ PO ₄	0.5 g
NH ₄ CL	0.5 g
MgCL ₂ . 6 H ₂ O	0.5 g
KCl	0.5 g

Solución III

Agua destilada	450.0 ml
NaHCO ₃	2.25 g

La solución III es enriquecida con CO₂ burbujeando hasta bajar el pH a 6.2.

Entonces las soluciones II y III se mezclan inmediatamente y se esterilizan por filtración. Lavar el filtro con 200 ml de agua destilada antes de esterilizar por filtración las soluciones II y III.

Distribuir en condiciones estériles 8 ml de la mezcla II y III estéril en las botellas de 30 ml que contienen 20 ml de solución I.

solución, IV

Agua destilada	100.0 ml
NaS .9H ₂ O	1.5 g

Utilizar reactivo "fresco". Tomar un Cristal grande, ponerlo en una caja petri y lavarlo con agua destilada hervida hasta que quede bien transparente. Secarlo con papel filtro y pesarlo (debe mantenerse el menor tiempo posible en contacto con el aire.

Para preparar esta solución se emplea agua destilada recién autoclaveada, para eliminar el oxígeno.

Dejar enfriar ligeramente el agua destilada estéril y añadir la sal de NaS .9H₂O, emplear botellas pyrex con tapón de rosca y juntas de teflon.

Esterilizar con autoclave y enfriar, dejando en su interior el agitador magnético de teflón para posteriormente facilitar el ajuste del pH.

Bajo condiciones de esterilidad adicionar gota a gota y con mucho cuidado dejando escurrir por las paredes del matraz solución estéril V (autoclave) 2 M de H_2SO_4 .

De esta forma se ajustará el pH

pH 6.8 Chlorobiaceae 1.7 ml

pH 7.2 Thiorodeaceae 1.6 ml

Mezclar IV y V y distribuir a frascos que ya contienen 1 (20 ml), I I + I I I (8 ml) IV + V (1.5 ml).

Complementar el volumen de cada una de las botellas con solución I dejando solo una burbuja de aire para hacer posible los cambios de presión.

MEDIO PARA MIEMBROS DE LA FAMILIA RHODOSPIRILLACEAE.

Biebl, H. y Pfennig, N. (1981).

Solución I

KH ₂ PO ₄	0.50	g
NH ₄ Cl	0.40	g
MgCl ₂ ·6H ₂ O	0.20	g
NaCl	20.00	g
CaCl ₂ ·2H ₂ O	0.05	g
Agua destilada	400.00	ml

Se esterilizó por autoclave.

Solución II

Acetato de sodio 3H ₂ O	1.65	g
Extracto de levadura	0.20	g
Agar	15.00	g.
Agua destilada	593.50	ml

Solución III

Citrato Ferrico (0.1 g/100 ml)

Solución IV

Solución de elementos traza SL7

Solución V

Cianocobalamina(Vitamina B₁₂ 20 mg/ lt)

Las soluciones III, IV y V se esterilizan por filtración con membranas de 0.2 µm.

Para formular 1 litro de medio se mezcla de la siguiente manera:

Solución I	400.0	ml
Solución II	593.5	ml
Solución III	5.0	ml
solución IV	1.0	ml
Solución V	0.5	ml