



CENTRO DE INVESTIGACIONES BIOLÓGICAS
DEL NOROESTE, S.C.

Programa de Estudios de Posgrado

**ANÁLISIS ESPACIO TEMPORAL DE LA
COMUNIDAD DE CIANOBACTERIAS DE
MANANTIALES HIDROTÉRMICAS
INTERMAREALES**

T E S I S

Que para obtener el grado de

Maestro en Ciencias

Uso, Manejo y Preservación de los Recursos
Naturales
(Orientación en Biología Marina)

p r e s e n t a

José Quinatzin García Maldonado

La Paz, B.C.S. Diciembre de 2009

ACTA DE LIBERACION DE TESIS

En la Ciudad de La Paz, B. C. S., siendo las 12 horas del día 04 del Mes de Diciembre de 2009, se procedió por los abajo firmantes, miembros de la Comisión Revisora de Tesis avalada por la Dirección de Estudios de Posgrado del Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, S. C., a liberar la Tesis de Grado titulada:

"Análisis espacio temporal de la comunidad de cianobacterias de manantiales hidrotermales"

Presentada por el alumno:

José Quinatzin García Maldonado

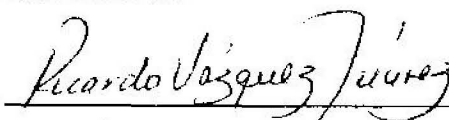
Aspirante al Grado de MAESTRO EN CIENCIAS EN EL USO, MANEJO Y PRESERVACION DE LOS RECURSOS NATURALES CON ORIENTACION EN **Biología marina**

Después de intercambiar opiniones los miembros de la Comisión manifestaron su **APROBACION DE LA TESIS**, en virtud de que satisface los requisitos señalados por las disposiciones reglamentarias vigentes.

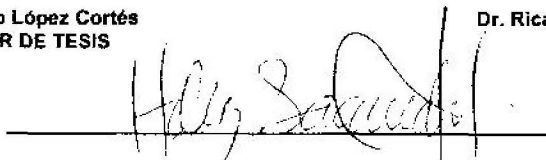
LA COMISION REVISORA



Dr. Alejandro López Cortés
DIRECTOR DE TESIS



Dr. Ricardo Vázquez Juárez
CO-TUTOR



Dra. Norma Yolanda Hernández Saavedra
CO-TUTOR



DRA. ELISA SERVIERE ZARAGOZA,
DIRECTORA DE ESTUDIOS DE POSGRADO

Conformación del comité:

Comité tutorial y comité revisor de tesis.

Dr. Alejandro López Cortés

Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste

Dra. Norma Yolanda Hernández Saavedra

Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste

Dr. Ricardo Vázquez Juárez

Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste

Jurado de examen:

Dr. Alejandro López Cortés

Dra. Norma Yolanda Hernández Saavedra

Dr. Ricardo Vázquez Juárez

Suplente:

Dra. Yolanda Maya Delgado

Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste

RESUMEN

El desarrollo de nódulos de manganeso con biopelículas dominadas por cianobacterias, en manantiales hidrotermales intermareales en Bahía Concepción, México, es un fenómeno extraño en la naturaleza. La diversidad de cianobacterias asociadas a manantiales hidrotermales intermareales, en general, no ha sido bien caracterizada. En el presente estudio se analizó la composición de la comunidad de cianobacterias asociada a macroestructuras microbianas, detectadas en manantiales hidrotermales intermareales en la Playa Santispac, en dos años de muestreo (2001 y 2008), a través de una aproximación polifásica. De los once morfotipos de cianobacterias que han sido detectados en trabajos previos en ambientes similares en otras partes del mundo, siete fueron detectados en este estudio. Adicionalmente, esta es la primera vez que se reportan los géneros *Cyanobacterium*, *Gloeothoece* y *Lyngbya*, para un manantial hidrotermal intermareal bajo la influencia de agua de mar. Cinco grupos filogenéticos de cianobacterias, correspondientes a las subsecciones I (*Chroococcales*) y II (*Oscillatoriales*) de la clasificación actual bacteriológica, fueron detectados a partir de la secuenciación parcial del gen 16S ARNr, con lo cual se complementan trabajos previos. En un periodo de siete años (de 2001 a 2008), la comunidad de cianobacterias del Charco 1 presentó una disminución tanto en macroestructuras como en sus índices de diversidad. Por otra parte, el Charco 2 presentó una mayor estabilidad en la comunidad de cianobacterias, y los grupos dominantes fueron detectados en ambos años de muestreo. La comprensión de la diversidad microbiana en un ambiente extremo con bajo ciclos de inundación – desecación por agua de mar, altas temperaturas y hábitats químicamente modificados con altas concentraciones de sulfuro y metales pesados, como las que se presentan en los manantiales hidrotermales intermareales de Bahía Concepción, es de gran utilidad para la búsqueda de nuevos microorganismos con uso potencial en biotecnología.

Palabras clave: manantiales hidrotermales intermareales, nódulos de manganeso, cianobacterias.

ABSTRACT

The development of manganese nodules with biofilms dominated by cyanobacteria in intertidal hydrothermal springs in Bahia Concepcion, Mexico, is a rare event in nature. The cyanobacterial diversity associated with intertidal hydrothermal springs, in general, has not been well characterized. In this work, the composition of cyanobacterial community associated to microbial macrostructures, detected in intertidal hydrothermal springs at Santispac Beach in two years of sampling (2001 and 2008), was analyzed through a polyphasic approach. Seven morphotypes of cyanobacteria were detected comparable to eleven previously reported in similar environments. Additionally, this is the first time that *Cyanobacterium*, *Gloeotheca* and *Lyngbya* are reported for an intertidal hydrothermal springs under seawater influence. Five cyanobacterial phylogenetic groups, corresponding to subsections I (Chroococcales) and II (Oscillatoriales) in the current bacteriological classification, were identified from partial sequencing of 16S rRNA gene, which complement previous work. In a seven years period (from 2001 to 2008), the community of cyanobacteria from Pond 1 had a decrease in both macrostructures and in its diversity index. Moreover, Pond 2 showed greater stability in cyanobacterial community, and the dominant groups were detected in both years. The understanding of microbial diversity in an extreme environment with low cycles of inundation – desiccation by sea water, high temperatures and chemically modified habitats with high concentrations of sulfur and heavy metals, such as those detected in the intertidal hydrothermal springs of Bahia Concepcion, is useful for finding new microbes with potential use in biotechnology.

Key words: intertidal hydrothermal springs, manganese nodules, cyanobacteria.

Dedicatoria

A la mujer que me inspira día con día a seguir creciendo como persona y como profesionalista. Muchas gracias por estar a mi lado siempre. Te amo Anita.

A mi mamá, papá y hermana por las enseñanzas que me han dado a cerca de la vida y por todo el apoyo y la confianza que siempre han depositado en mí. Los quiero mucho.

AGRADECIMIENTOS

Este trabajo fue desarrollado gracias al apoyo del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT). Beca de manutención para nivel maestría (212242). Proyecto 105969 “Bioprospección de genes y actividades de metanogénesis e hidrogénesis en ecosistemas hipersalinos. Biocombustibles” de la convocatoria 2008-01 de ciencia básica. Beca mixta para la realización de la estancia en el Instituto de Tecnologías Biomédicas (ITB) en Milán, Italia. Además, este trabajo fue concluido gracias al Programa de Estudios de Posgrado, y al proyecto fiscal PC4.1 “Análisis de la diversidad de cianobacterias de ecosistemas hipersalinos” del Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, S.C.

Un especial agradecimiento para el Dr. Alejandro López Cortés por haber compartido conmigo su conocimiento y por haber depositado en mí su confianza. Muchas gracias doctor Alejandro.

A mi comité tutorial, Dra. Norma Hernández Saavedra y Dr. Ricardo Vázquez Juárez por sus importantes aportaciones para este trabajo.

Al grupo de Tecnología de Arreglos del ITB, especialmente al Dr. Gianluca de Bellis por su cooperación para el desarrollo de la parte de LDR-Microarreglos de este trabajo, y un agradecimiento muy especial a la Dra. Clarissa Consolandi que me permitió conocer la parte académica y fraternal de Italia. Muchas gracias.

Al grupo de Exobiología de “Ames, Research Center, National Aeronautics and Space Administration (NASA)”, especialmente al Dr. Brad Bebout quien aportó en mi una visión diferente de la biología.

AGRADECIMIENTOS (*Continuación*)

Al laboratorio de microscopía electrónica y al laboratorio de espectrofotometría de absorción atómica del CIBNOR, por la generación de resultados importantes para la comprensión de la composición química y biológica de los nódulos de manganeso que se desarrollan en la Playa Santispac. Al laboratorio de Ecología Microbiana Molecular del CIBNOR y al técnico Ángel Carrillo por el apoyo brindado para facilitar la realización de la parte experimental.

A la Lic. en L.L.H. Ma. Verónica Maldonado Magos por la revisión de redacción y estilo de este documento, y a la B.M. Ana Dalia Sarabia Trejo, por su ayuda en la edición de imágenes y su apoyo incondicional durante el desarrollo y redacción de este trabajo.

A toda mi familia por todo su apoyo a distancia, en especial al C.P. Erick Olaf Maldonado Magos y al Lic. en Derecho Antonio Rafael Santana García, por haber compartido conmigo tantos momentos importantes para mi desarrollo personal.

Al B.M. Iván González Contreras por haber sido parte importante de mi formación como biólogo marino y al B.M. Rubén Carmona Pérez por compartir siempre conmigo sus puntos de vista a cerca del mundo de la investigación.

A mis compañeros de generación, que siempre aportaron algo para que la maestría fuera menos complicada y a la vez divertida. Muchas gracias.

CONTENIDO

1. INTRODUCCIÓN	1
1.1 Comunidades microbianas.....	1
1.2 Aproximaciones para estudiar la diversidad microbiana.....	4
1.2.1 Electroforesis de geles con gradiente desnaturalizante (DGGE).....	6
1.2.2 Detección de cianobacterias a través de RDL-Microarreglos.....	7
1.3 Manantiales hidrotermales submarinos someros.....	9
1.3.1 Características fisicoquímicas de los manantiales hidrotermales someros..	10
1.3.2 Distribución de los manantiales hidrotermales someros.....	11
1.3.3 Depósitos minerales asociados a manantiales hidrotermales someros.....	12
1.3.4 Comunidades microbianas asociadas a manantiales hidrotermales.....	14
1.3.5 Manantiales hidrotermales someros de Bahía Concepción, México.....	16
1.3.6 Diversidad de cianobacterias en manantiales hidrotermales someros.....	17
2. OBJETIVOS	19
2.1 General.....	19
2.2 Específicos.....	19
3. HIPÓTESIS	20
4. JUSTIFICACIÓN	21
5. MATERIAL Y MÉTODOS	23
5.1 Área de estudio.....	23
5.2 Parámetros fisicoquímicos y colecta de muestras.....	25
5.3 Cultivo de cianobacterias.....	26
5.3.1 Observación e identificación morfológica de cianobacterias.....	27
5.4 Determinación de la composición química de nódulos de manganeso.....	28
5.5 Microscopía electrónica de barrido de biopelículas de nódulos de manganeso....	28
5.6 Biología Molecular.....	29
5.6.1 Extracción de ADN.....	29
5.6.2 Reacción en cadena de la Polimerasa (PCR).....	29
5.6.3 Detección de sondas específicas de cianobacterias a través de RDL- Microarreglos.....	30
5.6.4 Electroforesis en geles con gradiente desnaturalizante (DGGE).....	31
5.6.5 Obtención de secuencias.....	32
5.7 Análisis de comunidad generados a partir de perfiles de bandas de DGGE.....	33
5.8 Reconstrucción filogenética.....	34
6. RESULTADOS	35
6.1 Parámetros fisicoquímicos y macroestructuras microbianas.....	35
6.2 Cultivos monocianobacterianos.....	36
6.3 Diversidad de morfotipos de cianobacterias.....	38
6.4 Composición química de nódulos de manganeso.....	40
6.5 RDL-Microarreglos.....	42
6.6 Estructura de la comunidad de cianobacterias.....	44
6.6.1 Muestras de 2001.....	44
6.6.2 Muestras de 2008.....	46

6.7	<i>Números de acceso de secuencias nucleotídicas.....</i>	49
6.8	<i>Diversidad de cianobacterias estimada a partir de OTU's.....</i>	50
6.9	<i>Filogenia.....</i>	51
7.	DISCUSIÓN.....	55
7.1	<i>Análisis de comunidades cianobacterianas.....</i>	55
7.2	<i>Variaciones en parámetros fisicoquímicos y macroestructuras microbianas.....</i>	58
7.3	<i>Diversidad de morfotipos de cianobacterias.....</i>	59
7.4	<i>Índices de diversidad.....</i>	60
7.5	<i>Electroforesis de geles con gradiente desnaturalizante y obtención de secuencias....</i>	64
7.6	<i>Filogenia.....</i>	65
8.	CONCLUSIONES.....	68
9.	LITERATURA CITADA.....	70

LISTA DE FIGURAS

- Fig. 1. Mapa de localización de los sitios de muestreo en La Playa Santispac de Bahía Concepción, B.C.S., México..... 25
- Fig. 2. Morfotipos de cianobacterias detectados mediante microscopía de contraste de fases..... 39
- Fig. 3. Aspectos macro y microscópico de nódulos de manganeso..... 41
- Fig. 4. Detección de sondas de cianobacterias en muestras de 2008 de manantiales hidrotermales someros mediante la técnica RDL-Microarreglos..... 43
- Fig. 5. Electroforesis en gel con gradiente desnaturizante (DGGE) de un fragmento del gen 16S ARNr de cianobacterias de muestras de 2001 y su análisis de agrupación. 45
- Fig. 6. Electroforesis en gel con gradiente desnaturizante (DGGE) de un fragmento del gen 16S ARNr de cianobacterias de muestras de 2008 y su análisis de agrupación. 48
- Fig. 7. Árbol filogenético basado en secuencias parciales del gen 16S ARNr de cianobacterias de 300 - 330 pb., obtenidas a partir de cultivos monocianobacterianos y a partir de bandas de DGGE..... 52
- Fig. 8. Árbol filogenético basado en secuencias parciales del gen 16S ARNr de cianobacterias de ~ 250 pb., obtenidas a partir de cultivos monocianobacterianos, bandas de DGGE, y secuencias de GenBank..... 53
- Fig. 9. Árbol filogenético basado en secuencias parciales del gen 16S ARNr de cianobacterias de 300 – 415 pb., obtenidas a partir de cultivos monocianobacterianos y a partir de bandas de DGGE..... 54

LISTA DE TABLAS

Tabla I. Parámetros fisicoquímicos y macroestructuras detectadas en los sitios de muestreo.....	36
Tabla II. Cepas monocianobacteriales generadas a partir del enriquecimiento de muestras naturales de manantiales hidrotermales.....	38
Tabla III. Morfotipos de cianobacterias detectados en los dos años de muestreo.....	40
Tabla IV. Composición química de nódulos de manganeso del Charco 2.....	41
Tabla V. Lista de secuencias generadas a partir de Unidades Taxonómicas Operacionales (OTU's) de muestras colectadas en 2001 de manantiales hidrotermales en Santispac, Bahía Concepción, Baja California Sur, México.....	46
Tabla VI. Lista de secuencias generadas a partir de Unidades Taxonómicas Operacionales (OTU's) de muestras colectadas en 2008 de manantiales hidrotermales en Santispac, Bahía Concepción, Baja California Sur, México.....	49
Tabla VII. Riqueza (R), diversidad (H') e uniformidad (<i>e</i>) de cianobacterias calculada partir de análisis de perfiles de bandas de DGGE con muestras de 2001 y 2008 de manantiales hidrotermales intermareales.....	51

LISTA DE FÓRMULAS

Fórmula (1). Coeficiente de similitud Dice.....	33
Fórmula (2). Índice de diversidad de Shannon-Weaver.....	34
Fórmula (3). Índice de uniformidad.....	34

1. INTRODUCCIÓN

1.1 Comunidades microbianas

En un ecosistema, la jerarquía ecológica de los microorganismos comprende desde el organismo individual hasta la comunidad integrada. Una comunidad microbiana es un conjunto integrado de poblaciones microbianas que interactúan y coexisten en un espacio determinado, denominado hábitat. En las comunidades, cada población de microorganismos desempeña un papel funcional (nicho) que permite su supervivencia. Las poblaciones microbianas presentan diferentes adaptaciones para sobrevivir en comunidades diversas; estas adaptaciones, así como las interacciones dentro de la población, contribuyen a la estabilidad de las comunidades (Atlas y Bartha, 1998).

La estabilidad de las comunidades ha sido definida por algunos autores como el número de especies ocupando una localidad. Otros autores, sugieren que la estabilidad está más relacionada con la redundancia funcional encontrada en una localidad. Bajo este concepto, las comunidades son estables si las mismas funciones prevalecen bajo condiciones ambientales variables. En otras palabras, varias especies pueden ser eliminadas, y la comunidad permanecerá estable si otras especies, de las que permanecen, realizan la misma función (McArthur, 2006).

Las comunidades biológicas suelen contener pocas especies con muchos individuos y numerosas especies con pocos individuos. Aunque normalmente el flujo de energía en un nivel trófico depende sólo de unas pocas especies dominantes, las especies menos

abundantes determinan en gran parte la diversidad específica del nivel trófico correspondiente y de toda la comunidad. Generalmente, la diversidad disminuye cuando una o unas pocas poblaciones alcanzan densidades altas; los números elevados indican que una población individual ha superado con éxito la competencia y ha logrado dominar en la comunidad. Las comunidades que tienen una estructura compleja, rica en información, como lo refleja la alta riqueza de especies, necesitan una cantidad de energía menor para mantenerse. Ninguna población es esencial en una comunidad con alta diversidad; por eso, aunque se elimine una población, la estructura en conjunto de la comunidad no se altera (Atlas y Bartha, 1998).

Debido a que los hábitats sufren variaciones temporales y espaciales, es importante comprender cómo se mantiene la diversidad de especies. Varias hipótesis examinan el efecto que tiene la variación temporal del hábitat sobre la diversidad de especies. El modelo de “efecto de almacenamiento” se relaciona directamente con comunidades microbianas. En la forma básica de este modelo desarrollado por Chesson (1994), el efecto de almacenamiento es el resultado de tres componentes: competición entre especies; existencia de una larga etapa de la historia de vida, y variación en el reclutamiento temporal de individuos dentro de la etapa de larga vida.

Para comprender cómo se forman y mantienen las comunidades, se requiere de la síntesis de tres grandes elementos: filogenia, composición de la comunidad, e información de los rasgos de los miembros de la comunidad.

El estudio de la filogenia aplicado a comunidades, amplía la comprensión de la ecología y evolución de las comunidades. La construcción de árboles filogenéticos para comunidades, permite hipotetizar acerca de los mecanismos que permiten la coexistencia de dos especies. Los dos individuos más similares, genética y fenotípicamente, son los que tienen mayor probabilidad de competencia entre ellos. La similitud de los organismos está controlada por las habilidades de dispersión, por los sucesos de colonización, por los eventos de aislamiento, y por las divergencias que han ocurrido en varias escalas geográficas (McArthur, 2006).

Los índices de diversidad relacionan el número de especies y la importancia relativa de las especies individuales. Los dos componentes principales de la diversidad de especies son la riqueza y la uniformidad. La riqueza de especies puede expresarse mediante relaciones simples entre el número total de especies y el número total de organismos. Es una medida del número de especies en la comunidad, pero no de cuántos individuos existen de una especie en particular. La uniformidad es una medida de la proporción de individuos dentro de cada especie e indica si existen poblaciones dominantes (Atlas y Bartha, 1998).

La descripción completa de la composición de la comunidad microbiana incluye tanto componentes filogenéticos como funcionales. La diversidad filogenética (riqueza de especies y equidad), junto con su papel funcional en el ambiente, reflejan la estructura de la comunidad microbiana (Neufeld y Mohn, 2006). La ecología microbiana estudia la diversidad de los microorganismos en la naturaleza y sus interacciones dentro de las

comunidades; mide las actividades de los microorganismos en la naturaleza y monitorea sus efectos sobre el ecosistema (Madigan, 2000).

1.2 Aproximaciones para estudiar la diversidad microbiana

Durante el periodo de 1880 a 1890, Robert Koch logró crecer por primera vez bacterias en medios de cultivo sólidos; desde entonces, se comenzó a comprender la fisiología de ciertas bacterias cultivables. Sin embargo, gradualmente, con el paso de los años, se ha demostrado que los microorganismos crecidos en medios específicos no son representativos de los miembros más abundantes de poblaciones microbianas naturales. De hecho, se han realizado comparaciones del número de células viables, teñidas, contadas microscópicamente, contra el número de colonias formadas en placas, y se ha demostrado que únicamente entre 0.001% y 15% de los microorganismos de un ambiente determinado puede ser cultivado (Amann *et al.*, 1995).

Los análisis cultivo dependientes son importantes para la comprensión de la fisiología y función de los microorganismos (Palleroni, 1997), sin embargo, esta aproximación por sí sola, resulta insuficiente para monitorear la diversidad y abundancia de los microorganismos en un ambiente determinado, y para describir sus relaciones evolutivas. El campo de la ecología microbiana ha tenido avances significativos debido al desarrollo de técnicas que se basan en fundamentos evolutivos y en procesos biológicos; ya no es necesario cultivar un microorganismo para detectar su presencia en una muestra.

A principios del siglo pasado, los científicos comenzaron a utilizar técnicas moleculares para elucidar las relaciones en ecología microbiana. A partir de ese momento, el ADN ha sido una molécula ideal usada para detectar la diversidad microbiana, para evaluar cambios poblacionales espaciales y temporales, y para comparar y contrastar comunidades microbianas específicas (métodos cultivo independiente) (McArthur, 2006).

Recientemente, se ha logrado obtener la caracterización de la diversidad microbiana en la mayoría de los ambientes a través de varias técnicas moleculares tales como la obtención de perfiles electroforéticos y / o la clonación y secuenciación del gen 16S ARNr. Estas aproximaciones han sido extremadamente satisfactorias, ya que revelan la enorme diversidad de la vida microbiana, pero, por otra parte, tienen ciertas limitaciones relacionadas con sesgos, debido a la generación de moléculas erróneas (quimeras) por amplificación vía PCR, que dificultan los análisis filogenéticos. La técnica más reciente que evita este sesgo es la denominada piro-secuenciación del ADN de la comunidad (metagenómica), la cual representa una aproximación totalmente nueva al estudio de las comunidades microbianas. Se define como el análisis funcional y de secuencias de los genomas microbianos colectivos contenidos en una muestra ambiental, basándose ya sea en expresión o secuenciación (Bonilla-Rosso *et al.*, 2008)

1.2.1 Electroforesis de geles con gradiente desnaturalizante

(DGGE)

Para estudiar las funciones e interacciones de las comunidades microbianas, es necesario revelar la composición y dinámica de sus poblaciones. También es importante relacionar cepas aisladas con sus contrapartes en la naturaleza para extrapolar los resultados de los experimentos fisiológicos llevados a cabo bajo condiciones naturales. Relacionar los cultivos generados en el laboratorio con las poblaciones naturales es a menudo problemático, debido a la selectividad inherente de los aislamientos y a los cambios morfológicos que ocurren después de cultivar a los microorganismos. La electroforesis de geles con gradiente desnaturalizante (Denaturing Gradient Gel Electrophoresis, DGGE), es una técnica para la separación de productos de PCR (Muyzer *et al.*, 1993), que puede ser usada tanto para evaluar la diversidad genotípica en muestras naturales como para juzgar la pureza de cepas aisladas, además de evaluar la existencia de sólo un genotipo.

DGGE separa moléculas de ADN en función de las diferencias en estabilidad térmica causadas por diferencias en la secuencia de las bases (Abrams y Stanton, 1992). El poder de resolución depende de la disminución de la movilidad electroforética que ocurre cuando una parte de la molécula del ADN se fusiona, resultando en la formación de una estructura que es parcialmente helicoidal y parcialmente una cadena azarosa. La incorporación de una secuencia artificial rica en GC (una cola de GC) a través de la PCR, proporciona un medio sencillo para modular las características de fusión de la

mayoría de las secuencias dentro del perfil de dos dominios, lo que es considerado óptimo para la detección de mutaciones (Sheffield *et al.*, 1989).

Los cultivos aislados pueden relacionarse con poblaciones naturales basándose en la comparación de la migración de bandas en un gel de DGGE, y la información de la secuencia (de cada una de las bandas) permite tener una aproximación sobre el tipo de organismos que están presentes en una muestra dada (Janse *et al.*, 2003).

Una fracción del ADN de los organismos a estudiar es adecuada para análisis de DGGE, si es específicamente amplificado. Además, la fracción de ADN debe tener una secuencia suficientemente heterogénea para dar la resolución deseada, y preferentemente, debe ser parte de un gen para el cual hayan sido depositadas un número considerable de secuencias en base de datos pública. Nübel *et al.* (1997), diseñaron una pareja de primers para la amplificación específica de una región del gen 16S ARNr de cianobacterias y plástidos, permitiendo realizar con ello el análisis de poblaciones naturales de cianobacterias a través de DGGE.

1.2.2 Detección de cianobacterias a través de RDL-Microarreglos

Tradicionalmente, la identificación de cianobacterias se ha basado en características morfológicas, fisiológicas y ecológicas, que pueden variar bajo condiciones ambientales (Castenholz, 2001). Recientemente, la clasificación de cianobacterias se ha basado en una aproximación polifásica, que considera tanto características fenotípicas como genotípicas (Wilmotte, 1994). La clasificación molecular de cianobacterias está basada

en secuencias del gen 16S ARNr obtenidas a partir de cultivos puros. Usando esta información molecular, pueden ser empleadas varias técnicas para determinar la composición de cianobacterias de muestras ambientales, sin embargo, la mayoría de las técnicas requieren de un gran esfuerzo para obtener los resultados esperados. Por lo tanto, nuevas aproximaciones para el análisis genético de comunidades complejas cianobacterianas han sido desarrolladas (Castiglioni *et al.*, 2004).

Recientemente, microarreglos de oligonucleótidos (microchips) han sido utilizados ampliamente en estudios de biología molecular y han mostrado un gran potencial para diagnósticos ambientales. La tecnología de microarreglos de ADN ha sido aplicada a la detección de la diversidad microbiana, sin embargo, el uso específico de los microarreglos para la caracterización de la diversidad cianobacteriana es aún más reciente. Rudi *et al.* (2000) diseñaron un pequeño microarreglo específico para los géneros *Microcystis*, *Planktothrix*, *Anabaena*, *Aphanizomenon*, *Nostoc* y *Phormidium*, y así poder caracterizar las poblaciones de cianobacterias en lagos.

En el 2004, Castiglioni *et al.*, aplicaron el método de los arreglos de ADN para discriminar 19 grupos cianobacterianos (*Anabaena/Aphanizomenon*, *Calothrix*, *Cylindrospermopsis*, *Cylindrospermum*, *Gloeotheca*, *Cyanotheca*, *Leptolyngbya*, *Lyngbya*, *Microcystis*, *Nodularia*, *Nostoc*, *Planktothrix*, *Phormidium* –Antártico-, *Prochlorococcus*, *Spirulina*, *Synechococcus*, *Synechocystis*, *Trichodesmium* y *Woronichinia*). Este procedimiento está basado en las propiedades discriminatorias de la reacción de detección de ligación (RDL) y requiere de dos sondas específicas para las secuencias problema (Gerry *et al.*, 1999). Una marca fluorescente es acoplada a una de

las sondas, y un “código postal” complementario (czip code) es acoplado a la otra sonda. Cuando el templete apropiado está presente, las dos sondas son ligadas por la actividad de una ADN ligasa, y posteriormente son hibridizados en el microarreglo que contiene el código postal (zip code) correspondiente y su detección se hace a través del barrido de la intensidad de la fluorescencia de hibridación.

1.3 Manantiales hidrotermales submarinos someros

Un manantial hidrotermal submarino es una fisura en la superficie del planeta, de la cual emerge agua geotérmica que se mezcla con agua marina al ser expulsada. De acuerdo a la profundidad donde se localicen, los manantiales pueden ser clasificados en hidrotermales submarinos de profundidad (Deep-Sea Hydrothermal Vents, DSHV) que se localizan a profundidades > 200 m; y en manantiales hidrotermales submarinos someros (Shallow Submarine Hydrothermal Vents, SSHV), que se localizan a profundidades < 200 m e incluyen a los manantiales hidrotermales intermareales (Tarasov *et al.*, 2005). Este límite de profundidad, que corresponde al límite de la zona nerítica, define diferencias fundamentales respecto a los parámetros ambientales y de estructura de las comunidades bióticas. Así, las comunidades que habitan los manantiales hidrotermales someros difieren de aquellas de las profundidades por la presencia de diatomeas y tapices de bacterias y algas, así como de fitoplancton (Canet y Prol-Ledesma, 2006).

Uno de los rasgos más tangibles de los sistemas hidrotermales someros, es la presencia de una fase gaseosa exhalada (evidenciada por un continuo burbujeo), hecho que determina que en algunos trabajos se haga referencia a este tipo de manifestaciones como sistemas gasohidrotermales (Tarasov *et al.*, 1990).

1.3.1 Características fisicoquímicas de los manantiales hidrotermales someros

De manera general, la salinidad y la densidad del agua de los manantiales hidrotermales someros son menores que en el agua de mar. Ello, junto con la composición isotópica de los fluidos hidrotermales, implica la presencia de un importante componente meteórico (agua de lluvia) en los mismos (Prol-Ledesma *et al.*, 2004, 2005). Los estudios que se han elaborado a partir de sistemas hidrotermales someros corroboran que el agua descargada por los manantiales es, en buena medida, agua meteórica que ha interactuado en mayor o menor grado con distintos tipos de rocas (Vidal *et al.*, 1981; Prol-Ledesma *et al.*, 2002; 2004).

El agua de los manantiales someros presenta algunas similitudes con la de los manantiales de fondos marinos profundos, tanto por sus concentraciones en algunos iones mayores, como por sus contenidos en tierras raras y otros elementos traza. Así, tanto en los manantiales someros como en los de fondos marinos profundos, el agua termal suele estar enriquecida en Si, Ba, Mn, B y Fe respecto al agua de mar y, comúnmente, presenta un enriquecimiento en Eu y no muestra ninguna anomalía negativa de Ce, en concordancia con su carácter reductor (Michard, 1989). Los fluidos

descargados por los manantiales someros son de menor temperatura que los que se registran en los de gran profundidad (Martínez-Frías, 1998; Stoffers *et al.*, 1999; Prol-Ledesma *et al.*, 2002; Canet *et al.*, 2005b; Jach y Dudek, 2005).

1.3.2 Distribución de los manantiales hidrotermales someros

Los manantiales hidrotermales submarinos de poca profundidad se localizan en diversos ambientes tectónicos, normalmente relacionados con márgenes de placa. Así, se distribuyen mayoritariamente a lo largo de arcos de islas y en segmentos someros de dorsales oceánicas, en la zona de influencia de puntos calientes (*hot spots*) (Fricke *et al.*, 1989; Dando y Leahy, 1993; Hoaki *et al.*, 1995; Fitzsimons *et al.*, 1997; Savelli *et al.*, 1999; Stoffers *et al.*, 1999; Geptner *et al.*, 2002).

En relación a arcos de islas, se han descrito manantiales hidrotermales submarinos de poca profundidad en Bay of Plenty en Nueva Zelanda (Stoffers *et al.*, 1999), en las islas Nueva Bretaña (Tarasov *et al.*, 1999), Ambitle y Lihir del arco de Bismarck en Papúa Nueva Guinea (Pichler *et al.*, 1999a,b), en el mar Egeo (Sedwick y Stüben, 1996; Dando *et al.*, 2000), en las islas Eolias, en el Mediterráneo central y oriental (Rusch *et al.*, 2005), así como en diversas localidades del margen pacífico occidental (Ferguson y Lambert, 1972; Tarasov *et al.*, 1990, 1999, 2005; Sarano *et al.*, 1989; Hashimoto *et al.*, 1993; Kamenev *et al.*, 1993; Chen *et al.*, 2005).

En zonas de interacción dorsal oceánica-punto caliente se han descrito sistemas hidrotermales submarinos de poca profundidad en la dorsal de Kolbeinsey en Islandia

(Benjamínsson, 1988; Botz *et al.*, 1999) y en el monte submarino de João de Castro, en las Azores (Cardigos *et al.*, 2005).

El contexto geológico de las localidades mencionadas concuerda con el hecho de que, en su mayoría, los sistemas hidrotermales submarinos de poca profundidad están directamente relacionados con actividad volcánica reciente. Sin embargo, también hay manantiales hidrotermales submarinos someros en márgenes continentales afectados por intensos procesos tectónicos de extensión, por ejemplo en White Point en California, EUA (Stein, 1984); en Punta Mita en Nayarit, México (Prol-Ledesma *et al.*, 2002) en Bahía Concepción (Prol-Ledesma *et al.*, 2004) y en Punta Banda, en la península de Baja California, México (Vidal *et al.*, 1978).

1.3.3 Depósitos minerales asociados a manantiales hidrotermales someros

Los sistemas hidrotermales submarinos someros pueden generar potencialmente depósitos metalíferos con óxidos, sulfuros y metales preciosos (Martínez-Frías, 1998; Stoffers *et al.*, 1999; Prol-Ledesma *et al.*, 2002). La presión que ejerce la columna de agua en estos sistemas es muy baja, a diferencia de los sistemas profundos. Esta circunstancia podría favorecer el depósito subsuperficial de algunos de los metales (Canet y Prol-Ledesma, 2006).

Los mecanismos de precipitación de minerales alrededor de zonas de emisión hidrotermal en ambientes submarinos de poca profundidad han sido objeto de diversos

estudios, y se ha señalado la importancia decisiva de los procesos biogeoquímicos regulados por microorganismos en estos mecanismos de precipitación (Pichler *et al.*, 1999b; Stoffers *et al.*, 1999; Prol-Ledesma *et al.*, 2002; Canet *et al.*, 2003, 2005a,b; Alfonso *et al.*, 2005). En general, los depósitos formados en manantiales hidrotermales, tanto subaéreos como submarinos, se originan a partir de soluciones a temperaturas por debajo del límite superior para el desarrollo de la vida (Jones y Renaut, 1996; Konhauser *et al.*, 2001). En muchos casos, se ha podido confirmar la estrecha asociación entre estos depósitos hidrotermales y la actividad microbiana (Konhauser *et al.*, 2001).

En la literatura existen abundantes trabajos referentes a depósitos minerales cuyo origen se atribuye a una actividad hidrotermal submarina de poca profundidad, como es el caso de la isla de Milos (Grecia), donde existen depósitos de manganeso cuya génesis se relaciona con manantiales hidrotermales someros y que, al mismo tiempo, presentan algunos rasgos típicos de las vetas epitermales (Hein *et al.*, 2000; Liakopoulos *et al.*, 2001; Naden *et al.*, 2005). Dichos depósitos consisten principalmente en vetas de óxidos de manganeso con barita, encajonadas en rocas volcánicas pliocenas a pleistocenas, en el área costera del cabo Vani. La mineralización de manganeso, además, se encuentra en forma de costras, como cemento en areniscas, y como reemplazamientos en niveles de caliza. Los minerales de manganeso de estos depósitos son pirolusita MnO_2 , criptomelana $\text{K}(\text{Mn}^{4+}, \text{Mn}^{2+})_8\text{O}_{16}$, hollandita $(\text{Ba}, \text{K})\text{Mn}_8\text{O}_{16}$, coronadita $\text{PbMn}_8\text{O}_{16}$, e hidrohetaerolita $\text{Zn}_2\text{Mn}_4\text{O}_8 \cdot (\text{H}_2\text{O})$ (Liakopoulos *et al.*, 2001). Estos depósitos, cuyo contenido en manganeso alcanza el 60% en peso, son además ricos en Pb (hasta 3.4% en peso), Ba (hasta 3.1% en peso de BaO), Zn (hasta 0.8% en

peso), As (hasta 0.3% en peso), Sb (hasta 0.2% en peso) y Ag (hasta 10 ppm). La cercanía geográfica con el yacimiento epitermal de baja sulfuración de Profitis Ilias, rico en metales preciosos, y la similitud que presentan en el estilo y contexto de mineralización, sugieren que ambos depósitos podrían estar relacionados geológicamente (Hein *et al.*, 2000).

Otro ejemplo de depósito de manganeso cuyo origen se asocia a la emanación de soluciones hidrotermales en un ambiente marino somero es Wafangzi (China). Dicho depósito representa el mayor yacimiento conocido de manganeso de ese país, y se presume que la actividad microbiana participó en la precipitación de los minerales que lo constituyen (Fan *et al.*, 1999).

En México, en el área de Bahía Concepción (Baja California Sur), hay numerosos depósitos emplazados en vetas y brechas de óxidos de Mn con dolomita, cuarzo y barita, encajonados mayoritariamente en rocas andesíticas terciarias y, localmente, en rocas carbonatadas y detríticas del Plioceno (Rodríguez-Díaz, 2004). La disposición de las estructuras mineralizadas está controlada por sistemas de fallas normales miocenas de dirección Noroeste–Sureste (Camprubí *et al.*, 2007).

1.3.4 Comunidades microbianas asociadas a manantiales hidrotermales someros

Los procesos biogeoquímicos en zonas de hidrotermalismo submarino somero reúnen condiciones aptas tanto para el metabolismo fotosintético como para el quimiosintético.

Por ello, los manantiales someros ofrecen la oportunidad de estudiar la competencia y las relaciones entre organismos quimiosintéticos y fotosintéticos. Las comunidades de procariotas son tan diversas en los manantiales hidrotermales someros como en los de fondos marinos profundos (Prol-Ledesma *et al.*, 2005), a pesar de que los someros contienen pocas especies endémicas (Tarasov *et al.*, 2005). Estas comunidades bióticas están específicamente adaptadas para desarrollarse en hábitats modificados químicamente, con elevadas concentraciones de sulfuro y metales pesados, así como en temperaturas elevadas. Las comunidades de los sistemas someros incluyen especies fotosintéticas (Dando *et al.*, 1999) y, en algunos casos, son también focos de biodiversidad de organismos eucariotas (Morri *et al.*, 1999). Sin embargo, aún no se conoce el efecto del hidrotermalismo somero en las comunidades planctónicas y bentónicas, y las comunidades bióticas no están todavía tan bien caracterizadas como es el caso en los sistemas profundos (Canet y Prol-Ledesma, 2006).

Contrariamente al caso de los sistemas hidrotermales emplazados en el fondo oceánico, son pocos los sistemas de poca profundidad que han sido estudiados en detalle, a pesar de su mayor accesibilidad y relativa facilidad de muestreo. Pese a que en un inicio, en comparación con los sistemas oceánicos, los sistemas de poca profundidad despertaron un interés menor en la comunidad científica, el número de estudios realizados en este tipo de manifestaciones hidrotermales ha experimentado un notable crecimiento. Los primeros trabajos publicados al respecto se enfocaron preferentemente al estudio de las comunidades bióticas que colonizan dichos ambientes hidrotermales (*e. g.*, Tarasov *et al.*, 1990). De estos estudios y de los subsiguientes (*e. g.*, Kamenev *et al.*, 1993; Hoaki *et al.*, 1995; Cardigos *et al.*, 2005; Rusch *et al.*, 2005; Tarasov *et al.*, 2005) se

desprende que la biota de procariotas especializada en esos ambientes es muy diversa, siendo similar a la descrita en los manantiales termales de los fondos oceánicos.

1.3.5 Manantiales hidrotermales someros de Bahía Concepción, México

La Bahía Concepción, con 40 km de longitud, con disposición Noroeste–Sureste, está delimitada por la falla de mayor tamaño de la península de Baja California. Se localiza en su costa oriental y aloja a un sistema hidrotermal que consiste en diversas manifestaciones submarinas (de hasta 15 m de profundidad), intermareales y subaéreas. El área con actividad hidrotermal ocupa un segmento de unos 700 m de la costa occidental de la bahía, una zona acantilada cuya configuración obedece a un sistema de fallas normales el cual, a la vez, actúa como conducto de ascenso de los fluidos hidrotermales (Ledesma-Vázquez y Johnson, 2001).

En esta zona se reconocen dos tipos de expresiones superficiales del sistema hidrotermal: (1) un área difusa de infiltración de fluidos hidrotermales (gas y agua) a través de los sedimentos, a profundidades entre 5 y 15 metros bajo el nivel del mar (mbnm), y (2) un grupo de manantiales hidrotermales y zonas de burbujeo en la zona intermareal (Canet *et al.*, 2005a, b). Todas estas manifestaciones hidrotermales se alinean según una dirección Noroeste–Sureste. La temperatura de las emanaciones hidrotermales es de hasta 87 °C en la manifestación difusa submarina y de 62 °C en los manantiales intermareales, y los valores de pH son de 5.9 y 6.7, respectivamente (Canet y Prol-Ledesma, 2006).

El agua termal pertenece al tipo clorurado-sódico y presenta elevadas concentraciones de Ca, Mn, Si, Ba, B, As, Hg, I, Fe, Li, HCO₃⁻ y Sr respecto al agua de mar (Prol-Ledesma *et al.*, 2004). Alrededor de los manantiales intermareales existen acumulaciones de precipitados hidrotermales en forma de pavimentos irregulares de hasta 10 m², que quedan parcialmente descubiertos durante las mareas bajas. Estos depósitos comprenden (1) agregados masivos compuestos por detritos y bioclastos cementados por ópalo-A y cantidades accesorias de calcita y barita, (2) agregados de óxidos de Mn, y (3) costras estromatolíticas de sínter silicocalcáreo (Canet y Prol-Ledesma, 2006).

1.3.6 Diversidad de cianobacterias en manantiales hidrotermales someros

Las comunidades de cianobacterias de manantiales hidrotermales intermareales subaéreos costeros, han sido caracterizadas a través de aproximaciones botánicas (Anagnostidis y Pantazidou, 1988; López-Cortés, 1999; Pétursdóttir y Kristjánsson, 1996) y por aproximaciones moleculares (Hobel *et al.*, 2005; Jing *et al.*, 2006; López-Cortés, 2001). Sin embargo, la diversidad desarrollo de cianobacterias bajo ciclos de inundación – desecación por agua de mar, altas temperaturas y hábitats químicamente modificados con altas concentraciones de sulfuro y metales pesados como las que se presentan en los manantiales hidrotermales intermareales de Bahía Concepción, no han sido bien caracterizados.

En ambientes marinos, la mayoría de la investigación sobre ambientes geotérmicos se ha centrado en manantiales hidrotermales de fondos marinos de profundos donde, se desarrollan comunidades quimiolitotróficas por debajo de la zona fótica (Belkin y Jannasch, 1989; Heijs *et al.*, 2005; Jorgensen y Boetius, 2007). Sin embargo, muy poco se ha estudiado acerca de la composición de cianobacterias en hábitats geotérmicos que se localizan en la zona fótica, donde se alcanzan temperaturas mayores a los 40°C, y por consiguiente, se desarrollan cianobacterias termófilas (Alfonso *et al.*, 2005; Dando *et al.*, 1999; Giaccone, 1969; Hirayama *et al.*, 2007; Mattison *et al.*, 1998; Sievert *et al.*, 2000; Ward y Castenholz, 2000). Sólo se han desarrollado tres trabajos sobre diversidad de cianobacterias en manantiales hidrotermales intermareales basados en secuencias parciales del gen 16S ARNr. Dos de ellos se basan en condiciones de hábitats tropicales (Jing *et al.*, 2006; López-Cortés *et al.*, 2001), y el tercero en un hábitat frío (Hobel *et al.*, 2005). La diversidad reportada en esos trabajos incluye especies de los géneros *Leptolyngbya* (López-Cortés, 1999; Pétursdóttir y Kristjánsson, 1996), *Geitlerinema* (Jing *et al.*, 2006; López-Cortés *et al.*, 2001), *Oscillatoria* (Jing *et al.*, 2006), *Synechococcus* (Jing *et al.*, 2006; López-Cortés *et al.*, 2001), *Synechocystis*, *Aphanothece*, *Chroococcus*, *Gloeocapsa* (López-Cortés, 1999), *Chroococciopsis* (Jing *et al.*, 2006), *Chlorogloeopsis* y *Fischerella* (Hobel *et al.*, 2005).

2. OBJETIVOS

2.1 *General*

Analizar la composición de la comunidad de cianobacterias asociada a macroestructuras microbianas detectadas en manantiales hidrotermales intermareales en la Playa Santispac, Bahía Concepción, Baja California Sur, México, en dos años de muestreo (2001 y 2008), a través de una aproximación polifásica que incluye análisis microscópicos, obtención de cultivos monocianobacterianos y técnicas moleculares.

2.2 *Específicos*

- Correlacionar los parámetros fisicoquímicos presentes en las charcas hidrotermales intermareales con los índices de diversidad de cianobacterias obtenidos en los dos años de muestreo.

- Detectar morfotipos dominantes de cianobacterias en muestras naturales a través de microscopía de contraste de fases y microscopía electrónica de barrido.

- Obtener cultivos de monocianobacterianas a partir del enriquecimiento de muestras de macroestructuras microbianas, y realizar su caracterización morfológica y molecular (gen 16S ARNr).

- Identificar poblaciones naturales de cianobacterias en muestras de macroestructuras microbianas desarrolladas en manantiales hidrotermales intermareales, a través de la detección de sondas específicas para el 16S ARNr de cianobacterias con la técnica RDL-Microarreglos.

- Comparar la composición de comunidades cianobacterianas en dos años de muestreo de macroestructuras microbianas desarrolladas en manantiales hidrotermales intermareales, a través del análisis de grupos de perfiles electroforéticos.

3. HIPÓTESIS

Como los manantiales hidrotermales intermareales de la playa Santispac, Bahía Concepción, México, presentan variaciones en el número de ventilas y en el tipo de macroestructuras microbianas detectadas dependiendo del año de muestreo, se espera encontrar variaciones tanto en los morfotipos de cianobacterias detectados a través de análisis microscópicos, como en los índices de diversidad calculados a partir de perfiles electroforéticos en los dos años de muestreo.

4. JUSTIFICACIÓN

Los análisis de comunidades cianobacterianas relacionadas con parámetros fisicoquímicos de ambientes singulares y poco estudiados, como los manantiales hidrotermales intermareales de Bahía Concepción, proporcionan información que permite comprender la participación de estos microorganismos en la formación de macroestructuras microbianas y su participación en los procesos de precipitación de minerales. Además, el estudio de los procesos de biomineralización en ambientes hidrotermales proporciona información sobre la vida primitiva en la Tierra, ya que formas de vida termófilas, similares a las que prosperan en estos ambientes, han sido propuestas como el ancestro común de la vida en nuestro planeta (Walter y Des Marais, 1993).

Por otra parte, la caracterización de comunidades de cianobacterias en este tipo de ambientes extremos, con ciclos de inundación y desecación de agua de mar, altas temperaturas y hábitats químicamente modificados con altas concentraciones de azufre y metales pesados, son la base para la posible detección de microorganismos productores de enzimas y biomateriales de importancia biotecnológica. Estos sistemas hidrotermales también pueden ser evaluados para su uso potencial como fuente de energía geotérmica.

Las herramientas de biología molecular actuales, han demostrado que la comprensión de la sistemática de las cianobacterias se encuentra en desarrollo, por ello, el análisis de comunidades de cianobacterias de manantiales hidrotermales, que incluye la descripción

de los morfotipos y secuencias nucleotídicas, genera información de utilidad para una mejor comprensión de su taxonomía y evolución.

En la actualidad, existen evidencias que sugieren el descubrimiento de antiguos manantiales en el planeta Marte, por lo que se piensa que estos sistemas pudieron haber proporcionado agua relativamente caliente y rica en energía y nutrientes, con la que la vida primitiva en Marte pudo haber evolucionado y persistido conforme el planeta se comenzó a enfriar (Allen and Oehler, 2008). Por esa razón, el estudio y comprensión de los manantiales hidrotermales en la tierra, serán de gran importancia y base para futuros estudios del planeta Marte.

Debido a la importancia de los manantiales hidrotermales submarinos en el ámbito ecológico y biotecnológico, es necesario llevar a cabo estudios de monitoreo para poder detectar cambios en la comunidades y/o en la formación de macroestructuras microbianas, de tal manera que se puedan medir los daños al sistema por actividad humana.

5. MATERIALES Y MÉTODOS

5.1 Área de estudio

Bahía Concepción está localizada dentro en el Golfo de California en la costa Este de la península de Baja California Sur, México, y se caracteriza por presentar fallas tectónicas en sus bordes. En la parte Oeste de Bahía Concepción se encuentra la playa Santispac, que presenta dos manantiales hidrotermales de aproximadamente 3-4 metros de diámetro y menos de un metro de profundidad. Dichos manantiales se encuentran separados entre ellos por aproximadamente 100 metros lineales y están localizados en la zona intermareal, la cual está delimitada hacia el mar por un manglar, una pequeña laguna y la playa (Fig. 1).

La composición elemental del agua hidrotermal de los manantiales intermareales está dada Na y Cl, principalmente, y enriquecida con Ca, Mn, Si, Ba, B, As, Hg, I, Fe, Li, HCO_3^- , y Sr, en comparación con el agua de mar normal. El fluido emitido desde estos manantiales muestra mezclas químicas e isotópicas con el agua de mar. La composición isotópica está muy cercana a la de agua de lluvia. Los fluidos de las ventilas son 40% agua de mar y 60% agua de lluvia sometida a una circulación profunda. El agua termal se descarga sub-aereamente hacia el mar, pero cuando existe marea alta, el agua de mar cubre los manantiales (Prol-Ledesma *et al.*, 2004)

En el 2001, el manantial denominado Charco 1 ($26^{\circ}45'48.62''$ N; $111^{\circ}53'37.40''$ W) presentó dos ventilas hidrotermales de aproximadamente 15 cm de diámetro (cada una)

y macroestructuras microbianas compuestas de tapetes adheridos al sustrato, tapetes desarrollándose alrededor de las ventilas y natas flotando dentro del manantial. En el 2008, este mismo manantial únicamente presentó una ventila hidrotermal (aproximadamente de las mismas dimensiones) y solamente fueron detectados tapetes adheridos al sustrato como macroestructuras microbianas.

Por otra parte, el manantial denominado Charco 2 ($26^{\circ}45'45.73''$ N; $111^{\circ}53'39.31''$ W) en el 2001 presentó dos ventilas hidrotermales de aproximadamente 10 cm de diámetro con tapetes microbianos y estructuras minerales-microbianas distintivas denominadas nódulos-microestromatolitos-oncoides laminados, creciendo sobre las paredes del manantial y en el canal de salida de agua hacia la laguna (Lopez-Cortes, 1999). En la superficie de estos oncoides se detectó el desarrollo de parches delgados de biopelículas microbianas de color verde oscuro. Para el año 2008, fueron detectadas las mismas macroestructuras en el Charco 2, sin embargo, en este año no se detectó ninguna ventila hidrotermal. En 2008 también se detectó la presencia de otro pequeño charco de agua de aproximadamente 2 metros de diámetro producto de actividad humana (huella de la rodada de un automóvil), denominado Rodada ($26^{\circ}45'46.59''$ N; $111^{\circ}53'40.14''$ W). En este charco no se detectaron ventilas hidrotermales pero presentó tapetes microbianos coloridos laminados de interés para este estudio.

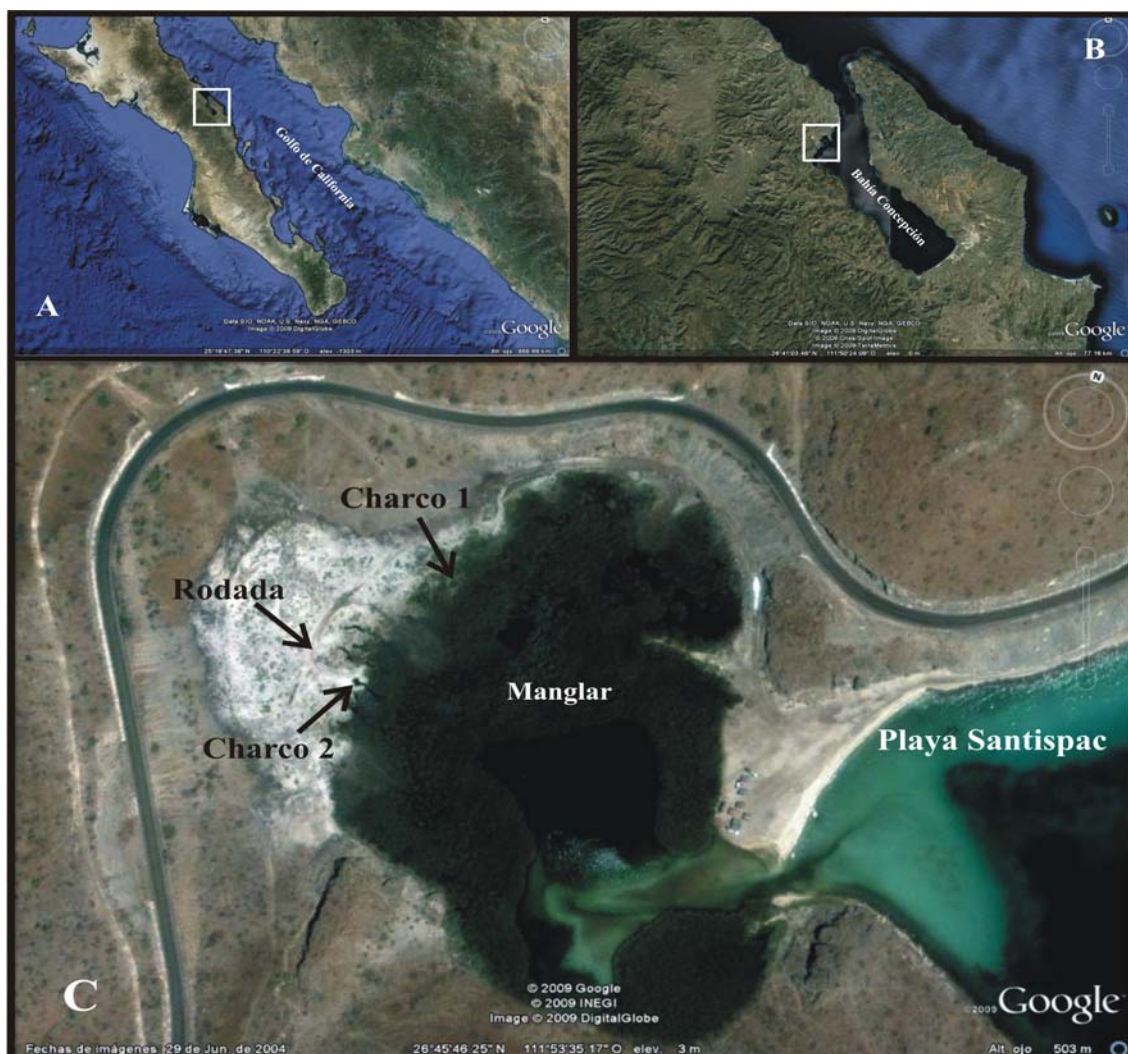


Fig. 1. Mapa de localización de los sitios de muestreo en La Playa Santispac de Bahía Concepción, B.C.S., México. A. Península de Baja California Sur, en el cuadro se delimita el área de Bahía Concepción. B. Imagen satelital de Bahía Concepción indicando en el recuadro la región donde se localiza la Playa Santispac. C. Localización de los manantiales hidrotermales intermareales, en La Playa Santispac (fuente: Google Earth).

5.2 Parámetros fisicoquímicos y colecta de muestras

En Julio de 2001 y en Noviembre de 2008 se realizaron visitas a la localidad para la determinación de parámetros fisicoquímicos *in situ* y para la colecta de muestras. La temperatura fue medida con un termómetro de mercurio (-20 a 150 °C), el pH se midió con un equipo pHep+ (Hanna Instruments), y la salinidad fue medida con un

refractómetro (SR5, Aquatic Eco-Systems, Inc.). Los datos fueron registrados manualmente.

Se colectaron seis muestras ($\sim 1 \text{ cm}^2$) de cada una de las macroestructuras microbianas encontradas en la localidad, usando contenedores de plástico y con material estéril (espátulas, nucleadores, etc.). De las seis muestras de cada macroestructura, dos fueron conservadas como material fresco para la posterior recuperación de cultivos cianobacterianos en el laboratorio, dos fueron fijadas al 3% de formaldehído en agua de mar de la localidad y con MgCO_3 como amortiguador para su posterior estudio bajo microscopía de contraste de fases. Finalmente, las dos muestras restantes de cada macroestructura, se almacenaron en nitrógeno líquido ($-196 \text{ }^\circ\text{C}$) para estudios posteriores de biología molecular. Adicionalmente, dos muestras de nódulos de manganeso fueron secadas a la intemperie durante 24 horas, para su posterior procesamiento químico para su observación bajo microscopía electrónica de barrido.

5.3 Cultivo de cianobacterias

Las muestras colectadas de material fresco fueron utilizadas para el enriquecimiento y aislamiento de cianobacterias. Cada muestra fue colocada en tubos de vidrio de 10 ml. con medio líquido ASN III (Ripka *et al.*, 1981) e incubadas a $25 \text{ }^\circ\text{C}$ con una intensidad luminosa en el rango de 50 a $75 \mu\text{Em}^{-2}\text{s}^{-1}$ durante seis semanas. Posteriormente, se realizaron aislamientos de talos de morfotipos de cianobacterias por micromanipulación con ayuda de pipetas Pasteur con puntas finas y con ayuda del estereomicroscopio. Los conglomerados de filamentos de cianobacterias previamente aislados, fueron separados

y limpiados mediante el arrastre sobre medio ASN III solidificado con 0.8% Bacto-agar (Difco), descrito previamente por García-Pichel *et al.*, 1996.

Para confirmar la presencia de solo un morfotipo de cianobacterias, se realizaron preparaciones de muestras previamente separadas y limpiadas para su observación bajo microscopía de contraste de fases. Aquellos cultivos que solo presentaron un morfotipo, fueron llamados cultivos monocianobacterianos. Cultivos monocianobacterianos de alta densidad en fase estacionaria de crecimiento fueron elegidos para formar parte de la colección de cianobacterias del CIBNOR y fueron preservados en nitrógeno líquido (-196 °C) usando Dimetil Sulfóxido (DMSO) a una concentración final de 5% como crioprotector (Ripka *et al.*, 1981).

5.3.1 Observación e identificación morfológica de cianobacterias

Análisis microscópicos de muestras previamente fijadas y de cultivos monocianobacterianos fueron realizados con un microscopio de contraste de fases (Nikon Labophot) a magnificaciones de 200×, 400×, 800×, y 2000×. Las asignaciones de nombres taxonómicos fueron hechas de acuerdo a sistemas de clasificación botánico (Gietler, 1932; Anagnostidis and Komarek, 1988; Anagnostidis and Pantazidou, 1988) y de acuerdo al sistema de clasificación bacteriológica de Castenholz, 2001.

5.4 Determinación de la composición química de nódulos de manganeso

Las muestras de nódulos de manganeso secadas a la intemperie fueron utilizadas para determinar su composición química mediante espectrofotometría de absorción atómica y rayos X en microscopía electrónica de barrido (EDX). Ambas determinaciones fueron realizadas por laboratorios analíticos del CIBNOR. En el caso de espectrofotometría de absorción atómica las determinaciones fueron hechas de acuerdo a la NMX-AA-051-SCFI-2001, MPT-LAN03/11-03 con el procedimiento para la determinación de metales por absorción atómica en tejidos animales y vegetales con un espectrofotómetro de absorción atómica GBC Avanta. En el caso de la determinación a través de rayos X y microscopía electrónica, las muestras fueron secadas a “punto crítico” con un equipo Samdri PVT 3B siguiendo el método propuesto por Anderson (1956). Las muestras fueron adheridas a las piezas de montaje con cinta adhesiva de carbono y fueron sometidas al microanálisis con un equipo HITACHI S-3000N.

5.5 Microscopía electrónica de barrido de biopelículas de nódulos de manganeso

Las muestras previamente secadas a la intemperie fueron completamente secadas a punto crítico (Samdri PVT 3B) siguiendo el método propuesto por Anderson (1956). Las muestras fueron adheridas a las piezas de montaje con cinta adhesiva de carbono y posteriormente fueron recubiertas con 8 – 10 nm de paladio 100% en un sistema de recubrimiento por pulverización catódica (Denton Vacuum Desk II). Finalmente, las observaciones de las muestras fueron realizadas con un microscopio electrónico de

barrido (HITACHI S-3000N) de presión variable; las imágenes fueron grabadas con el programa Quartz PCI v. 5.5.

5.6 *Biología Molecular*

5.6.1 *Extracción de ADN*

La extracción de ADN genómico de las muestras naturales previamente almacenadas en nitrógeno líquido, se realizó con el Kit comercial “FastDNA Spin Kit” (6000-121 FastPrep System, BIO 101, Vista, CA, USA). El ADN genómico de cepas monocianobacterianas fue extraído con el kit comercial “DNeasy Tissue Kit” (Qiagen, Hilden, Germany). En ambos casos, se siguió el protocolo del fabricante. El tamaño y pureza del ADN extraído fue verificado en geles de agarosa al 1%

5.6.2 *Reacción en cadena de la Polimerasa (PCR)*

La amplificación de segmentos específicos del gen 16S ARNr de cianobacterias, se realizó con un termociclador (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, U.S.A). Los primers CYA359F+GC y una mezcla equimolar de CYA781R(a) y CYA781R(b), fueron usados para amplificar selectivamente un segmento de 420 pares de bases (pb) a partir de ADN de muestras naturales (Nübel *et al.*, 1997). La pareja de primers, compuesta por CYA 106F y una mezcla equimolar de CYA781R(a) y CYA781R(b), fue utilizada para para amplificar selectivamente un segmento de 670 pb a partir de ADN de cultivos axénicos y puros.

Las reacciones fueron llevadas a cabo en un volumen final de 25 μl , conteniendo 2 μl de ADN ($\sim 50 \text{ ng } \mu\text{l}^{-1}$), 2.5 μl de cada primer (10 μM), 2.5 μl de cada desoxinucleótido trifosfatado (dNTP) (G,A,T,C a 2.5 mM), 5 μl de buffer verde de reacción 5 \times (Promega Madison, WI, USA), 0.25 μl de polimerasa (GoTaq® Flexi DNA Polymerase, Promega), 1.5 μl de MgCl_2 25mM y 8.75 μl de agua destilada estéril grado biología molecular. El programa de termociclador consistió de un paso de desnaturalización a 94 °C durante 5 min., posteriormente se adicionó la polimerasa y se dio un paso a 80 °C durante 1 min. (“Hot Start”), y finalmente se llevaron a cabo 35 ciclos de 1 min. a 94 °C, 1 min. a 60 °C y 1 min. a 72 °C. El tamaño y pureza de los productos de PCR fueron verificados en geles de agarosa al 1%.

5.6.3 Detección de sondas específicas de cianobacterias a través de RDL-Microarreglos

Las muestras usadas en la detección de sondas específicas de cianobacterias a través de la técnica RDL-Microarreglos, fueron las muestras colectadas en 2008, ya que no se contó con suficiente ADN genómico de las muestras colectadas en 2001. La amplificación por PCR de una fracción del gen 16S ARNr de cianobacterias, la preparación y verificación del arreglo universal, la reacción de detección de ligación (RDL), la hibridación del arreglo, la detección de señales positivas y el análisis de datos fueron realizados en el Instituto de Tecnologías Biomédicas con el Grupo de Tecnología de Arreglos (Milán, Italia) siguiendo las metodologías establecidas previamente por Castiglioni *et al.* (2004).

5.6.4 Electroforesis en geles con gradiente desnaturalizante (DGGE)

Los productos de PCR obtenidos fueron separados por DGGE. Entre 800 y 1000 ng de productos de PCR de muestras naturales y entre 80 y 100 ng de productos de PCR de cultivos, fueron cargados en carriles individuales de geles de poliacrilamida al 6% (de 1 mm. de grosor) conteniendo un gradiente de desnaturalizante químico vertical del 30 al 70 % (definiendo un agente 100% desnaturalizante como 7M de urea y 40% de formamida desionizada; acrilamida/bisacrilamida = 37.5:1). Los geles fueron corridos en electroforesis submarina durante 18 horas a 50 V. en un sistema universal de detección de mutaciones (Dcode, Bio-Rad Laboratories), sumergido en un tanque conteniendo buffer TAE 1× (40mM Trizma, 20 mM Ácido acético y 1mM EDTA, pH 8.3). El buffer fue mantenido a temperatura constante (60 °C) durante toda la electroforesis (Muyzer *et al.*, 1998). La detección de bandas fue hecha siguiendo el protocolo de tinción de plata de Bassam *et al.* (1991) para las muestras de 2001, y el protocolo de tinción con Bromuro de Etidio (30 min. en una solución de EtBr 0.5 µg/ml en TAE 1×) para las muestras de 2008. La documentación de los geles fue realizada con un scanner (UMAX, Powerlook 2100 XL).

Las secuencias de cianobacterias de referencia (estándar) usadas en el DGGE fueron obtenidas usando amplicones de cultivos monocianobacterianos: *Cyanobacterium* sp., cepa SP2B9510-3, *Synechococcus elongatus* cepa SP2A9606-8, *Leptolyngbya thermalis* cepa SP2A9510-1, y *Microcoleus chthonoplastes* cepa PCC7420. Los primeros tres cultivos fueron aislados por López-Cortés (1999); López-Cortés *et al.* (2001) de la misma localidad que este trabajo, y el cultivo de *Microcoleus chthonoplastes* fue

aislado por García-Pichel *et al.* (1996) de un ambiente hipersalino de Woods Hole, MA, Estados Unidos de América.

5.6.5 Obtención de secuencias

Las bandas de interés de los geles de DGGE fueron cortadas con un bisturí estéril. El ADN teñido con plata fue eluido del gel en buffer “Crush and Soak” de acuerdo al protocolo establecido por Sambrook y Russell (2001). El ADN teñido con EtBr fue eluido del gel en agua destilada estéril a 4 °C durante 24 horas. Los ADN’s eluidos fueron re-amplificados con la pareja de primers CYA 359F y CYA 781R mezcla (Nübel *et al.*, 1997) y posteriormente fueron nuevamente corridos en un gel de DGGE para verificar que la reamplificación única de la banda de interés correspondiera a la misma banda que fue cortada originalmente, de acuerdo a su movilidad electroforética en el gel. Finalmente, las bandas reamplificadas y los productos de PCR obtenidos de cultivos monocianobacterianos, fueron secuenciados por la empresa Macrogen (Jongro-gu, Korea and Rockville, Estados Unidos de América).

De las muestras colectadas en 2001, la muestra de nata filamentosa de color verde, fue considerada como cultivo, por lo tanto se extrajo el ADN de la misma manera que con los otros cultivos, para posteriormente amplificarlo y obtener su secuencia directamente sin correr sus productos de PCR sin la separación por DGGE.

5.7 Análisis de comunidad generados a partir de perfiles de bandas de DGGE

Las imágenes obtenidas de DGGE fueron procesadas con un programa diseñado para el análisis de perfiles de bandas (Gelcompar II, Applied Maths, Sint-Martens-Latem, Belgium). Posteriormente, se creó una matriz de similitudes usando el coeficiente de similitud “Dice” (Fórmula 1) y finalmente los perfiles de bandas fueron agrupados usando el método UPGMA (Unweighted Pair Group Method using Arithmetic Average).

Fórmula (1). Coeficiente de similitud Dice

$$S = \frac{2Nab}{Na + Nb}$$

S = Coeficiente de similitud Dice

Nab = Número de bandas en común entre dos perfiles de bandas

Na = Número de bandas del perfil A

Nb = Número de bandas del perfil B

(Kosman y Leonard, 2005).

Para cada macroestructura microbiana dominada por cianobacterias, se calculó la riqueza de especies (R), el índice de diversidad Shannon-Weaver (H') (Fórmula 2), y el índice de uniformidad (e) (Fórmula 3). Para R se asumió que cada banda de DGGE representa una unidad taxonómica operativa (OTU), y para H' se asumió que la intensidad de las bandas de DGGE es una aproximación de su abundancia relativa (Kosman y Leonard, 2005).

Fórmula (2). Índice de diversidad de Shannon-Weaver

$$H' = -\sum_{i=1}^D a_i \ln a_i$$

H' = Índice de diversidad

D = Número de bandas detectadas (R)

a = Valor de intensidad de la banda (abundancia relativa)

Fórmula (3). Índice de uniformidad

$$e = \frac{H'}{\log S}$$

H' = Índice de diversidad de Shannon-Weaver

S = número de especies (R)

(Atlas y Barta, 1998).

5.8 Reconstrucción filogenética

Con el programa 4Peaks v. 1.7.2 se verificó la calidad de las secuencias y se realizó la edición correspondiente de las mismas. Para la asignación taxonómica de las secuencias obtenidas en este estudio, las secuencias fueron comparadas con la base de datos de GenBank usando la herramienta BLAST (Altschul *et al.*, 1990). Todas las secuencias generadas en este estudio y aquellas cercanamente relacionadas fueron alineadas para construir tres árboles filogenéticos utilizando el algoritmo del vecino mas cercano (neighbor-joining) con 500 réplicas para el análisis de bootstrap utilizando la paquetería CLC v. 5.5 (CLC Bio, Aarhus, Dinamarca).

6. RESULTADOS

6.1 Parámetros fisicoquímicos y macroestructuras microbianas

Como se muestra en la Tabla I, durante los dos muestreos se observaron variaciones en los parámetros fisicoquímicos, así como en el número de salidas de agua (ventilas) dentro de los charcos y en la presencia o ausencia de macroestructuras formadas por microorganismos. En el 2001, se reconocieron dos ventilas en el Charco 1 con temperaturas de 46 – 52°C, mientras que en el 2008 solamente se reconoció una ventila con temperatura de 49°C. Con relación a la columna de agua dentro del mismo charco, esta presentó una temperatura de 44°C en el 2001 y en el 2008 bajó a 41°C. La salinidad se mantuvo en el rango de 2.4 – 2.8% mientras que el pH fue de 6.5 – 6.8 en ambos años (Tabla I).

Por otra parte, el Charco 2 también presentó algunas variaciones ya que en Julio de 2001 se pudo detectar una ventila con una temperatura de 58°C y alrededor de ella se observó una nata filamentosa de color verde muy notable, la cual fue identificada por observaciones al microscopio como nata de *Geitlerinema* sp. Sin embargo, el 2008 no fueron observadas ni la ventila ni la nata filamentosa. Respecto a la columna de agua hubo una disminución de 48°C en 2001 a 41-42°C en 2008. La salinidad estuvo en el rango de 2.4 – 2.9 % y el pH en el intervalo de 6.9 – 7.3.

Dentro de la rodada (detectada en 2008) no se detectaron ventilas hidrotermales pero si la presencia de tapetes microbianos laminados. En este sitio, se registró una salinidad de 5 – 7 %, una temperatura de 28 - 30°C y valores de pH de 7.5 – 7.9 (Tabla I).

Tabla I. Parámetros fisicoquímicos y macroestructuras detectadas en los sitios de muestreo.

	CHARCO 1		CHARCO 2		RODADA
	2001	2008	2001	2008	2008
Aberturas (Temp °C)	2 (46-52)	1 (49)	1 (58)	ND	ND
Temperatura charco (°C)	44	41	48	41 - 42	28 - 30
Salinidad (%)	2.5 – 2.8	2.4 – 2.5	2.4 – 2.9	2.7 – 2.8	5.0 – 7.0
pH	6.5 – 6.8	6.6	6.9 – 7.1	7.2 – 7.3	7.5 – 7.9
Macro - estructuras	Tapetes y natas	Tapetes	Tapetes y nódulos de Mn	Tapetes y nódulos de Mn	Tapetes laminados

ND = No detectadas.

6.2 Cultivos monocianobacterianos

Un total de 6 cultivos monocianobacterianos fueron aislados a partir del enriquecimiento de muestras de la localidad, dos de ellas fueron aisladas a partir de muestras del Charco 1 (SQP1Ab y SQP112), 3 a partir del Charco 2 (SQP2_1, SQP2_2, SQP2ONC) y una fue recuperada de muestras de la Rodada (SQRC) (Tabla II). Las dos cepas del Charco 1 y la cepa de la rodada fueron identificadas como tipo-*Geitlerinema*, ya que presentaron tricomas rectos con células mas largas que anchas o isodiamétricas de 3 a 5 µm de diámetro con constricciones celulares ligeras y células

apicales redondeadas, estos tricomas mostraron alta motilidad por deslizamiento (2 $\mu\text{m}/\text{seg.}$) acompañado de rotación del tricoma. Las secuencias parciales de estas cepas mostraron 96% de similitud con secuencias de *Geitlerinema* sp. CCY0102 (GQ402015) y 94% con secuencias de *Geitlerinema* sp. Flo1 (FJ042947).

La cepa SQP2_1 fue identificada como tipo-*Leptolyngbya* ya que presentó tricomas móviles con una vaina fina y células cilíndricas de 1.0 μm de ancho y 1 – 5 μm de largo, su secuencia parcial presentó 100% de similitud con la cepa *Leptolyngbya thermalis* SP2A9510-1 (AF410932) que fue aislada previamente a este estudio de la misma localidad. Por otra parte, la cepa SQP2-2 fue identificada como una cianobacteria de la subsección Oscillatoriales ya que presenta características muy similares a las cepas del género *Geitlerinema*. Sin embargo, cuando se obtuvo la secuencia parcial de nucleótidos del gen 16S ARNr, esta presentó 99% de similitud con *Oscillatoria limnetica* (AF410934) y 97% de similitud con varias cepas de cianobacterias no cultivables. Finalmente, la cepa SQP2ONC fue identificada como tipo-*Lyngbya* ya que es una cianobacteria filamentosa no ramificada con células discoidales apiladas como monedas, con una vaina firme laminada y sus tricomas miden de 8 a 24 μm de diámetro, sin embargo no se obtuvo la secuencia parcial de nucleótidos del gen 16S ARNr de esta cepa.

Tabla II. Cepas monocianobacteriales generadas a partir del enriquecimiento de muestras naturales de manantiales hidrotermales.

Asignación taxonómica	Cepa	Número de acceso GenBank	Fuente de aislamiento	Secuencia mas relacionada en GenBank
Tipo- <i>Geitlerinema</i>	SQP1Ab	GQ412716	Charco 1, tapete microbiano abertura	<i>Geitlerinema</i> sp. Flo1 (FJ042947) 99%
Tipo- <i>Geitlerinema</i>	SQP112	GQ412717	Charco 1, tapete microbiano	<i>Geitlerinema</i> sp. A28DM (FJ410907) 90%
Tipo- <i>Leptolyngbya</i>	SQP2_1	GQ412714	Charco 2, tapete microbiano	<i>Leptolyngbya thermalis</i> SP2A9510-1 (AF410932) 99%
Cyanobacteria Oscillatoriales	SQP2_2	GQ412715	Charco 2, tapete microbiano	<i>Oscillatoria lemnética</i> (AF410934) 99%
Tipo- <i>Lyngbya</i>	SQP2ONC	NS*	Charco 2, nódulos de manganeso	NS*
Tipo- <i>Geitlerinema</i>	SQRC	GQ412713	Rodada, tapete microbiano	<i>Geitlerinema</i> sp. CCY0102 (GQ402015) 96%

*NS = No secuenciada

6.3 Diversidad de morfotipos de cianobacterias

Mediante microscopía de contraste de fases y microscopía electrónica de barrido se identificaron dentro de las diferentes muestras 11 morfotipos de cianobacterias (Fig. 2), de los cuales 6 pertenecen al grupo de las Chroococcales y 5 al de las Oscillatoriales. El único morfotipo común a todas las muestras fue el tipo-*Leptolyngbya*. Por lo contrario, el tipo-*Lyngbya* solo se detectó en las muestras de nódulos de manganeso del Charco 2 del 2008, y los tipo-*Microcoleus* y tipo-*Gloeothecae* solo fueron detectados en las muestras de tapetes laminados de la Rodada (Tabla III).

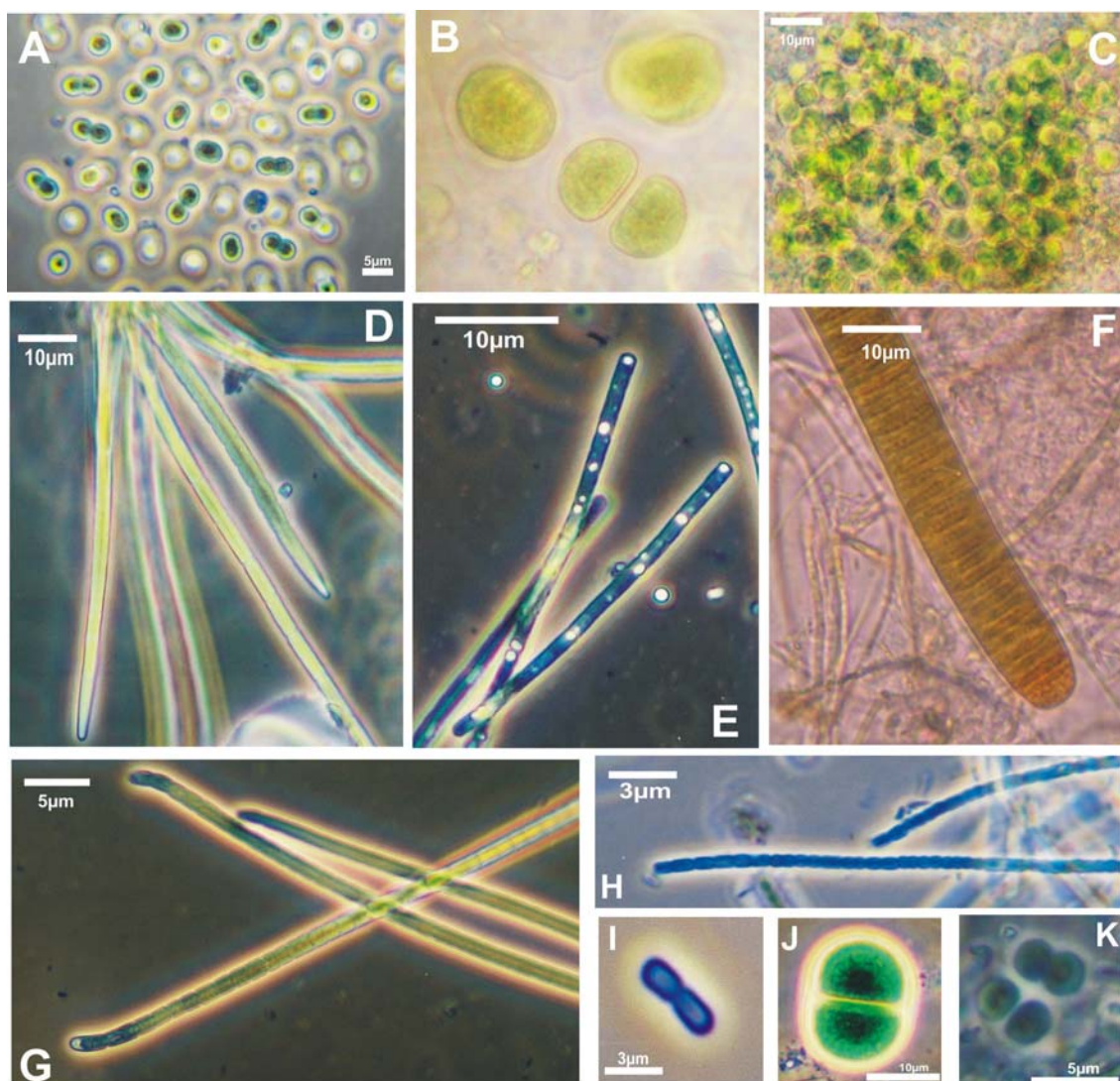


Fig. 2. Morfotipos de cianobacterias detectados mediante microscopía de contraste de fases. A. Micrografía del tipo-*Cyanobacterium* tomada de López-Cortés (1999). B. Tipo- *Gloeotheca* C. Cianobacterias unicelulares no identificadas. D. Tricomas del tipo-*Microcoleus*. E. Cianobacteria filamentosas con inclusiones celulares refráctiles identificadas como tipo-*Geitlerinema*. F. Tipo-*Lyngbya* con células discoidales apiladas. G. Tricomas con célula terminal curvada, identificada como tipo-*Oscillatoria*. H. Tricoma del tipo-*Leptolyngbya* con constricciones celulares. I. Células en forma de bastón identificadas como tipo-*Synechococcus*. J. Tipo-*Chroococcus* con una vaina gruesa. K. Tétrada de células esféricas, identificadas como tipo-*Synechocystis*. Nota: las imágenes E, I, K, son cortesía de Alejandro López Cortés (imágenes no publicadas previamente).

Tabla III. Morfotipos de cianobacterias detectados en los dos años de muestreo.

		CHARCO 1		CHARCO 2		RODADA
		2001	2008	2001	2008	2008
Chroococcales	Unicelulares no identificadas		X			
	Tipo- <i>Chroococcus</i>	X		X	X	X
	Tipo- <i>Cyanobacterium</i>			X	X	X
	Tipo- <i>Gloeotheca</i>					X
	Tipo- <i>Synechococcus</i>	X		X		
Oscillatoriales	Tipo- <i>Synechocystis</i>			X	X	X
	Tipo- <i>Geitlerinema</i>	X		X	X	X
	Tipo- <i>Leptolyngbya</i>	X	X	X	X	X
	Tipo- <i>Lyngbya</i>				X	
	Tipo- <i>Microcoleus</i>					X
	Tipo- <i>Oscillatoria</i>	X	X			X

6.4 Composición química de nódulos de manganeso

En el Charco 2 se detectó la presencia de agregados de nódulos de manganeso (Fig. 3A) con calcita adheridos a la pared del charco así como al canal de descarga de agua hacia la laguna. Estos nódulos miden ~ 2 cm. de diámetro, son de forma semiesférica a tabular y están compuestos de capas alternadas de laminas blancas de sílica – carbonatos y de capas negras de material poroso rico en manganeso (Fig. 3B). En la Tabla IV se presenta la composición química de los nódulos determinada mediante espectrofotometría de absorción atómica (EAA) y a través de rayos X en microscopio electrónico de barrido (EDX), sobresaliendo el alto porcentaje de manganeso detectado (21%). Por otra parte, en la superficie de los oncoides se observó el desarrollo de parches delgados de biopelículas microbianas, dominadas por frústulas vacías de diatomeas, células esféricas, filamentos y bastones pequeños (Fig. 3C y 4D).

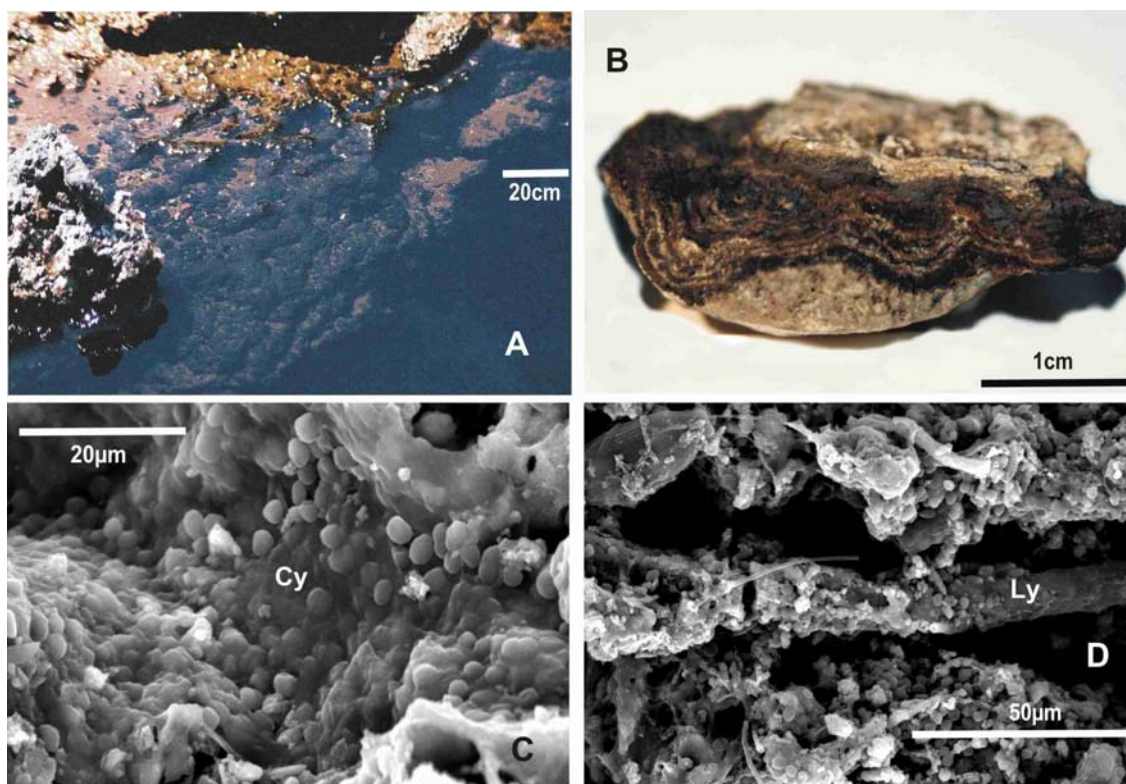


Fig. 3. Aspectos macro y microscópico de nódulos de manganeso. A. Macroestructura microbiana denominada nódulo de manganeso de color negro que se desarrolla en la pared del Charco 2. B. Magnificación de un nódulo de manganeso (vista invertida), nótese la laminación entre capas alternantes de color blanco ricas en sílica-carbonatos y negras de material poroso rico en manganeso. C y D. Micrografías electrónicas de barrido de la biopelícula que se desarrolla en la superficie de los nódulos de manganeso, mostrando la dominancia de morfotipos unicelulares del tipo *Cyanobacterium* (Cy) y la presencia de filamentos del tipo *Lyngbya* (Ly). Nota: La imagen A es cortesía de Alejandro López Cortés (imagen no publicada previamente).

Tabla IV. Composición química de nódulos de manganeso del Charco 2.

Elemento	EAA	EDX
C (%)	ND	25.38
O(%)	ND	35.98
Ca (%)	4.01	2.84
Mn (%)	12.44	21.80
Fe (mg/kg)	370.65	ND
Cu (mg/kg)	4,65	ND

EAA = Espectrofotometría de Absorción Atómica.

EDX = Rayos X en microscopio electrónico de barrido.

ND = No determinado.

6.5 RDL-Microarreglos

Con esta aproximación fue posible detectar la sonda universal diseñada para cianobacterias en todas las muestras de 2008 (Charco 1, Charco 2 y Rodada), lo cual corroboró la presencia de estos microorganismos en este tipo de muestras. De las 19 sondas específicas que fueron utilizadas para la hibridación, únicamente fue posible detectar las sondas de *Lyngbya*, *Leptolyngbya*, *Synechococcus* y *Gloeothece* para muestras de tapete del Charco 1 (Fig. 4A y 4B), y para muestras del Charco 2 se detectó la presencia de las sondas de *Gloeothece*, *Synechococcus* y *Synechocystis* (Fig. 4C y 4D); para las muestras de la Rodada no fue posible detectar ninguna de las sondas diseñadas.

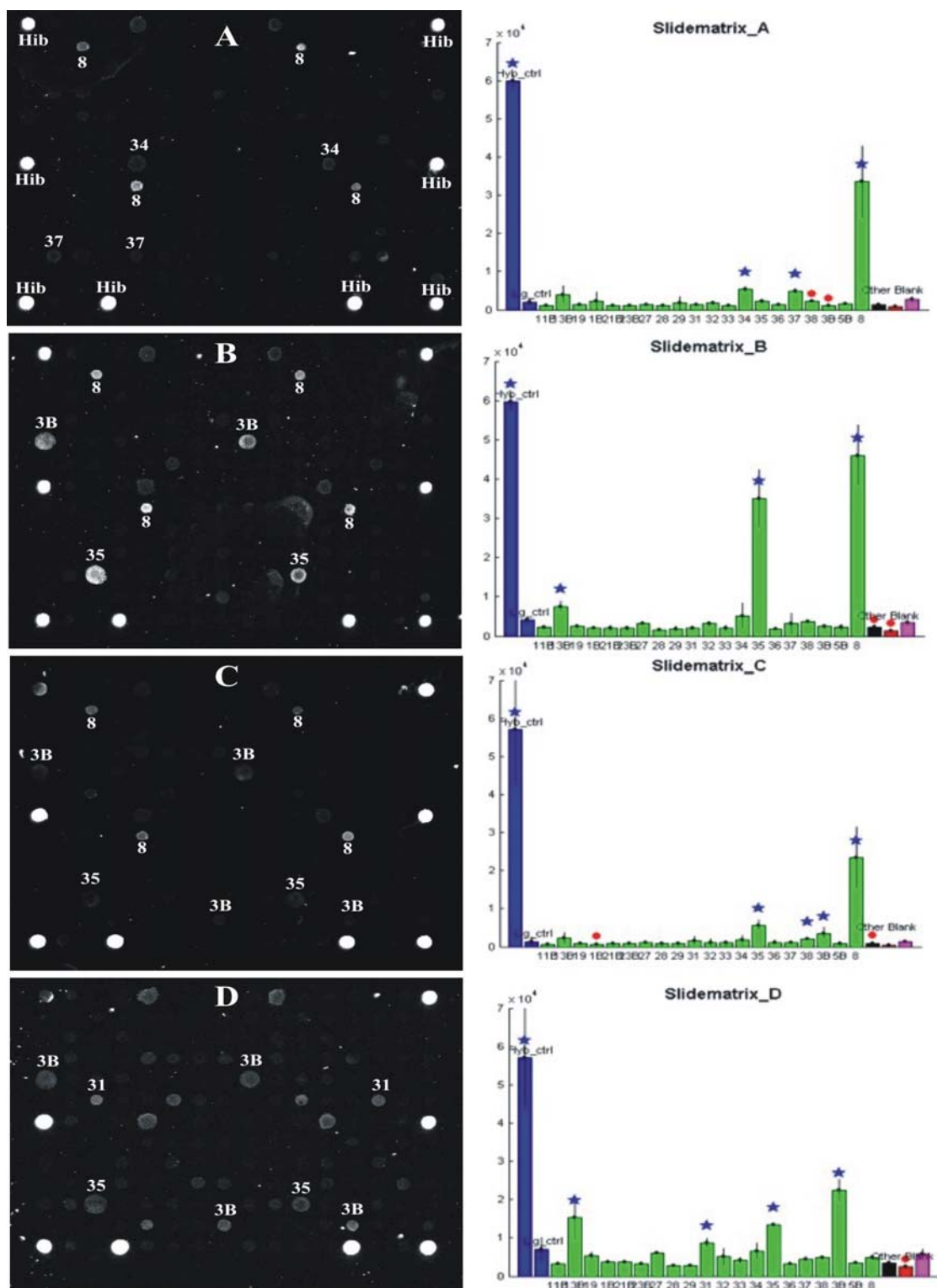


Fig. 4. Detección de sondas de cianobacterias en muestras de 2008 de manantiales hidrotermales someros mediante la técnica RDL-Microarreglos. Hib = control positivo de hibridación. A y B. Muestras de tapetes del Charco 1. C y D. Muestras de tapete del Charco 2. Los números corresponden a las claves de las sondas específicas de género. 8 = sonda universal de cianobacterias, 34 = *Lyngbya* sp., 37 = *Leptolyngbya* sp., 3B = *Synechococcus* sp., 35 = *Gloeothoeche* sp., 31 = *Synechocystis*.

6.6 Estructura de la comunidad de cianobacterias

6.6.1 Muestras de 2001

Se generaron perfiles de bandas de DGGE de cada macroestructura detectada para cada charco. Dichos perfiles estuvieron representados principalmente por bandas en la región de los estándares (40 – 60 % de gradiente desnaturizante) a lo largo del gel (Fig. 5A). El análisis de cluster UPGMA de estos perfiles, indicó que las muestras del Charco 1 fueron similares entre sí al menos en un 75%, sin embargo, las muestras de los oncoides del Charco 2 solamente fueron similares con las del Charco 1 en un 40%, lo cual indica que el patrón de bandas de ambos charcos tiene diferencias significativas (Fig. 5B).

La muestra de tapete microbiano del Charco 2 presentó un patrón de bandeo distintivo con dos bandas intensas (Fig. 5A, carril 9), de las cuales la banda denominada F3 fue única ya que en ninguna otra muestra fue detectada. Esta banda después de ser secuenciada, coincidió al 100% con la secuencia de *Oscillatoria* sp. (AY426542) (Tabla V), depositada previamente en GenBank. Por otra parte, una banda común fue detectada en todas las muestras de 2001 (Fig. 5A, bandas 2SA y J09), la cual presentó la misma movilidad electroforética dentro del gradiente desnaturizante que la banda de referencia del estándar correspondiente al cultivo de *Cyanobacterium* sp. Al obtener la secuencia de esta banda común, esta coincidió al 100% con una secuencia del mismo morfotipo (AB058249). En una muestra de oncoides del Charco 2, esta banda común (Fig. 5A, banda J09) presentó mayor intensidad con relación a todas las demás muestras, lo cual coincide con las observaciones realizadas mediante microscopía.

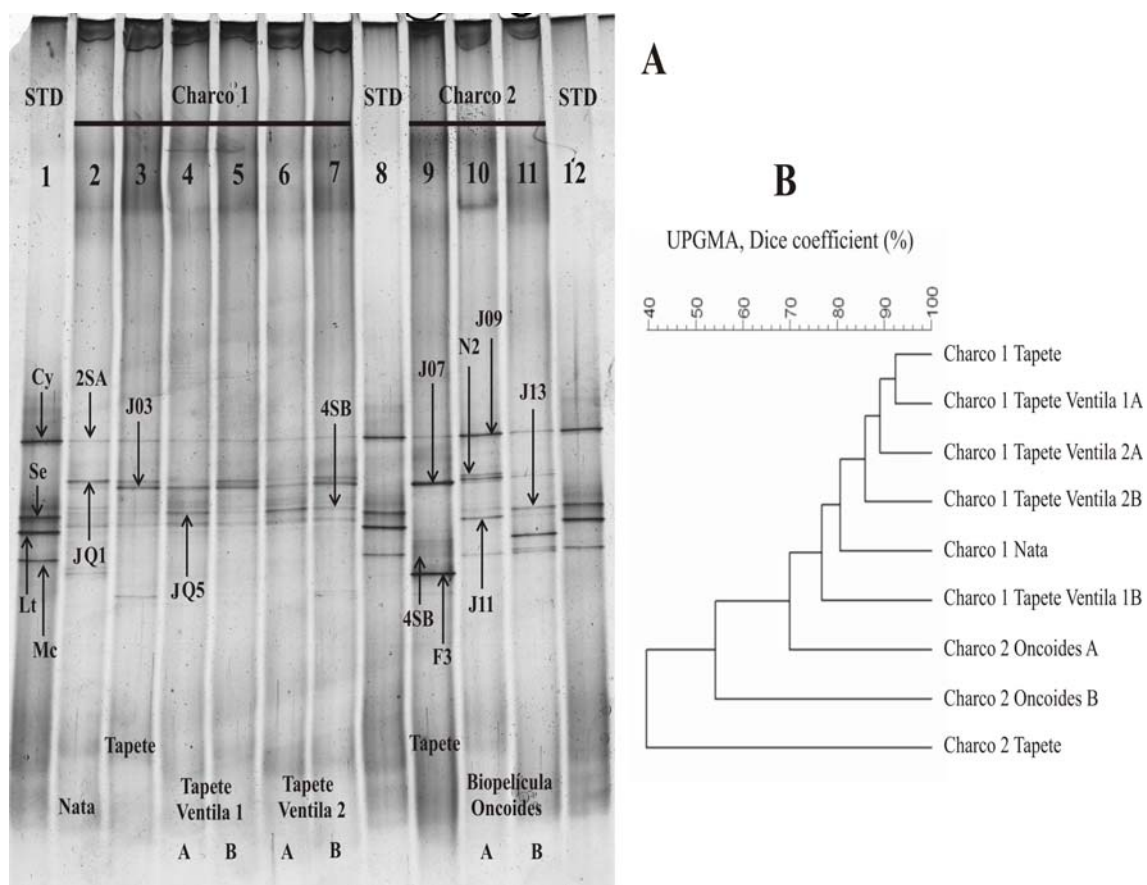


Fig. 5. Electroforesis en gel con gradiente desnaturalizante (DGGE) de un fragmento del gen 16S ARNr de cianobacterias de muestras de 2001 y su análisis de agrupación. A. Líneas: 1, 8 y 12 muestras de referencia (STD), Cy = *Cyanobacterium* sp. cepa SP2B9510-3; Se = *Synechococcus elongatus* cepa SP2A9606-8; Lt = *Leptolyngbya thermalis* cepa SP2A9510-1 y Mc = *Microcoleus chthonoplastes* cepa PCC7420; líneas 2 a 7 muestras del Charco 1, 9 a 11 muestras del Charco 2. Las bandas secuenciadas están indicadas con flecha y se muestra su respectiva clave. B. Análisis de agrupación de perfiles de DGGE de comunidades de cianobacterias en manantiales intermareales hidrotermales. La escala del dendrograma representa el porcentaje de similitud entre clusters, calculado por el método UPGMA con coeficiente Dice.

Tabla V. Lista de secuencias generadas a partir de Unidades Taxonómicas Operacionales (OTU's) de muestras colectadas en 2001 de manantiales hidrotermales en Santispac, Bahía Concepción, Baja California Sur, México

OTU	Número de acceso GenBank	Longitud (bp)	Secuencia mas relacionada en GenBank	Similitud (%)
2SA	FJ396033	289	<i>Cyanobacterium</i> sp. AB058249	98
JQ1	FJ396036	330	Cianobacteria no cultivable	97
			AM177395	
J03	FJ396038	250	Cianobacteria incultivable	95
			AM177415	
JQ5 y 4SB	FJ396035	322 y 340	Cianobacteria incultivable	97
	FJ396034		AB294942	
J07	FJ396039	248	Cianobacteria incultivable	95
			AM177415	
Q9	GU229746	470	<i>Geitlerinema</i> sp. SQP112 GQ412717	99
F3	FJ396043	328	<i>Oscillatoria</i> sp. AY426542	100
J09	FJ408731	250	<i>Cyanobacterium</i> sp. AB058249	100
			<i>Synechococcus</i> incultivable	100
			EF473719	
N2	FJ396040	312	Cianobacteria incultivable	96
			AM177406	
J11	FJ396041	257	<i>Leptolyngbya</i> sp. EF545644	95
J13	FJ396037	250	<i>Leptolyngbya</i> sp. EU249119	98
SP2	FJ396042	404	Cianobacteria incultivable EF429609	99
Fil				

6.6.2 Muestras de 2008

De igual manera que para las muestras de 2001, se generaron perfiles de bandas de DGGE de cada macroestructura detectada en el año de 2008 para cada charco. Dichos perfiles estuvieron representados principalmente por bandas en la región de los estándares (40 – 60 % de gradiente desnaturalizante) a lo largo del gel (Fig. 6A). El análisis de agrupación UPGMA de estos perfiles, indica que las muestras de la Rodada son similares entre sí al menos en un 68%, las muestras del Charco 1 son 90% similares entre ellas mismas y 42 % similares a las muestras de la Rodada. Por otra parte, las

muestras de los tapetes del Charco 2 fueron similares entre ellas en un 84% y 30% con todas las demás muestras. Sin embargo, las muestras de los oncoides del Charco 2 presentaron un patrón de bandeo (una sola banda) distinto a todas las demás muestras, por lo que comparten menos del 30% de similitud con el resto de las muestras (Fig. 6B).

La banda única de los oncoides del Charco 2 (Fig. 6A, banda ONC1) y la banda P21 del Charco 1 coincidieron en un 97% con una secuencia de *Lyngbya* no cultivable (DQ072924). Esta banda fue detectada en todas las muestras (Fig. 6A), lo cual hace suponer la presencia de esta cianobacteria en todas las muestras de este año. Por otra parte, de estas muestras se lograron recuperar secuencias a partir de bandas que fueron muy similares a secuencias obtenidas previamente de cultivos aislados de la misma localidad, tal es el caso de la banda P26 que mostró 97% de identidad con la secuencia de *Geitlerinema* SP2A9510-2 (FJ396032), y las bandas RA1 y RB1 que exhibieron 99 y 98% de similitud (respectivamente) con la secuencia de *Leptolyngbya thermalis* SQP2_1 (GQ412714) (Tabla VI).

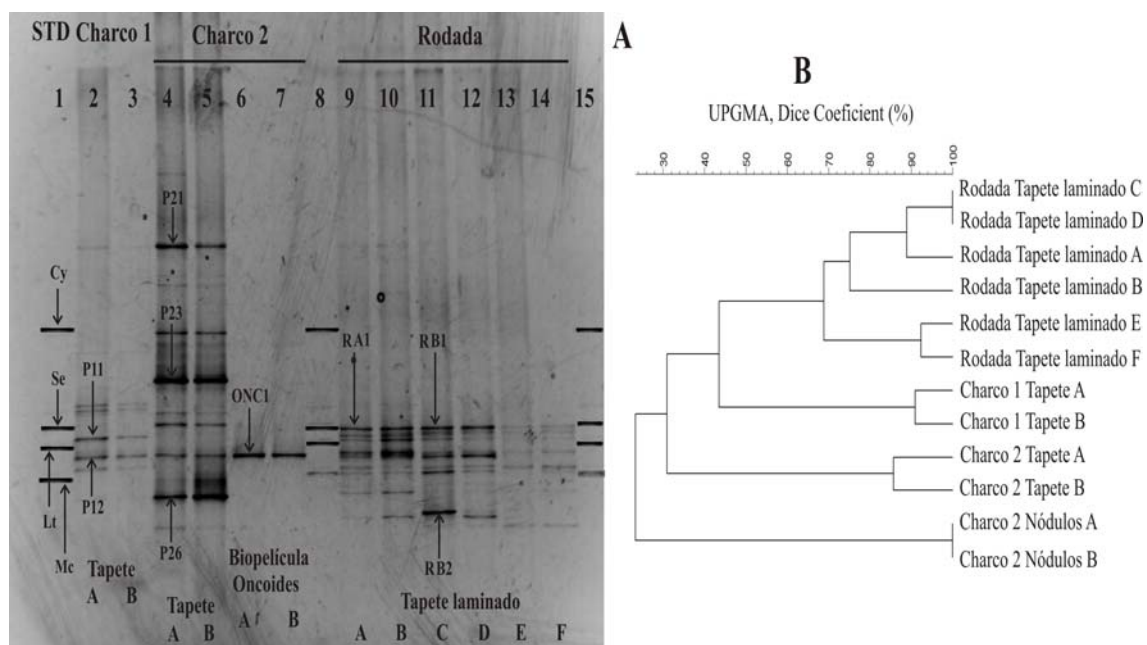


Fig. 6. Electroforesis en gel con gradiente desnaturizante (DGGE) de un fragmento del gen 16S ARNr de cianobacterias y su análisis de agrupación. A. Líneas: 1, 8 y 15 muestras de referencia (STD), Cy = *Cyanobacterium* sp. cepa SP2B9510-3; Se = *Synechococcus elongatus* cepa SP2A9606-8; Lt = *Leptolyngbya thermalis* cepa SP2A9510-1y Mc = *Microcoleus chthonoplastes* cepa PCC7420; líneas 2 y 3 muestras del Charco 1, 4 a 7 muestras del Charco 2, 9 a 14 muestras de la Rodada. Las bandas secuenciadas están indicadas con flecha y se muestra su respectiva clave. B. Análisis de agrupación de perfiles de DGGE de comunidades de cianobacterias en manantiales intermareales hidrotermales. La escala del dendrograma representa el porcentaje de similitud entre clusters, calculado por el método UPGMA con coeficiente Dice.

Tabla VI. Lista de secuencias generadas a partir de Unidades Taxonómicas Operacionales (OTU's) de muestras colectadas en 2008 de manantiales hidrotermales en Santispac, Bahía Concepción, Baja California Sur, México

OTU	Número de acceso GenBank	Longitud (bp)	Secuencia mas relacionada en GenBank	Similitud (%)
P11	GU229741	454	Cianobacteria no cultivable aislada de DGGE AY541050	94
P12	GU229742	400	<i>Lyngbya</i> incultivable DQ072924	98
P21	GU229743	455	Clon de cianobacteria incultivable FJ753106	100
P23	GU229744	446	Cianobacteria Oscillatoriales EF654035	95
P26	GU229745	467	<i>Geitlerinema</i> SP2A9510-2 FJ396032	97
ONC1	GU229747	466	<i>Lyngbya</i> incultivable DQ072924	97
RA1	GU229748	466	<i>Leptolyngbya thermalis</i> SQP2_1 GQ412714	99
RB1	GU229749	465	<i>Leptolyngbya thermalis</i> SQP2_1 GQ412714	98
RB2	GU229750	467	<i>Cyanothece</i> sp. incultivable AY429134	98

6.7 Números de acceso de secuencias nucleotídicas

Todas las secuencias parciales del gen 16S ARNr de cepas de cianobacterias (5) y de ADN ambiental obtenidas a partir de bandas de DGGE (22) generadas en este estudio, fueron depositadas en la base de datos de GenBank y se generó un número de acceso para cada una de ellas (Tabla II, V y VI).

6.8 Diversidad de cianobacterias estimada a partir de OTU's

El índice de Shannon - Weaver (H') estimado para las muestras de nata y tapete ventila en promedio del Charco 1 de muestras de 2001 fue de 1,81 y 1.13 respectivamente, mientras que para las muestras de tapete del mismo charco se estimó una H' de 1.83 para las muestras de 2001, disminuyendo a 1,68 con las muestras de 2008 (Tabla VII), lo cual presenta una correlación directamente proporcional con la cantidad de macroestructuras detectadas para el año de 2008 (Tabla I).

Para las muestras de tapete del Charco 2 se estimó un valor de H' de 0.8 con las muestras de 2001, sin embargo este valor se incrementó hasta 2.25 para las muestras de 2008, ya que el patrón de bandeo de estas muestras presentó dos veces el número de bandas que había mostrado con las muestras de 2001, contrario a lo que sucedió con las muestras de biopelícula de oncoide ya que en el año de 2001 se detectaron 7 bandas de DGGE (Fig. 5A, líneas 10 y 11) pero con las muestras de 2008, únicamente presentó 1 banda (Fig. 6A, líneas 4 y 5) , por lo que la diversidad de estas muestras bajó considerablemente (Tabla VII). Finalmente, el segundo valor más alto de diversidad fue encontrado en las muestras de Rodada de 2008, ya que se detectaron hasta 10 bandas en el perfil de DGGE y una H' de 1,99, lo cual corresponde con las observaciones realizadas de morfotipos con microscopía de luz (Tabla II).

Tabla VII. Riqueza (R), diversidad (H') e uniformidad (e) de cianobacterias calculada a partir de análisis de perfiles de bandas de DGGE con muestras de 2001 y 2008 de manantiales hidrotermales intermareales.

Localidad	Año	Macroestructura	R	H'	e
Charco 1	2001	Nata	8	1,81	2,01
Charco 1	2001	Tapete ventila 1	6	1,52	1,95
Charco 1	2001	Tapete ventila 2	6	0,75	0,96
Charco 1	2001	Tapete	7	1,83	2,17
Charco 1	2008	Tapete	6	1,68	2,16
Charco 2	2001	Tapete	5	0,80	1,14
Charco 2	2008	Tapete	11	2,25	2,16
Charco 2	2001	Biopelícula Oncoide	7	1,91	2,26
Charco 2	2008	Biopelícula Oncoide	1		
Rodada	2008	Tapete laminado	10	1,99	1,99

6.9 Filogenia

De manera general, los árboles filogenéticos obtenidos presentaron altos valores de soporte con un bootstrap de 500. El primer árbol construido únicamente con secuencias generadas en este estudio de 300 a 320 pb., permitió reconocer cuatro grupos principales. El primero (Fig. 7, I) estuvo bien representado con secuencias del tipo *Geitlerniema*, el segundo (Fig. 7, II) presentó pocas secuencias relacionadas con cianobacterias no cultivables, el tercero (Fig. 7, III) fue un grupo de cianobacterias filamentosas del tipo *Leptolyngbya* y *Oscillatoria*. Y finalmente, el cuarto grupo (Fig. 7, IV) permitió reconocer que la secuencia generada a partir de la banda ONC 1 que tuvo similitud del 97% con una secuencia del tipo *Lyngbya*, está poco relacionada con los otros tres grupos mencionados anteriormente.

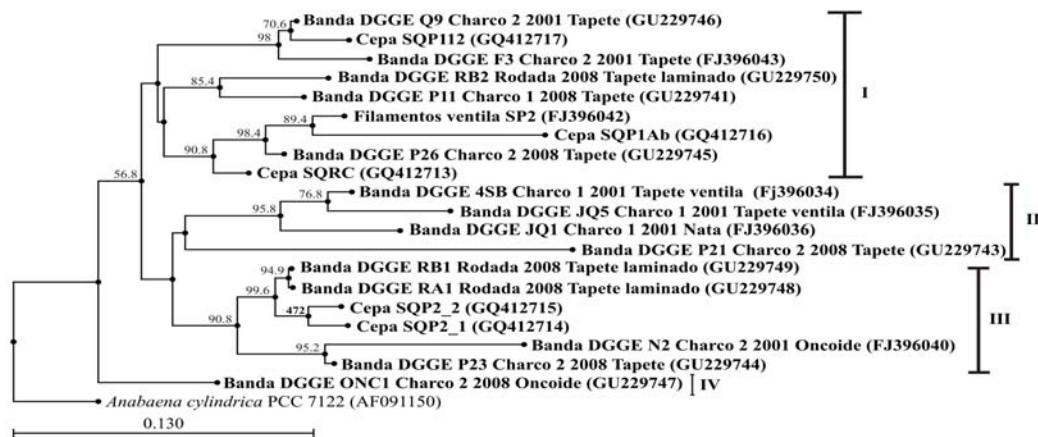


Fig. 7. Árbol filogenético basado en secuencias parciales del gen 16S ARNr de cianobacterias de 300 - 330 pb., obtenidas a partir de cultivos monocianobacterianos y a partir de bandas de DGGE. La construcción del árbol fue hecha con el algoritmo “neighbor joining” en el programa CLC v5.5. Los números en los nodos representan los valores de “bootstrap” con 500 réplicas. *Anabaena cylindrica* fue usada como “outgroup”. La barra de escala corresponde a 13 cambios por cada 100 posiciones.

La topología arrojada por el segundo árbol, que fue construido con secuencias generadas en este estudio y secuencias previamente depositadas en GenBank de 180 a 250 pb, permitió reconocer cinco grupos principales, el primer grupo (Fig. 8, I) incluye secuencias de cianobacterias filamentosas sin heterocistos relacionadas con miembros de cultivos y miembros incultivables de la Subsección III Oscillatoriales del género *Leptolyngbya*. El segundo grupo (Fig. 8, II) estuvo representado por secuencias que tienen similitud con miembros de cianobacterias no cultivables sin género alguno en específico. El tercer grupo (Fig. 8, III) lo integran secuencias relacionadas con cianobacterias unicelulares (cultivables y no cultivables) de la subsección I Chroococcales del género *Cyanobacterium*, *Cyanothece* y *Synechococcus*. El cuarto grupo (Fig. 8, IV) está integrado por secuencias relacionadas con cianobacterias de la subsección Oscillatoriales de los géneros *Geitlerinema* y *Oscillatoria*. Finalmente el quinto grupo (Fig. 8, V) fue una pequeña agrupación de secuencias relacionadas con cianobacterias de la subsección Oscillatoriales del género *Lyngbya*.

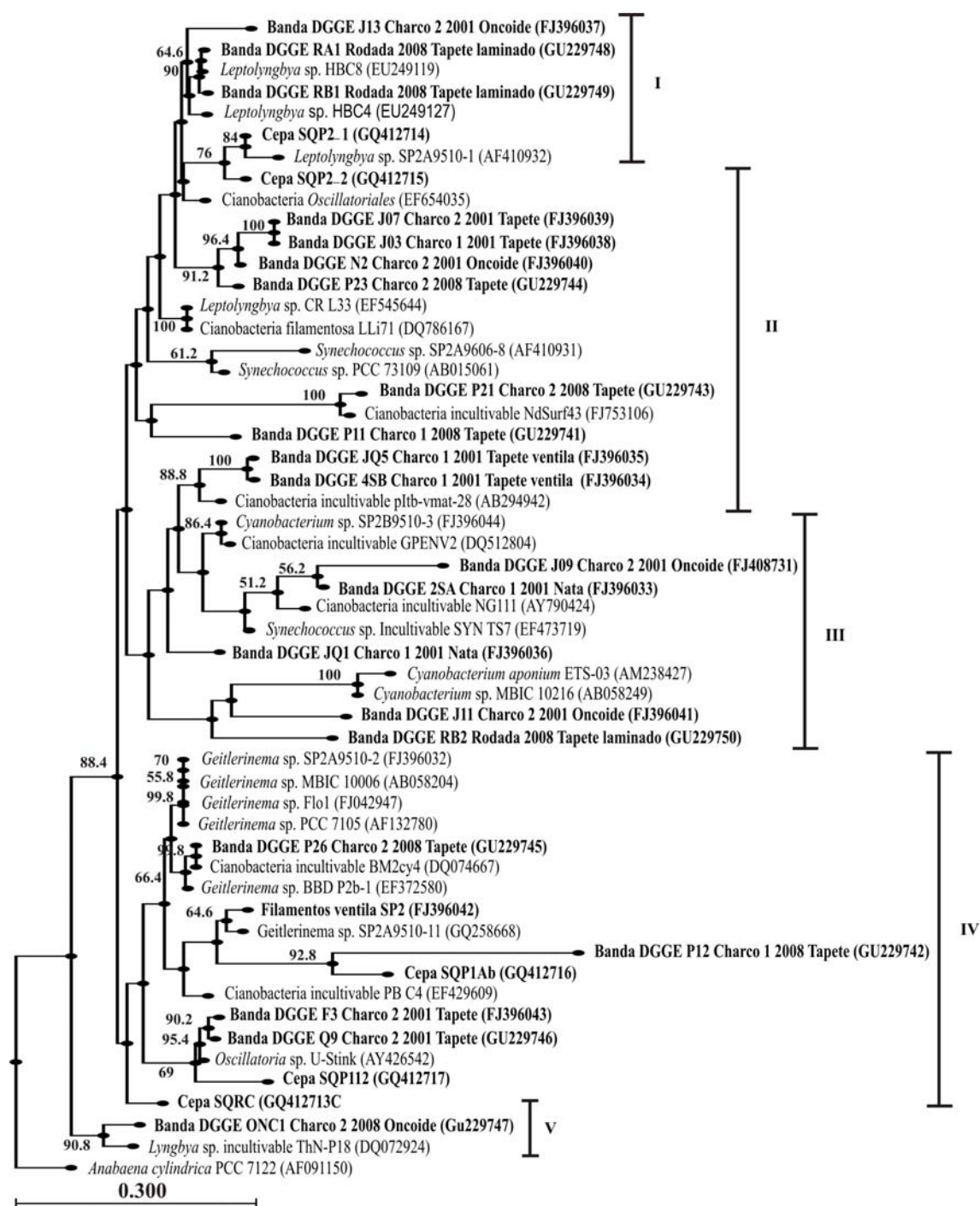


Fig. 8. Árbol filogenético basado en secuencias parciales del gen 16S ARNr de cianobacterias de ~ 250 pb., obtenidas a partir de cultivos monocianobacterianos, bandas de DGGE (nombres resaltados), y secuencias de GenBank. La construcción del árbol fue hecha con el algoritmo “neighbor joining” en el programa CLC v5.5. Los números en los nodos representan los valores de “bootstrap” con 500 réplicas. *Anabaena cylindrica* fue usada como “outgroup”. La barra de escala corresponde a 30 cambios por cada 100 posiciones.

Finalmente, el tercer árbol, que incluyó únicamente secuencias de 300 a 415 pares de bases, para verificar la robustez del segundo árbol, permitió reconocer tres grupos principales. El primer y más grande grupo (Fig. 9, I) estuvo compuesto por secuencias del tipo *Geitlerinema*, el segundo grupo (Fig. 9, II) fue representado por secuencias del género *Leptolyngbya*, y finalmente un pequeño tercer grupo (Fig. 9, III) compuesto por secuencias de cianobacterias no cultivables, que está claramente menos relacionado con los otros dos grupos (Fig. 9).



Fig. 9. Árbol filogenético basado en secuencias parciales del gen 16S ARNr de cianobacterias de 300 – 415 pb., obtenidas a partir de cultivos monocianobacterianos y a partir de bandas de DGGE (nombres resaltados). La construcción del árbol fue hecha con el algoritmo “neighbor joining” en el programa CLC v5.5. Los números en los nodos representan los valores de “bootstrap” con 500 réplicas. *Anabaena cylindrica* fue usada como “outgroup”. La barra de escala corresponde a 30 cambios por cada 100 posiciones.

7. DISCUSIÓN

7.1 Análisis de comunidades cianobacterianas

En estudios de comunidades microbianas, la cantidad de morfotipos o genotipos detectados tiene una relación directamente proporcional con el esfuerzo de muestreo, hasta que todas las especies son detectadas. Las relaciones entre el número de especies observadas y el esfuerzo de muestreo, proporcionan información acerca de la diversidad total de la comunidad muestreada. Por tanto, es recomendable el uso de datos de varios muestreos, como en el presente estudio, para poder obtener una mejor comprensión acerca de la composición real de las comunidades microbianas (Hughes *et al.*, 2001). Por otra parte, la diversidad actual de especies en una localidad específica está determinada por el tamaño del área y por la resolución taxonómica (número de grupos biológicos a estudiar) elegida por el investigador (McArthur, 2006). Así, el estudio de comunidades de un grupo específico, como es el caso de cianobacterias en este trabajo, en un área pequeña como son los manantiales hidrotermales intermareales de Bahía Concepción, proporciona información más específica de gran utilidad para la comprensión de un ecosistema raro en la naturaleza.

La comprensión de la función de algún grupo de cianobacterias en particular en el ambiente, requiere que primero sea identificada taxonómicamente de manera adecuada, sin embargo, es sabido que la identificación en el campo de poblaciones dentro de las cianobacterias tiene grandes dificultades. La aproximación bacteriológica para la clasificación de cianobacterias, basada en el estudio de cepas axénicas en cultivo, es

insuficiente para el uso en estudios actuales de ecología microbiana, porque el número de cepas estudiadas es bastante restringido. Por otra parte, la aproximación botánica tradicional hace identificación a nivel de especie en la mayoría de los casos, sin embargo, debido a que esta identificación está basada en criterios morfológicos únicamente, los morfotipos pueden o no corresponder a taxa coherentes filogenéticamente (García-Pichel *et al.*, 1996). Por ello, la asignación de nombres taxonómicos en el presente estudio, se realizó de acuerdo a sistemas de clasificaciones botánicas y bacteriológicas.

Estudios de ecología microbiana molecular han mejorado considerablemente nuestra capacidad para detectar e identificar organismos en la naturaleza (Amman *et al.*, 1995). Además, se ha reconocido la necesidad del uso de herramientas moleculares para estudiar la relación genotípica de cianobacterias; para la reconstrucción de su evolución, y para mejorar su taxonomía (Wilmotte, 1994), por eso, en el presente estudio se utilizaron herramientas moleculares, que junto con análisis microscópicos de muestras naturales y con la recuperación de cultivos monocianobacterianos aislados de la localidad, complementan trabajos previos (López-Cortés, 1999; López-Cortés *et al.*, 2001).

La extrapolación de los resultados de los experimentos basados en cultivos monocianobacterianos a las condiciones ambientales ha permitido comprender importantes aspectos ecológicos. Esta extrapolación, asume que los cultivos usados son representativos de las poblaciones naturales. Sin embargo, un posible problema es la incorrecta identificación de las cepas cultivadas. Para más del 50% de las cepas de

colección, los nombres taxonómicos asignados no corresponden con la descripción morfológica del taxón (Tauton *et al.*, 2003). Además, análisis comparativos de secuencias del gen 16S rARN derivadas de DNA cianobacteriano ambiental han demostrado que las cepas de cianobacterias mantenidas en cultivo, por lo general, no son representativas de aquellas encontradas en su hábitat natural (Ferris *et al.*, 1996). En el presente estudio, en algunos casos, las secuencias obtenidas a partir de cultivos monocianobacterianos presentaron mayor similitud con secuencias depositadas previamente en GenBank de morfotipos relacionados genéticamente pero con una morfología distinta a la que se detectó por microscopía. Un ejemplo fue la cepa SQP1Ab que había sido identificada como un cultivo monocianobacteriano del género *Oscillatoria*, pero su secuencia tuvo una identidad del 99% con *Geitlerinema*. Por lo tanto, es necesario generar secuencias de mayor tamaño para corroborar esta discrepancia.

García-Pichel *et al.*, 1996 señalaron que la diversidad genotípica de cianobacterias y la diversidad inferida por medio de la identificación de morfotipos puede o no coincidir, dependiendo del caso específico analizado. En este estudio, los morfotipos detectados a través de microscopía y por la recuperación de cultivos monocianobacterianos, fueron también detectados a través de secuencias ambientales. Sin embargo, la diversidad genotípica detectada siempre fue mayor que la diversidad de morfotipos.

La revolución genómica actual (entendida como el desarrollo de tecnologías de secuenciación de genomas completos, pirosecuenciación) le ha dado un nuevo sentido al análisis de la ecología microbiana, ya que al conocer el total de los genes contenidos

dentro del genoma de una especie, es posible resolver incógnitas fisiológicas y ecológicas de ciertos organismos e inferir las necesidades de crecimiento de otros nuevos (Bonilla *et al.*, 2008). Por tanto, esta aproximación puede ser de gran ayuda en estudios posteriores con este tipo de ambientes hidrotermales intermareales.

7.2 Variaciones en parámetros fisicoquímicos y macroestructuras microbianas

Canet *et al.* (2005b) encontraron, al igual que en este estudio, variaciones temporales y espaciales con respecto a la temperatura de ambos charcos termales, contrario a la salinidad y pH donde solo diferencias mínimas fueron detectadas. (Tabla I). Además, el baño recreativo en charcas hidrotermales intermareales, acompañado de disturbios ambientales causados por actividad humana, han sido detectados en este tipo de ambientes (Olafsson *et al.*, 1996). Por ello, este tipo de actividades pueden ser causantes de los notables daños físicos y de la desaparición de macroestructuras microbianas en la playa Santispac en el 2008 con respecto a aquellas detectadas en 2001. Sin embargo, observaciones recientes (Octubre de 2009) de la localidad, indicaron la presencia nuevamente de ventilas y de columnas de filamentos en el Charco 2, por lo tanto es probable que la misma localidad por si misma presente variaciones temporales, por lo que se sugiere realizar un continuo monitoreo de la localidad con el objetivo de comprender mejor este tipo de ambientes.

Roy (1992) y Canet *et al.* (2005b) señalan que los depósitos contemporáneos de manganeso ocurren predominantemente en áreas marinas de profundidad en lugar de los dominios de agua poco profundos (someros), por lo tanto el biotopo presentado en este

trabajo representa un ejemplo extraño de un depósito de manganeso formado en un ambiente hidrotermal intermareal. La concentración de manganeso en solución y su depositación está controlada por procesos de reducción en una variedad de ambientes geológicos y geoquímicos antiguos y recientes. La participación biológica, directa o indirectamente controla la depositación de manganeso. Depósitos similares antiguos parecen haber ocurrido en márgenes de cuenca poco profundos (Roy, 1992). Los ensamblajes minerales y la textura de los nódulos de manganeso que se desarrollan en los manantiales hidrotermales intermareales de la playa Santispac, sugieren la mediación microbiana por depositación.

7.3 Diversidad de morfotipos de cianobacterias

De los 11 morfotipos de cianobacterias que han sido detectados en manantiales hidrotermales intermareales en trabajos previos por López-Cortés (1999), Hobel *et al.* (2005) y Jing *et al.* (2006), los géneros *Aphanothece*, *Gloeocapsa*, *Chroococoidiopsis*, *Chlorogloeopsis* y *Fischerella*, no fueron detectados en el presente estudio. Sin embargo, este es el primer estudio donde se reportan los género *Cyanobacterium*, *Gloeothece* y *Lyngbya*, para un manantial intermareal hidrotermal bajo la influencia de agua de mar. Además, de los 11 morfotipos detectados en este trabajo, *Microcoleus* fue detectado en muestras de la planicie hipersalina intermareal denominada la Rodada, pero no en los manantiales hidrotermales. Lo anterior concuerda con los estudios de Prufert-Bebout y García-Pichel (1994) y de García-Pichel *et al.* (1996), quienes mencionan que *Microcoleus* es una cianobacteria filamentosa que forma grandes paquetes de tricomas estrechamente entrelazados en una vaina común, por lo que este

organismo es un conspicuo morfotipo fácilmente identificable, que es un constituyente dominante dentro de tapetes microbianos laminados en ambientes marinos intermareales e hipersalinos en varias partes del mundo, por lo cual este morfotipo ha sido objeto de mucha atención. Sin embargo, *Microcoelus* nunca ha sido detectado en ambientes hidrotermales como los de la playa Santispac.

El morfotipo *Gloeothece*, únicamente fue detectado por microscopía de contraste de fases para las muestras de la Rodada, sin embargo, a través de la técnica de RDL-microarreglos pudo ser detectado en ambos manantiales, con lo cual se corrobora la complementariedad de las técnicas y la importancia de realizar estudios polifásicos.

7.4 Índices de diversidad

Los índices de diversidad originalmente creados para macroorganismos, son frecuentemente utilizados en datos de perfiles de comunidades microbianas (Kent y Triplett, 2002), incluyendo datos generados a través de DGGE (Fromin *et al.*, 2002), sin embargo, en ocasiones el uso de estos índices de diversidad para microorganismos es debatido por algunos ecólogos, debido a que el concepto de diversidad está embebido en un gran cuerpo de teorías ecológicas (Loreau *et al.*, 2001). A pesar de lo anterior, en este estudio se decidió utilizar el índice de diversidad H' debido a que creemos que es una buena herramienta para poder hacer comparaciones entre muestras de diferentes macroestructuras y de diferentes años.

De todas las macroestructuras detectadas en los manantiales hidrotermales en los dos años de muestreo, las muestras de tapete microbiano en los manantiales hidrotermales y la muestra de tapete laminado de la Rodada, presentaron los valores más altos de diversidad Shannon-Weaver. Sin embargo, se tiene que tomar en cuenta que los métodos de análisis de diversidad, usando estrategias basadas en la obtención de secuencias de muestras ambientales, son altamente dependientes de la distribución espacial y de la ocurrencia temporal de poblaciones específicas, así como de la cantidad, calidad y composición del ADN recuperado a partir de muestras naturales (Hobel *et al.*, 2005).

En el Charco 1, los mayores valores de diversidad (H') y de uniformidad (e) fueron obtenidos para la muestra de tapete microbiano de 2001 con valores de 1,83 y 2,17 respectivamente, pero cabe mencionar que la muestra de tapete microbiano de 2008 presentó valores muy similares ($H' = 1,68$; $e = 2,16$), por lo que se puede especular que no hubo diferencias significativas en la diversidad de cianobacterias de estas macroestructuras. Sin embargo, en 2008 no fueron detectadas otras macroestructuras como tapetes microbianos desarrollándose en las aberturas hidrotermales, ni columnas de filamentos, por tanto, de manera general para el Charco 1 sí hubo una disminución considerable en la diversidad de cianobacterias detectadas en un periodo de siete años.

En el Charco 2 se detectaron las mismas macroestructuras en los dos años de muestreo, lo cual indica que las comunidades de cianobacterias desarrollándose en ese sitio son más estables que las del Charco 1. Sin embargo los valores obtenidos de H' y e , reflejaron algunos cambios temporales en las comunidades de cianobacterias de este

manantial. Respecto a los tapetes microbianos, se detectó un gran incremento en la diversidad en el año 2008, ya que el valor de H' aumentó de 0,8 a 2,25. Caso contrario, en las biopelículas de los oncoides, se presentó una considerable disminución en el valor de H' , ya que solamente se detectó una banda en el perfil de DGGE de la muestra de 2008, por lo que fue imposible calcular su índice de diversidad (Tabla VII). En este manantial, el mayor índice de uniformidad (2,26) fue detectado para la muestra de biopelícula Oncoides de 2001, lo cual no concuerda con el mayor valor de H' (2,25) detectado en la muestra de tapete de 2008. Según Atlas y Bartha, 2002, ese fenómeno puede reflejar una dominancia de ciertos grupos de cianobacterias en la muestra con mayor índice de diversidad, pero con bajo valor de uniformidad, lo cual se pudo verificar con la detección de tres bandas de DGGE muy intensas del perfil de la muestra de tapete de 2008 (Fig. 6A, bandas P21, P23 y P26).

Los valores de H' y e calculados para la muestra de tapete laminado de la Rodada de 2008, fueron similares ($H = 1,99$; $e = 1,99$) a los valores máximos obtenidos para los manantiales. Además, la mayoría de los morfotipos que fueron detectados en ese lugar, también fueron detectados en los manantiales hidrotermales. Por lo tanto y contrario a lo expresado por Skirnisdottir *et al.* (2000), se puede inferir que las diferencias de los parámetros ambientales de temperatura y salinidad detectadas entre la Rodada y los manantiales hidrotermales (menor temperatura y mayor salinidad en la Rodada) en general, no tienen un efecto en la diversidad y composición de las comunidades de cianobacterias que se desarrollan tanto en manantiales hidrotermales intermareales como en aquellas comunidades de la planicie rica en minerales evaporíticos (RODADA) (Tabla I, III y VII).

En el estudio realizado por Jing *et al.*, (2006) se menciona que (1) los mayores índices de diversidad de cianobacterias (1,29) de manantiales geotérmicos intermareales tropicales, inferidos a través de secuencias derivadas de librerías de clones, fueron obtenidos de muestras de charcos que no presentan inundación de agua de mar debido a que se encuentran por encima de la marca de agua de las mareas altas, (2) que los charcos que se encuentran en la zona intermareal fueron los que presentaron menores índices de diversidad (0,54), y se lo atribuyen a las condiciones fluctuantes causadas por la inundación periódica de agua de mar, en vez de las condiciones fisicoquímicas por si mismas, y (3) que todos los filotipos de cianobacterias que obtuvieron presentaron alta afinidad filogenética con contrapartes termófilos terrestres en lugar de taxas marinos.

En el presente trabajo, la inundación de agua de mar en los manantiales hidrotermales intermareales, no fue un factor importante, ya que los dos charcos están aproximadamente al mismo nivel con respecto al nivel de marea. Otra diferencia con el trabajo de Jing *et al.* (2006), es que los valores obtenidos en este trabajo son mayores (0,75 a 2,25), y las secuencias obtenidas a partir de bandas de DGGE y de cultivos, cazan mayoritariamente con secuencias de afiliaciones marinas y de manantiales termales. Por tanto, se puede sugerir que la diversidad y composición de comunidades cianobacterianas de manantiales hidrotermales intermareales en Bahía Concepción presentan diferencias en comparación con los manantiales geotérmicos intermareales presentes en Bicol, Pasacau, Filipinas.

7.5 Electroforesis de geles con gradiente desnaturalizante y obtención de secuencias

Como todos los métodos usados para estudiar microorganismos en la naturaleza, DGGE también presenta limitaciones, obviamente, existen varias posibles razones por las que algunas poblaciones pueden ser no detectadas, y los datos de secuencias limitadas no permiten una robusta evaluación de las relaciones filogenéticas de los tipos de secuencias detectados. Sin embargo, DGGE ofrece un medio rápido para la detección de poblaciones dominantes que pueden ser amplificadas por PCR, y el sesgo que puede ser causado mediante el proceso de clonación (Rayney *et al.*, 1994), es eliminado con la secuenciación directa de las bandas de DGGE. Además, como en el DGGE la separación de las diferentes secuencias se logra a través de electroforesis, la laboriosa detección necesitada por la redundancia de clones en una librería, es también eliminada. Así, el incremento en el número de muestras que pueden ser evaluadas y la capacidad de detectar simultáneamente varias poblaciones con el DGGE, permite generar una mejor comprensión de la ecología de bacterias nativas (Ferris *et al.*, 1996).

Con este trabajo, encontramos que la identificación de las bandas de DGGE a través de su secuenciación es un paso esencial, ya que algunas secuencias que se sabe que migran a cierto nivel dentro del gel (por secuencias de referencia, estándar), pueden migrar diferente y empatar con otras secuencias. Un ejemplo fue la banda J13 de las muestras de 2001 (Fig. 5A), que migró a la misma posición que la banda de referencia de *S. elongatus*, sin embargo, cuando obtuvimos su secuencia, ésta tuvo 98% de similitud con *L. themalis* (Fig. 5; Tabla V). Por tanto, hasta que la secuencia de la banda sea verificada, su posición dentro del gel por sí sola no es un medio confiable para su

identificación. Gradientes más estrechos, geles más largos, o productos de PCR de diferente región del gen 16S rARN pueden proporcionar un mecanismo con el cual este problema sea disminuido (Ferris *et al.*, 1996).

Otro problema generado a partir de la secuenciación de bandas de DGGE de fragmentos cortos (400 pares de bases) es que, en muchos casos, estas secuencias presentan similitud con secuencias previamente depositadas en GenBank de bacterias o cianobacterias no cultivables. Por ello, nuestra comprensión de la composición de la comunidad de cianobacterias en este estudio, detectada únicamente por secuenciación de bandas de DGGE, estuvo reducida a la identificación de siete filotipos: (*Cyanobacterium*, *Cyanothece*, *Synechococcus*, *Geitlerinema*, *Leptolyngbya*, *Lyngbya* y *Oscillatoria*) de los 11 morfotipos que fueron detectados a través de microscopía, cultivos y microarreglos. Sin embargo, sería de gran utilidad generar secuencias de mayor longitud para poder tener mayor información acerca de su identidad, ya que Tarasov *et al.* (2005) mencionan que dentro de los manantiales hidrotermales someros han sido detectadas algunas especies endémicas, por lo que aquellas secuencias que hasta este momento presentan bajos valores de similitud con secuencias previamente depositadas en GenBank podrían ser casos potenciales de endemismos dentro de un ambiente extraño en la naturaleza como es el caso de Santispac, Bahía Concepción.

7.6 Filogenia

Los análisis filogenéticos realizados en este estudio fueron usados para resolver identidades y establecer relaciones, entre secuencias obtenidas a partir de cultivos y de

bandas de DGGE, con secuencias representativas depositadas previamente en GenBank. El patrón de ramificación de los árboles generalmente presentaron altos niveles de soporte con bajos valores de bootstrap, lo cual refleja que existen ambigüedades recientes en la taxonomía de cianobacterias, pero también puede reflejar una limitación en cuanto a la longitud de las secuencias para el análisis filogenético (Jing *et al.*, 2005). Ejemplos de lo anterior se pudieron detectar dentro de la segunda agrupación de segundo árbol filogenético (Fig. 8, II), donde secuencias de cianobacterias unicelulares del género *Synechococcus* (SP2A9606-8, PCC73109) fueron altamente relacionadas con secuencias de cianobacterias filamentosas del tipo *Oscillatoriales* y con secuencias de cianobacterias no cultivables. Otro ejemplo se encontró dentro del tercer grupo, del mismo árbol (Fig. 8, III), que estuvo compuesto por secuencias de cianobacterias unicelulares del tipo *Cyanobacterium*, *Cyanothece* y *Synechococcus*, pero dentro de ellas se ubicó una secuencia obtenida a partir de una banda de DGGE (J11) que tuvo similitud con una secuencia de la cianobacteria filamentososa del género *Leptolyngbya*. Además, otro caso similar fue detectado con la secuencia de la banda de DGGE P12, que en GenBank fue similar una secuencia de cianobacteria del género *Lyngbya*, sin embargo, en ese árbol filogenético se ubicó ligeramente relacionada con secuencias del género *Geitlerniema*, pero muy alejada de las otras secuencias de su mismo género (Fig. 8).

Un ejemplo muy claro de que los árboles filogenéticos sirven para establecer relaciones y resolver identidades, se presentó con el caso de la secuencia de la banda de DGGE F3, la cual cazó en GenBank con una cianobacteria filamentososa del tipo *Oscillatoria*, sin embargo, dentro del segundo árbol (Fig. 8), estuvo altamente relacionada con

secuencias del tipo *Geitlerinema*, por lo que se puede sugerir una alta relación de parentesco entre secuencias de esos dos géneros de cianobacterias, que concuerda con la incongruencia que fue detectada entre la morfología y la secuencia obtenida de la cepa SQP1Ab, mencionada anteriormente.

El primer árbol (Fig. 7), permitió reflexionar que nuestra capacidad en la recuperación de secuencias de cianobacterias unicelulares está limitada. Además, arrojó que la secuencia obtenida a partir de la banda RB2, que se asemejó a secuencias del tipo *Cyanothece* (unicelular), presenta una alta relación filogenética con secuencias de cianobacterias filamentosas del tipo *Geitlerinema*. La secuencia de la banda ONC 1 que fue relacionada con secuencias del género *Lyngbya*, fue la secuencia que menor relación presentó con los demás grupos, por lo que demuestra sus grandes diferencias morfológicas que presenta con respecto a los demás. Finalmente, el tercer árbol (Fig. 9) presentó una mayor robustez que el segundo, por la longitud de las secuencias, y nos permitió detectar dos grandes diferencias con respecto a los anteriores árboles. La primera fue que el pequeño grupo de las secuencias de *Lyngbya*, si presenta relaciones con el grupo de *Geitlerinema*, lo cual no había podido ser detectado con los dos árboles previos. Y la segunda fue que el grupo de cianobacterias no cultivables está muy bien agrupado y separado de los otros grupos, lo cual habla de la complejidad de este grupo de organismos.

8. CONCLUSIONES

Diferencias en la composición de la comunidad de cianobacterias, de macroestructuras microbianas que se desarrollan en manantiales hidrotermales someros de la Playa Santispac, Bahía Concepción, fueron detectadas. Nódulos de manganeso fueron observados únicamente en el Charco 2, lo cual expresa diferencias importantes de un manantial a otro. La cantidad y tipo de macroestructuras, así como el número de ventilas que fueron detectadas para cada charco en los diferentes años de muestreo, fueron variables, lo cual corrobora la naturaleza extraña de estos ambientes. En un periodo de siete años, el Charco 1 presentó una disminución considerable en la diversidad de cianobacterias, sin embargo, el Charco 2, presentó una mayor estabilidad en la comunidad de cianobacterias, y grupos dominantes fueron detectados para este manantial.

El presente estudio contribuyó con el conocimiento de la diversidad de cianobacterias en manantiales hidrotermales intermareales, con la detección de los géneros *Cyanobacterium*, *Gloeotheca* y *Lyngbya*, por primera vez en este tipo de ambientes. Además, este estudio contribuyó para la comprensión de sistemas hidrotermales, que actualmente tienen alto valor científico, por los hallazgos que se han detectado en otros planetas. Por lo tanto, se corrobora la importancia de tener un monitoreo de estas localidades con gran valor ecológico y potencialmente biotecnológico, que son afectadas directamente por actividad humana. Además, la obtención de secuencias con valores de similitud menores al 97%, así como la identificación de características morfológicas distintivas, pueden sugerir la posibilidad de la existencia de nuevos

microorganismos endémicos de la región, confiriéndole mayor valor ecológico a este ambiente particular, donde se desarrollan nódulos de manganeso en una zona intermareal, dentro de la península de Baja California, que contribuirá para la valoración de sus recursos naturales.

Este es el primer trabajo donde se ha realizado una comparación de la composición de la comunidad cianobacteriana entre manantiales hidrotermales intermareales y un ambiente hipersalino asociado a ellos. Los resultados obtenidos arrojaron que la mayoría de las cianobacterias detectadas en este estudio, tienen la capacidad de desarrollarse en los dos tipos de ambientes, donde existe un rango de diferencia de aproximadamente 20 grados de temperatura y el doble de salinidad, por lo tanto, se corroboró la capacidad de tolerancia a condiciones extremas por parte de estos microorganismos. Por sus características especiales, este tipo de microorganismos pueden ser considerados para la búsqueda de enzimas o bioproductos de interés para la humanidad.

9. LITERATURA CITADA

- Abrams ES and StantonVP (1992) Use of denaturing gradient gel electrophoresis to study conformational transitions in nucleic acids. *Methods Enzymol.* 212:71–104
- Alfonso P, Prol-Ledesma RM, Canet C, Melgarejo JC, Fallick AE (2005) Isotopic evidence for biogenic precipitation as a principal mineralization process in coastal gasohydrothermal vents, Punta Mita, Mexico. *Chem Geol* 224:113-121
- Allen CC, Oehler EZ (2008) A Case for Ancient Springs in Arabia Terra, Mars. *Astrobiology* 8(6):1093-1112
- Altschul SF, Gish W, Miller W, Myers EW, Lipman DJ (1990) Basic local alignment search tool. *J Mol Biol* 215:403-410
- Amman RI, Ludwig W, Schleifer K-H (1995) Phylogenetic identification and in situ detection of individual microbial cells without cultivation. *Microbiol Rev* 59:143-169
- Anagnostidis K, Komarek J (1988) Modern approach to the classification system of cyanophytes. 3. Oscillatoriales. *Arch Hydrobiol* 80:327-472

Anagnostidis K, Pantazidou A (1988) Endolithic cyanophytes from the saline thermal springs of Aedipsos, Hellas (Greece). Arch Hydrobiol 80:555-559

Anagnostidis K, Pantazidou A (1988) Endolithic cyanophytes from the saline thermal springs of Aedipsos, Hellas (Greece). Arch Hydrobiol 80:555-559

Anderson TF (1956) Electron microscopy of microorganisms. Phys Tech Biol Res 3:78-181

Atlas RM, Bartha R (1998) Ecología Microbiana y Microbiología Ambiental. Addison Wesley. España. 677 pp

Belkin S, Jannasch HW (1989) Microbial mats at deep-sea hydrothermal vents: New Observations. In: Cohen Y, Rosenberg E (eds) Microbial Mats, Am Soc Microbiol, Washington DC, pp 16-21

Benjamínsson J (1988) Jarðhiti í sjó og flaedamáli við Ísland: Natturufraedingurinn, 58: 153-169

Bonilla-Rosso G, Souza V, Eguiarte LE (2008) Metagenómica, Genómica y Ecología Molecular: La Nueva Ecología en el Bicentenario de Darwin. Revista Especializada en Ciencias Químico-Biológicas 11(1) 41-51

- Camprubí A, Canet C, Rodríguez-Díaz AA, Prol-Ledesma RM, Villanueva-Estrada RE (2007) Geology, ore deposits, and hydrothermal venting in Bahía Concepción, Baja California Sur, Mexico. *Island Arc* 17(1):6-25
- Canet C y Prol-Ledesma RM (2006) Procesos de mineralización en manantiales hidrotermales submarinos someros. *Boletín de la Sociedad Geológica Mexicana* LVII (1) 83-102
- Canet C, Prol-Ledesma RM, Proenza J, Rubio-Ramos M A, Forrest M, Torres-Vera MA, Rodríguez-Díaz AA, (2005b) Mn-Ba-Hg Mineralization at shallow submarine hydrothermal vents in Bahía Concepción, Baja California Sur, Mexico. *Chemical Geology*, 224: 96-112
- Canet C, Prol-Ledesma RM, Torres-Alvarado I, Gilg HA, Villanueva RE, Lozano-Santa Cruz R (2005a) Silica-carbonate stromatolites related to coastal hydrothermal venting in Bahía Concepción, Baja California Sur, Mexico. *Sedimentary Geology* 174: 97-113
- Canet C, Prol-Ledesma, RM, Melgarejo JC, Reyes A, (2003) Methane-related carbonates formed at submarine hydrothermal springs: a new setting for microbially-derived carbonates? *Marine Geology* 199: 245-261

- Cardigos F, Colaço A, Dando PR, Ávila SP, Sarradin PM, Tempera F, Conceição P, Pascoal A, Serrão Santos R (2005) Shallow wáter hydrothermal vent field fluids and communities of the D. João de Castro Seamount (Azores). *Chemical Geology* 224: 153-168
- Castenholz R W (2001). Phylum BX. Cyanobacteria. Oxygenic photosynthetic bacteria p. 473–599. *In* D. R. Boone and R. W. Castenholz (ed.), *Bergey's manual of systematic bacteriology*, vol. 1. Springer-Verlag, New York NY
- Castenholz RW (2001) Oxygenic photosynthetic bacteria. *In*: Garrity, G.M. (Ed) *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, 2nd edition, vol. 1, Springer Press, New York, pp 473-599
- Castiglioni B, Rizzi E, Frosini A, Sivonen K, Rajaniemi P, Rantala A, Mugnai MA, Ventura S, Wilmotte A, Boutte C, Grubisic S, Balthasart P, Consolandi C, Bordoni R, Mezzelani A, Battaglia C, De Bellis G (2004) Development of a Universal Microarray Based on the Ligation Detection Reaction and 16S rRNA Gene Polymorphism To Target Diversity of Cyanobacteria. *App Environ Microbiol* 70(12):7161-7172
- Chen AC, Zhigang Z, Fu-Wen K, Tsanyao FY, Bing-Jye W, Yueh-Yuan T (2005) Tide-infl uenced Acidic Hydrothermal System off Taiwan. *Chemical Geology* 224: 69-81

- Chesson P (1994) Multispecies competition in variable environments. *Theor Pop Biol* 45:227-273
- Dando P, Stüben D, Varnavas SP (1999) Hydrothermalism in the Mediterranean Sea. *Prog Oceanogra* 44:333-367
- Dando PR, Leahy Y (1993) Hydrothermal activity off Milos, Hellenic Volcanic Arc. *BRIDGE Newsletter* 5: 20-21
- Fan D, Ye J, Li J (1999) Geology, mineralogy, and geochemistry of the Middle Proterozoic Wafangzi ferromanganese deposit, Liaoning Province, China. *Ore Geology Reviews* 15: 31-53
- Ferguson J, Lambert IB (1972) Volcanic exhalations and metal enrichments at Matupi Harbour, New Britain, T.P.N.G. *Economic Geology* 67: 25-37
- Ferris MJ, Muyzer G, and Ward D M (1996) Denaturing gradient gel electrophoresis profiles of 16S rRNA-defined populations inhabiting a hot spring microbial mat community. *Appl. Environ. Microbiol* 62:340–346
- Fitzsimons MF, Dando PR, Hughes JA, Thiermann F, Akoumianaki I, Pratt SM (1997) Submarine hydrothermal brine seeps off Milos, Greece, Observations and geochemistry. *Marine Chemistry* 57: 325-340

- Fricke H, Giere O, Stetter K, Alfredsson GA, Kristjansson JK, Stoffers P, Svavarsson J (1989) Hydrothermal vent communities at the shallow subpolar Mid-Atlantic Ridge. *Marine Biology* 102: 425-429
- Fromin N, Hamelin J, Tarnawski S, Roesti D, Jourdain-Miserez K, Forestier N, Teyssier-Cuvette S, Gillet F, Aragno M, and Rossi P (2002) Statistical analysis of denaturing gel electrophoresis (DGE) fingerprinting patterns. *Environ Microbiol* 4:634-643
- Garcia-Pichel F, Prufert-Bebout L, Muyzer G (1996) Phenotypic and phylogenetic analyses show *Microcoleus chthonoplastes* to be a cosmopolitan cyanobacterium. *Appl Environ Microbiol* 62:3284–3291
- Geitler L (1932) Cyanophyceae. Rabenhorsts Kryptogamenflora von Deutschland, Osterreich und der Schweiz. Akademische Verlag, Leipzig, Germany
- Geptner A, Kristmannsdóttir H, Kristiansson J, Marteinson V (2002) Biogenic saponite from an active submarine hot spring, Iceland. *Clay and Clay Minerals* 50: 174-185
- Gerry N P, Witowski N E, Day J, Hammer RP, Barany G and Barany F (1999) Universal DNA microarray method for multiplex detection of low abundance point mutations. *J Mol Biol* 292:251–262

- Giaccone G (1969) Associazioni algali e fenomeni secondari di vulcanismo nelle acque marine di Vulcano (Mar Tirreno). *Giornale Botanico Italiano* 68:353-366
- Hashimoto J, Miura T, Fujikura K, Oosaka J (1993) Discovery of vestimentiferan tube-worms in the euphotic zone. *Zoological Science* 10: 1063-1067
- Heijs SK, Sinninghe-Damsté JS, Forney LJ (2005) Characterization of a deep-sea microbial mat from an active cold seep at the Milano mud volcano in the Eastern Mediterranean Sea. *FEMS Microbiol Ecol* 54:47-56
- Hein JR, Stamatakis MG, Dowling JS (2000) Trace metal-rich Quaternary hydrothermal manganese oxide and barite deposits, Milos Island, Greece. *Transactions of the Institute of Mining and the Metallurgy Section B Applied Earth Sciences* 109: B67- B76
- Hirayama H, Sunamura M, Takai K, Nunoura T, Noguchi T, Oida H, Furushima Y, Yamamoto H, Oomori T, Horikoshi K (2007) Culture-dependent and independent characterization of microbial communities associated with a shallow submarine hydrothermal system occurring within a coral reef off Taketomi Island, Japan. *Appl Environ Microbiol* 73:7642-7656

- Hoaki T, Nishijima M, Miyashita H, Maruyama T (1995) Dense community of hyperthermophilic sulfur dependent heterotrophs in geothermally heated shallow submarine biotope at Kodakara- Jima island, Kagoshima, Japan. *Applied and Environmental Microbiology* 61: 1931-1937
- Hobel CFV, Marteinsson VT, Hreggvidsson GO, Kristjánsson JK (2005) Investigation of the microbial ecology of intertidal hot springs by using diversity analysis of 16S rRNA gene and Chitinase genes. *Appl Environ Microbiol* 71:2771-2776
- Hughes JB, Hellmann JJ, Ricketts TH, Bohannan BJM (2001). Counting the Uncountable: Statistical Approaches to Estimating Microbial Diversity. *Appl Environ Microbiol* 67(10): 4399-4406
- Jach R, Dudek T (2005) Evidence for hydrothermal origin of Toarcian manganese deposits from Krízna unit, Tatra Mountains, Poland. *Chemical Geology* 224: 136-152
- Janse I, Meima M, Cardinal WEA, Zwart G (2003) High-Resolution Differentiation of Cyanobacteria by Using rRNA-Internal Transcribed Spacer Denaturing Gradient Gel Electrophoresis. *Appl Environ Microbiol* 69(11) 6634-6643
- Jing H, Lacap DC, Lau CY, Pointing SB (2006) Community phylogenetic diversity of cyanobacterial mats associated with geothermal springs along a tropical intertidal gradient. *Extremophiles* 10:159-163

Jones B, Renaut RW (1996) Influence of thermophilic bacteria on calcite and silica precipitation in hot springs with water temperatures above 90°C evidence from Kenya and New Zealand. *Canadian Journal of Earth Sciences* 33: 72-83

Jorgensen BB, Boetius A (2007) Feast and famine – microbial life in the deep-sea bed. *Nature Rev Microbiol* 5:770-781

Kamenev GM, Fadeev VI, Selin NI, Tarasov VG (1993) Composition and distribution of macro- and meiobenthos around hydrothermal vents in the Bay of Plenty, New Zealand. *New Zealand Journal Marine and Freshwater Research* 27: 407-418

Kent AG and Triplett EW (2002) Microbial communities and their interactions in soil and rhizosphere ecosystems. *Annu Rev Microbiol* 56: 211–236

Konhauser KO, Phoenix VR, Bottrell SH, Adams DG, Head IM (2001) Microbial-silica interactions in Icelandic hot spring sinter possible analogues for some Precambrian siliceous stromatolites. *Sedimentology* 48: 415-433

Kosman E, Leonard J (2005) Similarity coefficients for molecular markers in studies of genetic relationships between individuals for haploid, diploid, and polyploid species. *Mol Ecol* 14:415-424

- Ledesma-Vázquez J, Johnson ME (2001) Miocene–Pleistocene tectonosedimentary evolution of Bahía Concepción region, Baja California Sur, Mexico. *Sedimentary Geology* 144: 83-96
- Liakopoulos A, Glasby GP, Papavassiliou CT, Boulegue J (2001) Nature and origin of the Vani manganese deposit, Milos, Greece: an overview. *Ore Geology Reviews* 18: 181-209
- López-Cortés A (1999) Marine cyanobacteria from Bahía Concepción, B.C.S., México. In: Charpy L, Larkum AWD (eds) *Marine Cyanobacteria*, Bulletin de l'Institut Océanographique, Monaco. 19:87-94
- López-Cortés A, García-Pichel F, Nübel U, Vázquez-Juárez R (2001) Cyanobacterial Diversity in extreme environments in Baja California, México: A polyphasic study. *Int Microbiol* 4:227-23
- Loreau M, Naeem S, Inchausti P, Bengtsson J, Grime JP, Hector A, Hooper DU, Huston MA, Raffaelli D, Schmid B, Tilman D and Wardle DA (2001) Biodiversity and ecosystem functioning: current knowledge and future challenges. *Science* 294:804–808
- Madigan MT, Martinko JM, Parker J (2000) *Brock Biology of Microorganisms*. 9th edición. Prentice Hall. USA. 991 pp

- Martínez-Frías J (1998) An ancient Ba-Sb-Ag-Fe-Hg-bearing hydrothermal system in SE Spain. *Episodes* 21: 248-251
- Mattison RG, Abbiati M, Dando PR, Fitzsimons MF, Pratt SM, Southward AJ, Southward EC (1998) Chemoautotrophic microbial mats in submarine caves with hydrothermal sulphidic springs at Cape Palinuro, Italy. *Microbial Ecology* 35:58-71
- McArthur JV (2006) *Microbial Ecology An Evolutionary Approach*. Elsevier. USA. 416 pp
- Michard A (1989) Rare earth element systematics in hydrothermal fluids: *Geochimica et Cosmochimica Acta* 53: 745-750
- Morri C, Bianchi CN, Cocito S, Peirano A, De Biasi AM, Aliani S, Pansini M, Boyer M, Ferdeghini F, Pestarino M, Dando P (1999) Biodiversity of marine sessile epifauna at an Aegean island subject to hydrothermal activity: Milos, Eastern Mediterranean Sea. *Marine Biology* 135: 729-739
- Muyzer G, Brinkhoff T, Nübel U, Santegoeds C, Schäfer H, Wawer C (1998) Denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) in microbial ecology. In: Akkermans ADL, van Elsas JD, de Bruijn FJ (eds) *Molecular Microbial Ecology Manual*, Kluwer, The Netherlands pp 1-23

- Muyzer G, de Waal EC, Uitterlinden AG (1993) Profiling of complex microbial population by denaturing gradient gel electrophoresis analysis of polymerase chain reaction-amplified genes coding for 16S rRNA. *Appl Environ Microbiol* 59:695-700
- Naden J, Kiliyas SP, Darbyshire DPF (2005) Active geothermal systems with entrained seawater as modern analogs for transitional volcanichosted massive sulfide and continental magmato-hydrothermal mineralization: The example of Milos Island, Greece. *Geology* 33: 541-544
- Neufeld JD, Mohn WW (2006) Assessment of Microbial Phylogenetic Diversity Based on Environmental Nucleic Acids. In: Stackebrandt, E. (Ed) *Molecular Identification, Systematics, and Population Structure of Prokaryotes*. Springer, Germany pp 219-259
- Nübel U, Garcia-Pichel F, Muyzer G (1997) PCR primers to amplify 16S rRNA genes from cyanobacteria. *Appl Environ Microbiol* 63:3327-3332
- Ólafsson JH, Sigurgeirsson B, Pálsdóttir R (1996) Psoriasis treatment: Bathing in a thermal lagoon combined with UVB, versus UVB treatment only. *Acta Derm Venereol* 76: 228-230
- Palleroni NJ (1997) Prokaryotic diversity and the importance of culturing. *Antonie van Leeuwenhoek* 72:3-19

- Pétursdóttir SK, Kristjánsson JK (1996) The relationships between physical and chemical conditions and low microbial diversity in the Blue Lagoon geothermal lake in Iceland. *FEMS Microbiol Ecol* 19:39-45
- Pichler T, Giggenbach WF, McInnes BIA, Buhl D and Duck B (1999b) Fe sulfide formation due to seawater-gas-sediment interaction in a shallow water hydrothermal system at Lihir Island, Papua New Guinea. *Economic Geology* 94: 281-287
- Pichler T, Veizer J, Hall GEM (1999a) The chemical composition of shallow-water hydrothermal fluids in Tutum Bay, Ambitle Island, Papua New Guinea and their effect on ambient seawater. *Marine Chemistry* 64: 229-252
- Prol-Ledesma R M, Canet C, Melgarejo JC, Tolson G, Rubio- Ramos MA, Cruz-Ocampo JC, Ortega-Osorio A, Torres-Vera MA, Reyes A (2002) Cinnabar deposition in submarine coastal hydrothermal vents, Pacific Margin of central Mexico. *Economic Geology* 97: 1331-1340
- Prol-Ledesma R M, Canet C, Torres-Vera MA, Forrest MJ, Armienta MA (2004) Vent fluid chemistry in Bahía Concepción coastal submarine hydrothermal system, Baja California Sur, Mexico. *Journal of Volcanology and Geothermal Research* 137: 311-328

- Prol-Ledesma RM, Canet C, Torres-Vera MA, Forrest MJ, Armienta MA (2004) Vent fluid chemistry in Bahia Concepcion coastal submarine hydrothermal system, Baja California Sur, Mexico. *J Vulc Geother Res* 137:311-328
- Prol-Ledesma RM, Dando PR, de Ronde CEJ (2005) Special Issue on “Shallow-water Hydrothermal Venting”: *Chemical Geology* 224: 1-4
- Prufert-Bebout L, Garcia-Pichel F (1994) Field and cultivated *Microcoleus chthonoplastes*: the search for clues to its prevalence in marine microbial mats. *NATO ASI Ser G* 35:111–116
- Rainey FA, Ward N, Sly LI, Stackebrandt E (1994) Dependence of the taxonomic composition of clone libraries for PCR-amplified naturally occurring 16S rDNA on the primer pair and the cloning system used. *Experientia* 50:789–801
- Rippka R, Waterbury JB, Stanier RY (1981) Isolation and purification of cyanobacteria: Some general principles. In: Starr MP et al (eds) *The Prokaryotes*, vol. I, Springer-Verlag Press, New York pp 212-223
- Rodríguez-Díaz AA (2004) Caracterización geológica y geoquímica del área mineralizada de manganeso en Bahía Concepción, Baja California: México, D.F. Facultad de Ingeniería, Universidad Nacional Autónoma de México, Tesis de licenciatura 82 p

- Rudi K, Skulberg O M, Skulberg R and Jakobsen K S (2000) Application of sequence-specific labeled 16S rRNA gene oligonucleotide probes for genetic profiling of cyanobacterial abundance and diversity by array hybridization. *Appl Environ Microbiol* 66:4004–4011
- Rusch A, Walpersdorf E, deBeer D, Gurrieri S, Amend JP (2005) Microbial communities near the oxic/anoxic interface in the hydrothermal system of Vulcano Island, Italy. *Chemical Geology* 224: 169-182
- Sambrook J, Russell DW (2001) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. New York, USA: Cold Spring Harbor Laboratory Press
- Sarano P, Murphy RC, Houghton B F, Hedenquist J W (1989) Preliminary observations of submarine geothermal activity in the vicinity of White Island volcano, Taupo Volcanic zone, New Zealand. *Journal of the Royal Society of the New Zealand* 19: 449-459
- Savelli C, Marani M, Gamberi F (1999) Geochemistry of metalliferous, hydrothermal deposits in the Aeolian arc Tyrrhenian Sea. *Journal of Volcanology and Geothermal Research* 88: 305-323
- Sedwick P, Stuben D (1996) Chemistry of shallow submarine warm springs in an arc-volcanic setting: Vulcano Island, Aeolian Archipelago, Italy. *Marine Chemistry* 53: 147-161

- Sheffield VC, Cox DR, Lerman LS and Myers RM (1989) Attachment of a 40-base-pair G + C-rich sequence (GC-clamp) to genomic DNA fragments by the polymerase chain reaction results in improved detection of single-base changes. *Proc Natl Acad Sci USA*. 86:232–236
- Sievert SM, Kuever J, Muyzer G (2000) Identification of 16S ribosomal DNA-defined bacterial populations at a shallow submarine hydrothermal vent near Milos Island (Greece). *Appl Environ Microbiol* 66:3102-3109
- Stein JL (1984) Subtidal gastropods consume sulphur-oxidizing bacteria: Evidence from coastal hydrothermal vents. *Science* 223: 696-698
- Stetter KO, Fiala G, Huber G, Huber R, Seegerer A (1990) Hyperthermophilic microorganisms. *FEMS Microbiology Reviews* 75: 117-124
- Stoffers P, Hannington M, Wright I, Herzig P, De Ronde C, the Shipboard Scientific Party (1999) Elemental mercury at submarine hydrothermal vents in the Bay of Plenty, Taupo volcanic zone, New Zealand. *Geology* 27: 931-934
- Tarasov VG, Gebruk AV, Mironov AN, Moskalev LI (2005) Deepsea and shallow-water hydrothermal vent communities: two different phenomena? *Chemical Geology* 224: 5-39

- Tarasov VG, Gebruk AV, Shulkin VM, Kamenev GM, Fadeev VI, Kosmynin VN, Malakhov VV, Starynin DA, Obzhirov AI (1999) Effect of shallow-water hydrothermal venting on the biota of Matupi Harbor (Rabaul Caldera, New Britain Island, Papua-New Guinea). *Continental Shelf Research* 19: 79-116
- Tarasov VG, Propp MV, Propp LN, Zhirmunsky AV, Namsaraev BB, Gorlenko VM, Starynin DA (1990) Shallow-water gasohydrothermal vents of Ushishir Volcano and the ecosystem of Kraternaya Bight (The Kurile Islands). *Marine Ecology* 11: 1-23
- Tauton A, Grubisic S, Brambilla E, De Wit R, Wilmotte A (2003) Cyanobacterial Diversity in Natural and Artificial Microbial Mats of Lake Fryxell (McMurdo Dry Valleys, Antarctica): a Morphological and Molecular Approach. *Appl Environ Microbiol* 69(9):5157-5169
- Vidal VMV, Vidal FV, Isaacs JD (1978) Coastal submarine hydrothermal activity off northern Baja California. *Journal of Geophysical Research* 83-B: 1757-1774
- Vidal VMV, Vidal FV, Isaacs JD (1981) Coastal submarine hydrothermal activity off northern Baja California 2. Evolutionary history and isotope chemistry: *Journal of Geophysical Research* 86-B: 9451-9468

Walter MR, Des Marais DJ (1993) Preservation of biological information in thermal spring deposits: developing a strategy for the search for fossil life on Mars. *Icarus* 101: 129-143

Ward DM, Castenholz RW (2000) Cyanobacteria in geothermal habitats. In: Whitton and Potts (eds) *The ecology of cyanobacteria. Their diversity in time and space*. Kluwer Academic Publishers, London. pp 37-59

Wilmotte A (1994) Molecular evolution and taxonomy of the cyanobacteria, p. 1–25. *In* D. A. Bryant (ed.), *The molecular biology of cyanobacteria*. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, The Netherlands