



Centro de Investigación Científica de Yucatán, A.C.
Maestría en Ciencias del Agua

“Diversidad genética y filogenia de las tres principales Divisiones de microalgas dulceacuícolas en dos cenotes de Quintana Roo, México”

Tesis que presenta:

Fayco Sayd Amateco Rivero

En opción al título de:

Maestro en Ciencias

Asesor:

Dra. Cecilia Hernández Zepeda

Cancún, Quintana Roo. Febrero, 2015.



RECONOCIMIENTO

Por medio de la presente, hago constar que el trabajo de tesis titulado “**Diversidad genética y filogenia de las tres principales Divisiones de microalgas dulceacuícolas en dos cenotes de Quintana Roo, México**” fue realizado en los laboratorios de la Unidad de Ciencias del Agua del Centro de Investigación Científica de Yucatán, A. C. bajo la dirección de la Dra. Cecilia Hernández Zepeda, perteneciente a la Maestría en Ciencias del Agua de este Centro.

Atentamente,

Dr. Manuel Martínez Estévez

Director de Docencia

Centro de Investigación Científica de Yucatán, A. C.

Cancún, Quintana Roo, México; Febrero del 2015

DECLARACIÓN DE PROPIEDAD

Declaro que la información contenida en la sección de Materiales y Métodos Experimentales, los Resultados y Discusión de este documento provienen de las actividades de experimentación realizadas durante el período que se me asignó para desarrollar mi trabajo de tesis, en las Unidades y Laboratorios del Centro de Investigación Científica de Yucatán, A. C., y que a razón de lo anterior y en contraprestación de los servicios educativos o de apoyo que me fueron brindados, dicha información, en términos de la Ley Federal del Derecho de Autor y la Ley de la Propiedad Industrial, le pertenece patrimonialmente a dicho Centro de Investigación. Por otra parte, en virtud de lo ya manifestado, reconozco que de igual manera los productos intelectuales o desarrollos tecnológicos que deriven o pudieran derivar de lo correspondiente a dicha información, le pertenecen patrimonialmente al Centro de Investigación Científica de Yucatán, A. C., y en el mismo tenor, reconozco que si derivaren de este trabajo productos intelectuales o desarrollos tecnológicos, en lo especial, estos se regirán en todo caso por lo dispuesto por la Ley Federal del Derecho de Autor y la Ley de la Propiedad Industrial, en el tenor de lo expuesto en la presente Declaración.

Firma: _____

Nombre: Fayco Sayd Amateco Rivero

*Con amor y aprecio a mis padres quienes con su
apoyo y confianza me han impulsado a ser la
persona quien soy hoy en día*

AGRADECIMIENTOS

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología por haberme otorgado las facilidades para realizar éste importante paso en mi vida profesional, académica y personal. De igual manera le agradezco al Centro de Investigación Científica de Yucatán, A. C. por brindarme las herramientas necesarias para cumplir mis estudios de posgrado, con lo que mi formación académica se pudo concluir.

Muy especialmente quiero agradecer a la Dra. Cecilia Hernández Zepeda por la dirección, dedicación, conocimiento y esfuerzo que le brindó a mi tesis y a mi persona, de igual manera le agradezco que me haya hecho una persona más fuerte, crítica y sabia. Con cariño le agradezco a la M. en C. Gabriela Rosiles González, por la guía, dedicación, sacrificio y esfuerzo, ya que además de ser mi mentora en el laboratorio se volvió mi confidente y mi amiga. A las dos les debo mucho y se los agradezco sincera y profundamente.

A los Drs. Rosa María Leal Bautista, Patricia Thomé Ortiz, Jesús Alvarado Flores y principalmente al Dr. Oscar Alberto Moreno Valenzuela, quien confió en mi propuesta y en mi persona desde el principio. A todos ustedes, quienes con sus grandes consejos y pequeños detalles hicieron de éste trabajo algo de lo que me puedo sentir orgulloso, les agradezco.

Con mucho cariño quiero agradecer a mis padres, María Rivero García y Esteban Amateco Dionicio, quienes me han dado los valores, la educación y los medios para realizar mi sueño, este gran paso en mi vida no lo habría podido dar sin su incondicional apoyo. No puedo dejar de mencionar a mi hermano Octavio Alain Amateco Rivero, quien a pesar de la distancia sé que me apoya y siempre está conmigo.

A mis amigos, la I. A. Paulina Aguilar Martínez y el Biól. Abraham Agustín Vargas Hernández con quienes empecé este recorrido, y que a lo largo de él disfrutamos, sufrimos, reímos y lloramos juntos, me llevo valiosos recuerdos de ustedes pero sobre todo le agradezco a la vida el habernos puesto en el mismo camino.

A los Biólogos Alfrancis Teresa Arredondo Chávez, Paloma Zaría López Peña y Juan Antonio Sánchez Jimenez por el apoyo, la energía, las ganas de trabajar y superarse así mismos, ustedes siempre me han demostrado eso y sé que lo mantendrán hasta el final.

No puedo omitir a mis amigos de toda la vida, el Psic. Carlos Ignacio Romero González y el L.D.G. Felipe Santos Morales Montiel, quienes me han demostrado que la amistad no tiene barreras, ya que siempre me han hecho sentir bien y me han ayudado con varios consejos, ustedes también son importantes para mí.

Finalmente quiero agradecer a la Biól. Silvia Espinoza Espinosa por el apoyo, cariño, comprensión, sacrificio y consejos que me dió. Relamente le debo mucho y gran parte de lo que soy hoy en día es gracias a ella, sin su valiosa ayuda no lo hubiera conseguido.

A todos ustedes y a aquellos que de alguna u otra forma ayudaron a que este gran paso en mi vida se pudiera dar...

...muchas gracias

ÍNDICE

RESUMEN	1
ABSTRACT	3
CAPÍTULO I. ESTUDIO DE LAS MICROALGAS DULCEACUÍCOLAS	5
INTRODUCCIÓN	5
ANTECEDENTES	7
1. Introducción General	7
1.1 Las Principales Divisiones de Microalgas en Ambientes Epicontinentales y sus Características	7
2. Tipos de Hábitat de las Microalgas	8
2.1 Fitoplancton	8
2.2 Fitobentos	8
3. Métodos para la Caracterización de las Comunidades Microalgales	9
3.1 Cuantificación de la Biomasa.....	9
3.2 Citometría de Flujo	10
3.3 Análisis al Microscopio.....	10
3.4. Técnicas Moleculares para el Estudio de la Diversidad de Microalgas.....	11
4. Diversidad de Microalgas en México	17
4.1 Diversidad Morfológica de Microalgas en México.....	17
4.2 Diversidad Genética de Microalgas en México	18
5. Diversidad de Microalgas en la Península de Yucatán	19
5.1 Diversidad Morfológica de Microalgas en la Península de Yucatán	19
OBJETIVOS	20
1. Objetivo General	20
2. Objetivos Particulares	21
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	22
CAPÍTULO II. PARÁMETROS FÍSICO-QUÍMICOS Y NUTRIENTES DE DOS CENOTES DE QUINTANA ROO	31
INTRODUCCIÓN	31
OBJETIVOS	34
1. Objetivo General	34

2. Objetivos Particulares	35
MATERIALES Y MÉTODOS.....	35
1. Área de Estudio.....	35
2. Parámetros Físico-Químicos y Nutrientes.....	36
RESULTADOS.....	37
1. Parámetros Físico-Químicos y Nutrientes.....	37
1. Temperatura del Agua.....	38
2. Oxígeno Disuelto.....	38
3. Alcalinidad y pH.....	39
4. Conductividad.....	40
5. Sólidos Disueltos Totales (SDT).....	40
6. Nitratos	41
7. Nitritos.....	41
8. Ortofosfatos	42
CONCLUSIÓN	42
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	45
CAPÍTULO III. MICROALGAS PROCARIOTAS: CIANOBACTERIAS	49
INTRODUCCIÓN.....	49
1. Cianobacterias.....	49
MATERIALES Y MÉTODOS.....	53
1. Área de Estudio y Colecta de Muestras	53
2. Trabajo de Laboratorio.....	53
2.1 Extracción de ADN	53
2.2 Amplificación.....	55
2.3 Clonación de los Fragmentos del Gen 23S ADNr	56
2.4 Análisis Bioinformático	57
RESULTADOS.....	57
1. Diversidad Genética de las Cianobacterias de los Cenotes de Playa del Carmen y Leona Vicario	57
1.1 Extracción de ADN	57
1.2 Amplificación de los Fragmentos del Gen 23S ADNr.....	59

1.3 Clonación de los Fragmentos del Gen 23S ADNr	61
1.4 Identificación de OTU's	62
1.5 Porcentaje de Identidad por Pares.....	64
1.6 Análisis Filogenético.....	66
DISCUSIÓN.....	68
CONCLUSIÓN	69
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	71
CAPÍTULO IV. MICROALGAS EUCARIOTAS: BACILLARIOPHYTA Y CHLOROPHYTA	75
INTRODUCCIÓN.....	75
1. Bacillariophyta	75
2. Chlorophyta.....	76
MATERIALES Y MÉTODOS.....	80
1. Área de Estudio y Colecta de Muestras	80
2. Trabajo de Laboratorio	80
2.1 Extracción de ADN	80
2.2 Amplificación.....	80
2.3 Clonación de los Fragmentos de los Genes 18S ADNr.....	81
2.4 Análisis Bioinformático	82
RESULTADOS.....	82
1. Diversidad Genética de las Microalgas de los Cenotes de Playa del Carmen y Leona Vicario	82
1.1 Extracción de ADN	82
2. Amplificación de los Fragmentos del Gen 18S ADNr de Bacillariophyta y Chlorophyta	83
3. Clonación de los Fragmentos del Gen 18S ADNr.....	84
4. Identificación de OTU's.....	86
5. Porcentaje de Identidad por Pares.....	90
6. Análisis Filogenético.....	98
DISCUSIÓN.....	102
CONCLUSIÓN	106
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	107

CAPÍTULO V. DISCUSIÓN GENERAL Y CONCLUSIONES.....	113
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	119

LISTADO DE ABREVIATURAS

ADN.- Ácido desoxirribonucleico

ADNr.- Ácido desoxirribonucleico ribosomal

AFLP.- Amplified fragment length polymorphism (Polimorfismo de longitud de fragmentos amplificados)

ARN.- Ácido ribonucleico

Chl a.- Clorofila a

CTAB.- Cetyl trimethyl ammonium bromide (Bromuro de cetiltrimetilamonio)

EDTA.- Ethylenediaminetetraacetic acid (Ácido etilendiaminotetraácético)

HPLC.- High performance liquid chromatography (Cromatografía líquida de alto desempeño)

OTU.- Organizational taxonomic unit (Unidad organizacional taxonómica)

PCR.- Polymerase chain reaction (Reacción en cadena de la polimerasa)

RAPD.- Random amplified polymorphic DNA (Polimorfismo de ADN amplificado aleatoriamente)

RFLP.- Restriction fragment length polymorphism (Polimorfismo de longitud de fragmentos de restricción)

SDT.- Sólidos disueltos totales

ÍNDICE DE FIGURAS

- Figura 1.** Ubicación de los sitios de muestreo, Playa del Carmen (S1) y Leona Vicario (S4). (Elaborado por el Biól. Juan Antonio Sánchez Jiménez).....36
- Figura 2.** Extracción de ADN total de Playa del Carmen (1.- ADN extraído a partir de la Pastilla obtenida por centrifugación, 2.- ADN extraído a partir de las muestras filtradas). M: marcador de peso molecular BenchTop de Promega® (10 000 pb).....58
- Figura 3.** Extracción de ADN de la muestra tomada del cenote de Leona Vicario (LV). M: marcador de peso molecular BenchTop de Promega® (10 000 pb).....59
- Figura 4.** Amplificación por el juego de cebadores p23SrV de las muestras de Playa del Carmen para una muestra obtenida por centrifugación (1) y otra por filtración (2). M: marcador de peso molecular BenchTop de Promega® (10 000 pb). P: control positivo: Plásmido recombinante previamente secuenciado. N: control negativo. Los carriles 3 y 5 están vacíos.....60
- Figura 5.** Amplificación por el juego de cebadores p23SrV de las muestras de Leona Vicario obtenidas por kit de extracción DNeasy Plant Mini Kit de QIAGEN® (1, 2). M: marcador de peso molecular BenchTop de Promega® (10 000 pb). 4: control positivo: Plásmido recombinante previamente secuenciado. N: control negativo. Los carriles 3, 5 y 6 están vacíos.....60
- Figura 6.** Digestión de las clonas obtenidas por medio del juego de cebadores p23SrV con la enzima *EcoRI*. M: marcador de peso molecular BenchTop de Promega® (10 000 pb). 1-30 número de clona.....62
- Figura 7.** Matriz de la comunidad de Cianobacteria basada en la identidad por pares de las secuencias de Playa del Carmen.....65
- Figura 8.** Matriz de la comunidad de Cianobacteria basada en la identidad por pares de las secuencias de Leona Vicario.....66
- Figura 9.** Árbol filogenético basado en las secuencias obtenidas por el juego de cebadores p23SrV (Sherwood y Presting, 2007). Verde: Playa del Carmen; Azul: Leona

Vicario; **Negro:** Secuencias de referencia con su correspondiente número de accesoión.
Raíz: *Granulibacter bethesdensis* (NR_076433).....68

Figura 10. a. Amplificación por el juego de cebadores BACI de las muestras de Playa del Carmen obtenidas por centrifugación (1) y otra por filtración (2). Los carriles 3, 5 y 6 no se cargaron. **b.** Amplificación por el juego de cebadores BACI de las muestras de Leona Vicario obtenidas por el kit de extracción DNeasy Plant Mini Kit de QIAGEN® (1, 2). Los carriles 3 y 5 no se cargaron. **c.** Amplificación por el juego de cebadores CHLORO de las muestras de Playa del Carmen obtenidas por centrifugación (1) y por filtración (2). Los carriles 3, 5 y 6 no se cargaron. **d.** Amplificación por el juego de cebadores CHLORO de las muestras de Leona Vicario obtenidas por el kit de extracción DNeasy Plant Mini Kit de QIAGEN® (1, 2). Los carriles 3, 4, 6, 7 no se cargaron. M: marcador de peso molecular BenchTop de Promega ® (10 000 pb). P: control positivo, plásmido recombinante previamente secuenciado. N: Control negativo.....84

Figura 11. a. Digestión con la enzima *EcoRI* de las clonas obtenidas por medio del juego de cebadores BACI para el cenote de Playa del Carmen. **b.** Digestión con la enzima *EcoRI* de las clonas obtenidas por medio del juego de cebadores BACI para el cenote de Leona Vicario. **c.** Digestión con la enzima *EcoRI* de las clonas obtenidas por medio del juego de cebadores CHLORO para el cenote de Playa del Carmen. **d.** Digestión con la enzima *EcoRI* de las clonas obtenidas por medio del juego de cebadores CHLORO para el cenote de Leona Vicario. M: marcador de peso molecular BenchTop de Promega ® (10 000 pb). 1-30 número de clona.....85

Figura 12. Matriz de identidad por pares de la comunidad de Bacillariophyta de Playa del Carmen.....96

Figura 13. Matriz de identidad por pares de la comunidad de Bacillariophyta de Leona Vicario.....96

Figura 14. Matriz de identidad por pares de la comunidad de Chlorophyta de Playa del Carmen.....97

Figura 15. Matriz de identidad por pares de la comunidad de Leona Vicario.....97

Figura 16. Árbol filogenético basado en las secuencias obtenidas con los cebadores específicos para la División Bacillariophyta. Verde: Playa del Carmen; Azul: Leona Vicario; **Negro:** Secuencias de referencia con su correspondiente número de accesoión del GenBank. La secuencia de la Chlorophyta *Scenedesmus pectinatus* (FR568730) se utilizó como grupo externo para enraizar el árbol.....100

Figura 17. Árbol filogenético basado en las secuencias obtenidas con lo cebadores específicos para la División Chlorophyta. Verde: Playa del Carmen; Azul: Leona Vicario; **Negro:** Secuencias de referencia con su correspondiente número de accesoión del GenBank. La secuencia de la Bacillariophyta *Nitzschia supralitorea* (AJ867019) se utilizó como grupo externo para enraizar el árbol.....102

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro 1. Concentración de los parámetros físico-químicos y nutrientes de los cenotes muestreados. *SDT: Sólidos disueltos totales. **ND: No detectado.....	37
Cuadro 2. Número de clonas pertenecientes a cada OTU en las librerías genéticas de cada sitio.....	63
Cuadro 3. Número de clonas pertenecientes a cada OTU en las librerías genéticas de cada sitio.....	86
Cuadro 4. Similitudes más cercanas encontradas entre las secuencias obtenidas y las disponibles en el GenBank en porcentaje de identidad por pares (>90%).....	90

RESUMEN

Los cenotes son sitios que poseen una amplia diversidad de microorganismos entre los cuales se incluyen a las microalgas. Las microalgas son un grupo de organismos microscópicos que se caracterizan por ser principalmente acuáticos, fotosintéticos y por ser la base de la cadena trófica en los cuerpos de agua. En el presente trabajo se analizó la diversidad genética de las tres Divisiones más importantes de microalgas (Cyanobacteria, Bacillariophyta y Chlorophyta) presentes en cuerpos dulceacuícolas, utilizando la secuenciación de fragmentos de los genes ribosomales 18S y 23S. Las muestras fueron colectadas durante Febrero del 2014 en dos cenotes localizados en el noreste del estado de Q. Roo. En cada sitio se tomaron los parámetros físico-químicos *in situ* y se cuantificaron los nutrientes en el laboratorio. Las muestras de agua fueron tomadas de la superficie y filtradas (0.45 µm); el material biológico colectado en los filtros fue utilizado para extraer ADN total. Se realizó la amplificación por PCR, utilizando cebadores específicos para cada una de las tres Divisiones; los fragmentos obtenidos (410-516 pb dependiendo de los cebadores utilizados) fueron clonados y secuenciados. Las secuencias (182) fueron comparadas en BLAST, además se alinearon utilizando MUSCLE (MEGA 6.0) para determinar los porcentajes de identidad de los nucleótidos. Los OTU's (Unidades Operacionales Taxonómicas) fueron identificados utilizando un corte del 97% de identidad de nucleótidos. Se elaboraron listados con el número de clonas separadas por OTU's para los dos sitios. Los resultados indicaron que la menor diversidad de OTU's (considerando las tres Divisiones) se encontró en el cenote eutrófico de Playa del Carmen con un total de 12 OTU's. El cenote de Leona Vicario fue el más diverso con un total de 31 OTU's. Las tres Divisiones de microalgas se encontraron en ambos sitios, sin embargo, al utilizar el corte del 99% se identificaron algunas especies, las cuales fueron diferentes en cada sitio, lo que indica que la comunidad de microalgas difiere entre cenotes. De las 182 clonas estudiadas el 17% perteneció a *Chlamydomonas applanata* y el 13% a *Frustulia cassiae*, haciendo de éstas las más abundantes para Playa del Carmen y Leona Vicario respectivamente. Se registraron por primera vez en el estado de Quintana Roo las especies *Nitzschia supralitorea*, *N. palea*, *N. bizertensis*, *Navicula gregaria*, *Frustulia cassiae*, *Chlamydomonas applanata*, *C. Mexicana*, *C. noctigama*, *Botryococcus terribilis*, *B. braunii*, *Tetracystis pulchra*, *T. sarcinalis*, *Asterococcus korschikoffii* y *Spongiochloris spongiosa*.

ABSTRACT

Freshwater sinkholes or “cenotes” host a great diversity of microorganisms including planktonic microalgae. Microalgae are a group of microscopic organisms characterized mainly by aquatic lifestyles, they are able to photosynthesize and they are the primary producers in water bodies. In this work, the genetic diversity of three main Divisions of freshwater microalgae (Cyanobacteria, Bacillariophyta and Chlorophyta) was explored from two sinkholes, both located in the state of Quintana Roo. Water collection was done in February 2014. Physicochemical parameters were measured *in situ* and nutrients were quantified at the laboratory. Water samples were collected at the surface of each sinkhole and were passed through 0.45 µm filters to collect the material for DNA isolation. Amplification was done by PCR with specific primers for each Division, yielding different size fragments (410-516 bp depending of the Division). Amplicons were cloned by standard procedures and sequenced. A total of 182 sequences were compared in BLAST, after which sequences were aligned using MUSCLE (MEGA 6.0) to determine their pairwise identity. Each OTU (operational taxonomic unit) was determined by using a 97% of nucleotide identity cut off. A list was elaborated with the number of the clones per OTU for each site. Results showed that the lowest diversity of OTU’s was found at the eutrophic sinkhole in Playa del Carmen with a total of 12 OTU’s. Leona Vicario’s sinkhole hosted more diversity with a total of 31 OTU’s. The three main microalgae Divisions were found in both sites, however when using the 99% cut off, we were able to confidently identify species. Community composition was different in each site; none of the species were shared, suggesting that the microalgae community composition differs from each sinkhole. From the 182 clones studied, 17% belonged to *Chlamydomonas applanata* and 13% belonged to *Frustulia cassiae*, being these species the most abundant for Playa del Carmen and Leona Vicario respectively, over the sampling period. The species *Nitzschia supralitorea*, *N. palea*, *N. bizertensis*, *Navicula gregaria*, *Frustulia cassiae*, *Chlamydomonas applanata*, *C. Mexicana*, *C. noctigama*, *Botryococcus terribilis*, *B. braunii*, *Tetracystis pulchra*, *T. sarcinalis*, *Asterococcus korschikoffii* y *Spongiochloris spongiosa* were reported for the first time in Quintana Roo.

CAPÍTULO I. ESTUDIO DE LAS MICROALGAS DULCEACUÍCOLAS

INTRODUCCIÓN

Las microalgas son un grupo de organismos microscópicos que se caracterizan por ser principalmente acuáticos, fotosintéticos y poseen una estructura vegetativa simple. Las microalgas muestran una gran diversidad morfológica, ya que pueden ser unicelulares, multicelulares o pluricelulares, llegando a formar filamentos, colonias o cenobios. Éstas conforman un grupo taxonómico informal, cuya clasificación se basa en las características morfológicas, en el tipo de productos de almacenamiento y en los pigmentos fotosintéticos que poseen (Wehr y Sheath, 2003)

Las microalgas son fundamentales en los sistemas acuáticos debido a su capacidad fotosintética, lo que las convierte en la base de la cadena trófica de todo cuerpo de agua, además, contribuyen a la fijación del CO₂, uno de los principales gases del efecto invernadero (Ebenezer *et al.*, 2011). Las microalgas pueden llegar a formar grandes florecimientos que afectan la biodiversidad local y el funcionamiento de los ecosistemas (Eiler *et al.*, 2013). Aunado a esto, su valor comercial incrementa día con día, como por ejemplo, al utilizarlas en suplementos alimenticios, en acuicultura y en la producción de biodisel (Brown *et al.*, 1997; Becker, 2004; Chisti, 2007).

En general, la clasificación de las microalgas se ha basado en sus características morfológicas (Van den Hoek *et al.*, 1995; John *et al.*, 2002; Wehr y Sheath, 2003; Barsanti y Gualtieri, 2006; Lee, 2008; Bellinger y Sigee, 2010), las cuales se observan con mayor detalle gracias a la ayuda de un microscopio de luz o electrónico de barrido. Los pigmentos que las microalgas poseen son un aspecto importante para su clasificación ya que pueden dar una noción de la División a la que pertenecen. Además de los pigmentos que llegan a poseer, otras características que se pueden observar bajo el microscopio son el tamaño, la organización unicelular o colonial y sí es móvil o no (Bellinger y Sigee, 2010). Sin embargo, este tipo de trabajos en ocasiones caen en la ambigüedad debido a que la experiencia y la habilidad del taxónomo pueden ser distintas en cada caso, lo que lleva a cierta incertidumbre en la clasificación taxonómica (Eiler *et al.*, 2013). Es por esta razón que desde hace varios años se ha empezado a utilizar la biología molecular como

una herramienta importante y complementaria para el estudio de la taxonomía e identificación de las microalgas (Kudela *et al.*, 2010). En comparación con la descripción morfológica de las microalgas, el usar técnicas moleculares posee algunas ventajas, por ejemplo: este tipo de herramientas moleculares puede facilitar las comparaciones a gran escala en diferentes sistemas acuáticos. Además, al utilizar el mismo protocolo en diferentes laboratorios el análisis puede ser estandarizado, ya que esta identificación taxonómica basada en las secuencias genéticas se puede hacer de manera idéntica, independientemente del investigador y del laboratorio (Eiler *et al.*, 2013). Otra de las ventajas de las herramientas moleculares es que se pueden identificar microalgas que miden menos de 1 μm , las cuales son difíciles de caracterizar morfológicamente (Not *et al.*, 2007; Lèpere *et al.*, 2010). La información que se encuentra en las secuencias también permite la identificación de especies crípticas, es decir, aquellas especies que comparten características morfológicas similares dificultándose su identificación (Eiler *et al.*, 2013).

En la Península de Yucatán existen varios estudios que describen la diversidad de las microalgas con base en sus características morfológicas, varios de ellos han aportado imágenes, listados e información sobre las condiciones limnológicas de los cuerpos acuáticos. Sin embargo, a la fecha no se tiene registro de ningún trabajo que utilice las técnicas moleculares para la identificación de las microalgas en el estado de Quintana Roo.

En el presente estudio se utilizarán herramientas moleculares que se basan en la amplificación y secuenciación de genes ribosomales, con el fin de explorar la diversidad de las especies microalgales de la región. Las secuencias obtenidas nos permitirán la identificación de posibles nuevas especies y aportarán información de relevancia sobre la composición microalgal presente en dos cenotes del estado de Quintana Roo.

El objetivo principal de este estudio es comparar la composición de la comunidad de microalgas de dos cenotes con base en las secuencias de los genes ribosomales 23S ADNr y 18S ADNr.

ANTECEDENTES

1. Introducción General

Las microalgas son organismos principalmente acuáticos y productores de oxígeno, poseen una diversidad morfológica, molecular y reproductiva amplia (Van den Hoek *et al.*, 1995). Estudios recientes han llevado al reconocimiento de que las algas representan un amplio número de linajes evolutivos (John *et al.*, 2002; Lee, 2008). La mayoría de estos linajes probablemente surgieron independientemente como resultado de una endosimbiosis entre una proteobacteria y una cianobacteria (Keeling, 2010). De este evento se derivaron tres linajes: Glaucophyta, Rhodophyta y Chlorophyta (Keeling, 2010). Los plástidos de Rhodophyta y Chlorophyta fueron transferidos subsecuentemente a otros linajes a través de una endosimbiosis secundaria. Los plástidos de las Chlorophyta fueron tomados por euglenidos y Chlorarachniophyta, así como por un pequeño grupo de dinoflagelados. Aparentemente las Rhodophyta realizaron solo una endosimbiosis dando origen a un tercer linaje llamado Chromalveolata (Keeling, 2010).

1.1 Las Principales Divisiones de Microalgas en Ambientes Epicontinentales y sus Características

Los nombres de las divisiones y las clases de las microalgas a veces contienen una referencia al color de los organismos incluidos en ellos. Los tipos y las combinaciones de los pigmentos fotosintéticos, los productos de reserva y otros aspectos de su organización celular son características importantes en las que se basa la clasificación microalgal (Van den Hoek *et al.*, 1995; John *et al.*, 2002; Wehr y Sheath, 2003; Barsanti y Gualtieri, 2006; Sambamurty, 2005; Lee, 2008). Hasta la fecha no se cuenta con una resolución definitiva sobre la clasificación de las microalgas, ya que los sistemas de clasificación no pueden contener a todos los tipos de organismos existentes. Históricamente la clasificación de las algas fue establecida en 1753 por Linnaeus, desde entonces los sistemas de clasificación han cambiado continuamente (Sambamurty, 2005). A pesar de que la taxonomía está bajo una constante y rápida revisión en todos los niveles y que cada día hay nueva evidencia genética y ultraestructural, se ha llegado a un consenso entre ficólogos, que resulta en un número de 8 a 11 Divisiones algales (John *et al.*, 2002): Cianobacteria, Prochlorophyta, Glaucophyta, Rhodophyta, Heterokontophyta,

Haptophyta, Cryptophyta, Dinophyta, Euglenophyta, Chlorarachniophyta y Chlorophyta (Van den Hoek *et al.*, 1995). Las Divisiones de microalgas más importantes dentro de los ambientes dulceacuícolas debido a su abundancia y diversidad son Cianobacteria, Bacillariophyta y Chlorophyta (John *et al.*, 2002; Wehr y Sheath, 2003).

2. Tipos de Hábitat de las Microalgas

Para facilitar su estudio, las comunidades microalgales de los sistemas acuáticos se catalogan en dos grandes grupos: los organismos suspendidos en la columna de agua a los que se les conoce como fitoplancton y los organismos fijos al sustrato o fitobentos (Wehr y Sheath, 2003).

2.1 Fitoplancton

El fitoplancton es un conjunto de organismos que comparten niveles de organización y funciones autotróficas (Margalef, 1983). El fitoplancton se encuentra constituido por diferentes algas microscópicas unicelulares o coloniales, con tamaños que van desde los 0.2 μm hasta los que miden 2 000 μm ; es por esta razón que se le ha dividido en sub-categorías: picoplancton (0.2-2 μm), nanoplancton (2-20 μm), microplancton (20-200 μm) y macroplancton (200-2 000 μm) (Lee, 2008). El fitoplancton varía ampliamente entre regiones geográficas y el hecho de que sea tan ampliamente diverso se debe a la influencia de varios factores ambientales, entre los que destacan: el régimen térmico, la disponibilidad de luz, los nutrientes, la depredación y el parasitismo (Turpin y Harrison, 1979; Crumpton y Wetzel, 1982; Sommer, 1984).

2.2 Fitobentos

El fitobentos es la comunidad acuática de algas que se encuentra adherida a varios sustratos o al fondo acuático, ocupa una enorme variedad de microhábitats, incluyendo rocas, macrófitas, sedimentos, granos de arena, maderos y sustratos artificiales (Wehr y Sheath, 2003). Todas las Divisiones de algas tienen representantes bénticos, sin embargo, las Bacillariophyta son las microalgas más comúnmente encontradas en el bentos. Los géneros *Frustulia*, *Navicula*, *Nitzschia*, *Pinnularia* y *Stauroneis* son los más comunes debido al amplio rango de superficies que pueden

habitar (Wehr y Sheath, 2003). En el fitobentos también se pueden encontrar algunas cianobacterias filamentosas tales como: *Oscillatoria*, *Hapalosiphon*, *Lyngbya* y *Microcoleus* (Castenholz, 1982). El fitobentos puede tener formas unicelulares, coloniales, filamentosas y multicelulares, el rango de tamaños es mayor que el de las microalgas planctónicas ya que van desde los 0.8 μm como las células de *Nannochloris* o *Synechococcus* hasta 1 m en el caso de *Cladophora*, *Chara* e *Hydrodictyon* (Wehr y Sheath, 2003).

3. Métodos para la Caracterización de las Comunidades Microalgales

La población y estructura de una comunidad microalgal puede ser evaluada de diferentes formas: por la cuantificación de la biomasa, por citometría de flujo o por análisis al microscopio (Stevenson, 1996).

3.1 Cuantificación de la Biomasa

La determinación del fitoplancton por medio de la biomasa nos provee información sobre la producción primaria de un sistema acuático y la cantidad de materia orgánica que está disponible para el consumo del zooplancton (Bellinger y Sigee, 2010). Existen varios parámetros que pueden ser utilizados para medir la biomasa, tales como: la clorofila *a*, medición de la turbidez, determinación de peso seco y el análisis de la concentración de los pigmentos. Estos tipos de análisis son relativamente económicos y algunos de ellos se pueden realizar *in situ* como la medición de la turbidez y la concentración de pigmentos, sin embargo, la medición de estos parámetros no es exacta. Cuantificar la clorofila *a* conlleva algunas limitantes, ya que la relación entre la biomasa y la clorofila *a* no es directa, es decir, la concentración de pigmentos en las microalgas varía entre especies en relación a factores externos como la temperatura, la luz o la disponibilidad de los nutrientes; o a factores internos como la fisiología de la microalga (Stevenson, 1996; Bellinger y Sigee, 2010). De igual manera, el nitrógeno, el carbono y el fósforo se pueden encontrar en otros organismos como las bacterias o el zooplancton además de las microalgas, con lo que el resultado final de estos elementos no tendría relación con ellas (Stevenson, 1996; Bellinger y Sigee, 2010). A pesar de las limitantes que estas técnicas pueden presentar, se ha utilizado en algunas ocasiones, principalmente en ambientes marinos y en estuarios (Goericke, 1998). La mejor manera en determinar la cuantificación

de la biomasa es por medio de la Cromatografía de Líquidos de Alto Desempeño o HPLC por sus siglas en inglés. La técnica de HPLC clasifica las muestras de microalgas en grandes grupos taxonómicos como Divisiones y la principal ventaja que se tiene al utilizar esta técnica es que puede ser utilizada para analizar un gran número de muestras; aunado a esto, la combinación de la HPLC, la espectrofotometría y el uso de programas matemáticos, da una rápida evaluación de la comunidad microalgal (Bellinger y Sigee, 2010).

3.2 Citometría de Flujo

Por medio de la citometría de flujo se puede obtener información sobre la población microalgal en relación a su composición taxonómica, el tamaño de las células y la cantidad de células o colonias que integran una población (Bellinger y Sigee, 2010). La citometría de flujo proporciona un análisis de partículas suspendidas que poseen tamaños de 0.5 a 40 μm de diámetro, como las microalgas (Bellinger y Sigee, 2010). Las muestras de microalgas se hacen pasar a través de un estrecho tubo donde un láser libera fotones al entrar en contacto con las células, de esta manera se mide la fluorescencia emitida por cada una de las células, la cual es particular dependiendo del pigmento analizado (Cavender-Bares *et al.*, 1998). A pesar de las ventajas que puede presentar la citometría de flujo, posee una desventaja importante, ya que en muestras ambientales el amplio rango de tamaños de los organismos dificulta el paso de las células a través del citometro, además de que la resolución de especies del mismo tamaño es imprecisa, es decir, especies microalgales del mismo tamaño pero morfofisiológicamente distintas pueden ser fácilmente confundidas (Urbach y Chisholm, 1998; Zubkov *et al.*, 2003).

3.3 Análisis al Microscopio

El análisis al microscopio de las especies que conforman una comunidad involucra la identificación morfológica y la cuantificación de las mismas (APHA *et al.*, 1998). El observar al microscopio permite realizar una descripción de los tamaños, formas, estructuras celulares así como movimiento y pigmentos de las células, sin embargo, este tipo de trabajos en ocasiones cae en la ambigüedad lo que lleva a cierta incertidumbre en la clasificación taxonómica (Eiler *et al.*, 2013).

La cuantificación se realiza al enumerar los organismos vivientes de una muestra, los cuales pueden ser una sola célula, filamentos o una colonia; no hay una regla que indique si las colonias o los filamentos deberían ser tratados como una unidad o como un conjunto de células, por lo que este es el principal inconveniente que se tiene al realizar este tipo de análisis (Bellinger y Sigee, 2010).

3.4. Técnicas Moleculares para el Estudio de la Diversidad de Microalgas

La aplicación de técnicas moleculares para la identificación de las microalgas comenzó hace más de 40 años y cada vez son más utilizadas en los campos de ecología, relaciones filogenéticas e identificación taxonómica (De Bruin *et al.*, 2003). En la actualidad la biología molecular es una valiosa herramienta para los ficólogos ya que permite el estudio de relaciones filogenéticas y la identificación taxonómica de las poblaciones, los géneros e inclusive las especies.

3.4.1 Marcadores Moleculares

En genética el principal objetivo que se tiene es el de estudiar, determinar y medir la variación existente entre y dentro de los individuos de una comunidad (Aranguren-Méndez *et al.*, 2005). Desde el punto de vista de la biología molecular, esta variación denominada polimorfismo deriva de cambios espontáneos en el ADN y puede medirse a través de diferentes técnicas disponibles (De Bruin *et al.*, 2003). Los marcadores moleculares, debido a su elevado nivel de polimorfismo resultan útiles para definir un genotipo en particular, siendo éste de especial interés en estudios de evolución, ecología, ciencias forenses y estudios de biodiversidad (Simpson, 1997; Jones *et al.*, 1998). Para que un marcador molecular sea considerado bueno, debe poseer ciertas características para maximizar su utilidad, entre ellas, debe tener una amplia distribución dentro del genoma y un alto grado de polimorfismo, así mismo, debe ser rápido, práctico y reproducible (Cheng y Crittenden, 1996).

Algunas características de los principales marcadores moleculares son enunciadas a continuación.

3.4.1.1 Microsatélites o Secuencias Cortas Repetidas

Los microsatelites son fragmentos cortos de ADN de 1 a 6 pares de bases que se repiten varias veces aleatoriamente a lo largo del genoma de los seres vivos (Coltman *et al.*, 1994; Gupta *et al.*, 1994). Los microsatelites se han detectado en varios grupos de plantas y animales y se han utilizado para determinar la variación genética entre y dentro de las especies, análisis de linajes y de sistemas reproductivos (Rentería-Alcántara, 2007), esto permite contestar preguntas evolutivas muy puntuales relacionadas con el monitoreo del flujo genético, introgresión y análisis de paternidad, con lo que se pueden hacer inferencias sobre parámetros demográficos y determinar patrones evolutivos que dieron origen a las especies (Vendramin *et al.*, 1998; McCracken *et al.*, 1999). Para poder trabajar con microsatélites es necesario conocer la secuencia de la región a analizar, es decir, los microsatélites son específicos para ciertos grupos de géneros o incluso especies (Golstein *et al.*, 1996). Rynearson y Armbrust (2000) fueron los primeros en utilizar esta técnica en microalgas, valiéndose de los microsatélites para conocer la diversidad genética de las poblaciones de *Ditylium brightwellii* (Bacillariophyta). Obtuvieron altas diferencias entre las poblaciones, ya que de las 23 poblaciones analizadas se obtuvieron 22 patrones de bandeo distintos; éstos sugieren que la alta diversidad genética de las diatomeas se debió a las diferentes características ambientales que presentan los sitios de muestreo en el estado de Washington, E. U. A.

3.4.1.2 Polimorfismo en la Longitud de Fragmentos de Restricción o RFLP's

La técnica de Polimorfismo en la Longitud de Fragmentos de Restricción fue una de las primeras en utilizar el ADN microalgal para analizar la comunidad (De Bruin *et al.*, 2003). Esta técnica consiste en visualizar las diferencias al nivel de la estructura del ADN, ya que se basa en la amplificación de un fragmento de ADN por medio de cebadores específicos, los cuales son cortados por enzimas de restricción, produciendo fragmentos de diferentes tamaños, los cuales pueden ser separados y visualizados por medio de electroforesis en gel (De Bruin *et al.*, 2003; Aranguren-Méndez *et al.*, 2005). Los RFLP's se han utilizado para construir mapas genéticos, para la clonación de genes y para ayudar a resolver problemas taxonómicos o filogenéticos. El grado de polimorfismo que se puede detectar por medio de esta técnica difiere ampliamente entre las especies dependiendo de la región que se vaya a utilizar (Rentería-Alcántara, 2007). Este marcador molecular fue

uno de los primeros en utilizarse con ADN de microalgas. Wood y Townsend (1990) identificaron la relación genética que existe entre especies de *Synechococcus*, encontrando altos niveles de variación genética entre las cepas cultivadas. Adachi *et al.* (1994), utilizaron RFLP's en cepas de *Alexandrium tamarense* y *Alexandrium catenatum* de los mares de Japón, encontrando poca diferencia genética entre las dos especies, sin embargo, una cepa fue poco definida debido a que presentaba características genéticas de las dos especies estudiadas. Con los análisis de RFLP's se pueden encontrar numerosos polimorfismos en regiones codificantes y no codificantes del ADN entre cepas de microalgas o muestras ambientales (De Bruin *et al.*, 2003).

3.4.1.3 Polimorfismo de ADN Amplificado Aleatoriamente o RAPD's

Los RAPD's son marcadores que amplifican fragmentos de ADN de forma azarosa en una gran variedad de especies; estos se basan en la probabilidad de que se presenten sitios complementarios a los cebadores utilizados a lo largo del genoma (Aranguren-Méndez *et al.*, 2005). El polimorfismo obtenido entre las bandas de las poblaciones se debe a cambios en la secuencia de los nucleótidos en los sitios de acoplamiento de los cebadores y por inserción o delección de los fragmentos en estos sitios (Williams *et al.*, 1990). Los fragmentos amplificados son separados por medio de la electroforesis. Los RAPD's son útiles en la elaboración de mapas genéticos, en estudios de parentesco y en el análisis de la estructura poblacional, sin necesidad de conocer previamente la secuencia del genoma (Otero *et al.*, 1997; De Bruin *et al.*, 2003). Esta técnica fue utilizada para estudiar la variación genética entre 19 cepas de la cianobacteria del género *Nodularia* colectadas en las costas de Australia, demostrando que existió variación genética entre ellas, expresada en diferentes morfoespecies relacionadas con las condiciones particulares de cada región (Bolch *et al.*, 1999). De igual manera, esta técnica se ha utilizado para otras microalgas como las diatomeas. Lewis *et al.* (1997) utilizaron esta técnica en 126 cepas de *Fragilaria capucina*, las muestras fueron colectadas en un gradiente latitudinal desde Manitoba hasta Texas. Los resultados indicaron que las cepas tuvieron variación genética dentro de las poblaciones, no obstante, la variación genética entre las poblaciones fue mayor, formando patrones muy marcados y relacionados con el sitio de colecta, revelando así siete poblaciones limitadas por las condiciones geográficas.

3.4.1.4 Polimorfismos de Longitud de Fragmentos Amplificados o AFLP's

Los AFLP's son una técnica que combina la digestión con dos enzimas de restricción, la unión de secuencias específicas al fragmento de ADN de interés y la amplificación por PCR (Vos *et al.*, 1995). Esta técnica detecta múltiples polimorfismos y es útil para generar mapas genómicos, también se utiliza para la caracterización de germoplasmas, estudios filogenéticos de plantas, bacterias, hongos y en genética de poblaciones (Rentería-Alcántara, 2007). Las bandas observadas en los geles de AFLP's son clasificadas como presencia o ausencia en cada individuo (Simpson, 1997). La variación genética en cepas de *Asterionella formosa* del lago Maarsseveen en Holanda fue sometida al análisis de AFLP. Mediante esta técnica se detectó una alta variabilidad genética de estos organismos a pesar de la poca frecuencia en la reproducción sexual, el limitado flujo génico y la susceptibilidad a los parásitos que estos organismos llegan a presentar (De Bruin *et al.*, 2004). La técnica de AFLP fue desarrollada por Vos *et al.* (1995) y es más reproducible que los RAPD's, además de que los resultados obtenidos son de mejor resolución y desde entonces se ha utilizado en varios organismos como plantas, animales y microorganismos (Savelkoul *et al.*, 1999)

Los marcadores moleculares han sido desarrollados para detectar y estimar la diversidad genética de muestras ambientales, principalmente para microalgas marinas nocivas, tal es el caso de los géneros *Alexandrium*, *Heterosigma*, *Gyrodinium*, *Gymnodinium*, *Karenia*, *Pfiesteria*, *Pseudo-nitzschia*, *Ostreopsis* entre otros (Adachi *et al.*, 1994; Sato *et al.*, 2001; Ebenezer *et al.*, 2011). Sin embargo, en aguas continentales también se han utilizado métodos de amplificación por PCR para detectar microalgas nocivas como las pertenecientes a los géneros *Microcystis*, *Anabaena*, *Oscillatoria*, *Nostoc*, *Anabaenopsis*, *Aphanizomenon* y *Cylindrospermopsis* productoras de dermatotoxinas, neurotoxinas y hepatotoxinas (Fernández *et al.*, 2005; Arzate-Cárdenas *et al.*, 2010; Berry y Lind, 2010).

3.4.2 Secuenciación Genética

La secuencia de ácidos nucleicos se modifica con el tiempo, teniendo en cuenta que estos cambios se producen al azar y que aumentan al transcurrir el tiempo, las diferencias en los nucleótidos reflejan la distancia evolutiva que existe entre ellos, es por

eso que se les puede considerar como cronómetros moleculares (Zuckerlandl y Pauling, 1965). La secuenciación de estos ácidos nucleicos es el análisis más detallado de la variación genética que posee un grupo de individuos, especies, poblaciones o comunidades (Parker *et al.*, 1998). La secuenciación de ciertas regiones en el genoma, o genes, de un organismo es una herramienta molecular utilizada ampliamente en estudios taxonómicos y filogenéticos (De Bruin *et al.*, 2003), siendo los genes ribosomales los más utilizados en este tipo de estudio (Rodicio y Mendoza, 2004). Debido a que los genes ribosomales son genes ancestrales presentes en todos los organismos, su estructura y función han permanecido constantes a lo largo del tiempo. Los cambios presentes en ellos ocurren de manera suficientemente lenta como para aportar información sobre la escala evolutiva, presentan suficiente variabilidad para diferenciar no sólo los organismos más alejados, sino también los más próximos. Ya que en la actualidad existen bases de datos con amplia información y continuo crecimiento, los genes ribosomales constituyen, por lo tanto, una diana universal para la identificación de microorganismos (Collins y Paskewitz, 1996; Rodicio y Mendoza, 2004).

En 1970 Carl Woese fue el primero en utilizar este ADN como un cronómetro molecular, de estos estudios se originó la división de las bacterias en dos grupos, procariotas y arqueas. Desde entonces el análisis del ADNr se ha utilizado ampliamente para establecer las relaciones filogenéticas, principalmente, de los microorganismos (Olsen y Woese, 1993).

Para estudiar las relaciones filogenéticas entre varios taxa de cianobacterias, ciertas regiones de los genes 16S y 23S han sido secuenciadas y utilizadas en análisis filogenéticos como los trabajos realizados por: Wilmotte *et al.* (1992), Lyra *et al.* (1997), Neilan *et al.* (1997), Otsuka *et al.* (1998) y Litvaitis (2002) por mencionar algunos. Estos trabajos se enfocan en las cianobacterias que producen toxinas como *Anabaena*, *Cylindrospermopsis*, *Microcystis*, *Oscillatoria* y *Pseudanabaena*. Estos géneros son de importancia ecológica ya que pueden formar florecimientos algales nocivos que logran afectar el sistema acuático que habitan. Es de resaltar que estos trabajos utilizan muestras de cultivos microalgales y no muestras ambientales, por lo que se utilizaron juegos de cebadores particulares para cianobacterias.

Sherwood y Presting (2007) diseñaron un juego de cebadores basados en el gen 23S ADNr para la identificación de microalgas. Este cebador se diseñó comparando 37 genomas de cloroplastos de una variedad de linajes de algas y plantas terrestres. El fragmento que se logró amplificar (~410 pb) sirvió para la identificación de 280 taxa, principalmente a nivel de género tanto de cultivos como de muestras ambientales, repartido en las Divisiones de Cianobacteria, Bacillariophyta, Chlorophyta, Euglenophyta, Rhodophyta, Xantophyta y Phaeophyta, resaltando la División de Cianobacterias la cual tuvo el mayor registro de secuencias con 117 (Sherwood y Presting, 2007; Sherwood *et al.*, 2008).

A la fecha varios juegos de cebadores se han empleado para realizar análisis filológicos; con el objetivo de determinar las relaciones filogenéticas entre taxa (An *et al.*, 1999; Sherwood y Presting, 2007) o para validar la filogenia existente, la cual se basa en caracteres morfológicos (Buchheim *et al.*, 1996; Lundholm *et al.*, 2002). En estos trabajos, sin embargo, las secuencias de los fragmentos amplificados no aportaron suficiente información taxonómica para poder identificar especies (Van Hannen *et al.*, 1998; Dorigo *et al.*, 2002; Zhu *et al.*, 2005). Otros autores diseñaron un juego de cebadores para amplificar un fragmento ~500 pb del gen 18S ADNr, basándose en dos bases de datos, la primera perteneciente a Chlorophyta y la segunda perteneciente a Bacillariophyta, consistiendo de 132 y 94 secuencias respectivamente (Valiente-Moro *et al.*, 2009). La precisión de los cebadores diseñados fue primero probada *in silico* por medio del software ARB, obteniendo un 73.2% de afinidad con los cebadores de Chlorophyta y un 85.6% para los cebadores de Bacillariophyta. La prueba con muestras ambientales logró identificar a nivel de especie 64 taxa de Chlorophyta y 59 de Bacillariophyta.

En conclusión, la utilización de estos cebadores reportados previamente es útil para la identificación de microalgas, basados en secuencias de los genes ribosomales 18S y 23S, debido a que los fragmentos amplificados proveen suficiente información taxonómica para reconocer géneros y especies de las principales Divisiones de microalgas de ambientes dulceacuícolas como los son Cianobacterias, Bacillariophyta y Chlorophyta.

4. Diversidad de Microalgas en México

4.1 Diversidad Morfológica de Microalgas en México

En México, el conocimiento que se tiene a la fecha sobre la diversidad de especies de microalgas epicontinentales se ha basado principalmente en la descripción morfológica de los organismos. Novelo y Tavera (2011) reportaron que desde 1984 se han publicado 123 artículos y 50 tesis que tienen registro de especies de microalgas.

En los siguientes párrafos se describen tres trabajos que se destacan por proporcionar un panorama general del conocimiento de las algas en el país.

En un libro publicado en el 2009 sobre la Biodiversidad en el Estado de México, se escribió un capítulo sobre la diversidad de especies, la distribución geográfica, la importancia y el uso de las algas; de acuerdo a los datos presentados, en el Estado de México, se registran 668 taxas de algas identificadas. La mayoría de especies pertenecieron a las Divisiones Chlorophyta (307), Bacillariophyta (262) y Cianobacteria (65) (Garduño-Solórzano *et al.*, 2009).

Una revisión realizada por Novelo y Tavera (2011), quienes utilizaron dos bases de datos que incluyen referencias bibliográficas (con 14 050 entradas) y registro de especies a nivel nacional (con 11 303 entradas), reportan que en el país existe un total de 2 974 taxa de algas. La mayoría de las algas se encuentran distribuidas en la División Bacillariophyta con 39% de los registros. De igual manera los autores proporcionaron los datos correspondientes al número de especies registradas por estado, en los que destacan las entidades federativas de Michoacán, Distrito Federal y Estado de México por su diversidad, la cual supera las 1 900 especies en total, mientras que en los estados de Aguascalientes, Campeche, Colima, Guerrero, Nayarit, Querétaro, Sinaloa y Zacatecas se han realizado pocos estudios relacionados con las algas, por lo que entre estas ocho entidades federativas se tiene un total de 13 especies. Sobresalen las especies: *Anabaena fallax*, *Aphanothece comasii*, *Cyanobacterium lineatum*, *Cyanotetras aerotopa*, *Cyclotella alchichicana*, *Cylindrospermopsis catemaco*, *Cylindrospermopsis tavaerae*, *Chroococcus deltoides* y *Planktolyngbya regularis*, por ser especies aparentemente endémicas del país.

Oliva-Martínez *et al.* (2013) realizaron una revisión de las microalgas planctónicas epicontinentales del país. La base de datos estuvo conformada por 55 publicaciones que abarcaron los años de 1984 a 2012. Los datos indican que México posee 1 025 especies de microalgas planctónicas, de las cuales Bacillariophyta fue la más diversa con 31.9%, seguida por Cianobacteria y Chlorophyta. De igual manera se incluyeron los datos por entidad federativa, siendo el Estado de México el que más se ha estudiado, ya que los registros indican que posee 317 especies, seguido de Oaxaca y Michoacán con 280 y 221 especies respectivamente. Sobresalen Baja California, Baja California Sur, Tamaulipas, Durango, Zacatecas y Aguascalientes por permanecer sin estudios relacionados al tema.

En conclusión, los datos publicados indican que la mayoría de las especies en el país pertenecen a la División de Bacillariophyta, probablemente esto se deba a las condiciones ambientales que proveen los sistemas acuáticos epicontinentales en el país. Así mismo la mayoría de la información recopilada muestra que el mayor esfuerzo de muestreo se ha realizado en la zona central del país, por lo que son necesarios más estudios de diversidad en otras regiones, de esta manera se ayudará a conocer el estado verdadero de la diversidad en México.

4.2 Diversidad Genética de Microalgas en México

A pesar de que en México se han realizado varios estudios sobre la diversidad de las microalgas, la mayoría se han basado en el uso de características morfológicas. En comparación con estos estudios los que utilizan herramientas moleculares son pocos y se han enfocados en sistemas muy particulares como los de Alchichica y Cuatro Ciénegas (Breitbart *et al.*, 2009; Couradeau *et al.*, 2011). En estos estudios se examinaron los estromatolitos que ahí se encuentran, por medio de la secuenciación metagenómica y la secuenciación del gen 16S ADNr. El resultado fue la descripción taxonómica de los Órdenes principales de bacterias, dentro de los cuales destacan para este trabajo: Chroococcales, Nostocales, Oscillatoriales y Pleurocapsales, pertenecientes a las Cianobacterias.

A la fecha, ninguno de estos trabajos ha llegado a la identificación de especies microalgales dulceacuícolas en el país a nivel molecular, ya que se han enfocado principalmente a describir la composición de la comunidad bacteriana a nivel de Orden.

Esto se debe a que el objetivo de los trabajos, más bien, está enfocado en el estudio de la función y desempeño de las poblaciones dentro del ambiente tan particular que habitan, como es el caso de los estromatolitos, y no en la composición de la comunidad microalgal.

5. Diversidad de Microalgas en la Península de Yucatán

5.1 Diversidad Morfológica de Microalgas en la Península de Yucatán

Aunque en la Península de Yucatán se describen alrededor de 2 000 cenotes (Beddows *et al.*, 2007) el conocimiento que se tiene sobre las comunidades de microalgas dulceacuícolas es menor en estos ambientes en comparación con otros ambientes dulceacuícolas del centro del país.

Sánchez *et al.* (2002) determinaron la composición de la comunidad microalgal de cinco cenotes y dos cuevas anquialinas cercanas al poblado de Tulum (Quintana Roo) en la temporada de lluvias y secas. Los resultados reportaron la presencia de 78 especies para los cenotes y 40 para las cuevas anquialinas, en los cuales la estacionalidad no marcó diferencias en la diversidad de las especies encontradas. Esto se puede deber, principalmente a la descarga de nutrientes que llegan al acuífero en temporada de lluvias.

Con el objetivo de determinar la composición y la diversidad del fitoplancton en doce cuerpos de agua dulce en la Península de Yucatán (Edzná y Zapote en Campeche; Chen-Há, Abalá, Ixin-Há, Xmucuy, Sambula y Sacalum en Yucatán; Box-Toro, Cobá, Framboyanes y San Antonio en Quintana Roo) López-Adrián y Barrientos-Medina (2005) tomaron muestras superficiales en la temporada de lluvias de 1994. Los resultados obtenidos demostraron la presencia de 98 especies en total, de las cuales 36 pertenecieron a Chlorophyta y 35 a Bacillariophyta. La mayor diversidad se encontró en el cenote Chen-Há con 24 especies y la menor en Ixin-Há con tres, ambos cenotes pertenecen al estado de Yucatán. Además durante el muestreo se tomó la medición de algunos parámetros físico-químicos como temperatura y conductividad, los cuales están aparentemente relacionados con la presencia/ausencia de algunas especies de microalgas.

Nava-Ruíz y Valdez (2012), reportaron el primer inventario del fitoplancton de la Laguna Lagartos y realizaron las primeras contribuciones al conocimiento sobre la

biodiversidad microalgal en el estado de Quintana Roo. En este trabajo, los muestreos se realizaron mensualmente a lo largo de un año entre 2007 y 2008 y las colectas se realizaron en los primeros 0.3 m de la superficie de la laguna. Los resultados obtenidos demostraron la presencia de 67 taxa de las cuales la mayoría perteneció a la División Bacillariophyta y Cyanobacteria con 28 y 22 especies respectivamente. Resalta el caso de las cianobacterias que presentaron un 80% de abundancia relativa en los muestreos. Además, se encontraron 13 nuevos registros para el país. Finalmente, los taxa listados fueron ilustrados con fotografías y descripciones breves.

Valadez y Hernández-Terrones (2012) reportaron el primer inventario de diatomeas perifíticas de la Laguna Lagartos en Quintana Roo, México. Los muestreos se realizaron mensualmente a lo largo de un año, a partir de septiembre del 2007 dentro de los primeros 0.3 m de profundidad de la laguna. Un total de 57 especies fueron registradas, las cuales se distribuyeron en 36 géneros y tres clases. El inventario estuvo conformado por una medición promedio de las especies a lo largo y ancho, así como de imágenes que ejemplifican a los organismos y su afinidad por el ambiente en el que se encuentran.

El estado de Quintana Roo es una región todavía inexplorada en cuanto a la diversidad de especies microalgales. A pesar de que ya se han realizado trabajos sobre la diversidad morfológica de microalgas, ninguno de ellos aborda el tema desde un punto de vista molecular. Aunado a esto, los estudios se han realizado en algunos cenotes de la Península de Yucatán, y ya que probablemente existan más de 2 000 de estos cuerpos acuáticos, varios de ellos con características físico-químicas particulares, la probabilidad de encontrar nuevos registros para el país, especies endémicas o nuevas especies podría ser alta.

OBJETIVOS

1. Objetivo General

Realizar la identificación de las tres principales Divisiones de microalgas dulceacuícolas (Cyanobacterias, Bacillariophyta y Chlorophyta) en dos cenotes de Q.

Roo, México con base en las secuencias de los fragmentos de los genes ribosomales 23S ADNr y 18S ADNr.

2. Objetivos Particulares

1. Obtener las secuencias correspondientes a los fragmentos amplificados por PCR de los genes ribosomales 23S ADNr utilizando cebadores para detectar Cianobacterias y 18S ADNr utilizando los cebadores específicos para las Divisiones Chlorophyta y Bacillariophyta.
2. Realizar la identificación taxonómica de los grupos de microalgas de cada División con base en las secuencias obtenidas.
3. Realizar la reconstrucción filogenética de las comunidades de microalgas de ambos sitios de colecta.
4. Comparar la composición microalgal de cada sitio muestreado con base en las especies identificadas.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Adachi, M.; Sako, Y.; e Ishida, Y. 1994. Restriction fragment length polymorphism of ribosomal DNA internal transcribed spacer and 5.8S regions in Japanese *Alexandrium* species (Dinophyceae). *Journal of Phycology*. 30: 857-863.
- An, S. S., Friedl, T. y Hegewald, E. 1999. Phylogenetic relationships of *Scenedesmus* and *Scenedesmus*-like coccoid green algae as inferred from ITS-2 rDNA sequence comparisons. *Plant Biology*. 1 (4): 418-428.
- APHA, AWWA y WEF. 1998. *Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater*. American Public Health. 20^a ed. United States of America. 1269 pp.
- Aranguren-Méndez, J. A., Román-Bravo, R., Isea, W., Villasmil, Y. y Jordana, J. 2005. Los microsatélites (STR's), marcadores moleculares de ADN por excelencia para programas de conservación: una revisión. *Archivos Latinoamericanos de Producción Animal*. 13 (1): 30-42.
- Arzate-Cárdenas, M. A.; Olvera-Ramírez, R. y Martínez-Jerónimo, F. 2010. *Mycrocystis* toxigenic strains in urban lakes: a case of study in Mexico city. *Ecotoxicology*. 19: 1157-1165.
- Barsanti, L. y Gualtieri, P. 2006. *Algae: Anatomy, Biochemistry and Biotechnology*. Taylor & Francis Group. United States of America. 301 pp.
- Berry, J. P. y Lind, O. 2010. First evidence of "paralytic shellfish toxins" and cylindrospermopsin in a Mexican freshwater system lago Catemaco, and apparent bioaccumulation of the toxins in "teogolo" snails (*Pomacea patula catemacensis*). *Toxicon*. 55: 930-938.
- Becker, W. 2004. Microalgae in human and animal nutrition. In: *Handbook of Microalgae Mass Culture and Biotechnology and Applied Phycology*. A. Richmond (Ed). Blackwell Publishing. pp: 312-351.
- Beddows, P. A.; Smart, P. L.; Whitaker, F. F.; y Smith, S. L. 2007. The coupled freshsaline groundwater circulation of a coastal carbonate aquifer: Spatial patterns of temperature and specific electrical conductivity. *Journal of Hydrology*. 346: 18-32.

- Bellinger, E. G. y Sigeo, D. C. 2010. *Freshwater algae. Identification and use as bioindicators*. Wiley-Blackwell. United States of America. 271 pp.
- Bolch, C. J. S, Orr, P. T., Jones, G. J. y Blackburn, S. I, 1999. Genetic, morphological and toxicological variation among globally distributed strains of *Nodularia* (Cyanobacteria). *Journal of Phycology*. 35 (2): 339-355.
- Breitbart, M.; Hoare, A.; Nitti, A.; Siefert, J.; Haynes, M.; Dinsdale, E.; Edwards, R.; Souza, V.; Rohwer, F.; y Hollander, D. 2009. Metagenomic and stable isotopic analyses of modern freshwater microbialites in Cuatrociénegas, México. *Environmental Microbiology*. 11 (1): 16-34.
- Brown, M. R., Mular, M., Miller, I., Farmer, C. y Trener, C. 1997. The vitamin content of microalgae used in aquaculture. *Journal of Applied Phycology*. 11: 247-255.
- Buchheim, M., Lemieux, C., Otis, C. Gutell, R. R., Chapman, R. L. y Turmel, M. 1996. Phylogeny of the Chlamydomonadales (Chlorophyceae): A comparison of ribosomal rna gene sequences from the nucleus and the chloroplast. *Molecular Phylogenetics and Evolution*. 5 (2): 391-402.
- Castenholz, R. W. 1982. Motility and taxes. In: *Freshwater Algae of Northamerica Ecology and Classification*. J. Wehr y R. Sheath (eds). American Press. 11-57 pp.
- Cavender-Bares, K. K., Frankael, S. L. y Chisholm, S. W. 1998. A dual sheath flow cytometer for shipboard analyses of phytoplankton communities from the oligotrophic oceans. *Limnology and Oceanography*. 43: 1383-1388.
- Cheng, H. H. y Crittenden, L. B. 1994. Microsatellite markers for genetic mapping in the chicken. *Poultry Science*. 73: 539-546.
- Chisti, Y. 2007. Biodiesel from Microalgae. *Biotechnology Advances*. 25: 294-306.
- Collins, F. H. y Paskewitz, S. M. 1996. A review of the use of ribosomal DNA (rDNA) to differentiate among cryptic *Anopheles* species. *Insect Molecular Biology*. 5 (1): 1-9.

- Coltman D.W., Bowen, D. W. y Weith, J. M. 1996. PCR primers for harbour seal (*Phoca vitulina concolour*) microsatellites amplify polymorphic loci other pinniped species. *Molecular Ecology*. 5: 161-163.
- Couradeau, E.; Benzerara, K.; Moreira, D.; Gérard, E.; Kaz'mierczak, J.; Tavera, R.; y López-García, P. 2011. Prokaryotic and eukaryotic community structure in field and cultured microbialites from the alkaline lake Alchichica (Mexico). *PLoS ONE*. 6(12): e 28767. doi: 10.1371/journal.one.0028767.
- Crumpton, W. G.; y Wetzel, R. G. 1982. Effects of differential growth and mortality in the seasonal succession of phytoplankton populations in Lawrence lake, Michigan. *Ecology*. 63: 1729-1739.
- De Bruin, A., Bas, W. I., Rijkeboer, M., Brehm, M. y Van Donk, E. 2004. Genetic variation in *Asterionella formosa* (Bacillariophyceae): Is it linked to frequent epidemics of host-specific parasitic fungi? *Journal of Phycology*. 40 (5): 823-830.
- De Bruin, A., Ibelings, B. W. y Van Donk, E. 2003. Molecular techniques in phytoplankton research: from allozyme electrophoresis to genomics. *Hydrobiologia*. 491: 47-63.
- Dorigo, U., Bérard, A. y Humbert, J. F. 2002. Comparison of eukaryotic phytobenthic community composition in a polluted river by partial 18S rRNA gene cloning and sequencing. *Microbial Ecology*. 44: 372-380.
- Ebenezer, V., Medlin, L. K. y Ki, J.S. 2011. Molecular detection, quantification, and diversity evaluation of microalgae. *Marine Biotechnology*. 14 (2): 129-142.
- Eiler, A., Drakare, S., Bertilsson, S., Pernthaler, J., Peura, S., Rofner, C., Simek, K., Yang, Y., Znachor, P. y Lindström, E. S. 2013. Unveiling distribution patterns of freshwater phytoplankton by a next generation sequencing based approach. *PLoS ONE*. 8 (1): e53516. DOI: 10.1371/journal.pone.0053516.
- Fernández, A. M. C., Navarro, I. M., Gallego, A. J., Kuhn, G. R., Sánchez, S. P. y Ortega, A. I, P. 2005. Cianobacterias y cianotoxinas: necesidad de su control en el agua de consumo humano. *Revista de Salud Ambiental*. 5 (2): 137-141.

- Garduño-Solórzano, G., Oliva, M. G. y Ortega, M. M. 2009. Algas. *In: La diversidad biológica del Estado de México, Estudio de Estado*. G. Ceballos, R. List, G. Garduño, R. López-Cano, M. J. Muñozcano-Quintanar, E. Collado y J. E. San Román (comps). Gobierno del Estado de México, Toluca. pp. 153-162.
- Golstein, D. B., Zhivotovsky, L. A., Nayar, K., Ruíz, L. A., Cavalli-Sforza, L. L. y Feltman, M. W. 1996. Statistical properties of the variation at linked microsatellite loci: implications for the history of human Y-chromosome. *Molecular Biology and Evolution*. 13: 1213-1218
- Goericke, R. 1998. Response of phytoplankton community structure and taxon-specific growth rates to seasonally varying physical forcing in the Sargasso Sea off Bermuda. *Limnology and Oceanography*. 43: 921-935.
- Gupta, M., Chyi, Y. S., Romero-Severson, J. y Own, J. L. 1994. Amplification of DNA markers from evolutionary diverse genomes using single primers of simple-sequence repeats. *Theoretical Applied Genetics*. 89: 998-1006.
- John, D. M., Whitton, B. A. y Brook, A. J. 2002. *The Freshwater Algal Flora of the British Isles. An Identification Guide to Freshwater and Terrestrial Algae*. Cambridge University Press. United Kingdom. 707 pp.
- Jones, A. G., Östlund-Nilsson, S. y Avise, J. C. 1998. A microsatellite assessment of sneaked fertilizations and eggs thievery in the fifteen-spined stickleback. *Evolution*. 52: 848-858.
- Keeling, P. J. 2010. The endosymbiotic origin, diversification and fate of plastids. *Philosophical Transactions of the Royal Society B*. 365: 729-748.
- Kudela, R. M.; Howard, M. D. A.; Jenkins, B. D.; Miller, P. E.; Smith, G. J. 2010. Using the molecular toolbox to compare harmful algal blooms in upwelling systems. *Progress in Oceanography*. 85(1-2): 108-121.
- Lee, R. E. 2008. *Phycology*. Cambridge University Press. 4th ed. United States of America. 547 pp.

- Lèpere, C., Masquelier, S., Mangot, J. F., Debroas, D. y Domaizon, I. 2010. Vertical structure of small eukaryotes in three lakes that differ by their trophic status: a quantitative approach. *The ISME Journal*. 4: 1509-1519.
- Lewis, R. J., Jensen, S. I., DeNicola, D. M., Miller, V. I., Hoagland, K. D. y Ernest, S. G. 1997. Genetic variation in the diatom *Fragilaria capucina* (Fragilariaceae) along a latitudinal gradient across North America. *Plant Systematics and Evolution*. 204: 99-108.
- Litvaitis, M. K. 2002. A molecular test of cyanobacterial phylogeny: inferences from constraint analyses. *Hydrobiologia*. 468: 135-145.
- López-Adrián, S. J. y Barrientos-Medina, R. C. 2005. Diversidad y distribución del fitoplancton de agua dulce en la Península de Yucatán, México. *Ibugana*. 13 (2): 3-12.
- Lundholm, N., Daugbjerg, N. y Moestrup, O. 2002. Phylogeny of the Bacillariaceae with emphasis on the genus *Pseudo-nitzschia* (Bacillariophyceae) based on partial LSU rDNA. *European Journal of Phycology*. 37: 115-134.
- Lyra, C., Hantula, J., Vainio, E., Rapala, J., Rouhiainen, L. Sivonen, K. 1997. Characterization of Cyanobacteria by SDS-Page of whole-cell proteins and PCR/RFLP of the 16 rRNA gene. *Archives of Microbiology*. 168: 176-184.
- McCracken G. F., Burghard, G. M. y Houst, S. E. 1999. Microsatellites marker and multiple paternity in the garter snake *Thamnophis sirtalis*. *Molecular Ecology*. 8:1475-1479.
- Margalef, R. 1983. *Limnología*. Omega. España. 1010 pp.
- Nava-Ruíz, V. M. y Valadez, F. 2012. Flora planctónica de laguna Lagartos, Quintana Roo. *Revista Mexicana de Biodiversidad*. 83 (3): 561-582.
- Neilan, B. A., Stuart, J. L., Goodman, A. E., Cox, P. T. y Hawkins, P. R. 1997. Specific amplification and restriction polymorphisms of the Cyanobacterial rRNA operon spacer region. *Systematic and Applied Microbiology*. 20: 612-621.

- Not, F., Gausling, R., Azam, F., Heidelberg, J. F. y Worden, A. Z. 2007. Vertical distribution of picoeukaryotic diversity in the open ocean. *Environmental Microbiology*. 9: 1233-1252.
- Novelo, E. y Tavera, R. 2011. Un panorama gráfico de las algas de agua dulce de México. *Hidrobiológica*. 21 (3): 333-341.
- Oliva-Martínez, M. G., Godínez-Ortega, J. L. y Zuñiga-Ramos, C. A. 2013. Biodiversidad del fitoplancton de aguas continentales en México. *Revista Mexicana de Biodiversidad*. DOI: 10.7550/rmb.32706.
- Olsen, G. J. y Woese, C. R. 1993. Ribosomal RNA: a key to phylogeny. *FASEB Journal*. 7: 113-23.
- Otero, A. A., De la Cruz, M. y Oyama, K. 1997. El uso de los RAPDs como marcadores moleculares en plantas. *Boletín de la Sociedad Botánica de México*. 60: 85-117.
- Otsuka, S., Suda, S., Li, R., Watanabe, M., Oyaizu, H., Matsumoto, S. y Watanabe, M. 1998. 16S rDNA sequences and phylogenetic analyses of *Microcystis* strains with and without phycoerythrin. *FEMS Microbiology Letters*. 164: 119-124.
- Parker, P. G., Snow, A. A., Schug, M. D., Booton, G. C. y Fuerst, P. A. 1998. What molecules can tell us about populations: choosing and using a molecular marker. *Ecology*. 79: 361-382.
- Rentería-Alcántara, M. 2007. Breve revisión de los marcadores moleculares. *In: Ecología Molecular*. L. E. Eguiarte, V. Souza y X. Aguirre (comps). Instituto Nacional de Ecología. pp 541-566.
- Rodicio, M. R. y Mendoza, M. C. 2004. Identificación bacteriana mediante secuenciación del ARNr 16S: fundamento, metodología y aplicaciones en microbiología clínica. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*. 22 (4): 238-45.
- Rynearson, T. A. y Armbrust, A. V. 2000. DNA fingerprinting reveals extensive genetic diversity in a field population of the centric diatom *Ditylum brightwellii*. *Limnology and Oceanography*. 45 (6): 1329-1340.

- Savelkoul, P. H. M., Aarts H. J. M., De Haas, J., Dijkshoorn, L., Duim, B., Otsen, M., Rademaker, J. L. W., Schouls, L. y Lenstra, J. A. 1999. Amplified-fragment length polymorphism analysis: the state of an art. *Journal of Clinical Microbiology*. 37: 3083–3091.
- Sambamurthy, A. V. S. S. 2005. *A Text Book of Algae*. I. K. International. India. 322 pp.
- Sánchez, M., Alcocer, J., Escobar, E. y Lugo, A. 2002. Phytoplankton of cenotes and anchialine caves along a distance gradient from the northeastern coast of Quintana Roo, Yucatan Peninsula. *Hydrobiologia*. 467: 79-89.
- Sato, S., Nishimura, T., Uehara, K., Sakanari, H., Tawong, W., Hariganeya, N., Smith, K., Rhodes, L., Yasumoto, T., Taira, Y., Suda, S., Yamaguchi, H. y Adachi, M. 2011. Phylogeny of *Ostreopsis* along west Pacific coast, with special reference to a Novel Clade from Japan. *PLoS ONE*. 6 (12): e27983. Doi: 10.1371/journal.pone.0027983.
- Sherwood, A. R., Chan, Y. L. y Presting, G. G. 2008. Application of universally amplifying plastid primers to environmental sampling of a stream periphyton community. *Molecular Ecology Resources*. 8 (5): 1011-1014.
- Sherwood, A. R. y Presting, G. G. 2007. Universal primers amplify a 23S rDNA plastid marker in Eukaryotic algae and Cyanobacteria. *Journal of Phycology*. 43 (3): 605-608.
- Simpson J. 1997. Amplified fragment length polymorphisms. *Boletín de la Sociedad Botánica de México*. 60:73-76.
- Sommer, U. 1984. The paradox of plankton: Fluctuations in phosphorus availability maintain diversity in flow-through cultures. *Limnology and Oceanography*. 29: 633-636.
- Stevenson, R. J. 1996. An introduction to algal ecology in freshwater benthic habitats. *In: Algal Ecology: Freshwater Benthic Ecosystems*. R. J. Stevenson, M. L. Bothwell, R. L. Lowe (Eds). Academic Press. pp. 3-30.
- Turpin, D. H. y Harrison, P. J. 1979. Limiting nutrient patchiness and its role in phytoplankton ecology. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*. 39: 151-166.

- Urbach, E. y Chisholm, S. W. 1998. Genetic diversity in *Prochlorococcus* populations flowcytometrically sorted from the Sargasso Sea and Gulf Stream. *Limnology and Oceanography*. 43: 1615–1630
- Valadez, F. y Hernández-Terrones, L. M. 2012. Diatomeas perifíticas de laguna Lagartos, Akumal, Quintana Roo. In: *Recursos Acuáticos Costeros del Sureste. Vol. 1*. A. Sánchez, X. Chiappa-Carrara y R. Brito-Pérez (eds). RECORECOS. pp. 147-159.
- Valiente-Moro, C., Crouzet, O., Rasconi, S., Thouvenot, A., Coffe, G., Batisson, I. y Bohatier, J. 2009. New design strategy for development of specific primer sets for PCR-based detection of Chlorophyceae and Bacillariophyceae in environmental samples. *Applied and Environmental Microbiology*. 75 (17): 5729-5733.
- Van den Hoek, C., Mann, D. G. y Jahns, H. M. 1995. *Algae. An Introduction to Phycology*. Cambridge University Press. United States of America. 625 pp.
- Van Hannen, E. J., Van Agterveld, M. P., Gons, H. J. y Lanbroek, H. J. 1998. Revealing genetic diversity of eukaryotic microorganisms in aquatic environments by denaturing gradient gel electrophoresis. *Journal of Phycology*. 34: 206-213.
- Vendramin G. G., Anzide, M. y Bucci, G. 1998. Distribution of genetic diversity in *Pinus pinaster* Ait. as revealed by chloroplast microsatellites. *Theoretical and Applied Genetics*. 97: 456-463.
- Vos, P., Hogers, R., Bleeker, M., Reijans, M., Van de Lee, T., Hornes, M., Friters, A., Pot, J., Paleman, J., Kuiper, M. y Zabeau, M. 1995. AFLP: a new technique for DNA fingerprinting. *Nucleic Acids Research*. 23 (21): 4407-4414.
- Wehr, J. D. y Sheath, R. G. 2003. *Freshwater Algae of North America. Ecology and classification*. Academic Press. United States of America. 918 pp.
- Williams, J. G. K., Kubelik, A. R., Livak, K. J., Rafalski, J. A. y Tingey, S. V. 1990. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nucleic Acids Research*. 18: 6531-6535

- Wilmotte, A., Turner, S., Van de Peer, Y. y Pace, N. R. 1992. Taxonomic study of marine Oscillatoriacean strains (Cyanobacteria) with narrow trichomes. II. Nucleotide sequence analysis of the 16S ribosomal RNA. *Journal of Phycology*. 28: 828-838.
- Wood, A. M. y Townsend, D. 1990. DNA Polymorphism within the WH7803 Serogroup of marine *Synechococcus* spp. (Cyanobacteria). *Journal of Phycology*. 26 (3): 576-585.
- Zhu, F., Massana, R., Not, F., Marie, D. y Vaultot, D. 2005. Mapping of picoeukaryotes in marine ecosystems with quantitative PCR of the 18S rRNA gene. *FEMS Microbiology Ecology*. 52: 79-92.
- Zubkov, M. V., Fuchs, B. M. y Tarran, G. A. 2003. High uptake of organic nitrogen compounds by *Prochlorococcus* cyanobacteria as a key to their dominance in oligotrophic ocean waters. *Applied Environmental Microbiology*. 69: 1299–1304.
- Zuckerlandl, E. y Pauling, L. 1965. Molecules as documents of evolutionary history. *Journal of Theoretical Biology*. 8: 357-66.

CAPÍTULO II. PARÁMETROS FÍSICO-QUÍMICOS Y NUTRIENTES DE DOS CENOTES DE QUINTANA ROO

INTRODUCCIÓN

En la parte sureste de México se encuentra la Península de Yucatán, la península recibe más del 50% del volumen total de agua de lluvia de todo el país (Alcocer y Escobar, 1996), no obstante, se caracteriza por la ausencia de cuerpos acuáticos superficiales (Alcocer y Escobar, 1996; Schmitter-Soto *et al.*, 2002b; Marín *et al.*, 2004). Esto se debe a que la mayor parte del agua de lluvia se infiltra al subsuelo por la permeabilidad de la roca caliza (Schmitter-Soto *et al.*, 2002b; Beddows *et al.*, 2007; Bauer-Gottwein *et al.*, 2011). El agua que llega al subsuelo se almacena y fluye dentro de un acuífero de tipo karst, este tipo de acuíferos se caracteriza por poseer tres escalas de porosidad. La primera porosidad es aquella propia de la roca, es decir, la que se encuentra entre los espacios intergranulares; las fracturas en la roca son la segunda escala de porosidad y, finalmente, la tercera escala de porosidad comprende una intrincada red de cavernas inundadas (Worthington *et al.*, 2000). Aunado a esto el acuífero de tipo karst de la Península de Yucatán sobresale por ser un acuífero de tipo costero, es decir, posee una constante conexión hidráulica con el océano, por lo cual el acuífero llega a tener una intrusión salina proveniente del mar (Perry *et al.*, 2002), la cual llega a alcanzar varios kilómetros tierra adentro, por lo que el lente de agua dulce es relativamente delgado, variando entre 10 y 100 m de espesor (Bauer-Gottwein *et al.*, 2011).

El acuífero es la principal fuente de agua dulce en la Península de Yucatán (White *et al.*, 1995; Cervantes-Martínez *et al.*, 2009). En este sistema los colapsos de roca caliza, o dolinas son propios de este medio (Vélez-Otálvaro, 1999); cuando uno de estos colapsos llega a tener contacto con el acuífero se les denomina localmente como cenote, los cenotes son evidencia de la interacción topográfica con el acuífero (Alcocer *et al.*, 1998). Gracias a los cenotes, el agua del acuífero queda expuesta a la atmosfera, permitiéndonos estudiar su circulación, almacenamiento, propiedades físico-químicas, así como sus interacciones con el medio físico, biológico y sus reacciones a la acción del hombre de manera directa, tal y como se realiza en cuerpos acuáticos superficiales,

debido a esto, los cenotes son utilizados como objeto de estudio en investigaciones de tipo limnológico.

Limnológicamente hablando, los cuerpos de agua dulce se clasifican en lénticos y lóticos (Curtis *et al.*, 2008). Los cuerpos de agua lénticos se caracterizan por poseer un flujo multidireccional de sus aguas, por lo que las tasas de renovación de sus aguas son variables y lentas; en contraste los sistemas lóticos son aquellos que tienen un flujo unidireccional a lo largo de una pendiente y responden a la fuerza de la gravedad, dando como resultado una renovación constante de sus aguas (Wetzel, 2001). Schmitter-Soto *et al.* (2002a) proponen que los cenotes pueden ser clasificados tanto en sistemas lénticos y lóticos. Los cenotes lénticos son aquellos en los que la sedimentación ha bloqueado casi en su totalidad la entrada y salida del agua, por lo que el intercambio de agua con el acuífero está restringido, provocando que las aguas de estos cenotes sean turbias, térmicamente estratificadas y sobresaturadas en oxígeno (Schmitter-Soto *et al.*, 2002a). En contraste, los cenotes lóticos están bien interconectados con el acuífero a través de fracturas, haciendo que el intercambio de agua sea constante; las aguas de estos cenotes se caracterizan por ser claras, térmicamente homogéneas y bien oxigenadas a lo largo de la columna (Schmitter-Soto *et al.*, 2002a). Estas características, junto con el pH y la concentración de elementos como calcio, nitrógeno, fósforo y hierro hacen que los cenotes, y en general los cuerpos de agua dulce, se clasifiquen por sus diferentes estados tróficos (Wetzel, 2001).

La trofía se refiere a la cantidad de materia orgánica, autóctona o alóctona, que se encuentra en un cuerpo dulceacuícola en un período dado. En otras palabras, la trofía representa la cantidad de materia orgánica generada en el cuerpo de agua o fuera de él en un lapso de tiempo (Wetzel, 2001). En cuanto a los cenotes, la materia orgánica autóctona es producida por las microalgas y bacterias sulfo-reductoras, en contraste, la materia orgánica alóctona proviene de los alrededores del cenote y su principal incorporación al cuerpo de agua es durante la temporada de lluvias, ya que troncos, hojas, organismos y materiales disueltos por la actividad antropogénica son arrastrados hacia los cenotes (Schmitter-Soto *et al.*, 2002b). Debido a la cantidad de materia orgánica que se puede encontrar en los cuerpos de agua dulce, estos se han clasificado en diferentes estados tróficos, los cuales van desde oligotróficos a eutróficos (Naumann, 1919).

Naumann (1919) fue quien introdujo los conceptos de oligotrofia y eutrofia, originalmente estos conceptos se diferenciaban en función de las poblaciones fitoplanctónicas, sin embargo, hoy en día estos conceptos han evolucionado integrando conocimientos de otras áreas como la geomorfología, la física, la química y la biología. Los cuerpos dulceacuícolas en estado oligotrófico son aquellos que poseen una alta diversidad de especies fitoplanctónicas pero una baja producción de materia orgánica ($< 3.5 \text{ mg m}^{-3} \text{ Chl } a$); la carga de nutrientes también es baja ya que el fósforo y el nitrógeno se encuentran a concentraciones menores a 10 y 350 mg m^{-3} respectivamente; además de que el oxígeno disuelto se encuentra en abundancia a lo largo de la columna de agua (Smith *et al.*, 1999; Burkholder y Gilbert, 2001; Schmitter-Soto *et al.*, 2002a). Los cuerpos de agua que se encuentran en estado eutrófico están conformados por una comunidad fitoplanctónica integrada principalmente por cianobacterias, por lo que su diversidad es baja, pero su producción en materia orgánica es muy elevada, rebasando los 20 mg m^{-3} de clorofila *a*. La carga de nutrientes es de igual manera alta ya que la concentración de fósforo es de 100 mg m^{-3} y la de nitrógeno llega hasta los 1 200 mg m^{-3} . Las concentraciones de oxígeno disuelto son bajas a lo largo de la columna de agua, principalmente en el fondo donde se llega inclusive a la anoxia (Smith *et al.*, 1999; Burkholder y Gilbert, 2001; Schmitter-Soto *et al.*, 2002a).

El que un cuerpo de agua pase de un estado oligotrófico a un estado eutrófico se conoce como eutrofización y alrededor del mundo se ha convertido, desde hace varios años, en un problema de suma importancia (De La Lanza-Espino y García-Calderón, 2002). La eutrofización conlleva al deterioro en la calidad del agua y una limitación en el uso del recurso hídrico, por lo que prevenir, ralentizar e identificar este proceso es de vital importancia. Las microalgas son fundamentales en los cuerpos dulceacuícolas y algunas especies responden rápidamente al aumento en la concentración de los nutrientes, es decir, a la eutrofización; esto se debe a que las microalgas están inmersas en el medio y los nutrientes están en contacto con toda su superficie (López-Fuerte, 2010). Las especies con un óptimo crecimiento en elevadas concentraciones de nutrientes son estimuladas, por lo tanto su incremento se da de manera exponencial y reemplazan a las especies que crecen de mejor manera a concentraciones bajas de nutrientes (Burkholder y Gilbert, 2001). El incremento de los nutrientes generalmente promueve un decrecimiento en la diversidad de las especies de microalgas y cambia la dominancia de diatomeas por

la de las algas verdes filamentosas o cianobacterias cocoides (Wetzel, 2001; Burkholder y Gilbert, 2001; John *et al.*, 2002; Wehr y Sheath, 2003; Oliva-Martínez *et al.*, 2013).

Entre las especies microalgales favorecidas por el enriquecimiento de los nutrientes, hay algunas como las cianobacterias, que son tóxicas para el zooplancton, los peces y la vida en general de los cuerpos dulceacuícolas (Wetzel, 2001; Burkholder y Gilbert, 2001; John *et al.*, 2002; Wehr y Sheath, 2003; Lee, 2008; Bellinger y Sigee, 2010; Oliva-Martínez *et al.*, 2013). Por lo tanto es importante conocer a las especies o comunidades, que por su presencia nos puedan proveer información sobre las condiciones físicas y químicas de un sitio, lo cual es de vital importancia para determinar la “salud” de un cuerpo dulceacuícola (Burkholder y Gilbert, 2001; Bellinger y Sigee, 2010).

A pesar de la importancia que tienen las microalgas como indicadoras de la calidad del agua de cuerpos acuáticos, no solo a nivel ecológico, sino también a nivel económico, es de remarcar el poco conocimiento que se tiene sobre el tema (Burkholder y Gilbert, 2001), principalmente en zonas tan distintivas como lo es la Península de Yucatán. La península está sujeta a un rápido desarrollo urbano y económico, particularmente a lo largo de la línea costera del Caribe, donde el desarrollo turístico es más alto (Schmitter-Soto *et al.*, 2002a; Bauer-Gottwein *et al.*, 2011), representando un riesgo significativo para el acuífero y la Península (Beddows *et al.*, 2007), por lo que un manejo apropiado del ecosistema es indispensable y la sustentabilidad de los cenotes es una actividad que cada vez toma más importancia. Es por esta razón que este trabajo tiene como objetivo principal determinar las características físico-químicas y de nutrientes de dos cenotes en el norte del estado de Quintana Roo, México.

OBJETIVOS

1. Objetivo General

Determinar las características físico-químicas y de nutrientes de dos cenotes en el norte del estado de Quintana Roo, México.

2. Objetivos Particulares

Caracterizar físico-químicamente ambos cenotes durante el período muestreado.

Determinar las concentraciones de nutrientes de ambos sitios durante el período de muestreo.

MATERIALES Y MÉTODOS

1. Área de Estudio

El área de estudio se encuentra ubicada en el estado de Quintana Roo, situado en el extremo este del país, ocupando la porción oriental de la península de Yucatán; se encuentra entre los paralelos 17° 54' y 21° 36' de latitud norte y entre los meridianos 86° 45' y 89° 10' de longitud oeste, tiene una extensión superficial aproximada de 42 535 km²; limita al norte con el Golfo de México; hacia el este con el Mar Caribe; al sur con Belice y al oeste con los estados de Yucatán y Campeche (INEGI, 2005). Dentro de esta área, se seleccionaron dos cenotes, en cada uno de ellos se hizo un muestreo dentro de los primeros 0.3 m de agua durante la temporada de lluvias. El primero de ellos corresponde al cenote localizado en las inmediaciones de la ciudad de Playa del Carmen (S1) en el municipio de Solidaridad, Q. Roo, ubicado en las coordenadas 20° 40' 22'' de latitud Norte y 87° 06' 21'' de longitud Oeste (Figura 1). El segundo cenote se encuentra en las coordenadas 20° 57' 44'' de latitud Norte y 87° 16' 26'' longitud Oeste y es denominado como Laguna Leona Vicario (S4), se encuentra en las afueras del poblado del mismo nombre dentro del municipio de Benito Juárez, Q. Roo (Figura 1).

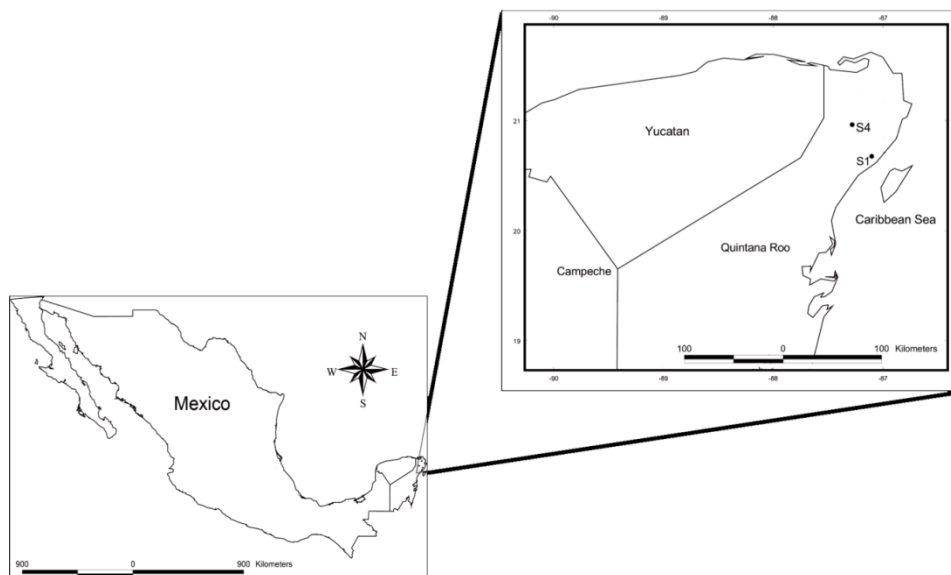


Figura 3. Ubicación de los sitios de muestreo, Playa del Carmen (S1) y Leona Vicario (S4). (Elaborado por el Biól. Juan Antonio Sánchez Jiménez).

2. Parámetros Físico-Químicos y Nutrientes

Los siguientes parámetros físico-químicos fueron tomados *in situ*: temperatura del agua, oxígeno disuelto, pH, conductividad y sólidos disueltos totales (SDT) por medio del equipo multiparamétrico YSI 600QS conectado a un almacenador electrónico YSI 650. La alcalinidad se midió utilizando la técnica de Gram por medio del potenciómetro XL60 de la marca accumet® en los laboratorios de la Unidad de Ciencias del Agua del CICY (APHA *et al.*, 1998).

Para la cuantificación de los Nitratos (N-NO₃), Nitritos (N-NO₂) y Fósforo reactivo soluble (P-PO₄) se tomaron muestras de agua de 250 ml en la superficie de los cenotes y se filtraron por medio de filtros Millipore® de 0.45 µm de apertura, del material filtrado se tomaron 60 ml y se almacenaron en condiciones de refrigeración (4 °C) en el laboratorio, donde fueron medidos utilizando el fotómetro Micro 7+ de la marca Exact® siguiendo las instrucciones del fabricante (APHA *et al.*, 1998).

RESULTADOS

1. Parámetros Físico-Químicos y Nutrientes

La temperatura del agua varió entre los cenotes 4.4 °C, siendo Leona Vicario el que registró una mayor temperatura con 32.3 °C, mientras que para el caso de Playa del Carmen se reportó una temperatura de 27.9 °C (Cuadro 1). El máximo valor de oxígeno disuelto fue registrado en Leona Vicario con 7.3 mg l⁻¹ y el mínimo con 2.2 mg l⁻¹ en Playa del Carmen. Para el caso de la Alcalinidad, ésta varió entre 192 mg l⁻¹ CaCO₃ en Playa del Carmen y 117 mg l⁻¹ CaCO₃ en Leona Vicario. Los valores más altos registrados para Conductividad fueron tomados en Playa del Carmen con 4 518 µS cm⁻¹, para el caso de Leona Vicario el valor fue menor con 628 µS cm⁻¹. El valor de Sólidos disueltos totales (*SDT) fue más alto en el cenote de Playa del Carmen, dando un valor de 2 789 mg l⁻¹, mientras que en el cenote de Leona Vicario fue 358 mg l⁻¹. En cuanto a los nutrientes, nitratos, nitritos y ortofosfatos en el cenote de Playa del Carmen se obtuvieron valores de 0.6, 0.05 y 0.024 mg l⁻¹ respectivamente, mientras que en el cenote de Leona Vicario sólo se registraron los ortofosfatos con un valor de 0.028 mg l⁻¹ mientras que los nitratos y nitritos no se detectaron.

Cuadro 5. Concentración de los parámetros físico-químicos y nutrientes de los cenotes muestreados. *SDT: Sólidos disueltos totales. **ND: No detectado.

	PLAYA DEL CARMEN	LEONA VICARIO
Temperatura del agua (°C)	27.9	32.3
O ₂ disuelto (mg l ⁻¹)	2.2	7.3
pH	7.5	7.7
Alcalinidad (mg l ⁻¹ CaCO ₃)	192	117
Conductividad (µS cm ⁻¹)	4 518	628
SDT* (g l ⁻¹)	2.789	0.358
N-NO ₃ (µg l ⁻¹)	600	ND**
N-NO ₂ (µg l ⁻¹)	50	ND**

P-PO ₄ (µg l ⁻¹)	24	28
---	----	----

En conclusión se pueden observar algunas diferencias marcadas entre los sitios de muestreo, principalmente en las concentraciones de oxígeno disuelto, conductividad, sólidos disueltos totales, nitratos y nitritos. Como ya se ha explicado previamente, algunos géneros de las microalgas son sensibles y estos cambios en las concentraciones de los parámetros físico-químicos y nutrientes afectan su crecimiento y permanencia dentro de un sistema acuático. López-Adrián y Barrientos-Medina (2005) reportaron la asociación de varias especies, principalmente las pertenecientes a las Divisiones de Cianobacteria, Bacillariophyta y Chlorophyta, con parámetros físico-químicos como temperatura, alcalinidad, conductividad y pH; por lo que es de suponer que las condiciones ambientales juegan un papel importante en la composición de la comunidad microalgal de cada cenote.

DISCUSIÓN

1. Temperatura del Agua

El clima de la Península de Yucatán se caracteriza por ser principalmente cálido sub-húmedo con una temperatura media de 26 °C (Suárez-Morales *et al.*, 1996; Schmitter-Soto *et al.*, 2002b) por lo que la temperatura superficial del cenote de Playa del Carmen es cercana a este valor con 27.9, por otro lado el cenote de Leona Vicario tuvo una temperatura de 32.3 °C, esta diferencia de 4.4 °C se debió a la hora del muestreo, mientras que en Playa del Carmen la temperatura se tomó a las 10 de la mañana en Leona Vicario el muestreo se realizó casi a las 3 de la tarde. De acuerdo con Reid y Wood (1976) la temperatura superficial de los cenotes los hacen clasificar como cuerpos de agua tropical.

2. Oxígeno Disuelto

El oxígeno disuelto está asociado con una oxidación química y biológica del acuífero (Alcocer *et al.*, 1998). La superficie de los cenotes posee la mayor concentración de oxígeno disuelto, esto debido a que el oxígeno cruza de la atmósfera hacia la superficie del agua, de igual manera la mayor cantidad de fotosíntesis se realiza en las

capas superiores de los cenotes por lo que aumentan los niveles de oxígeno disuelto (Alcocer *et al.*, 1998). En el caso de Playa del Carmen donde los valores de oxígeno disuelto fueron de 2.2 mg l^{-1} , posiblemente se deba a una alta tasa de respiración y degradación de materia orgánica, visto comúnmente en cuerpos de agua eutróficos. Por el contrario Leona Vicario presentó 7.3 mg l^{-1} de oxígeno disuelto, lo que indica una menor demanda de oxígeno, ya sea por respiración o por degradación de materia orgánica, lo que permite una acumulación de éste (Wehr y Sheath, 2003).

3. Alcalinidad y pH

Los cenotes de Playa del Carmen y de Leona Vicario registraron valores similares a los previamente reportados por Alcocer *et al.* (1998) con valores de calcita de 192 y 117 $\text{mg l}^{-1} \text{ CaCO}_3$ para Playa del Carmen y Leona Vicario respectivamente. El valor registrado en Playa del Carmen cae dentro del rango reportado previamente por Alcocer *et al.* (1998) quienes reportaron valores de alcalinidad que van desde los 138 hasta los 696 $\text{mg l}^{-1} \text{ CaCO}_3$. En el caso de Leona Vicario donde el valor detectado estuvo por debajo de lo referenciado, posiblemente se deba a las precipitaciones ocurridas en días previos al muestreo, disminuyendo la concentración de la alcalinidad (Alcocer *et al.*, 1998). Estos mismos resultados al ser expresados en bicarbonatos nos indican que dentro de los primeros 0.3 m de profundidad de ambos cenotes se mantiene una predominancia de la especie bicarbonatos, ya que se obtuvieron valores de $469 \text{ mg l}^{-1} \text{ HCO}_3^-$ para Playa del Carmen y $286 \text{ mg l}^{-1} \text{ HCO}_3^-$ para Leona Vicario respectivamente. De acuerdo con Alcocer *et al.* (1998) el aporte de agua freática rica en carbonatos (CO_3^{2-}) y bicarbonatos (HCO_3^-) ayuda a que estos valores de alcalinidad sean altos ($>150 \text{ mg l}^{-1} \text{ CaCO}_3$) (Feist y Kevern, 1989). Sin embargo, la roca caliza no es la única fuente de carbono (C) en el agua, también hay factores biológicos, como la fotosíntesis y la respiración, y atmosféricos como el bióxido de carbono (CO_2), que proporcionan este elemento y dependiendo de la concentración de iones hidronio disueltos en el agua, es decir pH, este carbono se disociará en diferentes especies carbonatadas. Generalmente los valores de pH de los cenotes de la Península de Yucatán tienden a ser ligeramente ácidos (<7) (Perry *et al.*, 2002; Schmitter-Soto *et al.*, 2002a), esto se debe a que el acuífero está conformado por rocas ricas en carbonato de calcio (CaCO_3), las cuales al estar en contacto con el agua producen bióxido de carbono (CO_2) disuelto que es transformado en ácido carbónico

(H_2CO_3) (Schmitter-Soto *et al.*, 2002b). Sin embargo, los cenotes muestreados tuvieron una tendencia opuesta, ya que sus valores de pH tienden a la alcalinidad (>7), esto posiblemente se deba a que las muestras fueron colectadas en los primeros 0.3 m de la columna de agua de los cenotes. La superficie de los cenotes tiende a la alcalinidad debido a que la fotosíntesis causa que el bicarbonato (HCO_3^-) se transforme en CO_2 , esto resulta en la liberación de un ion hidroxilo (OH^-), lo que eleva el pH. Los valores de pH reportados para ambos cenotes muestreados tuvieron una ligera tendencia hacia la alcalinidad con valores que van desde 7.5 a 7.7, estos valores son parecidos a los reportados previamente por Alcocer *et al.* (1998), quienes reportaron valores entre 6.7 y 7.9 de pH en cinco cenotes cercanos a la zona de Tulum y Schmitter-Soto *et al.* (2002a) obtuvieron un pH promedio de 7.5 después de haber evaluado 30 cenotes en la zona norte de la Península de Yucatán.

4. Conductividad

Dadas las características geológicas de la Península de Yucatán, ésta le otorga valores de conductividad altos a sus aguas, por lo tanto ésta llega a ser superior a los $600 \mu\text{S cm}^{-1}$ (Alcocer y Escobar, 1996). Schmitter-Soto *et al.* (2002a) muestrearon 30 cenotes de la parte norte de la Península de Yucatán obteniendo un promedio de $1\ 645 \mu\text{S cm}^{-1}$ y valores que van desde los $42.5 \mu\text{S cm}^{-1}$ hasta los $7\ 390 \mu\text{S cm}^{-1}$. En el caso de los cenotes estudiados en este trabajo, en ambos se observa una conductividad superior a lo mencionado por Alcocer y Escobar (1996), siendo Playa del Carmen el más alto con $4\ 518 \mu\text{S cm}^{-1}$, mientras que Leona Vicario registró un valor de $628 \mu\text{S cm}^{-1}$, esto posiblemente se deba a que en días anteriores al muestreo se presentaron precipitaciones en la zona de Leona Vicario, las cuales disminuyen los niveles de conductividad.

5. Sólidos Disueltos Totales (SDT)

La concentración de sólidos disueltos totales en los cenotes muestreados es característica de sistemas dulceacuícolas ya que está por debajo de los 3 g l^{-1} (Alcocer *et al.*, 1998; Schmitter-Soto *et al.*, 2002a; Schmitter-Soto *et al.*, 2002b) con 2.789 y 0.358 g l^{-1} para Playa del Carmen y Leona Vicario respectivamente. En el caso de Leona Vicario

donde los valores fueron menores, posiblemente se deban a las precipitaciones que ocurrieron en días previos al muestreo, las cuales disminuyen la concentración de los SDT por medio de la disolución; en el caso del cenote de Playa del Carmen, en donde la concentración fue mayor, esto se puede deber a que en este cenote se observó la presencia de patos y gansos (avifauna) que anidan en el sitio, así mismo se detectaron residuos sólidos de origen antropogénico que pueden aumentar la concentración de SDT. Asociado a esto, en este sitio no ocurrieron precipitaciones previas al muestreo lo que favorece de igual manera la concentración de SDT. Alcocer *et al.* (1998) registraron valores de SDT en cinco sitios cercanos a Tulum, detectando un promedio de 6.210 g l^{-1} , sin embargo, este dato se ve incrementado por la intrusión salina que hubo en uno de los sitios de muestreo; por otro lado los demás sitios tuvieron valores que fueron de 0.5 a 2.9 g l^{-1} , catalogándolos como agua dulce, al igual que nuestros lugares de muestreo.

6. Nitratos

Los niveles registrados en el cenote de Playa del Carmen para los nitratos tuvieron un valor de $600 \text{ } \mu\text{g l}^{-1}$, Alcocer *et al.* (1998) reportaron un valor promedio de $850 \text{ } \mu\text{g l}^{-1}$ de nitratos; por otro lado Schmitter-Soto *et al.* (2002a) tuvieron un promedio de $1\ 090 \text{ } \mu\text{g l}^{-1}$ en 30 cenotes del norte de la península. Generalmente estos valores aumentan durante la temporada de lluvias debido a los arrastres de materia orgánica, fertilizantes y pesticidas a los cenotes. Los nitratos son nutrientes que ya se han reportado previamente en el acuífero (Alcocer *et al.*, 1998; Sánchez *et al.*, 1998; Schmitter-Soto *et al.*, 2002a). Estos se relacionan con la vegetación circundante y materia orgánica del sitio, no obstante, también fertilizantes, pesticidas y fosas sépticas pueden incrementar las concentraciones de nitratos en el cenote (Van der Kamp, 1995; Alcocer *et al.*, 1998; Schmitter-Soto *et al.*, 2002a). Sin embargo, estos datos no representan un peligro para la salud ya que la NOM-127-SSA1-1994 indica que el límite máximo permisible para este nutriente en agua potable es de $1\ 000 \text{ } \mu\text{g l}^{-1}$. En el cenote de Leona Vicario no se detectaron nitratos.

7. Nitritos

Para el caso de los nitritos estos fueron detectados en el cenote de Playa del Carmen con una concentración de $50 \text{ } \mu\text{g l}^{-1}$, mientras que para el cenote de Leona Vicario

no se detectaron. Alcocer *et al.* (1998) registraron un valor promedio de $4 \mu\text{g l}^{-1}$, por otra parte Schmitter-Soto *et al.* (2002a) tuvieron un valor promedio de $10 \mu\text{g l}^{-1}$ durante su muestreo de 30 cenotes. El valor registrado durante nuestro muestreo fue más alto que el citado previamente, concentraciones altas de nutrientes son comunes en sitios cercanos a áreas urbanas (Schmitter-Soto *et al.*, 2002a). El cenote de Playa del Carmen se encuentra a escasos 350 m de una zona habitacional conocida como Villas del Sol en Playa del Carmen, por lo que aguas residuales cargadas con iones amonio (NH_4^+) están llegando al cenote muestreado (Martínez, 2014; Pacheco, 2014), el amonio se oxida por medio de un proceso biológico denominado nitrificación, de esta manera se transforma en nitritos (NO_2), por lo que los niveles de este compuesto se ven elevados. No obstante, estos valores no implican un daño a la población debido a que de acuerdo a la NOM-127-SSA1-1994 el límite máximo permisible para este nutriente en agua potable es de $1\ 000 \mu\text{g l}^{-1}$.

8. Ortofosfatos

Los ortofosfatos fueron detectados en ambos sitios, tanto en Playa del Carmen como en Leona Vicario con valores de 24 y $28 \mu\text{g l}^{-1}$ respectivamente. El fósforo es escaso en los cenotes debido a que la roca caliza abunda en la Península de Yucatán, ésta, al estar conformada por calcio, promueve la precipitación del fósforo (Margalef, 1986). Alcocer *et al.* (1998) detectaron un valor promedio de $5 \mu\text{g l}^{-1}$ durante la temporada de secas en cenotes cercanos a Tulum, sin embargo, es frecuente que estos valores lleguen a elevarse por causas antropogénicas, tales como, desechos orgánicos, fertilizantes y detergentes (Schmitter-Soto *et al.*, 2002b), como los reportados por Schmitter-Soto *et al.* (2002a), quienes registraron valores promedio de $180 \mu\text{g l}^{-1}$ en 30 cenotes de la zona norte de la Península de Yucatán.

CONCLUSIÓN

Los datos obtenidos de los parámetros físico-químicos y de los nutrientes de los cenotes muestreados son similares a otros sitios en los que se han realizado análisis de la misma índole (Alcocer *et al.*, 1998; Schmitter-Soto *et al.*, 2002a). Por lo que los datos obtenidos de condiciones físico-químicas y de nutrientes parecen estar dentro del rango de variación reportado previamente por Alcocer *et al.* (1998) y Schmitter-Soto *et al.*

(2002a) en la zona somera de los cenotes. Estas características proveen las condiciones suficientes para que especies en particular puedan sobrevivir, como es el caso de las diatomeas, las cuales son las microalgas más diversas en el estado, haciendo suponer que el entorno donde habitan posee cualidades particulares para su desarrollo; claro está, sólo se realizó un muestreo puntual en dos cenotes de la Península de Yucatán y falta más investigación para llegar a un consenso sobre esto. En el presente estudio los datos obtenidos de oxígeno disuelto, nitratos y nitritos aportaron evidencia para suponer que el cenote de Playa del Carme tiene características de un sitio eutrófico, lo que se puede relacionar con la influencia antropogénica, mientras que el cenote de Leona Vicario podría ser oligotrófico, no obstante, no se utilizó un índice trófico.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Alcocer, J., Lugo, A., Marín, L. E. y Escobar, E. 1998. Hydrochemistry of waters from five cenotes and evaluation of their suitability for drinking-water supplies, northeastern Yucatan, Mexico. *Journal of Hydrogeology*. 6 (2): 293-301.
- Alcocer, J. y Escobar, E. 1996. Limnological regionalization of Mexico. *Lakes and Reservoirs: Research and Management*. 2 (1-2): 55-69.
- APHA, AWWA y WEF. 1998. *Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater*. American Public Health. 20^a ed. United States of America. 1269 pp.
- Bauer-Gottwein, P., Gondwe, B. R., Charvet, G., Marín, L. E., Rebolledo-Vieyra, M., Merediz-Alonso, G. 2011. Review: The Yucatan Peninsula karst aquifer, Mexico. *Hydrogeology Journal*. 19 (3): 507-524.
- Beddows, P. A.; Smart, P. L.; Whitaker, F. F.; y Smith, S. L. 2007. The coupled freshsaline groundwater circulation of a coastal carbonate acuífer: Spatial patterns of temperature and specific electrical conductivity. *Journal of Hydrology*. 346: 18-32.
- Bellinger, E. G. y Siegee, D. C. 2010. *Freshwater algae. Identification and use as bioindicators*. Wiley-Blackwell. United States of America. 271 pp.
- Burkholder, J. y Gilbert, P. M. 2001. Eutrophication and oligotrophication. *Encyclopedia of Biodiversity*. 2: 649-670.
- Cervantes-Martínez, A., Mezeta-Barrera, M. y Gutiérrez-Aguirre, M. A. 2009. Limnología básica del lago cárstico turístico Cenote Azul en Quintana Roo, México. *Hidrobiológica*. 19(2): 177-180.
- Curtis, H., Barnes, S., Schnek, A. y Massarini, A. 2008. *Biología*. Médica Panamericana. 7^a ed. España. 1160 pp.
- De La Lanza-Espino, G. y García-Calderón, J. L. 2002. *Lagos y Presas de México*. Centro de Ecología y Desarrollo. México. 320 pp.

- Feist, T. J. y Kevern, N. R. 1989. Nutrient study of a new reservoir, Sessions Lake Michigan. *Michigan Academician Journal*. 21 (4): 339-58.
- Hutchinson, G. E. 1957. *A Treatise on Limnology*. Vol. 1. Wiley. United States of America. 1015 pp.
- INEGI. 2005. *Estudio hidrológico del estado de Quintana Roo*. Instituto Nacional de Estadística Geografía e Informática. México. 96 pp.
- John, D. M., Whitton, B. A. y Brook, A. J. 2002. *The Freshwater Algal Flora of the British Isles. An Identification Guide to Freshwater and Terrestrial Algae*. Cambridge University Press. United Kingdom. 707 pp.
- Lee, R. E. 2008. *Phycology*. Cambridge University Press. 4th ed. United States of America. 547 pp.
- López-Adrián, S. J. y Barrientos-Medina, R. C. 2005. Diversidad y distribución del fitoplancton de agua dulce en la Península de Yucatán, México. *Ibugana*. 13 (2): 3-12.
- López-Fuerte, F. O. 2010. *Diversidad alfa y beta de diatomeas epilíticas en oasis de Baja California Sur (Tesis Doctoral)*. Centro Interdisciplinario de Ciencias Marinas. Instituto Politécnico Nacional. México. 109 pp.
- Margalef, R. 1986. *Ecología*. Omega. España. 951 pp.
- Marín, S. L., Pacheco, A. J. y Méndez, R. R. 2004. Hidrogeología de la Península de Yucatán. In: *El Agua en México vista desde la Academia*. B. Jiménez y L. Marín (eds). Academia Mexicana de Ciencias. pp. 159-176.
- Martínez, P. 2014. Estragos por contaminación. *Quequi*.
- Naumann, E. 1919. Nagra synpunkter angående limnoplanktons okologi med sarskild hansyn till fytoplankton. *Svensk Botanisk Tidskrift*. 13: 34.

- Nava- Ruíz, V. M. y Valadez, F. 2012. Flora planctónica de laguna Lagartos, Quintana Roo. *Revista Mexicana de Biodiversidad*. 83: 561-582.
- Oliva-Martínez, M. G., Godínez-Ortega, J. L. y Zuñiga-Ramos, C. A. 2013. Biodiversidad del fitoplancton de aguas continentales en México. *Revista Mexicana de Biodiversidad*. DOI: 10.7550/rmb.32706.
- Pacheco, D. 2014. Exigen compromiso para resarcir daño ambiental. *Novedades Quintana Roo*.
- Perry, E., Vélazquez-Oliman, G. y Marin, L. 2002. The hydrogeochemistry of the karst aquifer system of the northern Yucatan Peninsula, Mexico. *International Geology Review*. 44: 191-221.
- Reid, G. K. y Wood, R. D. 1976. *Ecology of Inland Waters and estuaries*. D. Van Nostrand Company. 2ª ed. United States of America. 485 pp.
- Schmitter-Soto, J. J., Comín, F. A., Escobar-Briones, E., Herrera-Silveira, J., Alcocer, J., Suárez-Morales, E., Elías-Gutiérrez, M., Díaz-Arce, V., Marín, L. E. y Steinich, B. 2002a. Hydrogeochemical and biological characteristics of cenotes in the Yucatan Peninsula (SE Mexico). *Hydrobiologia*. 467: 215-228.
- Schmitter-Soto, J. J., Escobar-Briones, E., Alcocer, J., Suárez-Morales, E., Elías-Gutiérrez, M. y Marín, L. E. 2002b. Los cenotes de la Península de Yucatán. *In: Lagos y Presas de México*. G. De La Lanza-Espino y J. L. García-Calderón (eds). Centro de Ecología y Desarrollo. pp 337-381.
- Smith, V. H., Tilman, G. D. y Nekola, J. C. 1999. Eutrophication: impacts of excess nutrient inputs on freshwater, marine, and terrestrial ecosystems. *Environmental Pollution*. 100 (1): 179-196.
- Suárez-Morales, E. Reid, J. W., Iliffe, T. M. y Fiers, F. 1996. Catálogo de los copépodos (Crustacea) continentales de la Península de Yucatán, México. CONABIO/ECOSUR. México. 296 pp.

- Van der Kamp, G. 1995. The hydrogeology of springs in relation to the biodiversity of spring fauna: a review. *Journal of the Kansas Entomological Society*. 68: 4-17.
- Vélez-Otálvaro, M. V. 1999. *Hidráulica de Aguas Subterráneas*. Universidad Nacional de Colombia. 2ª ed. Colombia. 156 pp.
- Wehr, J. D. y Sheath, R. G. 2003. *Freshwater Algae of North America. Ecology and classification*. Academic Press. United States of America. 918 pp.
- Wetzel, R. 2001. *Limnology: Lake and River Ecosystems*. Academic Press. United States of America. 1006 pp.
- White, W. B., Culver, D. C., Herman, J. S., Kane, T. C. y Mylroie, J. E. 1995. Karst lands. *American Scientist*. 83 (5): 450-459.
- Worthington, S. R., Ford, D. C. y Beddows, P. A. 2000. Porosity and permeability enhancement in unconfined carbonate aquifers as a result of dissolution. *In: Spelogenesis: Evolution of Karst Aquifers*. A. Klimchouk, D. C. Ford, A. N. Palmer y W. Dreybrodt. (eds). Speological Society, Inc. pp 463-472.

CAPÍTULO III. MICROALGAS PROCARIOTAS: CIANOBACTERIAS

INTRODUCCIÓN

Las microalgas son organismos fotosintéticos, principalmente acuáticos y productores de oxígeno por lo que juegan un papel clave en ambientes acuáticos, siendo la base de la cadena trófica. Además, contribuyen a la fijación de CO₂, uno de los principales gases de efecto invernadero (Ebenezer *et al.*, 2012), de igual manera las microalgas pueden llegar a formar grandes florecimientos, los cuales pueden afectar la biodiversidad local y el funcionamiento del sistema (Eiler *et al.*, 2013).

Dentro del grupo de las microalgas existen una División de alta importancia ecológica como lo son las Cianobacterias o Algas Verde-Azules, esto se debe a que son consideradas las microalgas más diversas y abundantes en los ambientes acuáticos (John *et al.*, 2002; Wehr y Sheath, 2003).

1. Cianobacterias

Las cianobacterias o algas verde-azules son organismos unicelulares, filamentosos o coloniales que llegan a medir más de 100 µm, sin embargo, existen especies de menos de 1 µm de tamaño (John *et al.*, 2002; Wehr y Sheath, 2003). El término cianobacteria se debe a que estas microalgas procariotas están más cercanamente relacionadas a las bacterias que a las algas eucariotas. Las algas verde-azules son organismos unicelulares de vida libre con una morfología simple o bien se pueden encontrar agrupadas en una envoltura mucilaginosa. También se les puede encontrar en una línea de células llamada tricoma, cuando los tricomas son rodeados por una vaina esta organización celular es llamada filamento (Lee, 2008). Otras características de la División incluyen tilacoides, pigmentos como la clorofila *a*, ficocianina y ficoeritrina, lo que les puede dar tonos entre verde-azul, gris, violeta, pardo, púrpura o rojo (John *et al.*, 2002). Las Cianobacterias poseen glucógeno como producto de almacenamiento y sus paredes están constituidas de peptidoglicano (Wehr y Sheath, 2003; Lee, 2008).

Las algas verde-azules se encuentran en varios ambientes, pero son más frecuentes en sitios donde el pH es mayor a cuatro (John *et al.*, 2002). El verano parece ser la temporada donde más ocurrencia tienen, siendo los 24 °C la temperatura ideal para su crecimiento (Barsanti y Gualtieri, 2006). Son principalmente planctónicas y ocasionalmente forman florecimientos algales nocivos en lagos eutróficos. La capacidad de capturar la luz es superior al de otras microalgas, su alta afinidad por el nitrógeno y el fósforo las ayudan a sobrevivir cuando la limitación de nutrientes es más severa, además su habilidad para regular su posición en la columna de agua por medio de vacuolas de gas les da ventaja sobre sus competidores (Tang *et al.*, 1997). La mayoría de los florecimientos algales nocivos de cianobacterias están constituidos por los géneros *Microcystis*, *Anabaena*, *Aphanizomenon*, *Gloeotrichia*, *Lyngbya* y *Oscillatoria* (Lee, 2008).

La mayoría de las cianobacterias son difíciles de reconocer por medio de la observación de sus características morfológicas; por lo que desde la década pasada se han realizado trabajos moleculares para la detección e identificación de estos organismos (Ebenezer *et al.*, 2012).

Lyra *et al.* (1997) y Neilan *et al.* (1997b) utilizaron cebadores específicos para Cianobacterias con el objetivo de diferenciar las cepas bacterianas de los principales géneros productores de toxinas como *Anabaena*, *Nodularia*, *Oscillatoria*, *Microcystis* y *Cylindrospermopsis* por medio de AFLP y RFLP. Sin embargo, el objetivo de sus trabajos se enfocó en la diferenciación genética entre estos géneros de importancia ecológica y económica. Los cebadores sólo se utilizaron en muestras de laboratorio y no en muestras ambientales, además de que ninguno de los fragmentos fue secuenciado.

Neilan *et al.* (1997a) y Otsuka *et al.* (1998) estudiaron la diversidad genética del género *Microcystis* por medio de cebadores específicos. El género *Microcystis* se caracteriza por sus células esféricas que miden entre 0.8 y 6 µm de diámetro, sin embargo, llegan a formar colonias que llegan a tener tamaños macroscópicos. Debido a que varias especies son tóxicas, *Microcystis* es uno de los géneros más ampliamente estudiado en el campo de la limnología, sin embargo, la identificación de estos organismos es difícil por lo que es necesaria una mayor investigación a nivel taxonómico (Otsuka *et al.*, 1998; Whitton, 2002; Komárek, 2003). Es por esta razón que Neilan *et al.*

(1997a) y Otsuka *et al.* (1998) realizaron el análisis filogenético de este género. Neilan *et al.* (1997a) trabajaron con cepas provenientes de América, Europa y Asia, mientras que Otsuka *et al.* (1998) utilizaron cepas de Asia y Oceanía para su estudio. Las cepas utilizadas pertenecieron a especies de las que se conoce su toxicidad como *M. aeruginosa*, *M. viridis*, *M. wesenbergii*, entre otras. Ambos estudios concluyen que las diferencias genéticas entre las cepas estudiadas son pocas, debido a que la similitud que comparten las cepas varía entre el 91 al 99%, siendo Otsuka *et al.* (1998) quienes encontraron mayor similitud entre las microalgas analizadas, teniendo un mínimo de similitud del 99.3%. Los dos estudios concluyeron que es necesaria más experimentación para determinar claramente las especies pertenecientes a este género, además de ajustar la taxonomía morfológica para poder incluir datos moleculares.

Stiller y McClanahan (2005) desarrollaron un juego de cebadores “universales” basándose en el gen 16S ADNr, de 15 miembros de los principales linajes algales eucarióticos, cinco Cianobacterias y una bacteria acuática no fotosintética. Las secuencias de estos organismos fueron alineadas y en base a ellas se diseñó un juego de cebadores de 24 pb. Este juego de cebadores fue probado en muestras ambientales tomadas del río Roanoke, al noreste del estado de Carolina del Norte, E. U. A. Por medio de identificación morfológica se detectó que la División dominante de microalgas en este sitio fue Bacillariophyta con el género de *Aulacoseira*, además de otras diatomeas, algunas Chrysophyta y cianobacterias. Los resultados que obtuvieron indicaron que la mayoría de las secuencias pertenecieron a bacterias acuáticas, por lo que este juego de cebadores no es recomendable para la identificación de microalgas, no obstante, puede ser utilizado para la identificación de bacterias de ambientes acuáticos.

Sherwood y Presting (2007) diseñaron un juego de cebadores “universales” basados en el gen 23S ADNr para la identificación de varias Divisiones de microalgas. Este juego de cebadores se diseñó analizando 37 genomas de cloroplastos de una variedad de linajes de algas y plantas terrestres, este juego de cebadores flanquea el dominio V del gen 23S ADNr, el cual se encuentra exclusivamente en cianobacterias y cloroplastos (Presting, 2006). Este juego de cebadores se utilizó para la identificación de muestras de laboratorio, logrando identificar 107 taxa, divididos en las Divisiones de Cianobacteria, Rhodophyta, Euglenophyta, Xantophyta, Bacillariophyta, Phaeophyta y

Chlorophyta, de los cuales la mayoría pertenecieron a algas rojas (Rhodophyta) con 62 taxa. Posteriormente Sherwood *et al.* (2008) utilizaron este mismo juego de cebadores en muestras ambientales colectadas en Hawái, E. U. A. De las secuencias obtenidas se obtuvieron 173 taxa, de las cuales 117 pertenecieron a la División de Cianobacteria, 41 a Bacillariophyta, 1 a Chlorophyta, además de 12 linajes desconocidos y 2 bacterias. Por lo que el fragmento que se logró amplificar (~410 pb) sirvió para la identificación a nivel de género y especie para 280 taxa tanto de muestras de laboratorio como de muestras ambientales, repartido en las Divisiones de Cianobacteria, Bacillariophyta, Chlorophyta, Euglenophyta, Rhodophyta, Xantophyta y Phaeophyta (Sherwood y Presting, 2007; Sherwood *et al.*, 2008).

En conclusión, la mayoría de estos trabajos se enfocaron en el estudio de Cianobacterias a partir de cultivos de laboratorio y de ciertos grupos de importancia ecológica y económica, dejando de lado las muestras ambientales, las cuales contienen la mayor diversidad. Stiller y McClanahan (2005) diseñaron un juego de cebadores “universales” que les permitiera identificar varias Divisiones de microalgas, no obstante, al aplicar este juego de cebadores en muestras ambientales los resultados no probaron ser lo suficientemente específicos para la identificación de especies. Por otra parte, Sherwood *et al.* (2008) probaron que el juego de cebadores desarrollados por Sherwood y Presting (2007) puede ser utilizado en muestras ambientales, logrando identificar géneros e inclusive algunas especies, principalmente de la División de Cianobacterias por lo que éstos cebadores fueron seleccionados para cumplir con el objetivo del presente estudio. Debido a lo anterior, en éste trabajo se utilizarán los cebadores reportados por Sherwood y Presting (2007) para obtener un primer acercamiento de la diversidad genética de las Cianobacterias presentes en cenotes del sistema dulceacuícola tropical kárstico de Quintana Roo.

En este estudio se examinó la diversidad de la comunidad de cianobacterias mediante la clonación y secuenciación de un fragmento del gen 23S ADN ribosomal en dos cenotes.

MATERIALES Y MÉTODOS

1. Área de Estudio y Colecta de Muestras

El área de estudio fue la misma que previamente se describen en el Capítulo II de esta tesis (ver Figura 1). Previo a la extracción del ADN genómico se realizó un tratamiento al material colectado para concentrar la biomasa, siendo las muestras de Playa del Carmen centrifugadas y filtradas, mientras que las muestras del cenote de Leona Vicario fueron filtradas, la razón se explicará posteriormente. Las muestras de agua se filtraron para concentrar los organismos en un filtro Millipore® de 0.45 µm de abertura. Para el cenote de Playa del Carmen se filtraron 2 L de agua, y para Leona Vicario se utilizaron 12 L. Estos filtros se guardaron dentro de cajas Petri, dos filtros por caja, debidamente etiquetadas a -20 °C hasta su posterior utilización. De igual manera, se centrifugaron las muestras de agua de ambos sitios, para obtener una pastilla de material biológico. En seis tubos falcon de 50 ml se agregaron 40 ml de muestra, las centrifugaciones se realizaron por 10 minutos a 7 000 rpm y a temperatura ambiente. Después de cada ciclo de centrifugación se retiró el sobrenadante y se mantuvo la pastilla. Este proceso se repitió hasta centrifugar 2 L de la muestra de agua del cenote de Playa del Carmen y ~11 L de Leona Vicario.

2. Trabajo de Laboratorio

2.1 Extracción de ADN

2.1.1 Método CTAB

Para la extracción de ADN se siguió el método de Bromuro de etilmetilamonio (CTAB) (Doyle y Doyle, 1987) con modificaciones. Las pastillas concentradas en tubos falcon se maceraron en mortero con nitrógeno líquido y 0.1 g de polivinil polipirrolidona (PVPP) hasta obtener un polvo fino, el cual se colocó en varios tubos eppendorf de 1.5 ml. A cada uno de estos tubos se le agregó 1 ml de CTAB con β-mercaptoetanol al 98% previamente calentado a ~65 °C y 4 µl de ARNasa (20 mg ml⁻¹). Posteriormente las muestras se incubaron a 37 °C por 20 minutos para después ser colocadas en baño maría a ~65 °C por 10 minutos. El paso siguiente fue centrifugar las muestras a 13 000 rpm

durante 10 minutos, el sobrenadante obtenido se pasó a un nuevo tubo eppendorf de 1.5 ml. Para el caso de las muestras concentradas en filtros, a las cajas Petri que los contenían se les agregaron 2 ml de CTAB con β -mercaptoetanol al 98% previamente calentado a ~ 65 °C y 4 μ l de ARNasa (20 mg ml^{-1}) y se colocaron en la incubadora de agitación a 37 °C por 20 minutos y a 200 rpm, esto con el fin de que el material en los filtros se desprendiera de ellos, éste material líquido fue recolectado en tubos eppendorf de 1.5 ml (500 μ l por tubo) y posteriormente calentado en baño maría a ~ 65 °C por 10 minutos.

Tanto a las muestras líquidas como a los sobrenadantes se le agregaron 600 μ l de fenol:cloroformo (25:25) y la muestra se mezcló vigorosamente. Las muestras se centrifugaron a 13 000 rpm durante 10 minutos, posteriormente, se tomó la fase acuosa, la cual fue colocada cuidadosamente en un nuevo tubo eppendorf de 1.5 ml y se re-suspendió con 900 μ l de isopropanol almacenado a -20 °C y 100 μ l de acetato de sodio 3M pH 5.2. La mezcla obtenida se incubó a -20 °C entre 30 y 60 minutos. Las muestras se centrifugaron a 13 000 rpm durante 10 minutos a una temperatura de 4 °C, se decantó el sobrenadante y la pastilla obtenida se lavó dos veces con 200 μ l de etanol al 70% almacenado a -20 °C y se mezcló manualmente. La pastilla obtenida se dejó secar a temperatura ambiente y fue re-suspendida en 40 μ l de agua Milli-Q® estéril. El ADN extraído se almacenó a -20 °C.

Para comprobar el resultado de la extracción de ADN se tomó una alícuota de 4 μ l y se mezcló con 3 μ l de buffer de carga (Azul de bromofenol, glicerol y xileno), esta mezcla se corrió en un gel de agarosa al 1%, durante 25 minutos a 80 V, en una cámara de electroforesis (Major Science Modelo ME 10-7-10). A los geles se les agregó bromuro de etidio y fueron visualizados bajo luz UV. El marcador BenchTop de 10 000 pb de la marca Promega® fue el utilizado para diferenciar los tamaños de los fragmentos.

2.1.2 Extracción de ADN por el Kit DNeasy Plant Mini Kit de QIAGEN®

Debido a la dificultad que se tuvo para obtener una pastilla a partir del método de centrifugación para concentrar la muestra, para el cenote de Leona Vicario la muestra fue filtrada y además se utilizó el kit DNeasy Plant Mini Kit de QIAGEN® para la extracción de

ADN. Para esta muestra se filtraron previamente 100 L de agua del cenote de Leona Vicario por medio de una red fitoplanctónica (20 μm de apertura), para obtener un concentrado de 1 L. Este concentrado se pasó a través de un filtro Millipore® de 0.45 μm de apertura. Este filtro se guardó dentro de cajas Petri, debidamente etiquetadas a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ hasta su utilización. Para la extracción de ADN se siguieron las instrucciones del kit DNeasy Plant Mini Kit de QIAGEN® con algunas modificaciones. Es decir, 400 μl de buffer AP1 y 4 μl de ARNasa (20 mg ml^{-1}) se agregaron a la cajas Petri que contuvo el filtro Millipore® de 0.45 μm de apertura. Esta caja Petri se mantuvo en agitación durante 20 minutos a 200 rpm para desprender el material del filtro con ayuda del buffer. El paso siguiente fue colocar este concentrado en un tubo eppendorf de 1.5 ml y a partir de este momento se siguieron las instrucciones del fabricante. El ADN obtenido se almacenó en congelación ($-20\text{ }^{\circ}\text{C}$) hasta su utilización. Para comprobar el resultado de la extracción de ADN se tomó una alícuota de 4 μl y se mezcló con 3 μl de buffer de carga (azul de bromofenol, glicerol y xileno), esta mezcla se corrió en un gel de agarosa al 1%, durante 25 minutos a 80V, en una cámara de electroforesis (Major Science Modelo ME 10-7-10). A los geles se les agrego bromuro de etidio y fueron visualizados bajo luz UV. El marcador BenchTop de 10 000 pb de la marca Promega® fue el utilizado para diferenciar los tamaños de los fragmentos.

2.2 Amplificación

El fragmento del gen 23S ADNr se amplificó por medio de los cebadores p23SrV_f1 (5'-GGA CAG AAA GAC CCT ATG AA-3') y p23SrV_r1 (5'-TCA GCC TGT TAT CCC TAG AG-3'), el producto obtenido fue de ~410 pb (Sherwood *et al.*, 2008; Sherwood y Presting, 2007).

La reacción de amplificación para los fragmentos del gen 23S ADNr se preparó usando 5 μl de Buffer 10x (1.5 mM) (Promega ®), 1 μl de dNTP's (0.2 mM) (Promega ®), 0.5 μl de cada cebador (0.1-1.0 μM) (Promega ®), 0.2 μl de Taq Polimerasa (1.25 unidades/ μl) (Promega ®) y aproximadamente 0.5 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ de ADN total y 16.8 μl de agua libre de nucleasas.

Las amplificaciones se realizaron en el termociclador (Applied Biosystems® Modelo Veriti® 96-Well) bajo el siguiente ciclo de reacción: un calentamiento inicial de un minuto a 94 °C, seguido por 35 ciclos (60 segundos a 94 °C, 60 segundos a 55 °C, 60 segundos a 72 °C) con un ciclo adicional de 10 minutos a 72 °C, posteriormente los tubos se mantuvieron a 4 °C hasta el momento de su uso.

Para comprobar el resultado de las amplificaciones, se tomó una alícuota de 5 µl de cada producto de la amplificación y se corrió en un gel de agarosa al 1%, durante 25 minutos a 80V, en una cámara de electroforesis (Major Science Modelo ME 10-7-10). A los geles se les agrego bromuro de etidio y posteriormente se visualizaron bajo luz UV. Se utilizó el marcador BenchTop de 10 000 pb de la marca Promega® para discriminar entre los fragmentos amplificados.

2.3 Clonación de los Fragmentos del Gen 23S ADNr

Los fragmentos amplificados fueron clonados en el vector pGEM-T Easy® (Promega®). Previo a la clonación el ADN fue cuantificado con ayuda del espectrofotómetro (Nanodrop ND-1000), con el fin de obtener la cantidad de ADN óptima para realizar las ligaciones siguiendo las instrucciones del manual del pGEM-T Easy. La reacción de ligación fue en una proporción inserto-vector 3:1, usando la enzima ligasa T4. El plásmido recombinante fue utilizado para transformar bacterias *Escherichia coli* DH5α, mediante choque térmico, esto es, el producto de ligación fue adicionado a las células competentes de *E. coli*, las cuales fueron incubadas en hielo por 20 minutos, posteriormente se incubaron un minuto a 42 °C y finalmente se colocaron en hielo 5 minutos. Se agregaron 200 µl de medio LB y se incubaron en agitación durante una hora, posteriormente, las células transformadas fueron plaqueadas en medio LB con ampicilina (100 µg/µl) y X-Gal (20 µg/µl). Las bacterias recombinantes fueron seleccionadas para extraer el ADN plasmídico por lisis alcalina. Los plásmidos fueron digeridos con la enzima *EcoRI* para comprobar la presencia de los insertos, para aquellos que presentaron los insertos de los tamaños esperados se tomó una alícuota de 10 µl de cada producto de la amplificación y se mezcló con 3 µl de buffer de carga (azul de bromofenol, glicerol y xileno), esta mezcla se corrió en un gel de agarosa al 1%, durante 25 minutos a 80V, en una cámara de electroforesis (Major Science Modelo ME 10-7-10). A los geles se les

adicionó bromuro de etidio y de manera subsecuente se visualizaron bajo luz UV. El marcador BenchTop de 10 000 pb de la marca Promega® fue el utilizado para diferenciar los tamaños de los fragmentos. Posteriormente los plásmidos recombinantes fueron enviados a secuenciar a Macrogen Corea, utilizando el cebador universal M13F.

2.4 Análisis Bioinformático

Las secuencias obtenidas de los fragmentos del gen 23S ADNr se compararon con las secuencias disponibles en la base de datos del National Center for Biotechnology Information usando BLAST (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>). A partir de los resultados obtenidos, se seleccionaron secuencias relacionadas de la base de datos del GenBank, para realizar comparaciones con las clonas obtenidas en el laboratorio. Con base en estas secuencias se realizó una base de datos que fue alineada mediante el algoritmo MUSCLE (Edgar, 2004). Este alineamiento nos permitió estimar el porcentaje de identidad por pares de las secuencias bajo análisis.

Para realizar la reconstrucción filogenética se utilizó el método de la máxima similitud (Maximum Likelihood) con la ayuda del programa MEGA 6.0 (Tamura *et al.*, 2011). Adicionalmente se realizó un análisis Bootstrap como apoyo estadístico a la reconstrucción filogenética (1 000 repeticiones). La longitud de las ramas es proporcional a la distancia evolutiva.

RESULTADOS

1. Diversidad Genética de las Cianobacterias de los Cenotes de Playa del Carmen y Leona Vicario

1.1 Extracción de ADN

Los métodos de extracción de ADN por CTAB utilizados en este trabajo permitieron obtener ADN de buena calidad a partir de muestras de agua de Playa del Carmen. Este es un método simple, reproducible y relativamente económico para la obtención de ADN a partir de muestras ambientales (Figura 2). Este protocolo de extracción puede substituir protocolos más caros y proporcionar ADN de buena calidad,

sin embargo, es necesario recalcar que la extracción de ADN que se obtuvo por éste método, pertenece al cenote de Playa del Carmen, el cual podría ser eutrófico (ver Capítulos 2 y 5), por lo que la cantidad de organismos debería de ser alta, ya que es una de las características de este tipo de sitios, los cuales poseen altos niveles de materia orgánica, principalmente por la alta cantidad de nutrientes que favorece el crecimiento de las microalgas (Burkholder y Gilbert, 2001). Para el caso del cenote oligotrófico, Leona Vicario, a partir del cual no se obtuvo una concentración suficiente de ADN utilizando el método CTAB se observó un mejor resultado mediante el uso del kit DNeasy Plant Mini Kit de QIAGEN® para obtener ADN total. Al igual que Sherwood *et al.* (2008) quienes utilizaron el mismo kit para la obtención de ADN de muestras ambientales de microalgas en Hawái, EUA, obteniendo ADN de buena calidad. En el caso de este estudio el kit DNeasy Plant Mini Kit de QIAGEN® se utilizó de igual manera obteniendo resultados favorables para la muestra ambiental de Leona Vicario (Figura 3).

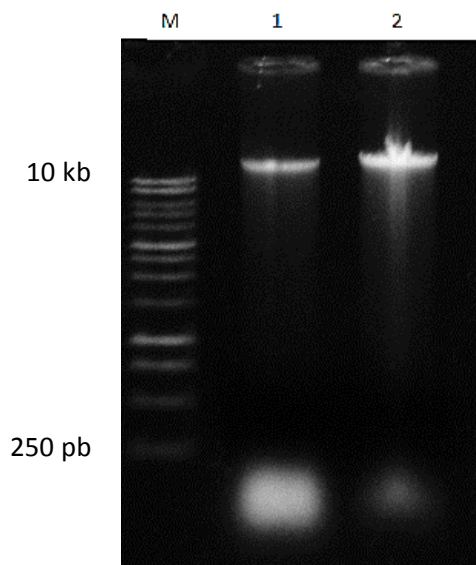


Figura 2. Extracción de ADN total de Playa del Carmen (1.- ADN extraído a partir de la Pastilla obtenida por centrifugación, 2.- ADN extraído a partir de las muestras filtradas). M: marcador de peso molecular BenchTop de Promega® (10 000 pb).

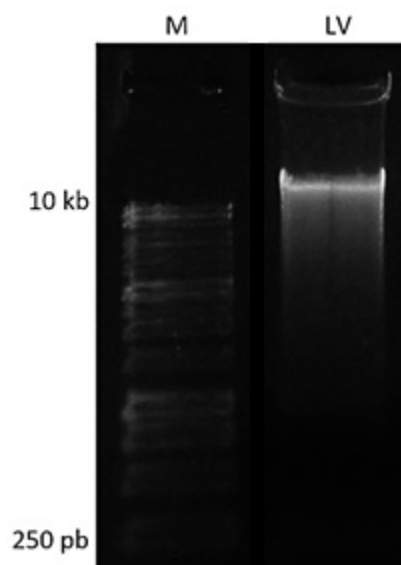


Figura 3. Extracción de ADN de la muestra tomada del cenote de Leona Vicario (LV). M: marcador de peso molecular BenchTop de Promega® (10 000 pb).

De los dos métodos utilizados en este trabajo para la concentración de la muestra biológica, se observó un mejor resultado al filtrar las muestras de agua, debido a que la centrifugación de las muestras para obtener una pastilla no siempre fue efectiva, como fue en el caso de Leona Vicario en donde no se formó una pastilla lo suficientemente grande como para poder extraer ADN de ella. Posiblemente esto se debió a la menor presencia de microorganismos en la muestra de Leona Vicario comparada con el cenote de Playa del Carmen.

1.2 Amplificación de los Fragmentos del Gen 23S ADNr

La amplificación por PCR con el juego de cebadores p23SrV generó bandas de ~410 pb (Figura 4 y 5), esto concuerda con lo mencionado con los antecedentes de Sherwood y Presting (2007) y Sherwood *et al.* (2008), quienes diseñaron y probaron los cebadores. Tanto las amplificaciones en las cuales se utilizó como templado el ADN extraído con el protocolo CTAB y con el kit de extracción fueron exitosas (Figuras 2 y 3).

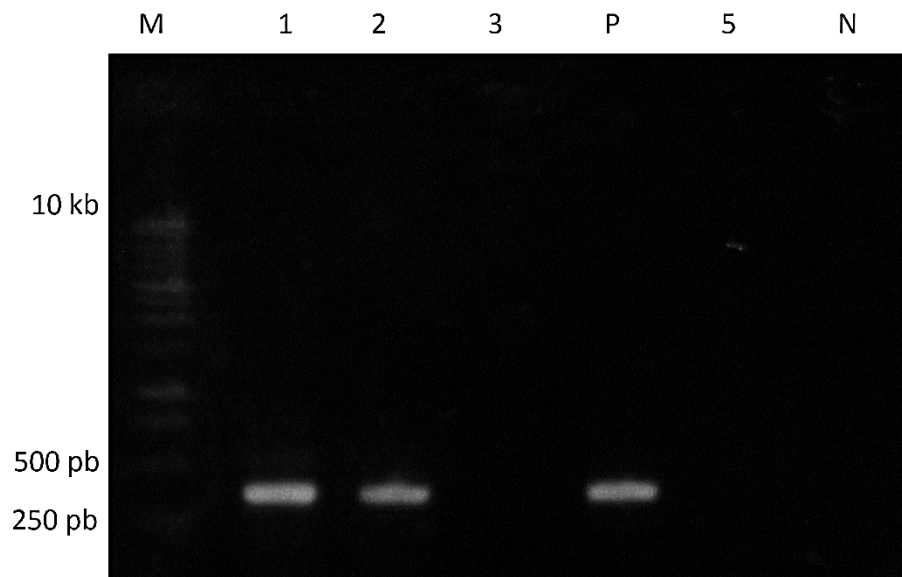


Figura 4. Amplificación por el juego de cebadores p23SrV de las muestras de Playa del Carmen para una muestra obtenida por centrifugación (1) y otra por filtración (2). M: marcador de peso molecular BenchTop de Promega ® (10 000 pb). P: control positivo: Plásmido recombinante previamente secuenciado. N: control negativo. Los carriles 3 y 5 están vacíos.

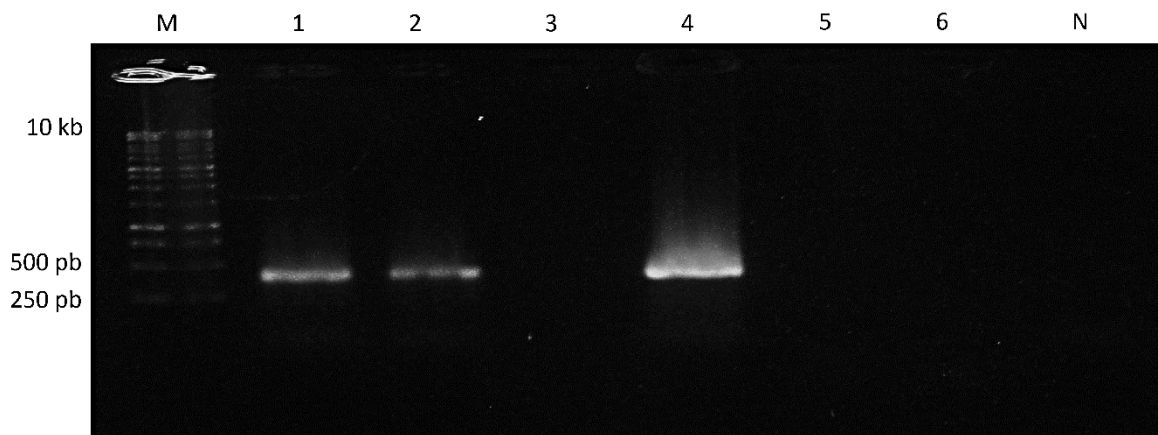


Figura 5. Amplificación por el juego de cebadores p23SrV de las muestras de Leona Vicario obtenidas por kit de extracción DNeasy Plant Mini Kit de QIAGEN® (1, 2). M: marcador de peso molecular BenchTop de Promega ® (10 000 pb). 4: control positivo: Plásmido recombinante previamente secuenciado. N: control negativo. Los carriles 3, 5 y 6 están vacíos.

De estos experimentos se concluyó que el juego de cebadores p23SrV fueron eficientes para amplificar fragmentos del gen 23S ADNr en muestras ambientales de los

cenotes estudiados, aparentemente la condición del sitio no afecta en el desempeño de la amplificación, ya que ambos cenotes presentaron una amplificación esperada de aproximadamente ~410 pb para este juego de cebadores.

1.3 Clonación de los Fragmentos del Gen 23S ADNr

Los fragmentos amplificados fueron ligados como se menciona a detalle en materiales y métodos en un vector de clonación pGEM T Easy (Promega). Los productos de ligación fueron utilizados para transformar células competentes de *E. coli* DH5 α . Las colonias recombinantes (blancas) fueron picadas y puestas a crecer en medio LB líquido y con ampicilina (ver Materiales y métodos). Se picaron varias colonias blancas por placa hasta obtener aproximadamente 32 colonias blancas, las cuales se cultivaron en medio LB líquido con ampicilina a 37 °C durante toda la noche. A partir de estos cultivos se realizó la extracción de ADN plasmídico mediante lisis alcalina o minipreps (ver Materiales y métodos). Con el fin de comprobar la presencia de insertos del tamaño esperado, en cada plásmido recombinante, se utilizó la enzima *EcoRI* para confirmar la presencia de los insertos del tamaño esperado. Los productos obtenidos de las digestiones con *EcoRI* se corrieron en un gel de agarosa al 1% (ver Materiales y métodos) y se seleccionaron las clonas positivas para su posterior secuenciación.

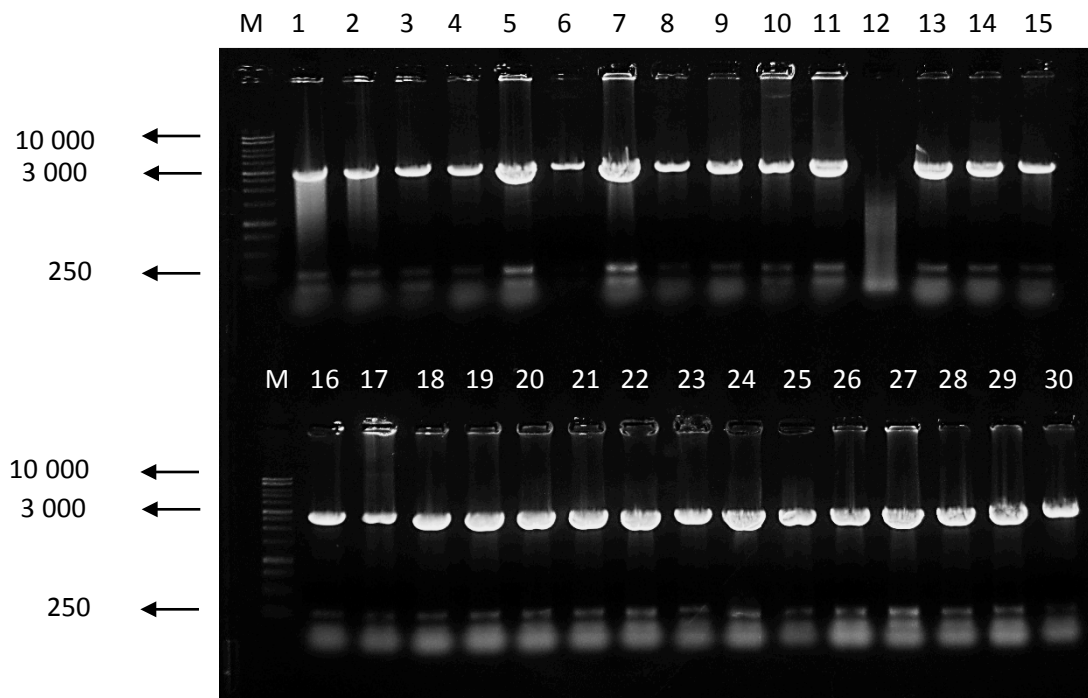


Figura 6. Digestión de las clonas obtenidas por medio del juego de cebadores p23SrV con la enzima *EcoRI*. M: marcador de peso molecular BenchTop de Promega® (10 000 pb). 1-30 número de clona.

Como se observa en la Figura 6, la enzima de restricción *EcoRI* además de liberar el fragmento clonado, produjo dos fragmentos correspondientes al inserto, el primero de ~250 pb y el segundo de ~150 pb, es decir, la enzima encontró un sitio de corte dentro del fragmento insertado. Para el sitio de Playa del Carmen se obtuvieron un total de 32 clonas positivas y para el sitio de Leona Vicario se obtuvieron un total de 31 clonas positivas para un total de 63 clonas positivas de las cuales se obtuvieron 53 secuencias de calidad.

1.4 Identificación de OTU's

Los OTU's se definen como un conjunto de secuencias con un 97% de similitud, esperando que estos correspondan con alguna especie ya identificada y disponible en el GenBank (Sneath y Sokal, 1973). Los OTU's obtenidos en este estudio correspondieron con secuencias respectivas a cianobacterias u organismos no cultivables relacionados con ellas, como se observa en el Cuadro 2. El análisis de las librerías demostró tres OTU's para el cenote de Playa del Carmen y seis OTU's para Leona Vicario. Hay que

recalcar que ningún OTU's se compartió entre los sitios de muestreo, lo que sugiere que las concentraciones de oxígeno disuelto, nitratos, nitritos, conductividad y sólidos disueltos totales proveen las condiciones necesarias para que ciertos organismos habiten en ellos, debido a que estas características fueron las que más variaron en cuanto a los cenotes muestreados.

Se analizó un total de 53 secuencias, de las cuales el 55% de ellas se asoció con *Geitlerinema* sp. perteneciente al cenote de Playa del Carmen, por lo que probablemente esta sea la especie más abundante de este sitio durante el período muestreado, mientras que *Synechococcus* sp. posiblemente sea la especie más abundante de Leona Vicario al estar relacionado con el 23% de las secuencias (Cuadro 2).

El 87% de las clonas tuvo porcentajes de identidad de nucleótidos menores al 97% con alguna de las secuencias del GenBank (Cuadro 2), por lo que esto indica que la información que se puede conseguir por medio del fragmento de ~410 pb es insuficiente para determinar especies o la información que se encuentra en el GenBank no provee la información necesaria para la identificación de nuestras secuencias. Estos resultado son similares a los obtenidos por Sherwood *et al.* (2008) quienes utilizaron el mismo juego de cebadores en muestras ambientales de Hawái, obteniendo la identificación de géneros de cianobacterias como *Leptolyngbya*, *Oscillatoria* y *Synechococcus*, sin llegar a la identificación de especies.

Cuadro 6. Número de clonas pertenecientes a cada OTU en las librerías genéticas de cada sitio.

División	Primer Hit en BLAST (No. de acceso)	Identidad de nucleótidos (%)	Número de clonas en la librería por cada sitio	
			Playa del Carmen	Leona Vicario
Cianobacteria	<i>Geitlerinema</i> (NR_102539)	sp. 92	29	
	<i>Arthrospira</i> sp. (FO818640)	91	1	

<i>Pleurocapsa</i> sp. (NR_102536)	95	1
<i>Cyanobium gracile</i> (NR_102534)	96	1
<i>Paulinella chromatophora</i> (FJ456920)	93	1
<i>Synechococcus</i> sp. (AM709627) (KC598135)	92	12
<i>Campilobacter concisus</i> (GQ167678)	73	1
<i>Cerataulina daemon</i> (KJ958484)	97	6
<i>Didymosphenia geminata</i> (KC509523)	94	1

1.5 Porcentaje de Identidad por Pares

En base al alineamiento que se consiguió por medio de MUSCLE (Edgar, 2004) se obtuvieron los porcentajes de identidad de las secuencias, los cuales fueron del 97% (Figura 7 y 8), con estos valores es difícil establecer con confiabilidad una especie, por lo que el resultado obtenido indica que lo más parecido dentro de la base de datos del GenBank es un organismo no cultivable (es decir, una especie de la cual no se ha obtenido un monocultivo del cual extraer ADN para su identificación, en otras palabras, es una especie de una muestra ambiental). Estas secuencias probablemente estén relacionadas con una nueva especie o la información necesaria para identificarlas de manera precisa no se encuentra hasta la fecha en el GenBank, de cualquier manera es necesario el seguir realizando trabajos de este tipo que nos permitan conocer el estado actual de la diversidad de estos organismos.

En las matrices de identidad por pares de la División de cianobacterias (Figura 7 y 8) se observa, en el caso de Playa del Carmen, el registro de tres OTU's, mientras que en Leona Vicario se registraron seis, como se mencionó previamente las secuencias tuvieron valores menores al 97% de identidad, con lo que es difícil hacer una identificación de

especies con suficiente confiabilidad, sin embargo, se pudieron identificar los géneros que posiblemente se encuentren en estos sitios, siendo aparentemente los más abundantes *Geitlerinema* y *Synechococcus*. Posiblemente el cenote de Leona Vicario posee una mayor cantidad de especies nuevas o no registradas en el GenBank y por lo tanto sus porcentajes de identidad fueron menores, caso contrario al cenote de Playa de Carmen.

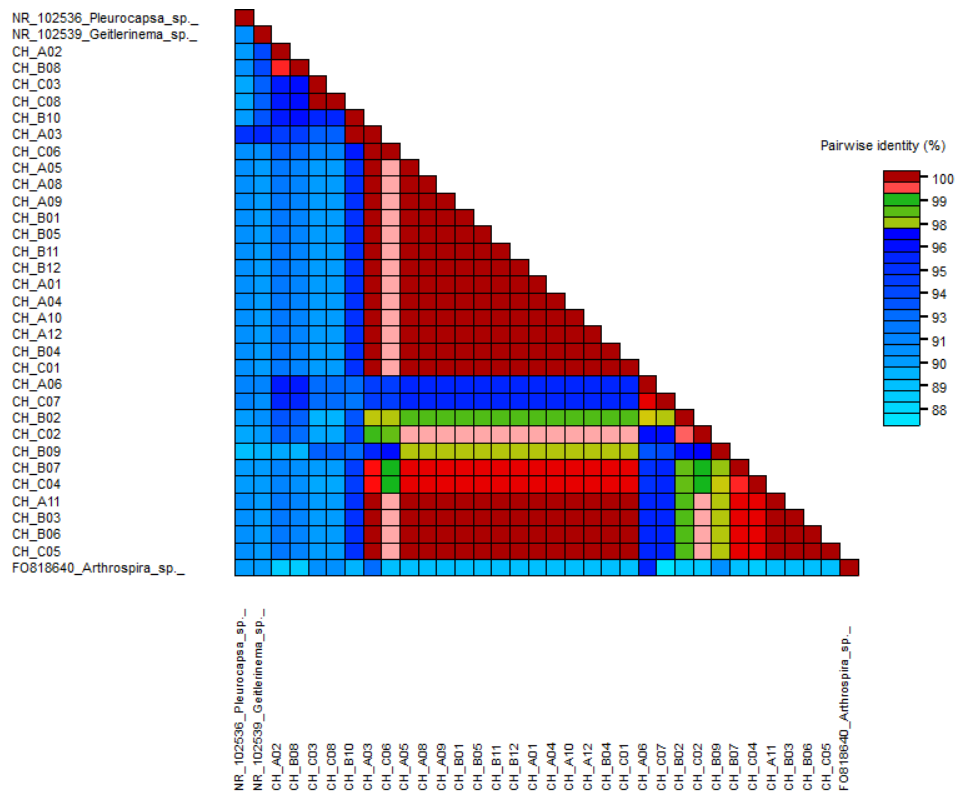


Figura 7. Matriz de la comunidad de Cianobacteria basada en la identidad por pares de las secuencias de Playa del Carmen

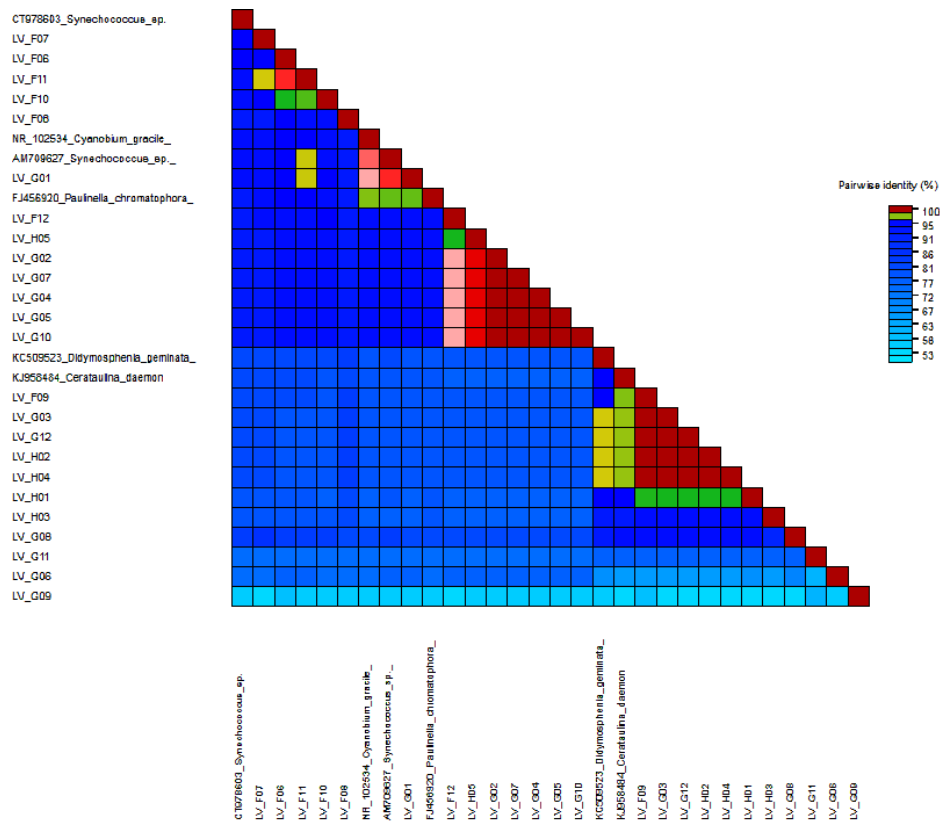


Figura 8. Matriz de la comunidad de Cianobacteria basada en la identidad por pares de las secuencias de Leona Vicario

1.6 Análisis Filogenético

Para conocer la relación filogenética entre las secuencias pertenecientes a cianobacterias obtenidas en este trabajo y las de referencia del GenBank, se realizó un árbol filogenético de máxima similitud (Figura 9) (Maximum Likelihood) por medio del programa MEGA 6.0. El árbol filogenético obtenido con base a las secuencias de la División Cianobacteria demostró que las secuencias de Playa del Carmen y de Leona Vicario no se integraron de manera aleatoria, por lo que las secuencias obtenidas se distribuyeron en siete sub-clados, cinco fueron monofiléticos y dos polifiléticos.

CAPÍTULO III. MICROALGAS PROCARIOTAS: CIANOBACTERIAS

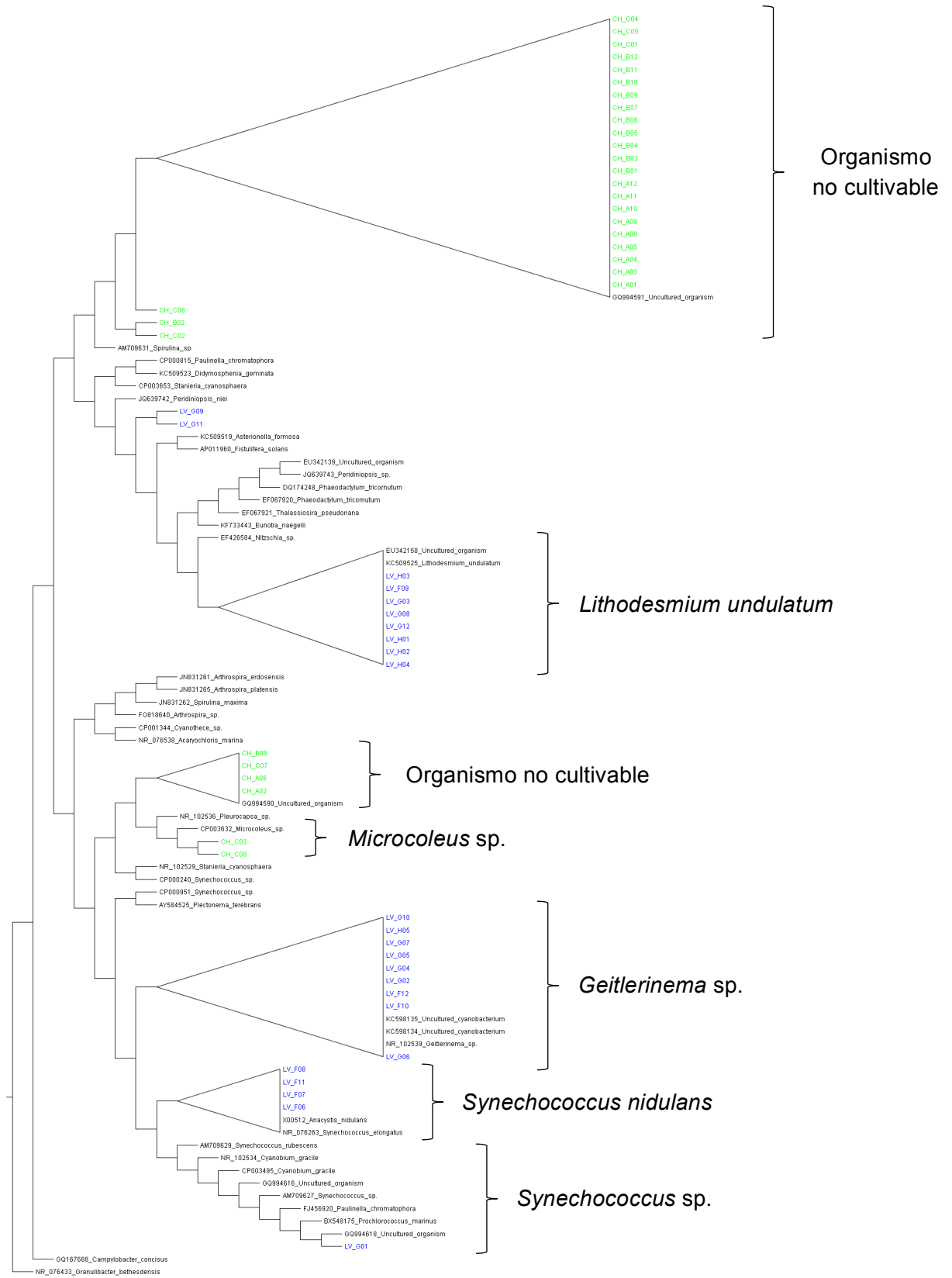


Figura 9. Árbol filogenético basado en las secuencias obtenidas por el juego de cebadores p23SrV (Sherwood y Presting, 2007). Verde: Playa del Carmen; Azul: Leona Vicario; **Negro:** Secuencias de referencia con su correspondiente número de accesión. Raíz: *Granulibacter bethesdensis* (NR_076433).

Los sub-clados monofiléticos demuestran que las especies *Geitlerinema* sp., *Synechococcus* sp. y *Synechococcus nidulans* son especies hermanas y todas se encontraron en el cenote de Leona Vicario, siendo *Synechococcus* sp. la más ancestral del estudio al encontrarse en la parte más basal del árbol. Como se puede observar en la Figura 10, los subclados de secuencias obtenidas en Playa del Carmen no se comparten con los sub-clados de secuencias obtenidas en Leona Vicario, esto sugiere que cada sitio posee una comunidad particular de microalgas.

Es de resaltar que el árbol filogenético obtenido en este trabajo no está completamente resuelto. Como se menciona previamente, la secuencia del fragmento amplificado de ~410 pb no provee suficiente información como para poder determinar especies, debido a que la datos necesarios no se encuentran todavía en el GenBank o a que se trata de especies sin identificar. Sherwood *et al.* (2008) obtienen resultados parecidos en muestras ambientales ya que la identificación que ellos logran es a nivel de género. En conclusión, el juego de cebadores p23SrV es útil para la identificación de grandes grupos taxonómicos como Divisiones, Órdenes, Familias e inclusive Géneros, no obstante, no es recomendable para la identificación de especies.

DISCUSIÓN

La presencia de las cianobacterias en ambientes dulceacuícolas está ampliamente registrada (John *et al.*, 2002; Wehr y Sheath, 2003; Lee, 2008; Novelo y Tavera, 2011; Oliva-Martínez *et al.*, 2013). Los géneros que principalmente se observan en los sitios dulceacuícolas son: *Microcystis*, *Anabaena*, *Aphanizomenon*, *Gloetrichia*, *Lyngbya* y *Oscillatoria* (Lee, 2008).

En el presente trabajo, se destaca la alta presencia de secuencias relacionadas con el género *Geitlerinema* en el cenote de Playa del Carmen, ya que el 55% de las clonas se asoció a este género, por lo que se podría suponer una alta abundancia del

género en el sitio de Playa del Carmen. *Geitlerinema* se caracteriza por ser filamentoso y formar matas que cubren los sustratos (Komárek, 1992), de diferentes cuerpos de agua, principalmente se le encuentra en sitios donde la carga de contaminantes es baja (Komárek y Komárková, 2003). Nava-Ruiz y Valadez (2012) reportaron, con datos morfológicos, la presencia de este género y el presente trabajo aporta evidencia molecular de la presencia de este género en el estado de Quintana Roo y es la primera vez que se registran secuencias asociadas a este género en la parte norte del estado.

El género *Synechococcus*, estuvo representado por 12 secuencias obtenidas del cenote de Leona Vicario, equivalente al 23% de las clonas, por lo que probablemente éste es el género más abundante de este cenote. *Synechococcus* se caracteriza por poseer un tamaño menor a los 2 μm , además de ser unicelular, cilíndrica u ovalada y se encuentra envuelta en un mucílago hialino, no obstante, llega a formar colonias que pueden llegar a ser macroscópicas. Este género posee un amplio rango de hábitats ya que se le puede encontrar en sitios dulceacuícolas y someros como también en sitios salobres e inclusive en sustratos rocosos (Whitton, 2002). Este género está registrado previamente por Nava-Ruiz y Valadez (2012) y Tavera *et al.* (2013) para la laguna Lagartos y parque El Edén en el estado de Quintana Roo.

El estado de Quintana Roo es un sitio prácticamente “virgen” para la investigación científica. A pesar de los esfuerzos realizados por tratar de conocer la comunidad cianobacteriana, ésta apenas se conoce. Este trabajo aumenta el conocimiento que se tiene sobre las cianobacterias en el estado y es la primera vez que esto se realiza desde un enfoque molecular, por lo que se esperan futuros trabajos que sigan esta línea de investigación en otros sitios de Quintana Roo y de la Península de Yucatán, con lo que la información que se tenga sobre ella cada vez sea más basta y nos ayude a utilizar los recursos que nos provee de manera más adecuada.

CONCLUSIÓN

El presente estudio demostró que la mayoría de los OTU's identificados tienden a formar clados específicos dependiendo del sitio de muestreo, ya que las secuencias de Playa del Carmen y de Leona Vicario no se compartieron. A pesar de que 24 secuencias se alinearon para formar clados con especies conocidas, 31 de ellas no se alinearon

directamente con ninguna especie, principalmente las secuencias obtenidas de Playa del Carmen. Esto indica que a pesar de la importancia que tienen las microalgas en los sistemas acuáticos, en particular los dulceacuícolas, los estudios de este tipo que se tienen hasta la fecha son insuficientes y por lo tanto las secuencias del gen 23S ADNr son pocas. Aparentemente los géneros más abundantes de los sitios son *Geitlerinema* y *Synechococcus* ya que cada una de estos estuvo asociado con al menos 12 clonas, esto no es de sorprender ya que estos taxa son considerados como cosmopolitas. Finalmente es de recalcar que la información obtenida durante este estudio nos permitió la identificación de algunos géneros cosmopolitas como *Geitlerinema* y *Synechococcus*, por lo que la utilización de técnicas moleculares para la identificación de microalgas queda validada, ya que es necesario el uso de estas técnicas para aumentar la información de estos organismos en la base de datos del GenBank que nos permita una identificación a nivel de especie de estos organismos. A pesar de que las cianobacterias son organismos fundamentales en los ecosistemas acuáticos poco es el conocimiento a nivel molecular que se tiene sobre ellas.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- APHA, AWWA y WEF. 1998. *Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater*. American Public Health. 20^a ed. United States of America. 1269 pp.
- Barsanti, L. y Gualtieri, P. 2006. *Algae: Anatomy, Biochemistry and Biotechnology*. Taylor & Francis Group. United States of America. 301 pp.
- Burkholder, J. y Gilbert, P. M. 2001. Eutrophication and oligotrophication. *Encyclopedia of Biodiversity*. 2: 649-670.
- Doyle, J. J. y Doyle, J. L. 1987. A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. *Phytochemical Bulletin*. 19: 11-15.
- Ebenezer, V., Medlin, L. K. y Ki, J. S. 2012. Molecular detection, quantification, and diversity evaluation of microalgae. *Marine Biotechnology*. DOI: 10.1007/s10126-011-9427-y.
- Edgar, R. C. 2004. MUSCLE: multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput. *Nucleic Acids Research*. 32(5): 1792-1797.
- Eiler, A., Drakare, S., Bertilsson, S., Pernthaler, J., Peura, S., Rofner, C., Simek, K., Yang, Y., Znachor, P. y Lindström, E. S. 2013. Unveiling distribution patterns of freshwater phytoplankton by a next generation sequencing based approach. *PLoS ONE*. 8 (1): e53516. DOI: 10.1371/journal.pone.0053516.
- INEGI. 2005. *Estudio hidrológico del estado de Quintana Roo*. Instituto Nacional de Estadística Geografía e Informática. México. 96 pp.
- John, D. M., Whitton, B. A. y Brook, A. J. 2002. *The Freshwater Algal Flora of the British Isles. An Identification Guide to Freshwater and Terrestrial Algae*. Cambridge University Press. United Kingdom. 707 pp.
- Komárek, J. 1992. *Geitlerinema*. In: *CyanoDB.cz. A database of cyanobacterial genera*. Buscado el 05 de noviembre del 2014.

- Komárek, J. 2003. Coccoid and colonial Cyanobacteria. *In: Freshwater Algae of North America. Ecology and Classification*. J. Wehr y R. Sheath (eds). Academic Press. pp 59-116.
- Komárek, J. y Komárková, J. 2003. Filamentous Cyanobacteria. *In: Freshwater Algae of North America. Ecology and Classification*. J. Wehr y R. Shetah (eds). Academic Press. pp. 117-196.
- Lee, R. E. 2008. *Phycology*. Cambridge University Press. 4th ed. United States of America. 547 pp.
- Lyra, C., Hantula, J., Vainio, E., Rapala, J., Rouhiainen, L. y Sivonen, K. 1997. Characterization of Cyanobacteria by SDS-PAGE of whole-cell proteins and PCR/RFLP of the 16S rRNA gene. *Archives of Microbiology*. 168: 176-184.
- Nava-Ruiz, V. M. y Valadez, F. 2012. Flora planctónica de laguna Lagartos, Quintana Roo. *Revista Mexicana de Biodiversidad*. 83: 561-582.
- Neilan, B. A., Jacobs, D., Del Dot, T., Blackall, L. L., Hawkins, P. R., Cox, P. T. y Goodman, A. E. 1997a. rRNA sequences and evolutionary relationships among toxic and nontoxic cyanobacteria of the genus *Microcystis*. *International Journal of Systematic Bacteriology*. 47 (3): 693-697.
- Neilan, B. A., Stuart, J. L., Goodman, A. E., Cox, P. T. y Hawkins, P. R. 1997b. Specific amplification and restriction polymorphisms of the Cyanobacterial rRNA operon spacer region. *Systematic and Applied Microbiology*. 20: 612-621.
- Novelo, E. y Tavera, R. 2011. Un panorama gráfico de las algas de agua dulce de México. *Hidrobiológica*. 21 (3): 333-341.
- Oliva-Martínez, M. G., Godínez-Ortega, J. L. y Zuñiga-Ramos, C. A. 2013. Biodiversidad del fitoplancton de aguas continentales en México. *Revista Mexicana de Biodiversidad*. DOI: 10.7550/rmb.32706.

- Otsuka, S., Suda, S., Li, R., Watanabe, M., Oyaizu, H., Matsumoto, S., Watanabe, M. M. 1998. 16S rDNA sequences and phylogenetic analyses of *Microcystis* strains with and without phycoerythrin. *FEMS Microbiology Letters*. 164: 119-124.
- Presting, G. G. 2006. Identification of conserved regions in the plastid genome: implications for DNA barcoding and biological function. *Canadian Journal of Botany*. 84: 1434-1443.
- Sherwood, A. R. y Presting, G. G. 2007. Universal primers amplify a 23S rDNA plastid marker in eukaryotic algae and cyanobacteria. *Journal of Phycology*. 43: 605-608.
- Sherwood, A. R., Chan, Y. L. y Presting, G. G. 2008. Application of universally amplifying plastid primers to environmental sampling of a stream periphyton community. *Molecular Ecology Resources*. 8: 1011-1014.
- Sneath, P. H. A. y Sokal, R. R. 1973. *Numerical Taxonomy. The Principles and Practice of Numerical Classification*. W. H. Freeman Company. United States of America. 573 pp.
- Stiller, J. W. y McClanahan, A. 2005. Phyto-specific 16S rDNA PCR primers for recovering algal and plants sequences from mixed samples. *Molecular Ecology Notes*. 5: 1-3.
- Tamura, K., Peterson, D., Peterson, N., Stecher, G., Nei, M. y Kumar, S. 2011. MEGA 6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Using Maximum Likelihood, Evolutionary Distance, and Maximum Parsimony Methods. *Molecular Biology and Evolution*. 28 (10): 2731-2739.
- Tang, E. P., Tremblay, R. y Vincent, W. F. 1997. Cyanobacterial dominance of polar freshwater ecosystems: are high - latitude mat-formers adapted to low temperature? *Journal of Phycology*. 33 (2): 171-181.
- Tavera, R., Novelo, E. y López, S. 2013. Cyanoprokaryota (Cyanobacteria) in karst environments in Yucatan, Mexico. *Botanical Sciences*. 91 (1): 27-52.

- Valiente-Moro, C., Crouzet, O., Rasconi, S., Thouvenot, A., Coffe, G., Batisson, I. y Bohatier, J. 2009. New design strategy for development of specific primer sets for PCR-based detection of Chlorophyceae and Bacillariophyceae in environmental samples. *Applied and Environmental Microbiology*. 75 (17): 5729-5733.
- Wehr, J. D. y Sheath, R. G. 2003. *Freshwater Algae of North America. Ecology and classification*. Academic Press. United States of America. 918 pp.
- Whitton, B. A. 2002. Phylum Cyanophyta (Blue-Green Algae/Cyanobacteria). In: *The Freshwater Algal Flora of the British Isles*. D. M. John, B. A. Whitton y A. J. Brook (eds). Cambridge. pp. 25-122.

CAPÍTULO IV. MICROALGAS EUCARIOTAS: BACILLARIOPHYTA Y CHLOROPHYTA

INTRODUCCIÓN

Las microalgas son organismos fotosintéticos, principalmente acuáticos y productores de oxígeno por lo que juegan un rol clave en ambientes acuáticos siendo la base de la cadena trófica. Además contribuyen a la fijación de CO₂, uno de los principales gases de efecto invernadero (Ebenezer *et al.*, 2012), de igual manera las microalgas pueden llegar a formar grandes florecimientos, los cuales pueden afectar la biodiversidad local y el funcionamiento del sistema (Eiler *et al.*, 2013).

Dentro del grupo de las microalgas existen dos Divisiones de alta importancia ecológica como lo son las Bacillariophyta o Diatomeas y las Chlorophyta o Algas Verdes, esto se debe a que son consideradas de las microalgas más diversas y abundantes en ambientes acuáticos (Valiente-Moro *et al.*, 2009).

1. Bacillariophyta

Las Bacillariophyta o diatomeas son un grupo de organismos unicelulares, coloniales o filamentosos que miden entre 10 y 200 μm (Round *et al.*, 1990). Las diatomeas se distinguen por sus cloroplastos, los cuales, están rodeados por cuatro membranas (Wehr y Sheath, 2003). Ésta característica hace pensar que las diatomeas probablemente evolucionaron de algún miembro de las Chrysophyceae o Bolidophyceae (Lee, 2008). Otras características de las Bacillariophyta es que los tilacoides que poseen se empaquetan en grupos de tres, la fucoxantina cubre a la clorofila *a* y *c*, dándole su característico color pardo-dorado. La crisolaminarina es el producto de reserva de esta División (Lee, 2008). Sin embargo, la principal característica de las diatomeas es que la célula está rodeada por una pared celular que está formada de sílice y se le conoce como frústula (John *et al.*, 2002; Wehr y Sheath, 2003; Barsanti y Gualtieri, 2006). La frústula está constituida de dos partes o valvas que terminan en un cíngulo, el cual permite la división celular. Las formas y tamaños que llegan a tener estas valvas les dan formas muy

particulares que son utilizadas para discriminar entre géneros e inclusive entre especies (John *et al.*, 2002).

Las Diatomeas se encuentran en casi todos los hábitats acuáticos como organismos de vida libre autótrofos, heterótrofos o simbioses fotosintéticos (Schmaljohann y Röttger, 1978). Las Bacillariophyta pueden encontrarse como fitoplancton flotando en la columna de agua o como fitobentos adheridas a sustratos tales como rocas o plantas acuáticas (Lee, 2008). Las Bacillariophyta se han utilizado con gran éxito para detectar el cambio ambiental, ya que responden rápidamente a cambios físicos, químicos y biológicos que se producen en su entorno. La evaluación de las condiciones ambientales se puede basar en una sola especie, un grupo de especies o en asociaciones (López-Fuerte y Siqueiros-Beltrones, 2011).

Varias diatomeas planctónicas tienen fluctuaciones anuales de crecimiento, lo cual se puede atribuir a las condiciones ambientales (Lee, 2008). *Asterionella formosa* es una Bacillariophyta que presenta florecimientos algales durante la primavera, mientras que en el otoño sus números suelen decrecer (Lund, 1950). Durante los meses de invierno la poca luz y las bajas temperatura limitan el crecimiento de las diatomeas; mientras que el inicio de la primavera y el consecuente incremento en la temperatura y la luz dan como resultado un rápido crecimiento de las células (Lee, 2008).

Las Bacillariophyta probablemente se originaron hace 200 millones de años (Medlin *et al.*, 1997). Desde entonces se originaron dos líneas evolutivas, las que formaron valvas y las que formaron bandas anilladas (Round *et al.*, 1990), por lo que la División comprende dos Ordenes: Biddulphiales y Bacillariales (Lee, 2008).

2. Chlorophyta

Las algas verdes o clorofitas constituyen una División que se caracteriza por tener los siguientes atributos: 1) cloroplastos sin retículo endoplásmico externo; 2) tilacoides organizados en paquetes de dos a seis; 3) la clorofila *a* y *b* son los pigmentos fotosintéticos; 4) forman almidón con los cloroplastos, el cual está usualmente asociado con un pirenoide; 5) sus paredes están compuestas por celulosa (Wehr y Sheath, 2003;

Lee, 2008); 6) sus tamaños son muy diversos ya que poseen organismos microscópicos y macroscópicos.

Las Chlorophyta poseen una mayor diversidad de formas en ambientes dulceacuícolas, ya que sólo el 10% de las especies se ha identificado en ambientes marinos (Lee, 2008; John *et al.*, 2002). Los Ordenes más comúnmente encontrados en agua dulce son Ulotrichales, Coleochaetales, Oedogoniales y Zygnematales (John *et al.*, 2002; Wehr y Sheath, 2003; Lee, 2008).

Algunos grupos deben tener ciertos requerimientos ecológicos. Por ejemplo, las algas verdes flageladas tienden a ser más abundantes en aguas estancadas ricas en nutrientes (Nozaki, 2003). Las coloniales son más comunes en el plancton de aguas estancadas cuando los nutrientes, la luz y la temperatura son altos (Shubert, 2003). La mayoría de las Chlorophyta filamentosas se adhieren a superficies duras en aguas estancadas o de poco movimiento (John *et al.*, 2002). Por otro lado, las Desmideas son más comunes en estanques y arroyos con bajos niveles de conductividad y nutrientes (Gerrath, 2003).

Las cuatro Clases de Chlorophyta se han formulado por sus características morfológicas, en particular por su organización celular, posición del flagelo en la célula y fisiología (Barsanti y Gualtieri, 2006).

A pesar de que las Bacillariophyta y las Chlorophyta son componentes esenciales de la cadena trófica, tienen un rol importante dentro de los ciclos biogeoquímicos y son uno de los grupos más abundantes de la Tierra (Caron *et al.*, 1999). Varias especies han permanecido pobremente caracterizadas debido a su pequeño tamaño y falta de características morfológicas, por lo que su identificación taxonómica por simple observación al microscopio es una tarea complicada (Lèpere *et al.*, 2010). De igual manera, los métodos de cultivo que se tienen hasta el día de hoy no permiten el crecimiento de todas las comunidades presentes en ambientes naturales, por lo que hay varias especies que todavía no se han descrito a pesar de ser abundantes (Lefranc *et al.*, 2005; Tavera y Díez, 2009). Una opción para el estudio de éstas comunidades, sin la necesidad de cultivarlas, es el uso de métodos cromatográficos como, la cromatografía líquida de alto desempeño (o HPLC por sus siglas en inglés) y la cromatografía de gases

(Ansotegui, 2003), sin embargo, la información filogenética obtenida por estos métodos es limitada (Lefranc *et al.*, 2005).

En los últimos años la utilización de técnicas moleculares en la identificación de microorganismos ha ampliado nuestro conocimiento sobre ellos, principalmente los pertenecientes a ambientes marinos y en menor medida los que se encuentran en ambientes dulceacuícolas (Lefranc *et al.*, 2005; Tavera y Díez, 2009; Lèpere *et al.*, 2010; Luo *et al.*, 2011; Zhao *et al.*, 2011). Estos estudios se basan en el análisis de las secuencias del gen ribosomal 18S ADN, el cual ha revelado una amplia diversidad filogenética (Díez *et al.*, 2001; López-García *et al.*, 2001; Moon-van der Staay *et al.*, 2001), como los trabajos mencionados a continuación.

Buchheim *et al.* (1996), An *et al.* (1999) y Lundholm *et al.* (2002) desarrollaron estudios relacionados con *Chlamydomonas*, *Scenedesmus* y *Pseudo-Nitzschia* respectivamente. Estos géneros se han caracterizado por tener un constante cambio en su sistemática y taxonomía por lo que con estos trabajos se pretendió elucidar a estos géneros por medio de la secuenciación del gen ribosomal 18S ADNr en muestras de laboratorio. Los resultados obtenidos en los tres trabajos son parecidos ya que proponen la incorporación de caracteres de tipo molecular para la diferenciación de especies e inclusive géneros, así como una nueva organización sistemática de los taxa. Sin embargo, también se han realizado estudios a nivel de muestras ambientales como los realizados por Lefranc *et al.* (2005).

De acuerdo a Lefranc *et al.* (2005) el análisis de la diversidad de microorganismos eucariotas en la superficie de tres lagos que difieren por sus estados tróficos (oligotrófico, oligomesotrófico y eutrófico) demostró que la menor diversidad de microorganismos se encontró en el lago eutrófico con sólo 12 unidades taxonómicas operacionales (OTU's), por el contrario el lago considerado oligomesotrófico tuvo la mayor diversidad con 26 OTU's. Los linajes eucarióticos de microalgas que lograron identificar fueron: Cryptophyta, Chrysophyta, Chlorophyta, Haptophyta y Dinophyceae, siendo las Cryptophyta y las Chrysophyta las más abundantes con 13 y 12% del total de clonas respectivamente.

Lèpere *et al.* (2010) realizaron un perfil de microorganismos eucariotas en la columna de agua de tres lagos con diferentes estados tróficos. Los principales linajes

relacionados con las microalgas identificadas pertenecieron a las Divisiones de Chlorophyta y Haptophyta, las cuales se encontraron principalmente en la zona eufótica de los lagos, aunque hubo algunos registros de organismos pertenecientes a la División de Chlorophyta en la parte más profunda de los lagos, haciendo pensar que estas especies de algas verdes pueden ser mixótrofas.

Zhao *et al.* (2011) realizaron un estudio para conocer la diversidad genética de microorganismos eucariotas de 8 lagos de China que difirieron por sus estados tróficos. Por medio de una electroforesis en gel de gradiente de desnaturalización seleccionaron los dos sitios más diversos, uno oligotrófico (Zixia) y uno mesotrófico (Xuanwu), para construir librerías genéticas de estos sitios, basándose en el gen 18S ADNr. Los resultados obtenidos en este trabajo indicaron que la diversidad genética de los microorganismos eucariotas difiere entre los ocho lagos muestreados, registrándose los linajes de Alveolata, Stramenophyla, Cryptophyta y Chlorophyta, todos relacionados con las microalgas. Además de que el lago mesotrófico fue el más diverso durante el período muestreado.

Es necesario resaltar que estos trabajos se enfocan en el estudio de especies que son difíciles de discriminar morfológicamente o en la diversidad de microorganismos eucariotas en ambientes dulceacuícolas de climas templados. Por lo tanto, poco se sabe sobre la diversidad de microorganismos eucariotas de ambientes dulceacuícolas tropicales y más aún en sistemas kársticos tropicales. Esto a pesar del amplio número de microorganismos que participan en la producción primaria, es decir, las microalgas. Por lo que este trabajo provee un primer acercamiento a la diversidad genética de microalgas presentes en ambientes dulceacuícolas y además en un ambiente tan característico como es el de la Península de Yucatán.

En este estudio se examinó la diversidad de la comunidad de Bacillariophyta y Chlorophyta mediante la clonación y secuenciación de un fragmento del gen 18S ADN ribosomal en dos cenotes.

MATERIALES Y MÉTODOS

1. Área de Estudio y Colecta de Muestras

El área de estudio (ver Figura 1) y colecta de las muestras de agua son las mismas que se detallan en el capítulo III de ésta tesis.

2. Trabajo de Laboratorio

2.1 Extracción de ADN

2.1.1 Método CTAB

La extracción de ADN por medio del método de CTAB se describe detalladamente en el capítulo III de ésta tesis dentro del apartado de Materiales y Métodos.

2.1.2 Extracción de ADN por el Kit DNeasy Plant Mini Kit de QIAGEN®

La extracción de ADN por medio de la utilización del kit de extracción DNeasy Plant Mini Kit de QIAGEN® se describe detalladamente en el capítulo III de ésta tesis dentro del apartado de Materiales y Métodos.

2.2 Amplificación

El fragmento del gen 18S ADNr de la División Chlorophyta se amplificó utilizando los cebadores ChloroF (5'-TGG CCT ATC TTG TTG GTC TGT-3') y ChloroR (5'-GAA TCA ACC TGA CAA GGC AAC-3'), el producto amplificado fue de ~473 pb (Valiente-Moro *et al.*, 2009). El fragmento del gen 18S ADNr de la División Bacillariophyta fue amplificado por los cebadores BaciF (5'-AGA TTG CCC AGG CCT CTC G-3') y BaciR (5'-CCA TCG TAG TCT TAA CCA TAA AC-3') y se obtuvo un producto de ~516 pb (Valiente-Moro *et al.*, 2009).

La reacción de amplificación para los fragmentos de los genes 18S ADNr se preparó usando 5 µl de Buffer 10x (1.5 mM) (Promega ®), 1 µl de dNTP's (0.2 mM) (Promega ®), 0.5 µl de cada cebador (0.1-1.0 µM) (Promega ®), 0.2 µl de Taq Polimerasa

(1.25 unidades/ μ l) (Promega ®) y aproximadamente 0.5 μ g/ μ l de ADN total y 16.8 μ l de agua libre de nucleasas.

Las amplificaciones para los dos juegos de cebadores se realizaron en el termociclador 96-Well Veriti de la marca Applied Biosystems® bajo el siguiente ciclo de reacción: un calentamiento inicial de un minuto a 94 °C, seguido por 35 ciclos (60 segundos a 94 °C, 60 segundos a 55 °C, 60 segundos a 72 °C) con un ciclo adicional de 10 minutos a 72 °C, posteriormente los tubos se mantuvieron a 4 °C hasta el momento de su uso.

Para comprobar el resultado de las amplificaciones, se tomó una alícuota de 5 μ l de cada producto de la amplificación y se corrió en un gel de agarosa al 1%, durante 25 minutos a 80V, en una cámara de electroforesis (Major Science Modelo ME 10-7-10). A los geles se les agregó bromuro de etidio y posteriormente se visualizaron bajo luz UV. Para diferenciar los tamaños de los fragmentos amplificados se utilizó el marcador BenchTop de la marca Promega® de 10 000 pb.

2.3 Clonación de los Fragmentos de los Genes 18S ADNr

Los fragmentos amplificados fueron clonados en el vector pGEM-T Easy® (Promega ®). Previo a la clonación el ADN fue cuantificado con ayuda del espectrofotómetro (Nanodrop ND-1000), con el fin de obtener la cantidad de ADN óptima para realizar las ligaciones siguiendo las instrucciones del manual del pGEM-T Easy. La reacción de ligación fue en una proporción inserto-vector 3:1, usando la enzima ligasa T4. El plásmido recombinante fue transferido en bacterias *Escherichia coli* DH5 α , mediante choque térmico, esto es, el producto de ligación fue adicionado a las células competentes de *E. coli*, las cuales fueron incubadas en hielo por 20 minutos, posteriormente se incubaron un minuto a 42 °C y finalmente se colocaron en hielo 5 minutos. Se agregaron 200 μ l de medio LB y se incubaron en agitación durante una hora, posteriormente, las células transformadas fueron plaqueadas en medio LB con ampicilina (100 μ g/ml) y X-Gal (20 μ g/ml). Las bacterias recombinantes fueron seleccionadas para extraer el ADN plasmídico por lisis alcalina. Los plásmidos fueron digeridos con la enzima *EcoRI* para comprobar la presencia de los insertos de los tamaños esperados. Se tomó una alícuota

de 10 μ l de cada producto de la amplificación y se mezcló con 3 μ l de buffer de carga, esta mezcla se corrió en un gel de agarosa al 1%, durante 25 minutos a 80V, en una cámara de electroforesis (Major Science Modelo ME 10-7-10). Los geles fueron teñidos con bromuro de etidio y visualizados bajo luz UV. El tamaño de marcador que se utilizó fue de 10 000 pb. Posteriormente los plásmidos recombinantes fueron enviados a secuenciar.

2.4 Análisis Bioinformático

Las secuencias obtenidas de los fragmentos de los genes 18S ADNr se compararon con secuencias disponibles en la base de datos del National Center for Biotechnology Information usando BLAST. A partir de los resultados obtenidos, se seleccionaron secuencias relacionadas de la base de datos del GenBank, para realizar comparaciones con las clonas obtenidas en el laboratorio. A partir de las secuencias se realizaron dos bases de datos que fueron alineadas mediante el algoritmo MUSCLE (Edgar, 2004) la primera con las secuencias de los genes ribosomales obtenidos con los cebadores para Chlorophyta, y la segunda con las secuencias obtenidas a partir de los cebadores para Bacillariophyta.

Para realizar la reconstrucción filogenética se utilizó el método de la máxima probabilidad (ML) con la ayuda del programa MEGA 6.0 (Tamura *et al.*, 2011). Adicionalmente se realizó un análisis Bootstrap (1000 repeticiones). La longitud de las sub-divisiones es proporcional a la distancia evolutiva.

RESULTADOS

1. Diversidad Genética de las Microalgas de los Cenotes de Playa del Carmen y Leona Vicario

1.1 Extracción de ADN

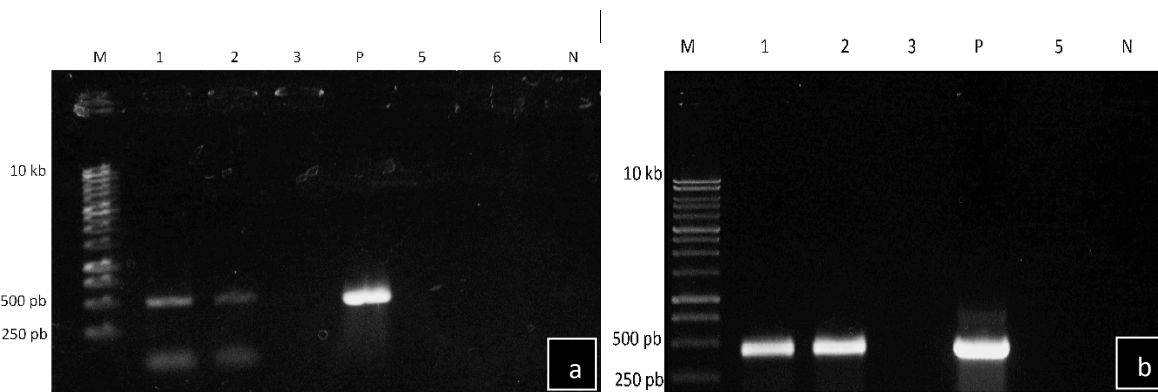
Los métodos de extracción de ADN por CTAB y por medio del kit de extracción DNeasy Plant Mini Kit de QIAGEN® utilizados en este trabajo permitieron obtener ADN de

buena calidad a partir de muestras de agua de los dos cenotes como se muestra en las figuras 2 y 3, por lo que este material fue utilizado en los análisis posteriores.

De los dos métodos utilizados en este trabajo para la concentración de la muestra biológica se observó un mejor resultado al filtrar las muestras de agua previo a la extracción de ADN total. Debido a que al utilizar el método de centrifugación para concentrar la muestra no funcionó en todos los casos (ej. Muestra de agua del cenote de Leona Vicario). Posiblemente esto se debió a la menor presencia de microorganismos en la muestra de Leona Vicario comparada con Playa del Carmen.

2. Amplificación de los Fragmentos del Gen 18S ADNr de Bacillariophyta y Chlorophyta

La amplificación por PCR con el juego de cebadores denominados “BACI” y “CHLORO” generó fragmentos de 516 y 473 pb respectivamente (Figura 10a, b, c, d), los cuales son los tamaños esperados de acuerdo con los resultados de Valiente-Moro *et al.* (2009), quienes diseñaron y probaron los cebadores en muestras ambientales de los lagos Grangent y Aydat en Francia. Ambas amplificaciones fueron exitosas, sin importar si los templados de ADN fueron extraídos por el protocolo CTAB o por medio del kit de Promega®.



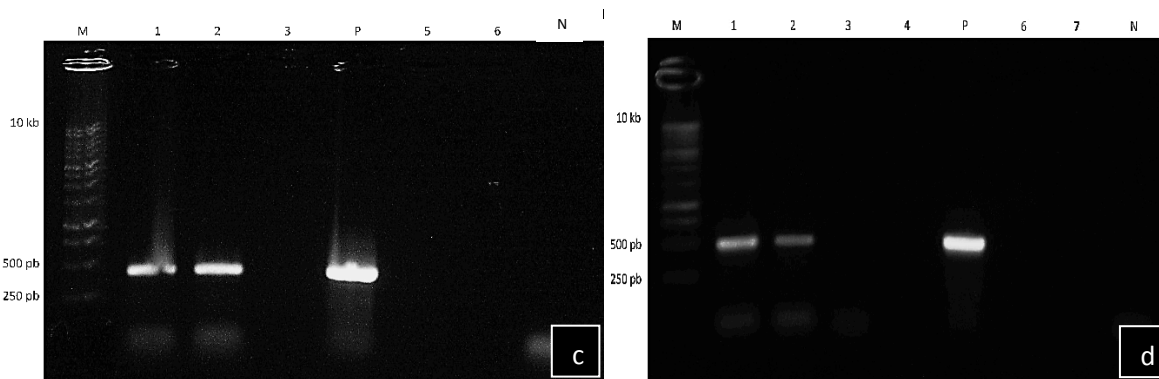


Figura 4a. Amplificación por el juego de cebadores BACI de las muestras de Playa del Carmen obtenidas por centrifugación (1) y otra por filtración (2). Los carriles 3, 5 y 6 no se cargaron. **b.** Amplificación por el juego de cebadores BACI de las muestras de Leona Vicario obtenidas por el kit de extracción DNeasy Plant Mini Kit de QIAGEN® (1, 2). Los carriles 3 y 5 no se cargaron. **c.** Amplificación por el juego de cebadores CHLORO de las muestras de Playa del Carmen obtenidas por centrifugación (1) y por filtración (2). Los carriles 3, 5 y 6 no se cargaron. **d.** Amplificación por el juego de cebadores CHLORO de las muestras de Leona Vicario obtenidas por el kit de extracción DNeasy Plant Mini Kit de QIAGEN® (1, 2). Los carriles 3, 4, 6, 7 no se cargaron. M: marcador de peso molecular BenchTop de Promega® (10 000 pb). P: control positivo, plásmido recombinante previamente secuenciado. N: Control negativo.

De estos experimentos se concluyó que los juegos de cebadores BACI y CHLORO fueron eficientes para amplificar fragmentos del gen 18S ADNr en muestras ambientales de los cenotes estudiados, aparentemente la condición del estado trófico del sitio no afecta en el desempeño de la amplificación ya que sitios oligotróficos como eutróficos presentaron una amplificación esperada de aproximadamente ~500 pb para este juego de cebadores.

3. Clonación de los Fragmentos del Gen 18S ADNr

Los fragmentos amplificados fueron ligados como se menciona a detalle en materiales y métodos en un vector de clonación pGEM T Easy (Promega®). Los productos de ligación fueron utilizados para transformar células competentes de *Escherichia coli* DH5α. Las colonias recombinantes (blancas) fueron picadas y puestas a crecer en medio LB líquido y con ampicilina (ver Materiales y métodos). Se picaron varias colonias blancas por placa hasta obtener aproximadamente 32 colonias blancas por cebador, las cuales se cultivaron en medio LB líquido con ampicilina a 37 °C durante toda la noche. A partir de estos cultivos se realizó la extracción de ADN plasmídico mediante

lisis alcalina o minipreps (ver Materiales y métodos). Con el fin de comprobar la presencia de insertos del tamaño esperado en cada plásmido recombinante, se utilizó la enzima *EcoRI* para confirmar la presencia de los insertos del tamaño esperado. Los productos obtenidos de las digestiones con *EcoRI* se corrieron en un gel de agarosa al 1% (ver Materiales y métodos) como se muestra en la figuras 11a, b, c, d y se seleccionaron las clonas positivas para su posterior secuenciación.

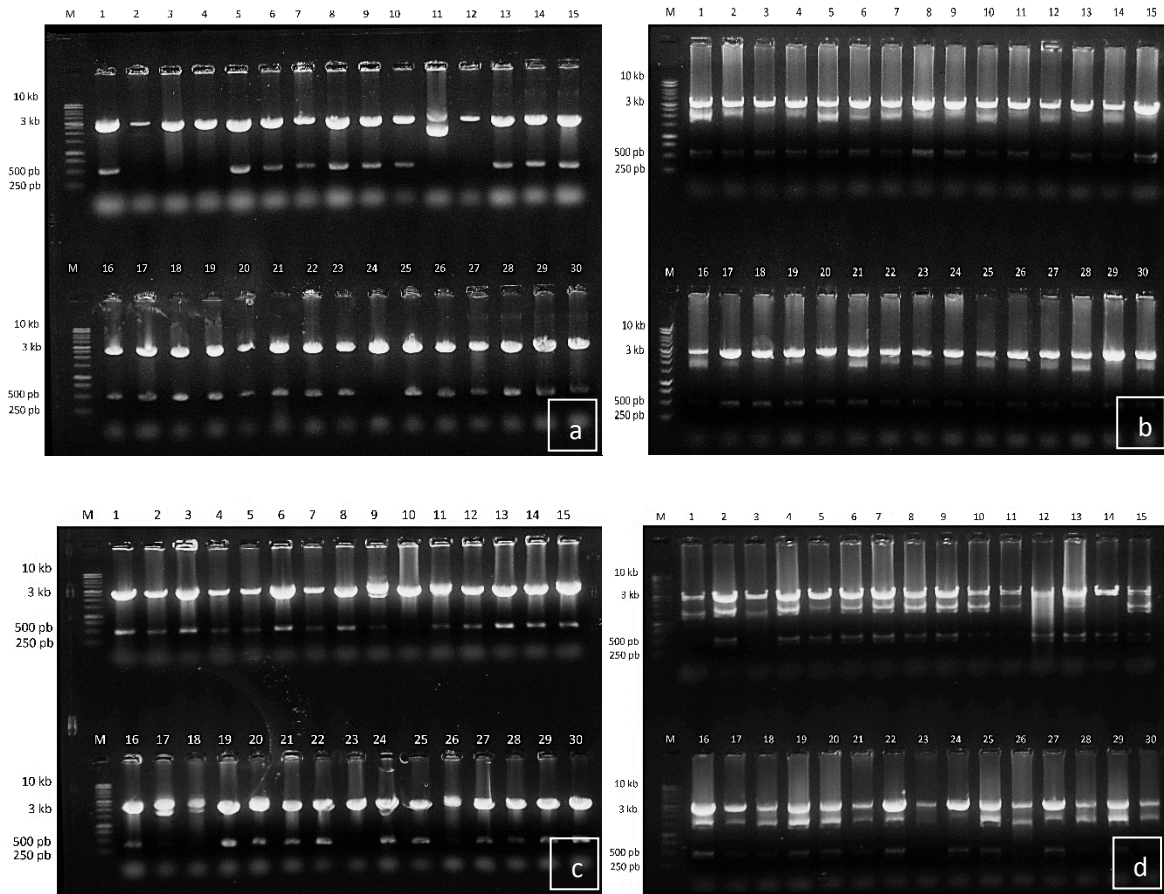


Figura 5a. Digestión con la enzima *EcoRI* de las clonas obtenidas por medio del juego de cebadores BACI para el cenote de Playa del Carmen. **b.** Digestión con la enzima *EcoRI* de las clonas obtenidas por medio del juego de cebadores BACI para el cenote de Leona Vicario. **c.** Digestión con la enzima *EcoRI* de las clonas obtenidas por medio del juego de cebadores CHLORO para el cenote de Playa del Carmen. **d.** Digestión con la enzima *EcoRI* de las clonas obtenidas por medio del juego de cebadores CHLORO para el cenote de Leona Vicario. M: marcador de peso molecular BenchTop de Promega ® (10 000 pb). 1-30 número de clona.

Para el sitio de Playa del Carmen se lograron obtener 32 clonas positivas de Bacillariophyta y 32 de Chlorophyta, mientras que para el sitio de Leona Vicario se obtuvieron 32 clonas positivas para Bacillariophyta y 31 para Chlorophyta.

4. Identificación de OTU's

Los OTU's se definen como un conjunto de secuencias con un 97% de similitud, esperando que estos correspondan con alguna especie (Sneath y Sokal, 1973). El análisis de cada librería demostró 7 OTU's de Bacillariophyta y 3 OTU's de Chlorophyta para el cenote de Playa del Carmen, en el cenote de Leona Vicario se registraron 4 OTU's pertenecientes a la División de Bacillariophyta, mientras que para la División Chlorophyta se registraron 11 OTU's. Además hay que resaltar que ningún OTU se compartió entre los cenotes (Cuadro 3), es decir, los OTU's de cada sitio fueron particulares, lo que hace suponer que las condiciones de los sitios influyen en la composición microalgal de los mismos.

Cuadro 7. Número de clonas pertenecientes a cada OTU en las librerías genéticas de cada sitio.

División	Primer Hit BLAST (Número de acceso)	Identidad de nucleótidos %	Número de clonas en la librería por cada sitio:	
			Playa del Carmen	Leona Vicario
Bacillariophyta	<i>Nitzschia supralitorea</i> (AJ867019)	98	10	
	<i>Nitzschia palea</i> (KF959653) (AJ867002)	99	11	
	<i>Nitzschia inconspicua</i> (KC736636)	98	1	

	<i>Navicula gregaria</i>	99	5
	(HM805037)		
	<i>Nitzschia bizertensis</i>	98	3
	(KF955285)		
	<i>Halamphora coffeaformis</i>	98	1
	(KJ463449)		
	<i>Frustulia</i> cf.	98	1
	<i>magaliesmontana</i>		
	(HF562287)		
	<i>Frustulia cassiae</i>	97	28
	(HF562289)		
	<i>Stauroneis kriegri</i>	92	1
	(AM502037)		
	<i>Berkeleya hyalina</i>	99	1
	(KJ577847)		
	<i>Stauroneis latistauros</i>	79	1
	(KM116114)		
<i>Chlorophyta</i>	<i>Chlamydomas applanata</i>	100	30
	(AB701512)		
	<i>Bracteacoccus minutus</i>	99	1
	(HQ902934)		
	<i>Chlamydomonas</i> sp.	100	1

(AB701530)		
<i>Botryococcus terribilis</i>	99	2
(KJ541891)		
<i>Chlamydomonas noctigama</i>	98	6
(AB753035) (JX101906)		
<i>Tetracystis pulchra</i>	99	6
(KM020022)		
<i>Stephanosphaera pluvialis</i>	99	2
(KC589697)		
<i>Borodinellopsis texensis</i>	91	1
(KM020129)		
<i>Tetracystis sarcinalis</i>	98	5
(KM020029)		
<i>Chloromonas kasaiae</i>	96	5
(AB734109)		
<i>Spongiochloris spongiosa</i>	99	1
(KM020025)		
<i>Asterococcus korschikoffii</i>	100	1
(AB175837)		
<i>Chlamydomonas mexicana</i>	99	1
(AB701546)		

<i>Botryococcus braunii</i>	98	1
(KC438298)		

Se analizaron un total de 126 secuencias, 63 para Bacillariophyta y 63 para Chlorophyta. Las Bacillariophyta fueron agrupadas en 11 OTU's, por otro lado, las Chlorophyta tuvieron 14 OTU's. El 17% de las clonas (17) se asociaron con *Frustulia cassiae* por parte de las Bacillariophyta y el 29% (30 clonas) se asoció con *Chlamydomonas applanata* por parte de las Chlorophyta, siendo posiblemente las especies más abundantes de los sitios de colecta. Sin embargo, el 7% de las clonas (2 de Bacillariophyta y 6 de Chlorophyta) no se asoció con una especie en particular, ya que las secuencias tuvieron un porcentaje de identidad menor al 97% con alguna de las secuencias del GenBank.

El 96% de las clonas tuvo porcentajes de identidad de nucleótidos superiores o iguales al 97% con alguna de las secuencias del GenBank, por lo que esto indica que la información que se puede conseguir por medio del fragmento de ~500 pb para Bacillariophyta y Chlorophyta es taxonómicamente informativo, es decir, permite determinar especies en la mayoría de los casos. Estos resultado son similares a los obtenidos por Valiente-Moro *et al.* (2009) quienes utilizaron el mismo juego de cebadores en muestras ambientales de Francia, obteniendo la identificación de géneros y especies de diatomeas y de algas verdes.

Se observaron diferencias en la diversidad de la comunidad de microalgas entre los dos cenotes, ya que el cenote con mayor diversidad fue Leona Vicario, donde la comunidad estuvo dominada por *Frustulia cassiae* en el caso de las Bacillariophyta y *Chlamydomonas noctigama* en el caso de Chlorophyta. Para el cenote de Playa del Carmen donde la diversidad fue menor, la especie más abundante fue *Chlamydomonas applanata* en el caso de las Chlorophyta y *Nitzschia palea* en el caso de las Bacillariophyta.

5. Porcentaje de Identidad por Pares

Con base al alineamiento que se consiguió por medio de MUSCLE (Edgar, 2004) se obtuvieron los porcentajes de identidad de las secuencias de los fragmentos amplificados por los cebadores BACI y CHLORO (Cuadro 4), gracias a este análisis se puede confirmar con suficiente confiabilidad la presencia de las especies *Nitzschia supralitorea*, *Nitzschia palea*, *Nitzschia bizertensis*, *Navicula gregaria*, *Halamphora coffeaformis* y *Frustulia cassiae* por parte de Bacillariophyta; en el caso de las Chlorophyta se registraron las especies *Chlamydomonas applanata*, *Botryococcus terrebilis*, *Tetracystis pulchra*, *Tetracystis sarcinalis*, *Spongiochloris spongiosa*, *Asterococcus korschikoffii*, *Chlamydomonas noctigama*, *Chlamydomonas mexicana* y *Botryococcus braunii* ya que sus porcentajes de identidad fueron mayores al 99%.

Cuadro 8. Similitudes más cercanas encontradas entre las secuencias obtenidas y las disponibles en el GenBank en porcentaje de identidad por pares (>90%).

DIVISIÓN	CLONA	POSICIÓN TAXONÓMICA	NÚMERO DE ACCESIÓN	PORCENTAJE DE IDENTIDAD POR PARES
BACILLARIOPHYTA	CH F05	<i>Nitzschia supralitorea</i>	AJ867019	99.99%
	CH F08			
	CH F10			
	CH F11			
	CH F12			
	CH G06			
	CH H01			
	CH H11			

CH G09	<i>Halamphora coffeaformis</i>	KJ463449	99.99%
CH H09	<i>Navicula gregaria</i>	HM805037	99.99%
CH H02			
CH G12			
CH G08			
CH G04			
CH F07	<i>Nitzschia palea</i>	KF959653	99.99%
CH F09			
CH G01			
CH G02			
CH G03			
CH G07			
CH G11			
CH H03			
CH H05			
CH H08			
CH H12			
CH G05	<i>Nitzschia bizertensis</i>	KF955285	99.99%
CH H07			
LV C08	<i>Frustulia cassiae</i>	HF562289	99.99%

LV C09

LV C10

LV C11

LV C12

LV D01

LV D03

LV D04

LV D06

LV D07

LV D10

LV D11

LV E01

LV E02

LV E03

LV E05

LV E06

LV E07

LV E08

LV E09

LV E10

LV E11

	LV F01			
	LV F02			
	LV F03			
	LV F05			
CHLOROPHYTA	CH C09	<i>Chlamydomonas</i>	AB701512	99.99%
	CH C10	<i>applanata</i>		
	CH C11			
	CH C12			
	CH D01			
	CH D02			
	CH D03			
	CH D04			
	CH D05			
	CH D06			
	CH D07			
	CH D08			
	CH D09			
	CH D10			
	CH D11			
	CH D12			
	CH E01			

CH E02			
CH E03			
CH E04			
CH E05			
CH E06			
CH E07			
CH E08			
CH E09			
CH E10			
CH E11			
CH E12			
CH F01			
CH F02			
CH F03			
LV A02	<i>Botryococcus terribilis</i>	KJ541891	99.99%
LV A09	<i>Tetracystis sarcinalis</i>	KM020029	99.99%
LV B03			
LV C05			
LV A04	<i>Tetracystis pulchra</i>	KM020022	99.99%
LV A07			
LV A12			

LV B02				
LV B11				
LV C07				
LV C04	<i>Spongiochloris spongiosa</i>	KM020025	99.99%	
LV B05	<i>Asterococcus korschikoffii</i>	AB175837	99.99%	
LV B01	<i>Chlamydomonas noctigama</i>	JX101906	99.99%	
LV B07	<i>Chlamydomonas mexicana</i>	AB701546	99.99%	
LV B09	<i>Botryococcus braunii</i>	KC438298	99.99%	

De igual manera se realizaron las matrices de los porcentajes de identidad de los sitios de muestreo por División, como se muestra en las Figuras 12, 13, 14 y 15. En estas matrices de datos se observa que la mayoría de las secuencias de Leona Vicario tuvieron porcentajes de identidad arriba del 99% con la especie *Berkeleya hyalina*, sin embargo, al hacer una comparación entre esta secuencia y la perteneciente a *Frustulia cassiae* se observa que son muy parecidas, siendo ésta última el primer hit de la mayoría de las secuencias de Leona Vicario, por lo que se decidió que ésta sería la especie identificada y posiblemente la más abundante en el cenote de Leona Vicario. En el caso de Playa del Carmen se encontró una mayor diversidad al encontrar cinco especies, reconociendo a *Nitzschia palea* y *Nitzschia supralitorea* como posiblemente las más abundantes, registrando 11 y 8 secuencias respectivamente. En el caso de las Chlorophyta para Playa del Carmen se registro la especie *Chlamydomonas applanata* con 31 secuencias, siendo la única especie identificada en éste cenote; por parte de Leona Vicario se registraron ocho especies, siendo *Tetracystis pulchra* y *Tetracystis sarcinalis* las de mayor presencia con seis y cuatro secuencias respectivamente.



Figura 6. Matriz de identidad por pares de la comunidad de Bacillariophyta de Playa del Carmen

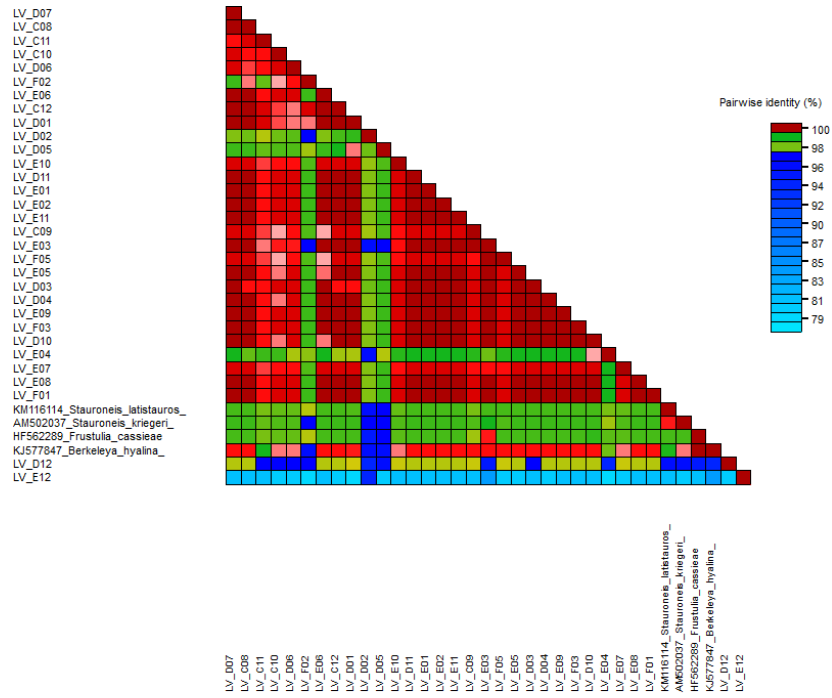


Figura 7. Matriz de identidad por pares de la comunidad de Bacillariophyta de Leona Vicario.

CAPÍTULO IV. MICROALGAS EUCARIOTAS: BACILLARIOPHYTA Y CHLOROPHYTA

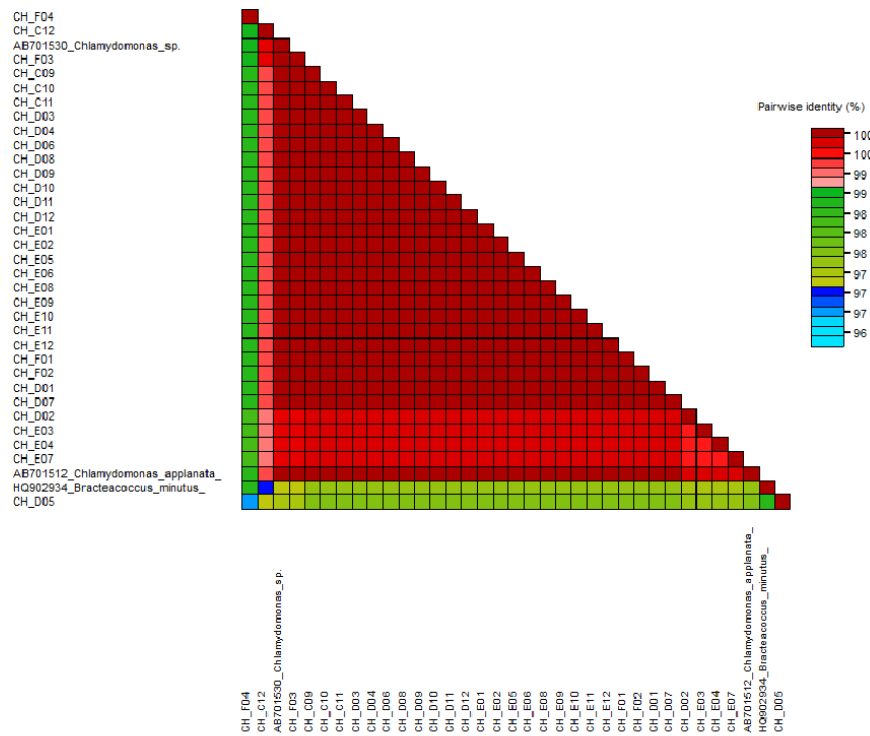


Figura 14. Matriz de identidad por pares de la comunidad de Chlorophyta de Playa del Carmen

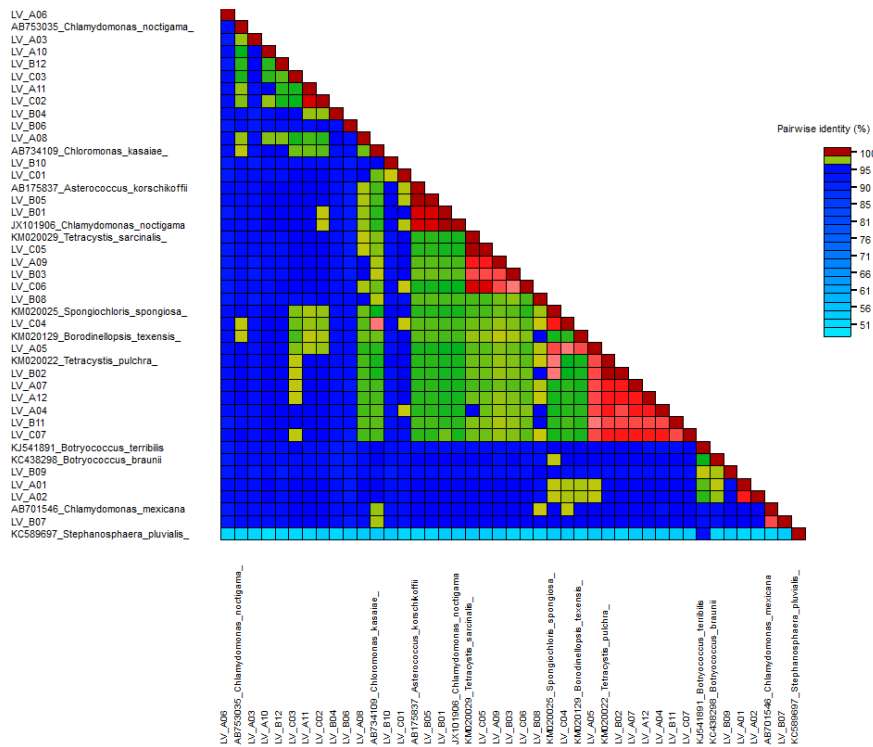


Figura 8. Matriz de identidad por pares de la comunidad de Leona Vicario

6. Análisis Filogenético

Para conocer la relación filogenética entre las secuencias obtenidas en este trabajo y las de referencia del GenBank se realizaron árboles filogenéticos de máxima similitud (Maximum Likelihood) por medio del programa MEGA 6.0. Los árboles filogenéticos obtenidos en base a las secuencias de las Divisiones Bacillariophyta y Chlorophyta demostraron que la mayoría de las secuencias de Playa del Carmen y de Leona Vicario no se integraron de manera aleatoria, más bien formaron sub-clados dependiendo del sitio de muestreo. Esto corrobora la particularidad de cada sitio para sostener una comunidad microalgal específica.

El árbol filogenético de la División de Bacillariophyta estuvo conformado por 63 secuencias y se organizó en seis sub-clados, formando un clado principal (Figura 16). El primer sub-clado de ellos estuvo conformado por 32 secuencias de Playa del Carmen y 31 de Leona Vicario. La identidad por pares de estas secuencias indica que la relación entre ellas es alta y el árbol filogenético lo comprueba, ya que la mayoría de las secuencias se agruparon en un solo clado. El árbol estuvo constituido por cuatro clados polifiléticos pertenecientes al cenote de Playa del Carmen y correspondiendo con las especies *Navicula gregaria*, *Nitzschia palea*, *Nitzschia supralitorea* y *Halamphora coffeaformis* y dos clados monofiléticos de Leona Vicario, estos clados demuestran que la especie *Frustulia vulgaris* y *Cylindrotheca* sp. son especies hermanas y se encontraron en la parte más basal del árbol siendo de las más ancestrales para éste árbol filogenético junto con la especie *Cylindrotheca closterium*. Aparentemente hay una diferencia marcada entre las secuencias de un sitio y de otro, ya que las muestras pertenecientes a Playa del Carmen no se intercalaron con las muestras de Leona Vicario y viceversa, esto hace suponer que las especies de Bacillariophyta de éste estudio tienen un reducido rango de hábitats, siendo sensibles al tipo de cuerpo acuático que habitan.

CAPÍTULO IV. MICROALGAS EUCARIOTAS: BACILLARIOPHYTA Y CHLOROPHYTA

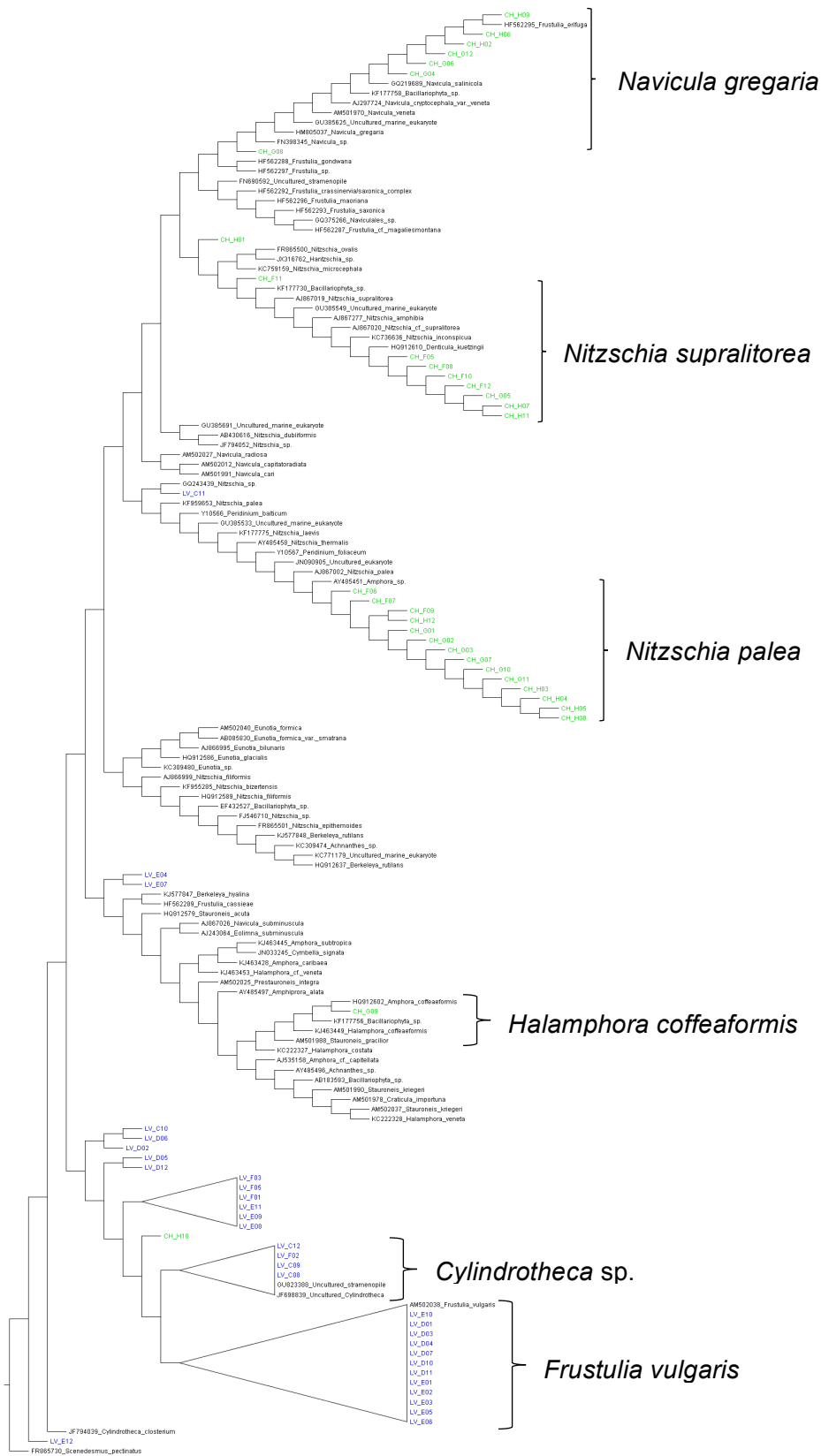


Figura 9. Árbol filogenético basado en las secuencias obtenidas con los cebadores específicos para la División Bacillariophyta. Verde: Playa del Carmen; Azul: Leona Vicario; **Negro:** Secuencias de referencia con su correspondiente número de accesoión del GenBank. La secuencia de la Chlorophyta *Scenedesmus pectinatus* (FR568730) se utilizó como grupo externo para enraizar el árbol.

El árbol filogenético de las Chlorophyta estuvo conformado por 63 secuencias, que lograron conformar dos clados principales (Figura 17). El primer clado estuvo constituido por 32 secuencias del cenote Playa del Carmen y 30 secuencias de Leona Vicario. De igual manera que en el árbol filogenético de las Bacillariophyta la identidad por pares demuestra que la relación entre ellas es alta, ya que todas las secuencias, a excepción de *Botryococcus braunii*, se agruparon en el primer clado. Las secuencias que se pudieron identificar con un alto nivel de confiabilidad fueron *Chlamydomonas* y *Botryococcus braunii* esto fue apoyado por sus altos porcentajes de identidad por pares el cual fue de 99.99%.

De igual manera que en el árbol filogenético anterior las secuencias de un sitio no se intercalaron con el otro, ya que formaron 11 sub-clados polifiléticos, uno de ellos perteneció a *Chlamydomonas applanata* de Playa del Carmen, mientras los otros 10 pertenecieron a Leona Vicario, siendo *Botryococcus braunii* la especie más ancestral de este estudio, ya que se encontró en la parte más basal del árbol. El hecho de que ninguna especie se compartiera entre sitios de muestreo nos hace suponer que estas especies tienen un reducido rango de hábitats. De esta manera, creemos que estas especies son susceptibles a las condiciones del medio en el que habitan, ya que son particulares para cada sitio. De igual manera 12 secuencias formaron sub-clados independientes al no relacionarse con ninguna referencia del GenBank por lo que posiblemente sean nuevas especies.

CAPÍTULO IV. MICROALGAS EUCARIOTAS: BACILLARIOPHYTA Y CHLOROPHYTA

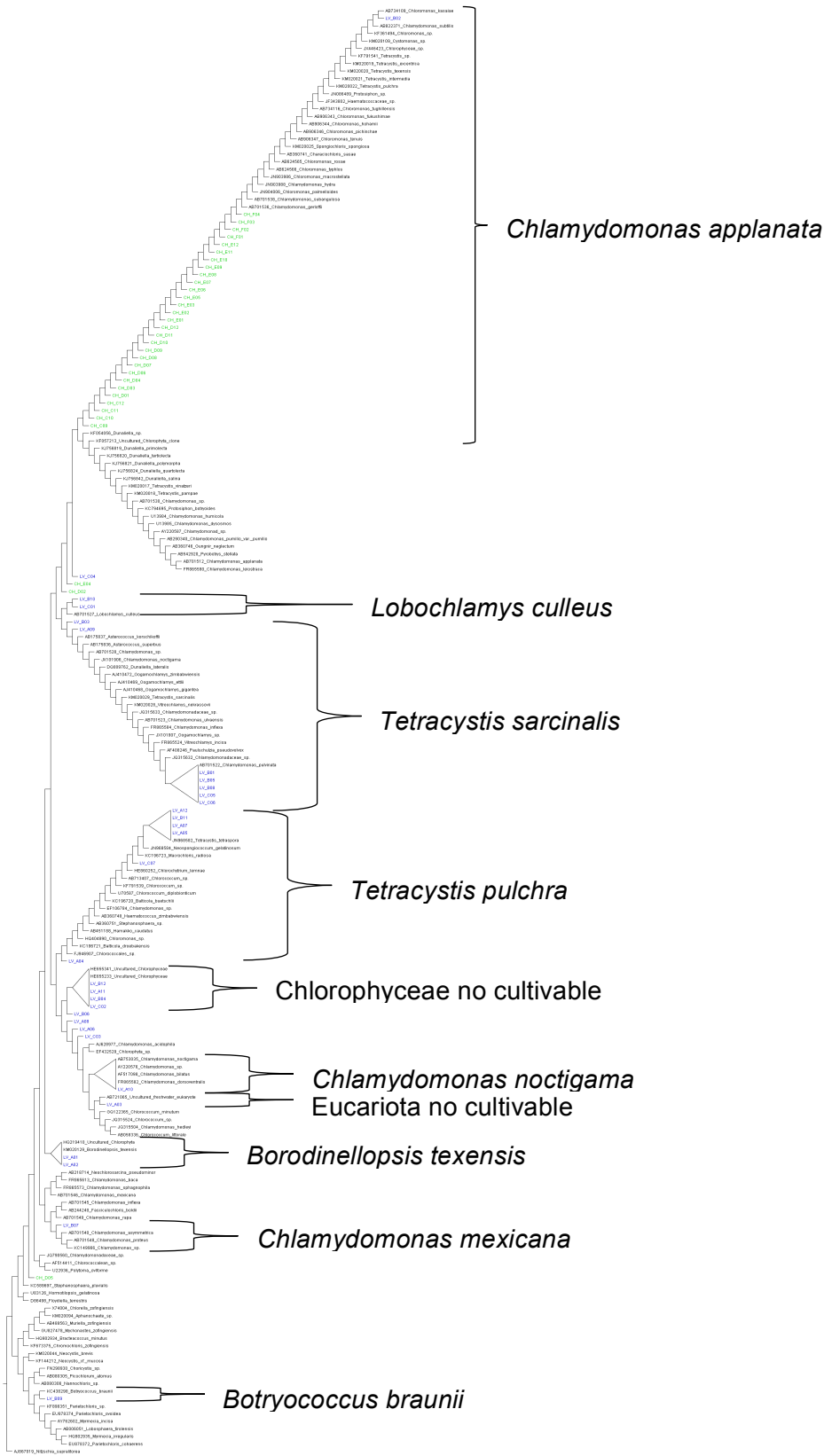


Figura 10. Árbol filogenético basado en las secuencias obtenidas con los cebadores específicos para la División Chlorophyta. Verde: Playa del Carmen; Azul: Leona Vicario; **Negro:** Secuencias de referencia con su correspondiente número de accesoión del GenBank. La secuencia de la Bacillariophyta *Nitzschia supralitorea* (AJ867019) se utilizó como grupo externo para enraizar el árbol.

DISCUSIÓN

Las Bacillariophyta son una División ampliamente distribuida en ambientes dulceacuícolas. En México se tiene el registro de 327 especies (Oliva-Martínez *et al.*, 2013), siendo la División con mayor diversidad en nuestro país.

En la Península de Yucatán se tienen varios estudios de descripción morfológica en los cuales se tiene el registro de especies de diatomeas, siendo los géneros *Navicula* y *Nitzschia* los más diversos (Sánchez *et al.*, 2002; López-Adrián y Barrientos-Medina, 2005; Nava-Ruíz y Valadez, 2012; Valadez y Hernández-Terrones, 2012).

En este estudio el género *Nitzschia* fue el que más registros tuvo con tres especies, con base en los porcentajes de identidad de nucleótidos y de la formación de dos sub-clados bien definidos con secuencias pertenecientes a este género. El género se caracteriza por habitar aguas con altas concentraciones de nutrientes, materia orgánica, moderada contaminación y valores de pH con tendencia a la alcalinidad (Spaulding y Edlund, 2008c). El género *Nitzschia* es uno de los más ampliamente distribuidos, así que no es de sorprender que las especies sean de un amplio rango de hábitats. Se registran por primera vez en el estado de Quintana Roo a las especies *Nitzschia bizertensis* y *N. supralitorea*, las cuales se encontraron en el cenote de Playa del Carmen.

El género *Navicula* con más de 10 000 especies se ha registrado en prácticamente todos los hábitats dulceacuícolas de Norte América, principalmente en sitios con altos niveles de nutrientes (Kocielek y Spaulding, 2003) y en regiones tropicales las especies de este género forman un componente dominante y altamente diverso de la comunidad bentónica de las microalgas, aunque ocasionalmente se le puede encontrar en el plancton (Werum *et al.*, 2004). Dentro de la Península se ha registrado la presencia de este género en varias ocasiones (Sánchez *et al.*, 2002; Schmitter-Soto *et al.*, 2002; López-Adrián y

Barrientos-Medina, 2005; Ibarra *et al.*, 2009; Nava-Ruíz y Valadez, 2012; Valadez y Hernández-Terrones, 2012), corroborando su carácter de cosmopolita, no obstante, es el primer registro en el estado de Quintana Roo para la especie *Navicula gregaria*, perteneciente al cenote de Playa del Carmen.

Frustulia es un género que se caracteriza por crecer en el bentos como células solitarias o a veces llegan a formar colonias que están unidas por un tubo mucilaginoso, es un género de amplia distribución con preferencia por los sitios con valores de pH cercanos a la neutralidad (6.5-7.5), altas concentraciones de alcalinidad y tolerantes a los cambios de salinidad ya que se le puede encontrar en agua dulce como en agua salobre (Kociolek y Spaulding, 2003; Spaulding y Edlund, 2008b). Dentro de la Península de Yucatán se ha registrado a la especie *F. vulgaris* por Schmitter-Soto *et al.* (2002) e Ibarra *et al.* (2009) y este estudio registra por primera vez en el estado de Quintana Roo a la especie *F. cassiae* en el cenote de Leona Vicario.

El género *Halamphora* fue originalmente un sub-género de *Amphora*, no obstante, desde el año 2009 se le considera como un género independiente. Su rango de distribución es bastante amplio, aunque es un género principalmente marino, también se le puede encontrar en ambientes salobres y dulceacuícolas (Spaulding, 2011). En los sistemas de agua dulce es característico encontrarlo en lugares con altos niveles de alcalinidad (Round *et al.*, 1990), por lo que no es de extrañar que se le haya encontrado en los sitios de muestreo, aunque sólo se registró en Playa del Carmen. Esta no es la primera vez que se tiene registro dentro de la Península de Yucatán. Varios trabajos como los de Sánchez *et al.* (2002), Schmitter-Soto *et al.* (2002), López-Adrián y Barrientos-Medina (2005), Ibarra *et al.* (2009), Valadez y Hernández-Terrones (2009) y Nava-Ruíz y Valadez (2012), citan al género pero como *Amphora*, es decir, como se le conocía hasta 2009.

Las Chlorophyta poseen una mayor diversidad en ambientes dulceacuícolas que en ambientes marinos (John *et al.*, 2002; Lee, 2008) por lo que es común tener registros de estas especies en este tipo de ambientes. Dentro de la Península de Yucatán se tiene el registro de 40 especies de Chlorophyta (López-Adrián y Barrientos-Medina, 2005; Nava-Ruíz y Valadez, 2012), resaltando los géneros *Kirchneriella*, *Pediastrum* y

Cosmarium por ser los más diversos. En este estudio se pudieron registrar las especies *Botryococcus terribilis*, *Botryococcus braunii*, *Tetracystis pulchra*, *Tetracystis sarcinalis*, *Spongiochloris spongiosa*, *Asterococcus korschikoffii*, *Chlamydomonas applanata*, *Chlamydomonas noctigama*, y *Chlamydomonas mexicana*.

El género *Chlamydomonas* está conformado por organismos unicelulares esféricos o elipsoidales que poseen un par de flagelos en la parte apical de la célula y son tan largos como la misma célula (John *et al.*, 2002). Las *Chlamydomonas* son microalgas que tienen una amplia distribución a nivel mundial por lo que se encuentran en todo tipo de agua, e inclusive en suelo y nieve (Pentecost, 2002). La mayoría de las especies son de ambientes con altos niveles de nutrientes y altos niveles de alcalinidad donde llegan a proliferar y se vuelven abundantes principalmente en primavera y en verano (Pentecost, 2002; Guiry y Guiry, 2008). Dentro de la Península de Yucatán el género se ha reportado con anterioridad por Sánchez *et al.* (2002) quienes registraron una especie en el cenote Mayan Blue, cercano a la ciudad de Tulum. De esta manera es la primera vez que se registran las especies *Chlamydomonas applanata*, *C. mexicana* y *C. noctigama* en el estado de Quintana Roo, siendo *C. applanata* registrada en Playa del Carmen, mientras que *C. mexicana* y *C. noctigama* se reconocieron en Leona Vicario.

Las especies del género *Tetracystis* se caracterizan por ser esféricas y formar generalmente colonias de dos a cuatro células verdosas, es un género pocas veces registrado ya que es característico de suelos (Shubert, 2003). Éste género fue registrado con las especies *T. pulchra* y *T. sarcinalis* en el cenote de Leona Vicario durante el presente estudio, donde previamente hubo lluvias que posiblemente facilitaron el acceso de estas especies a dicho sitio. Es la primera vez que se registra al género en el estado de Quintana Roo, consecuentemente las especies también son nuevos registros para el estado.

Botryococcus se caracteriza por ser una colonia de forma irregular que esta embebida en un mucilago y llega a tener colores verdes, amarillos, naranjas o inclusive rojos (John y Tsarenko, 2002; Shubert, 2003). A pesar de ser considerado como un género cosmopolita (John y Tsarenko, 2002) apenas es la segunda vez que se le registra dentro de la Península de Yucatán. López-Adrián y Barrientos-Medina (2005) fueron los

primeros en hacer registro del género con la especie *B. braunii* dentro de la zona, en el cenote Chen-Há (Yucatán), por lo que el reconocimiento de las especies *B. braunii* y *B. terribilis* en este trabajo es el primero para el estado de Quintana Roo, dentro del cenote de Leona Vicario.

El género *Asterococcus* está conformado por organismos esféricos o elipsoidales que llegan a formar colonias de 2 y hasta 16 células, por lo que no es común encontrarlos de manera unicelular, la colonia generalmente posee un amplio mucilago hialino, se le considera un género ampliamente distribuido, desde Canadá hasta Centro América (Shubert, 2003). A pesar de ser un género de amplia distribución, este trabajo registra por primera vez al género en el estado de Quintana Roo en el cenote de Leona Vicario gracias a la identificación de la especie *Asterococcus korschikoffii*.

Las células del género *Spongiochloris* se caracterizan por ser esféricas y aparentemente poseer partes esponjosas, se tiene poca información sobre este género debido a que son raros sus reportes y a que principalmente se le encuentra en suelos (Shubert, 2003). Al igual que *Tetracystis* el registro de este género en el cenote de Leona Vicario pudo deberse a las lluvias previas al muestreo, por lo que éstas pudieron haber arrastrado a las células al cenote. Es la primera vez que se registra al género y a la especie *S. spongiosa* en el estado de Quintana Roo.

Como lo demuestran los resultados, el cenote de Playa del Carmen tuvo menor cantidad de OTU's con 10, en comparación con el cenote de Leona Vicario, el cual registró 15 OTU's, estos datos son similares a los registrados en otros sistemas dulceacuícolas, como lo describen Lefranc *et al.* (2005) y Zhao *et al.* (2011), estos autores registraron mayor cantidad de OTU's en sitios que se clasifican como oligo u oligomesotróficos, caso contrario sucedió en sistemas catalogados como eutróficos, en donde hubo una menor cantidad de OTU's. Basandonos en estos trabajos, podemos inferir que el cuerpo de agua de Leona Vicario se podría catalogar como un sitio oligo u oligomesotrófico, por el contrario el cenote de Playa del Carmen podría ser un sitio eutrofizado.

CONCLUSIÓN

En conclusión éste estudio demostró que la mayoría de las especies u OTU's tienden a formar clados específicos dependiendo del sitio de muestreo, ya que las secuencias de Playa del Carmen y de Leona Vicario no se intercalaron entre ellas. A pesar de que 100 secuencias se alinearon para formar clados con especies conocidas, 26 de ellas no se alinearon directamente con ninguna especie. Esto indica que a pesar de la importancia que tienen las microalgas en los sistemas acuáticos, en particular los dulceacuícolas, los estudios de este tipo que se tienen hasta la fecha son escasos y por lo tanto las secuencias del gen 18S ADNr son insuficientes para resolver a todas las especies. Aparentemente las especies más abundantes de los sitios son *Nitzschia palea*, *Frustulia cassiae* y *Chlamydomonas applanata*, ya que cada una de estas secuencias estuvo asociada con al menos 11 clonas, esto no es de sorprender ya que estos taxa son considerados como cosmopolitas. Finalmente el principal aporte de este trabajo son los nuevos registros para el estado de Quintana Roo, ya que de los 25 OTU's obtenidos, se identificó a *Nitzschia supralitorea*, *Nitzschia bizertensis*, *Navicula gregaria*, *Frustulia cassiae*, *Chlamydomonas applanata*, *Chlamydomonas mexicana*, *Chlamydomonas noctigama*, *Botryococcus braunii*, *Botryococcus terribilis*, *Tetracystis pulchra*, *Tetracystis sarcinalis*, *Asterococcus korschikoffii* y *Spongiochloris spongiosa*, sumando 13 especies, las cuales son registradas por primera vez en el estado. Esto confirma la validez e importancia de realizar este tipo de trabajos en el área, ya que a pesar de que algunas especies se consideran cosmopolitas no se habían registrado con anterioridad por medio de técnicas morfológicas, de ésta manera se evidencia la utilidad de esta técnica y como puede complementar la información que tenemos sobre los microorganismos, en particular los de ambientes dulceacuícolas.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- An, S. S., Friedl, T. y Hegewald, E. 1999. Phylogenetics relationships of *Scenedesmus* and *Scenedesmus*-like coccoid Green Algae as inferred from ITS-2 rDNA sequence comparisons. *Plant Biology*. 1: 418-428.
- Ansotegui, A., Sarobe, A., Trigueros, J. M., Urrutxurtu, I. y Orive, E. 2003. Size distribution of algal pigments and phytoplankton assemblages in a coastal—estuarine environment: contribution of small eukaryotic algae. *Journal of Plankton Research*. 25 (4): 341-355.
- APHA, AWWA y WEF. 1998. *Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater*. American Public Health. 20^a ed. United States of America. 1269 pp.
- Barsanti, L. y Gualtieri, P. 2006. *Algae: Anatomy, Biochemistry and Biotechnology*. Taylor & Francis Group. United States of America. 301 pp.
- Buchheim, M. A., Lemieux, C., Otis, C., Gutell, R. R., Chapman, R. L. y Turmel, M. 1996. Phylogeny of the Chlamydomonadales (Chlorophyceae): A comparison of ribosomal RNA gene sequences from the nucleus and the Chloroplast. *Molecular Phylogenetics and Evolution*. 5 (2): 391-402.
- Caron, D. A., Peele, E. R., Lim, E. L., y Dennett, M. R. 1999. Picoplankton and nanoplankton and their trophic coupling in surface waters of the Sargasso Sea south of Bermuda. *Limnology and Oceanography*, 44 (2): 259-272.
- Díez, B., Pedrós-Alió, C. y Massana, R. 2001. Study of genetic diversity of eukaryotic picoplankton in different oceanic regions by small-subunit rRNA gene cloning and sequencing. *Applied and Environmental Microbiology*. 67 (7): 2932-2941.
- Doyle, J. J. y Doyle, J. L. 1987. A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. *Phytochemical Bulletin*. 19: 11-15.

- Ebenezer, V., Medlin, L. K. y Ki, J.S. 2012. Molecular detection, quantification, and diversity evaluation of microalgae. *Marine Biotechnology*. DOI: 10.1007/s10126-011-9427-y.
- Edgar, R. C. 2004. MUSCLE: multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput. *Nucleic Acids Research*. 32(5): 1792-1797.
- Eiler, A., Drakare, S., Bertilsson, S., Pernthaler, J., Peura, S., Rofner, C., Simek, K., Yang, Y., Znachor, P. y Lindström, E. S. 2013. Unveiling distribution patterns of freshwater phytoplankton by a next generation sequencing based approach. *PLoS ONE*. 8 (1): e53516. DOI: 10.1371/journal.pone.0053516.
- Gerrath, J. 2003. Conjugating green algae and desmids. *In: Freshwater Algae of North America. Ecology and Classification*. J. Wehr y R. Sheath (eds.). Academic Press. pp 353-382.
- Guiry, M. D. y Guiry, G. M. 2008. Algae Base. World-wide electronic publication. National University of Ireland. <http://www.algaebase.org>.
- Ibarra, C., Tavera, R. y Novelo, E. 2009. Diversity and structure of periphyton and metaphyton diatom communities in a tropical wetland in Mexico. *Revista Mexicana de Biodiversidad*. 80: 763-769.
- INEGI. 2005. *Estudio hidrológico del estado de Quintana Roo*. Instituto Nacional de Estadística Geografía e Informática. México. 96 pp.
- John, D. M. y Tsarenko, P. M. 2002. Order Chlorococcales. *In: The Freshwater Algal Flora of the British Isles. An Identification Guide to Freshwater and Terrestrial Algae*. John, D. M., Whitton, B. A. y Brook, A. J (eds). Cambridge University Press. United Kingdom. pp. 327-409.
- John, D. M., Whitton, B. A. y Brook, A. J. 2002. *The Freshwater Algal Flora of the British Isles. An Identification Guide to Freshwater and Terrestrial Algae*. Cambridge University Press. United Kingdom. 707 pp.

- Kociolek, J. P. y Spaulding, S. 2003. Symmetrical Naviculoid Diatoms. *In: Freshwater Algae of North America. Ecology and Classification*. Wehr, J. y Sheath, R. (eds). Academic Press. U. S. A. pp. 637-654.
- Lee, R. E. 2008. *Phycology*. Cambridge University Press. 4th ed. United States of America. 547 pp.
- Lefranc, M., Thénot, A., Lèpere, C. y Debroas, D. 2005. Genetic diversity of small eukaryotes in lakes differing by their trophic status. *Applied and Environmental Microbiology*, 71 (10): 5935-5942.
- Lèpere, C., Masquelier, S., Mangot, J. F., Debroas, D. y Domaizon, I. 2010. Vertical structure of small eukaryotes in three lakes that differ by their trophic status: a quantitative approach. *The ISME Journal*. 4: 1509-1519.
- López-Adrián, S. J. y Barrientos-Medina, R. C. 2005. Diversidad y distribución del fitoplancton de agua dulce en la Península de Yucatán, México. *Boletín IBUG*. 13 (2): 3-12.
- López-Fuerte, F. O. y Siqueiros-Beltrones, D. A. 2011. Diatomeas como indicadores de la calidad ecológica de los oasis de Baja California Sur, México. *Biodiversitas*. 99: 8-11.
- López-García, P., Rodríguez-Valera, F., Pedrós-Alió, C. y Moreira, D. 2001. Unexpected diversity of small eukaryotes in deep-sea Antarctic plankton. *Nature*. 409 (6820): 603-607.
- Lowe, R. 2003. Keeled and canalled raphid diatoms. *In: Freshwater Algae of North America. Ecology and Classification*. Wehr, J. y Sheath, R. (eds). Academic Press. U. S. A. pp. 669-684.
- Lund, J. W. G. 1950. Studies on *Asterionella formosa* Hass. II. Nutrient depletion and the spring maximum. *Journal of Ecology*. 38:1-14, 15-35.

- Lundholm, N., Daugbjerg, N. y Moestrup, O. 2002. Phylogeny of the Bacillariaceae with emphasis on the genus *Pseudo-nitzschia* (Bacillariophyceae) based on partial LSU rDNA. *European Journal of Phycology*. 37: 115-134.
- Luo, W., Bock, C., Li, H., Padisák, J. y Krienitz, L. 2011. Molecular and microscopic diversity of planktonic eukaryotes in the oligotrophic Lake Stechlin (Germany). *Hydrobiologia*. 661 (1): 133-143.
- Medlin, L. K., Kooistra, W. H. C. F., Gersonde, R., Sims, P. A. y Wellbrock, U. 1997. Is the origin of diatoms related to the end-Permian mass extinction? *Nova Hedwigia*. 65:1–11.
- Moon-van der Staay, S. Y., De Wachter, R. y Vaultot, D. 2001. Oceanic 18S rDNA sequences from picoplankton reveal unsuspected eukaryotic diversity. *Nature*. 409 (6820): 607-610.
- Nava-Ruíz, V. M. y Valadez, F. 2012. Flora planctónica de laguna Lagartos, Quintana Roo. *Revista Mexicana de Biodiversidad*. 83: 561-582.
- Nozaki, H. 2003. Flagellated green algae. In: *Freshwater Algae of North America. Ecology and Classification*. J. Wehr y R. Sheath (eds.). Academic Press. pp. 225-252.
- Oliva-Martínez, M. G., Godínez-Ortega, J. L. y Zuñiga-Ramos, C. A. 2013. Biodiversidad del fitoplancton de aguas continentales en México. *Revista Mexicana de Biodiversidad*. DOI: 10.7550/rmb.32706.
- Pentecost, A. 2002. Order Volvocales. In: *The Freshwater Algal Flora of the British Isles. An Identification Guide to Freshwater and Terrestrial Algae*. John, D., Whitton, B. y Brook, A (eds). Cambridge. United Kingdom. pp. 303-326.
- Round, F. E., Crawford, R. M. y Mann, D. G. 1990. *The Diatoms*. Cambridge University Press. United States of America. 747 pp.

- Sánchez, M., Alcocer, J., Escobar, E. y Lugo, A. 2002. Phytoplankton of cenotes and anchialine caves along a distance gradient from the northeastern coast of Quintana Roo, Yucatan Peninsula. *Hydrobiologia*. 467: 79-89.
- Schmaljohann, R. y Röttger, R. 1978. The ultrastructure and taxonomic identity of the symbiotic algae of *Heterostegina depressa* (Foraminifera: Nummulitidae). *Journal of the Marine Biological Association of The United Kingdom*. United Kingdom. 58: 227-37.
- Schmitter-Soto, J. J., Comín, F. A., Escobar-Briones, E., Herrera-Silveira, E., Alcocer, J., Suárez-Morales, E., Elías-Gutiérrez, M., Díaz-Arce, V., Marín, L. E. y Steinich, B. 2002. Hydrogeochemical and biological characteristics of cenotes in the Yucatan Peninsula (SE Mexico). *Hydrobiologia*. 467: 215-228.
- Sherwood, A. R., Chan, Y. L. y Presting, G. G. 2008. Application of universally amplifying plastid primers to environmental sampling of a stream periphyton community. *Molecular Ecology Resources*. 8: 1011-1014.
- Shubert, E. 2003. Nonmotile coccoid and colonial green algae. In *Freshwater Algae of North America. Ecology and Classification*. J. Wehr y R. Sheath (eds.). Academic Press. pp 253-310.
- Sneath, P. H. A. y Sokal, R. R. 1973. *Numerical Taxonomy. The Principles and Practice of Numerical Classification*. W. H. Freeman Company. United States of America. 573 pp.
- Spaulding, S. 2011. *Halamphora*. In: *Diatoms of the United States*. Buscado el 05 de noviembre del 2014.
- Spaulding, S. y Edlund, M. 2008a. *Cylindrotheca*. In: *Diatoms of the United States*. Buscado el 05 de noviembre del 2014.
- Spaulding, S. y Edlund, M. 2008b. *Frustulia*. In: *Diatoms of the United States*. Buscado el 05 de noviembre del 2014.

- Spaulding, S. y Edlund, M. 2008c. *Nitzschia*. In: *Diatoms of the United States*. Buscado el 05 de noviembre del 2014.
- Tamura, K., Peterson, D., Peterson, N., Stecher, G., Nei, M. y Kumar, S. 2011. MEGA5: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Using Maximum Likelihood, Evolutionary Distance, and Maximum Parsimony Methods. *Molecular Biology and Evolution*. 28 (10): 2731-2739.
- Tavera, R. y Díez, B. 2009. Multifaceted approach for the analysis of the phototrophic microbial community in a freshwater recreational area of Xochimilco, México. *Hydrobiologia*, 636 (1): 353-368.
- Valadez, F. y Hernández-Terrones, L. 2012. Diatomeas perifíticas de laguna Lagartos, Akumal Quintana Roo. In: *Recursos Acuáticos Costeros del Sureste*. Vol. 1. Sánchez, A., Chiappa-Carrara, X. y Brito-Pérez, R. (eds). RECORECOS. México. pp. 147-159.
- Valiente-Moro, C., Crouzet, O., Rasconi, S., Thouvenot, A., Coffe, G., Batisson, I. y Bohatier, J. 2009. New design strategy for development of specific primer sets for PCR-based detection of Chlorophyceae and Bacillariophyceae in environmental samples. *Applied and Environmental Microbiology*. 75 (17): 5729-5733.
- Wehr, J. D. y Sheath, R. G. 2003. *Freshwater Algae of North America. Ecology and classification*. Academic Press. United States of America. 918 pp.
- Werum, M., Lange-Bertalot, H. y Reichardt, E. 2004. *Diatoms in springs from Central Europe and elsewhere under the influence of hydrogeology and anthropogenic impacts*. A.R.G. Gantner Verlag K.G. Vol. 13. U. S. A. 480 pp.
- Zhao, B., Chen, M., Sun, Y., Yang, J. y Chen, F. 2011. Genetic diversity of picoeukaryotes in eight lakes differing in trophic status. *Canadian Journal of Microbiology*. 57 (2): 115-126.

CAPÍTULO V. DISCUSIÓN GENERAL Y CONCLUSIONES

La Península de Yucatán posee ciertas características hidrogeológicas que la hacen sobresalir; una de estas características es el acuífero con el que cuenta, siendo un acuífero de tipo cárstico el que se encuentra en la mayor parte de la península (Schmitter-Soto *et al.*, 2002; Beddows *et al.*, 2007). Este tipo de acuíferos se caracteriza por poseer tres escalas de porosidad, aunado a esto el acuífero de la Península de Yucatán destaca por ser un acuífero de tipo costero, por lo tanto, la intrusión salina proveniente del mar llega a alcanzar varios kilómetros tierra adentro, haciendo que el lente de agua dulce sea relativamente delgado (Worthington *et al.*, 2000; Bauer-Gottwein *et al.*, 2011).

Ya que la Península de Yucatán está constituida en gran parte por roca caliza, los colapsos de tierra, localmente conocidos como cenotes, son relativamente comunes en la región (Schmitter-Soto *et al.*, 2002). Gracias a los cenotes se pueden conocer de manera directa las características particulares que el acuífero posee. Los cenotes presentan diferencias limnológicas entre ellos, debido al aislamiento y a las condiciones geológicas que cada uno de ellos llega a presentar (Schmitter-Soto *et al.*, 2002), por lo que esto ha provisto el entorno apropiado para la sobrevivencia de ciertos microorganismos, de estos microorganismos destacan las microalgas. Las microalgas son microorganismos importantes en los ambientes acuáticos debido a que son productores de oxígeno, son la base de la cadena trófica y participan activamente dentro de los ciclos biogeoquímicos; al poseer una diversidad morfológica, molecular y reproductiva tan amplia, se les ha agrupado en diferentes Divisiones (Van den Hoek *et al.*, 1995), siendo las Cianobacterias, Bacillariophytas y Chlorophytas las más importantes en ambientes dulceacuícolas por su diversidad y abundancia (Wehr y Sheath, 2003; Valiente-Moro *et al.*, 2009; Bellinger y Sigeo, 2010; Novelo y Tavera, 2011; Oliva-Martínez *et al.*, 2013). A pesar de que la taxonomía está bajo una constante y rápida revisión en todos los niveles, y que cada día hay nueva evidencia genética y ultraestructural sobre estos organismos, es relativamente poca la información que se tiene sobre ellos, esto se debe principalmente al tamaño y a las pocas características que estos organismos poseen, dificultando trabajar con ellos, especialmente en el área de la identificación taxonómica (Lefranc *et al.*, 2005; Not *et al.*, 2007; Lèpere *et al.*, 2010).

En la última década la utilización de técnicas moleculares en el campo de la microbiología ha abierto un panorama no antes imaginado, incrementando ampliamente el conocimiento que tenemos sobre estos organismos (Lefranc *et al.*, 2005). En sitios como el estado de Quintana Roo la utilización de estas técnicas para la identificación de microorganismos, en particular microalgas, es relativamente nueva, haciendo de éste trabajo el primero en su tipo para el estado. Previamente en Quintana Roo se han realizado trabajos relacionados con el estudio de las microalgas, principalmente de índole taxonómica y morfológica, con lo que se han identificado especies de los géneros cosmopolitas: *Navicula*, *Nitzschia*, *Pediastrum*, *Scenedesmus*, *Chlorella*, *Chlamydomonas*, *Spirulina*, *Synechococcus* y *Microcystis*. Aunado a este conocimiento los resultados obtenidos durante este trabajo registran por primera vez las especies *Nitzschia supralitorea*, *Nitzschia bizertensis*, *Navicula gregaria*, *Frustulia cassiae*, *Chlamydomonas aplanta*, *Chlamydomonas mexicana*, *Chlamydomonas noctigama*, *Botryococcus braunii*, *Botryococcus terribilis*, *Tetracystis pulchra*, *Tetracystis sarcinalis*, *Asterococcus korschikoffii* y *Spongiochloris spongiosa* en el estado de Quintana Roo.

La dificultad de distinguir morfológicamente entre las especies del género *Chlamydomonas*, especialmente por los pocos caracteres morfológicos y el tamaño que estas microalgas poseen, posiblemente sea el principal factor por el cual no se les registra constantemente a pesar de ser géneros considerados como cosmopolitas, abriendo una ventana hacia los estudios moleculares. De esta manera queda confirmada la validez e importancia de realizar este tipo de trabajos en el estado de Quintana Roo, ya que a pesar de que algunas especies se consideran como cosmopolitas la detección de estas no se había logrado por medio de la discriminación de caracteres morfológicos, aunado a esto se pueden esclarecer especies crípticas, lo que evidencia la utilidad de esta técnica y como puede complementar la información que se tiene hasta la fecha sobre las microalgas del estado. No obstante, en algunas ocasiones no se puede llegar a una certidumbre sobre la especie que se está identificando, es decir, algunas secuencias no proveen la suficiente información como para una identificación lo suficientemente confiable, llegando a identificarla como un organismo no cultivable. Esto nos demuestra el “hueco” de información que se tiene sobre los organismos de muestras ambientales y de los cuales la información que se tiene hasta la fecha es muy poca, debido a que pocas

especies de muestras ambientales pueden ser cultivadas, limitando la información que se tiene sobre estas en el GenBank (Ansotegui *et al.*, 2003; Lefranc *et al.*, 2005).

Dentro de los aspectos técnicos de este trabajo cabe resaltar la técnica de amplificación de ADN por medio de la PCR. Esta técnica se ha convertido en el método más utilizado para obtener secuencias de ADN de comunidades microbianas (Stackebrandt *et al.*, 1992) y aunque es un proceso rutinario, sigue teniendo sus limitantes. La amplificación sólo podrá representar una abundancia cuantitativa de las especies colectadas de una muestra ambiental si la eficiencia de la amplificación es igual para todas las moléculas de ADN, no obstante, para que esto llegue a suceder se tendrían que cumplir ciertas condiciones, por ejemplo: el hecho de que todas las moléculas deben de tener la misma probabilidad de acceder a la hibridación con los cebadores, que la hibridación tenga la misma eficiencia con todas las moléculas y que la polimerasa tenga la misma eficacia con todos los templados (Suzuki y Giovannoni, 1996). Estos factores, sin embargo, quedan fuera de nuestro alcance, por lo que al utilizar la PCR, ésta amplificará con mayor probabilidad los fragmentos de ADN pertenecientes a las especies más abundantes de una muestra ambiental, de tal manera que los procesos posteriores llevarán un sesgo, dejando de lado las especies raras y/o temporales. Una manera de evitar este tipo de sesgos en las amplificaciones y los experimentos de este tipo, es la utilización de la metagenómica o secuenciación de siguiente generación. La secuenciación de siguiente generación posee la capacidad de procesar millones de secuencias (Mardis, 2007; Mardis, 2008; Metzker, 2010; Mardis, 2013) en lugar de 96 como fue el caso de este trabajo, con lo que se podrían tener las secuencias tanto de las especies abundantes como de las raras y/o temporales; además de que la secuenciación de siguiente generación no necesita un vector de clonación o a *Escherichia coli* para producir una librería genética (Mardis, 2007; Mardis, 2013) disminuyendo el tiempo de experimentación. Por consiguiente, el hecho de utilizar estas nuevas herramientas para conocer el estado de la diversidad de las microalgas y los microorganismos en general es de suma importancia, sobre todo en sitios como el estado de Quintana Roo donde los trabajos de este tipo han sido escasos durante varios años.

En un contexto relacionado, las microalgas han sido utilizadas para evaluar las condiciones ambientales en diferentes hábitats acuáticos alrededor del mundo (Wehr y

Sheath, 2003). Las microalgas como bioindicadores de la calidad del agua pueden ser útiles al dar señales de alerta que reflejen el estado de salud de un sistema acuático (Bellinger y Sigee, 2010). El uso de las microalgas para conocer las condiciones ambientales de un sistema acuático datan del siglo XIX (Liebmann, 1962), y esto se debe a la preferencia o tolerancia que llegan a tener por condiciones ambientales particulares como carga de nutrientes o pH, por lo que eventualmente son utilizadas como organismos de comparación entre ecosistemas (Lange-Bertalot, 1979; Burkholder y Gilbert, 2001; Wehr y Sheath, 2003; Bellinger y Sigee, 2010). Reynolds (1990) clasifica a los cuerpos dulceacuícolas, dependiendo de la diversidad de microalgas que en ellos habiten. Él considera que los sitios que son dominados por microalgas como las diatomeas son sitios que se pueden considerar como oligotróficos, tal es el caso del cenote de Leona Vicario, donde en base a las secuencias obtenidas, podemos inferir, que la especie dominante es *Frustulia cassiae* con 26 secuencias, por lo tanto y de acuerdo a la clasificación de Reynolds, el cenote de Leona podría clasificarse como oligotrófico. Por el contrario, Reynolds indica que los sitios con dominancia de algas verdes flageladas y verde-azules filamentosas se pueden considerar como eutróficos, tal es el caso del cenote de Playa del Carmen, donde se obtuvieron 31 secuencias de *Chlamydomonas applanata*, una microalga verde flagelada, y 25 secuencias de organismos no cultivables posiblemente relacionados con *Geitlerinema*, una microalga verde-azul filamentosa, por lo que se puede suponer que este sitio es eutrófico.

De igual manera esta suposición esta apoyada por los estudios realizados por Lefranc *et al.* (2005) y Zhao *et al.* (2011), estos estudios comparten la característica de que en ellos se registró una mayor diversidad de microlagas en los sitios caracterizados como oligo y oligomestróficos, mientras que en los sitios catalogados como eutróficos la diversidad fue menor. En el caso de éste estudio los resultados demostraron que el cenote de Leona Vicario tuvo mayor diversidad que el cenote de Playa de Carmen, aunado a esto los valores de oxígeno disuelto (7.3 mg l^{-1}), nitratos (No detectado) y nitritos (No detectado) apoyan la idea, bajo lo antes expuesto, de que el cenote de Leona Vicario se puede considerar como un cenote oligotrófico, mientras que al cenote de Playa de Carmen, por haber poseído una menor diversidad, menor concentración de oxígeno disuelto (2.2 mg l^{-1}) y una mayor cantidad de nutrientes como nitratos (0.6 mg l^{-1}) y nitritos (0.05 mg l^{-1}), nos hace pensar que a este cenote se le puede clasificar como eutrófico.

En resumen, el acuífero cárstico de tipo costero de la Península de Yucatán proporciona características muy particulares a los cenotes que en él se forman, propiciando las condiciones ambientales adecuadas para que ciertos organismos como las microalgas puedan sobrevivir y reproducirse de manera exitosa. A las microalgas se les ha estudiado principalmente por medio de técnicas morfológicas en el estado de Quintana Roo, sin embargo, este trabajo utiliza por primera vez la secuenciación de genes ribosomales para la identificación de las microalgas, proveyendo los primeros registros de las especies *Nitzschia supralitorea*, *Nitzschia bizertensis*, *Navicula gregaria*, *Halamphora coffeaformis*, *Frustulia cassiae*, *Chlamydomonas applanta*, *Chlamydomonas mexicana*, *Chlamydomonas noctigama*, *Botryococcus braunii*, *Botryococcus terribilis*, *Tetracystis pulchra*, *Tetracystis sarcinalis*, *Asterococcus korschikoffii* y *Spongiochloris spongiosa* en el estado de Quintana Roo.

Así mismo, los cenotes varían sus condiciones físicas y químicas entre ellos, esto depende de muchos factores naturales y humanos que benefician a ciertas especies de microalgas, por lo que éstas se pueden utilizar para conocer el estado trófico de un cuerpo acuático, en particular de un cenote. Hacen falta estudios más detallados, como por ejemplo: hacer un muestreo temporal que nos permita tener repeticiones que nos faciliten un estudio de carácter ecológico, mejorar las técnicas moleculares por medio de una secuenciación de siguiente generación que nos permita identificar las especies temporales y/o raras, la utilización de técnicas más sensibles para medir los nutrientes y otras que nos permitan establecer el estado trófico de los cenotes con base en un índice trófico, y así mismo complementar la información que se pueda obtener por medio de las técnicas moleculares con la obtenida por medio de la descripción morfológica.

En general, éste trabajo da un primer acercamiento de la capacidad que tienen las técnicas moleculares para la identificación de microalgas en cenotes del estado de Quintana Roo y nos muestra una gama de opciones y aprovechamiento que se puede realizar por medio de esta técnica, así como el potencial que las microalgas tienen en el estado y en la Península de Yucatán.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Ansotegui, A., Sarobe, A., Trigueros, J. M., Urrutxurtu, I. y Orive, E. 2003. Size distribution of algal pigments and phytoplankton assemblages in a coastal-estuarine environment: contribution of small eukaryotic algae. *Journal of Plankton Research*. 25 (4): 341-355.
- Bauer-Gottwein, P., Gondwe, B. R., Charvet, G., Marín, L. E., Rebolledo-Vieyra, M., Merediz-Alonso, G. 2011. Review: The Yucatan Peninsula karst aquifer, Mexico. *Hydrogeology Journal*. 19 (3): 507-524.
- Beddows, P. A., Smart, P. L., Whitaker, F. F. y Smith, S. L. 2007. The coupled freshsaline groundwater circulation of a coastal carbonate acuífer: Spatial patterns of temperature and specific electrical conductivity. *Journal of Hidrology*. 346: 18-32.
- Bellinger, E. G. y Sigee, D. C. 2010. *Freshwater algae. Identification and use as bioindicators*. Wiley-Blackwell. United States of America. 271 pp.
- Burkholder, J. y Gilbert, P. M. 2001. Eutrophication and oligotrophication. *Encyclopedia of Biodiversity*. 2: 649-670.
- Lange-Bertalot, H. 1979. Pollution tolerance of diatoms as a criterion for water quality estimation. *Nova Hedwigia*. 64: 285-304.
- Lefranc, M., Thénot, A., Lèpere, C. y Debroas, D. 2005. Genetic diversity of small eukaryotes in lakes differing by their trophic status. *Applied and Environmental Microbiology*, 71 (10): 5935-5942.
- Lèpere, C., Masquelier, S., Mangot, J. F., Debroas, D. y Domaizon, I. 2010. Vertical structure of small eukaryotes in three lakes that differ by their trophic status: a quantitative approach. *The ISME Journal*. 4: 1509-1519.
- Liebmann, H. 1962. *Handbuch der Frischwasser- und Abwasser-biologie*. Oldenbourg. Deutschland. 113 pp.

- Mardis, E. R. 2007. The impact of next-generation sequencing technology on genetics. *Trends in Genetics*. 24 (3): 133-141.
- Mardis, E. R. 2008. Next-generation DNA sequencing methods. *Annual Review of Genomics and Human Genetics*. 9: 387-402.
- Mardis, E. R. 2013. Next-generation sequencing platforms. *Annual Review of Analytical Chemistry*. 6: 287-303.
- Metzker, M. L. 2010. Sequencing technologies-the next generation. *Nature Reviews Genetics*. 11 (1): 31-46.
- Not, F., Gausling, R., Azam, F., Heidelberg, J. F. y Worden, A. Z. 2007. Vertical distribution of picoeukaryotic diversity in the open ocean. *Environmental Microbiology*. 9: 1233-1252.
- Novelo, E. y Tavera, R. 2011. Un panorama gráfico de las algas de agua dulce de México. *Hidrobiológica*. 21 (3): 333-341.
- Oliva-Martínez, M. G., Godínez-Ortega, J. L. y Zuñiga-Ramos, C. A. 2013. Biodiversidad del fitoplancton de aguas continentales en México. *Revista Mexicana de Biodiversidad*. DOI: 10.7550/rmb.32706.
- Reynolds, C. S. 1990. *The Ecology of Freshwater Phytoplankton*. Cambridge University Press. United Kingdom. 435 pp.
- Schmitter-Soto, J. J., Comín, F. A., Escobar-Briones, E., Herrera-Silveira, J., Alcocer, J., Suárez-Morales, E., Elías-Gutiérrez, M., Díaz-Arce, V., Marín, L. E. y Steinich, B. 2002a. Hydrogeochemical and biological characteristics of cenotes in the Yucatan Peninsula (SE Mexico). *Hydrobiologia*. 467: 215-228.
- Stackebrandt, E., Liesack, W. y Witt, D. 1992. Ribosomal RNA and rDNA sequence analyses. *Gene*. 115: 255-260.

- Suzuki, M. T. y Giovannoni, S. J. 1996. Bias caused by template annealing in the amplification mixtures of 16S rRNA genes by PCR. *Applied Environmental Microbiology*. 62: 625-630.
- Valiente-Moro, C., Crouzet, O., Rasconi, S., Thouvenot, A., Coffe, G., Batisson, I. y Bohatier, J. 2009. New design strategy for development of specific primer sets for PCR-based detection of Chlorophyceae and Bacillariophyceae in environmental samples. *Applied and Environmental Microbiology*. 75 (17): 5729-5733.
- Van den Hoek, C., Mann, D. G. y Jahns, H. M. 1995. *Algae. An Introduction to Phycology*. Cambridge University Press. United States of America. 625 pp.
- Wehr, J. D. y Sheath, R. G. 2003. *Freshwater Algae of North America. Ecology and Classification*. Academic Press. United States of America. 918 pp.
- Worthington, S. R., Ford, D. C. y Beddows, P. A. 2000. Porosity and permeability enhancement in unconfined carbonate aquifers as a result of dissolution. *In: Speloegenesis: Evolution of Karst Aquifers*. A. Klimchouk, D. C. Ford, A. N. Palmer y W. Dreybrodt. (eds). Speological Society, Inc. pp 463-472.
- Zhao, B., Chen, M., Sun, Y., Yang, J. y Chen, F. 2011. Genetic diversity of picoeukaryotes in eight lakes differing in trophic status. *Canadian Journal of Microbiology*. 57 (2): 115-126.