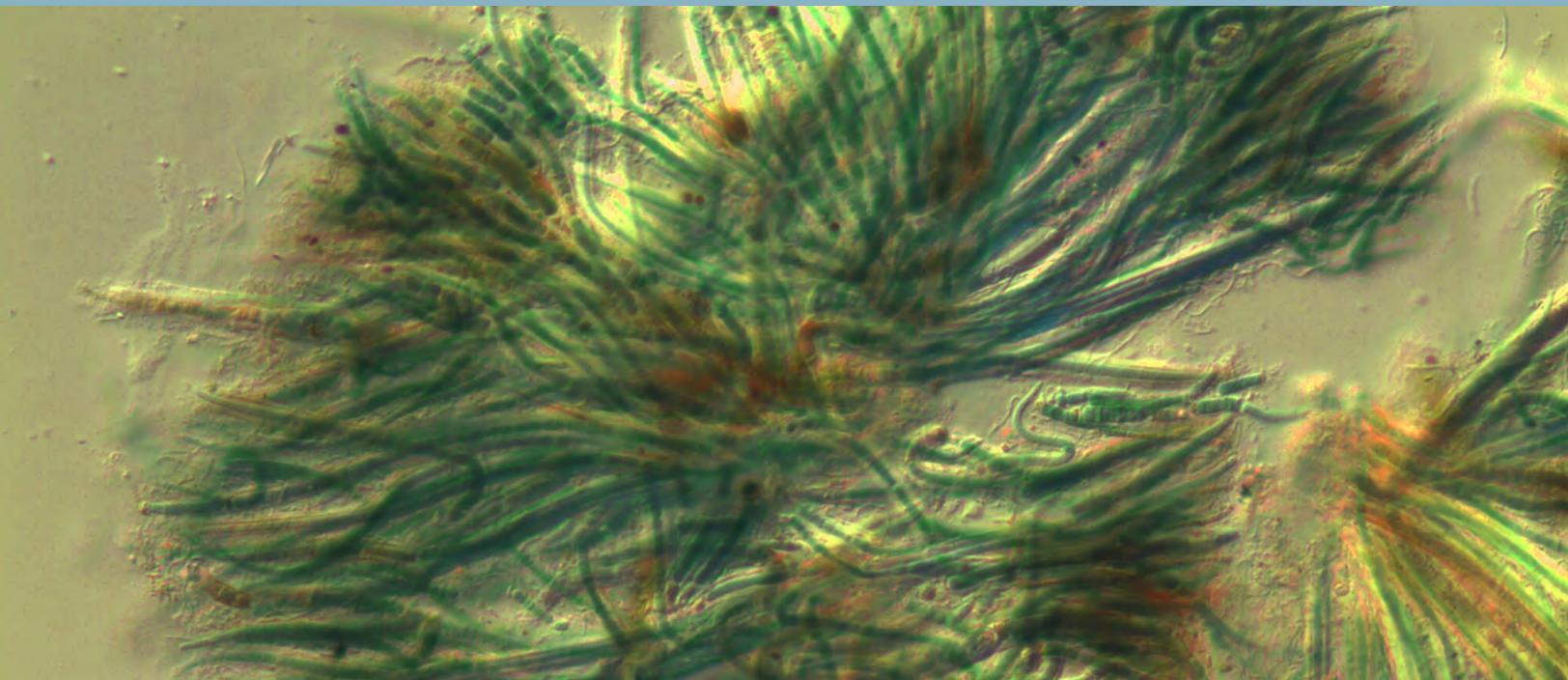


Método aplicado para la observación microscópica  
de algas vivas asociadas a microbialitas



# COMITÉ EDITORIAL

## EDITOR EJECUTIVO:

### Dr. Eberto Novelo

Facultad de Ciencias, Universidad Nacional Autónoma de México  
enm@ciencias.unam.mx

## EDITORES ADJUNTOS:

### Dr. Abel Sentfés

Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa, México  
asg@xanum.uam.mx

### Dr. Juan Manuel Lopez-Bautista

Universidad de Alabama, United States of America  
jlopez@biology.as.ua.edu

## EDITORES ASOCIADOS (COMITÉ EDITORIAL TEMÁTICO)

Florística, Taxonomía, Filogenia y sistemática, Biogeografía y distribución:

### Dr. Erasmo Macaya

Facultad de Ciencias Naturales y Oceanográficas, Universidad de Concepción, Chile  
emacaya@oceanografia.udec.cl

### M. en C. Gloria Garduño Solórzano

Facultad de Estudios Superiores Iztacala, Universidad Nacional Autónoma de México  
ggs@servidor.unam.mx

### Dr. Luis E. Aguilar Rosas

Instituto de Investigaciones Oceanológicas, Universidad Autónoma de Baja California  
aguilarl@uabc.edu.mx

### Dra. Visitación Conforti

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales Universidad de Buenos Aires, Argentina  
conforti@bg.fcen.uba.ar

Biología celular y Bioquímica, Fisiología y Ecofisiología:

### Dr. Pilar Mateo Ortega

Departamento de Biología, Universidad Autónoma de Madrid, España  
pilar.mateo@uam.es

Algas tóxicas y FANs:

### Dra. Marina Aboal Sanjurjo

Facultad de Biología, Universidad de Murcia, España  
maboal@um.es

### Dr. Yuri Okolodkov

Instituto de Ciencias Marinas y Pesquerías, Universidad Veracruzana, México  
yuriokolodkov@yahoo.com

Ecología de poblaciones y comunidades algales :

### Dr. Ligia Collado Vides

School of Environment, Arts and Society, Florida International University, United States of America  
Ligia.ColladoVides@fiu.edu

### Dra. Rosaluz Tavera

Facultad de Ciencias, Universidad Nacional Autónoma de México  
r\_tavera@ciencias.unam.mx

Ficología aplicada y biotecnología:

### Dra. Eugenia J. Olgún Palacios

Instituto de Ecología, Centro CONACYT  
eugenia.olguin@inecol.mx

### Dra. Marcia G. Morales Ibarria

División de Ciencias Naturales e Ingeniería, Universidad Autónoma Metropolitana – Cuajimalpa, México  
mmorales@correo.cua.uam.mx

## CINTILLO LEGAL

Cymbella Revista de investigación y difusión sobre algas. Vol. 2, Núm. 3, septiembre-diciembre de 2016, es una publicación cuatrimestral editada por la Universidad Nacional Autónoma de México, Ciudad Universitaria, Delegación Coyoacán, C.P. 04510, México D.F. a través del Laboratorio de Algas Continentales. Ecología y Taxonomía de la Facultad de Ciencias, Circuito exterior s/n, Ciudad Universitaria, Col. Copilco, Del. Coyoacán, C.P. 04510, Ciudad de México, Tel. (55) 56225430, <http://cymbella.mx/>, [enm@ciencias.unam.mx](mailto:enm@ciencias.unam.mx). Editor responsable: Dr. Eberto Novelo Maldonado. Reserva de Derechos al Uso Exclusivo: 04-2016-112410454200. ISSN: 2448-8100. Responsable de la última actualización de este número, Laboratorio de Algas Continentales. Ecología y Taxonomía de la Facultad de Ciencias, Dr. Eberto Novelo Maldonado, Circuito exterior s/n, Ciudad Universitaria, Col. Copilco, Del. Coyoacán, C.P. 04510, Ciudad de México, fecha de la última modificación, 29 de junio de 2017.

Los artículos firmados son responsabilidad de los autores y no necesariamente reflejan la opinión de los Editores ni de la Sociedad Mexicana de Ficología. El material publicado puede reproducirse total o parcialmente siempre y cuando exista una autorización de los autores y se mencione la fuente completa y la dirección electrónica de la publicación.

# Método aplicado para la observación microscópica de algas vivas asociadas a microbialitas

Vladimir Betancourt García<sup>1</sup>, Eleonor Cortés-López<sup>2</sup>, Rosaluz Tavera\*<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Posgrado en Ciencias del Mar y Limnología de la Universidad Nacional Autónoma de México.

<sup>2</sup>Posgrado en Ciencias Biológicas de la Universidad Nacional Autónoma de México.

<sup>3</sup>Laboratorio de Algas Continentales. Ecología y Taxonomía. Departamento de Ecología y Recursos Naturales, Facultad de Ciencias, Universidad Nacional Autónoma de México.

\* r\_tavera@ciencias.unam.mx

## INTRODUCCIÓN

Las microbialitas son depósitos sedimentarios resultado de la mineralización producida, inducida o influenciada por una comunidad bentónica microbiana embebida en sus sustancias exopoliméricas (EPS por sus siglas en inglés) (Dupraz *et al.* 2011). Existe un consenso en que las microalgas tienen un papel decisivo en la construcción y el desarrollo de estas estructuras por su actividad metabólica (Choo *et al.* 2002; Dupraz *et al.* 2011; Golubic 1976; Kupriyanova *et al.* 2007; Kupriyanova *et al.* 2013; Ludwig *et al.* 2005; Riding, 2000; Shiraishi *et al.* 2008; Winsborough & Golubić 1987; Winsborough 2000; Zavarzin 2002). El estudio de las microbialitas con su comunidad asociada promueve el planteamiento de hipótesis sobre la evolución del planeta desde el punto de vista geomicrobiológico (Buick 2001; Hofmann 2000; Shen & Buick 2004) y también profundiza el conocimiento sobre la biomineralización de ciertos organismos (Benzerara *et al.* 2014; Knoll 2003), por lo que existe un interés creciente en estudiar la relación entre las comunidades de microorganismos y la fase lítica de las microbialitas (Couradeau *et al.* 2013; Freytet & Verrecchia 1998; Gérard *et al.* 2013; Winsborough & Golubić 1987). Como muestran estos estudios, la observación in vivo de microalgas en microbialitas, representa un reto metodológico cuando se requiere observar su relación espacial con la fase mineral, debido a que las microbialitas son estructuras opacas. La microscopía de epifluorescencia y principalmente la confocal han resultado ser herramientas muy útiles (Bosak *et al.* 2012; Brown *et al.* 1998; Couradeau

*et al.* 2013; Douglas & Douglas 2001; Kus 2015; Solé *et al.* 2008; Seder-Colomina *et al.* 2012) ya que las algas son evidentes por la autofluorescencia de sus pigmentos fotosintéticos (Rost 1995) y que la microscopía confocal permite la investigación de la relación espacial de los elementos fluorescentes en al menos tres dimensiones de las muestras (Jerome *et al.* 2011).

El procesamiento de las muestras para ambas microscopías y fundamentalmente para la microscopía confocal requiere de una atención particular para preservar la estructura en tres dimensiones (3D) de la muestra durante la observación (Jerome *et al.* 2011). Couradeau *et al.* (2015) sugieren que las observaciones sean a partir de muestras de microbialitas fijadas, incluidas y seccionadas, lo que permite el mantenimiento de la estructura en 3D y la observación del material en distintas microscopías. No obstante, las muestras altamente porosas o con comunidades poco cohesivas tienden a perder los talos de algas que no se encuentran fuertemente adheridos a la fase lítica de las microbialitas durante los procesos de fijación y de inclusión, por lo que en estos casos particularmente (pero no exclusivamente) es recomendable minimizar el procesamiento del material y analizar las muestras vivas.

Existen en el mercado dispositivos que facilitan el montaje y la observación de las células vivas como son las celdas de montaje y separadores de silicón; sin embargo, estos sistemas son poco adecuados para el montaje de fragmentos de microbialitas y sus algas asociadas debido a su poca capacidad volumétrica. Aquí presentamos una alternativa metodológica que permite resolver esta problemática sin

contravenir a la obtención de imágenes de buena calidad de algas vivas de microbialitas en microscopía fotónica, de epifluorescencia y confocal.

### **Elaboración del dispositivo de soporte de muestra**

El dispositivo para la observación de microalgas vivas de microbialitas que aquí proponemos se elaboró en una placa de acrílico (polímero de metil metacrilato, PMMA) cuadrada, de 80 mm de lado y 6 mm de espesor, con dos perforaciones circulares de 20 mm de diámetro, cada una sellada en una de sus caras con un cubreobjetos de 22 x 22 mm del No. 1 (Fig. 1). Como alternativa, es posible sellar las dos perforaciones con un solo cubreobjetos rectangular de 24 x 50 mm también del No. 1 (Fig. 1d). Las dimensiones de la placa se establecieron considerando la mayoría de los soportes para muestras de los equipos de microscopía; las dimensiones de las perforaciones se establecieron considerando las dimensiones de los cubreobjetos de fácil adquisición y en vista de la importancia del sellado final de la muestra. El material de la placa se seleccionó por su resistencia y capacidad de mecanización y moldeo. El corte inicial de la placa de acrílico se realizó con una pulidora (amoladora) angular Bosch 4. ½" GWS 7-115, hasta obtener la forma cuadrada de las dimensiones señaladas anteriormente. Las perforaciones se obtuvieron con un tubo metálico de 20 mm de diámetro calentado previamente al rojo vivo. Los bordes exteriores e interiores de la estructura resultante se pulieron utilizando una lija de agua de grano 400, de tal manera que los acabados de la placa y de las perforaciones quedaron lisos. La placa perforada se preparó para montar el dispositivo en condiciones de esterilidad. Los cubreobjetos fueron adheridos por una cara de la placa con soldadura plástica Ceys™ para plásticos duros.

### **Montaje de la muestra**

Una vez elaborado el dispositivo, se utilizaron pinzas de disección para colocar los fragmentos frescos de la microbialita en interior de los pozos formados por las perforaciones y el cubreobjetos, cuidando que la parte que se deseaba observar quedara en contacto con el cubreobjetos. El fragmento se seleccionó al microscopio estereoscópico de modo que contuviera la sección de interés y buscando un tamaño menor a la capacidad de la perforación del dispositivo (Figura 1b).

Posteriormente, se cubrió el fragmento con una solución estéril y aún líquida, de agua-agar al 1%, a una temperatura entre 40 y 50 °C de tal manera que se evitó la formación de burbujas o huecos de

aire en torno al fragmento, con el volumen suficiente para que el pozo quedara lleno hasta el borde. Antes de la solidificación del agua-agar, se selló cada pozo con un cubreobjetos cuadrado de 22 x 22 mm, de grosor No. 1, evitando también la formación de burbujas. Para impedir la contaminación y la contracción del agua-agar por desecación, se recubrió el contorno del cubreobjetos con barniz de uñas transparente. Terminando todo el sellado, el dispositivo se manipuló en condiciones normales y se mantuvo a 4 °C hasta unos minutos antes de su observación, con el fin de disminuir la actividad metabólica de las células y evitar una posible generación de burbujas en la superficie del fragmento.

### **Observación al microscopio**

La documentación de las poblaciones y células vivas de las microbialitas puede ser realizada a través de diferentes microscopías: estereoscópica, fotónica, de epifluorescencia y confocal (Figs. 2 y 3), teniendo en cuenta, para estas últimas, los intervalos de excitación y emisión de la fluorescencia de los pigmentos fotosintéticos de las microalgas de interés. Couradeau *et al.* (2015) presentan los picos de absorción y fluorescencia para los principales pigmentos fotosintéticos de cianoprocariontes en estado puro, a pH 7 (Cuadro 1) y pueden ser utilizados como referencia si se tiene en cuenta que la fluorescencia puede variar en vivo y que usualmente los picos de absorción y fluorescencia tienen un intervalo de más de 100 nm. En el cuadro 1 indicamos estos picos y los intervalos utilizados en otros trabajos con organismos vivos.

### **Discusión del método propuesto**

El uso de diferentes técnicas microscópicas representa valiosas herramientas para el estudio de las comunidades microalgales que frecuentemente se encuentran en forma de agregados celulares o formando tapetes sobre las microbialitas (Couradeau *et al.* 2015). En este sentido, el uso del soporte de muestras que presentamos, nos proporcionó una opción eficiente para la obtención de imágenes en estos equipos, porque permite una examinación no destructiva; además los elementos utilizados, tanto los materiales del dispositivo como el medio de montaje, no obstruyen la identificación de la autofluorescencia de los organismos (Neu *et al.* 2004) y de minerales (MacRae & Wilson 2008), lo que posibilita distinguirlos para estudiar la relación entre las poblaciones de microalgas y la fase lítica de las microbialitas (Fig. 2).

La elaboración del dispositivo implicó tomar en cuenta la sencillez en su elaboración, la estabi-

lidad de la muestra, la facilidad de trasportarla, su versatilidad en el uso de distintos equipos de microscopía y el cuidado necesario para realizar observaciones adecuadas.

El dispositivo que proponemos aquí está fabricado con acrílico, un material fácil de conseguir y con alta resistencia, ligereza y maniobrabilidad. Al montar los fragmentos de microbialitas en el dispositivo vacío, es posible acomodar la muestra de tal forma que el área de interés se encuentre más cercana al cubreobjetos inferior (a través del cual se realiza la observación), lo que corresponde con las recomendaciones de Waters (2007) para la observación de material vivo en microscopía confocal. El que nuestra propuesta incluya dos pozos de montaje, permite tener de manera simultánea dos muestras listas para ser observadas sobre las platinas de los microscopios; lo que facilita la exploración de muestras al aumentar el tiempo efectivo de observación en los microscopios. No obstante, el dispositivo puede ser ajustado a uno o más pozos. La manufactura del dispositivo por lo tanto obedece a la necesidad de cada investigador. Las medidas que proponemos aquí resultaron efectivas para el montaje de fragmentos idóneos de microbialitas y la utilización del dispositivo en los diferentes microscopios fotónicos, con o sin epifluorescencia y sin que las distancias entre las platinas y los objetivos fueran un impedimento para lograr un buen enfoque (Nikon 80i tiene un intervalo de movimiento de la platina de 27 mm; Nikon OptiPhot-2, tiene un intervalo de 29 mm).

Debido a que la preparación y montaje de las muestras en microscopía confocal tiene un grado de dificultad mayor que en microscopía fotónica y de epifluorescencia (Pawley 2000), buscamos cumplir con los cuidados requeridos para el uso de esta microscopía en el método propuesto. Las precauciones que deben ser consideradas en la preparación y observación del material vivo en microscopía confocal han sido detalladamente expuestas por Waters (2007), quien precisa que lo elemental para una localización y cuantificación adecuada de la fluorescencia es la obtención de imágenes de la mayor calidad posible. Así, un aspecto importante es el establecimiento de las condiciones adecuadas para el mantenimiento de las células y su fluorescencia durante su observación, a la par de un montaje adecuado en relación con el tipo de microscopio utilizado. Usualmente, la estabilidad en la temperatura, la hidratación y el flujo de nutrientes es requerido para el mantenimiento de las células durante su observación en vivo (Waters 2007). En este caso, el método que proponemos permite el

mantenimiento de los organismos a temperatura ambiente sin alterar su relación entre ellos y la fase lítica de las microbialitas y en una condición suficiente de humedad al estar incluidas en agua-agar, lo que resuelve estos problemas.

Algunos autores (Diaspro *et al.* 2006) hacen hincapié en que la observación y obtención de imágenes de calidad, tiene que tomar en cuenta el decaimiento de la fluorescencia de los fluorocromos que usualmente ocurre tras su exposición a las longitudes de onda que los excitan, pues después de cierto tiempo, su capacidad fluorescente puede perderse completamente y corresponde a su blanqueamiento. El observar los pigmentos fotosintéticos de microalgas vivas permite tiempos de observación suficientes para la exploración y la captura de imágenes simples y secuenciales, ya que se ha calculado que para cianoprocariontes planctónicas el blanqueamiento de los pigmentos fotosintéticos ocurre alrededor de 45 minutos para longitudes de onda azules, de 120 minutos para longitudes de onda verdes y superiores a 24 horas para las longitudes de onda rojas (Sinha *et al.* 2002). Por lo tanto, el montaje que proponemos aquí permite el mantenimiento de la autofluorescencia de los pigmentos para la obtención de imágenes de calidad, sin contaminación de la muestra. En este sentido, la manipulación en condiciones de esterilidad es para evitar que algún material alóctono pudiera alterar las observaciones.

Existen, además de la preparación y el montaje de las muestras, ciertas restricciones a considerar para la obtención de imágenes de calidad en microscopía confocal, como la captación de aberraciones esféricas (Inoué 2006; Waters 2007) que provocan una elongación axial y una asimetría de las imágenes. Para evitar o disminuir estas aberraciones, es necesario mantener una constancia entre el índice de refracción del medio en el que se encuentra el espécimen y el medio de inmersión del objetivo utilizado, a la par de un cubreobjetos de grosor adecuado a las características de los objetivos utilizados (Waters 2007). Para resolver estas restricciones, sugerimos la inclusión de las microbialitas en agua-agar al 1%, el uso de un lente seco o preferiblemente de inmersión en agua, y un cubreobjetos de grosor No. 1 (0.13 a 0.16 mm de espesor) o No. 1.5 (0.16 a 0.19 mm de espesor), que coincida con las especificaciones del lente empleado (en este caso utilizamos UPLFLN 10x con apertura numérica de 0.30).

Finalmente, si bien es cierto que este dispositivo se fabricó con la intención de contener muestras de microbialitas, no se descarta su uso para otras

estructuras o sustratos opacos como rocas provenientes de cavernas o muestras de suelo en donde las células algales pueden ser evidentes por autofluorescencia. Igualmente, el uso de material fijado y de fluorocromos para el marcaje y observación de estructuras particulares puede ser explorado en función del tipo de investigación a realizar. Además, el dispositivo puede ser empleado en otras disciplinas (médicas y odontológicas) e incluso podría ser utilizado en la sujeción de muestras para la obtención de imágenes tomográficas ya que permite la estabilidad de la muestra en un medio de baja densidad.

## CONCLUSIONES

El diseño de este dispositivo de montaje permite: 1) el estudio de un volumen suficiente de muestras de microalgas vivas de microbialitas sin pérdida de células o alteración del arreglo 3D de la comunidad; 2) la pronta exploración de las muestras; 3) la estabilidad necesaria de las muestras durante su traslado para el uso de distintos equipos de microscopía y 4) la obtención de imágenes de buena calidad en distintas microscopías, cuando es acompañado de un montaje adecuado para las especificaciones técnicas de los microscopios.

Debido a la versatilidad del dispositivo de montaje, es posible ampliar su uso al estudio de otras estructuras opacas y no sólo células con pigmentos autofluorescentes, al usar fluorocromos particulares.

## AGRADECIMIENTOS

Laboratorio Nacional de Microscopía Avanzada (LNMA) de la UNAM y particularmente al M. en C. Andrés Saralegú Amaro y al Dr. Jaime Arturo Pimentel Cabrera por el apoyo en la observación, toma y análisis de las fotografías en microscopía confocal. Agradecemos también a: M. en C. Beatriz Lira Hernández por el apoyo en las observaciones en epifluorescencia; M. en C. Guadalupe Vidal por el apoyo en el establecimiento del montaje de las muestras; al Posgrado en Ciencias del Mar y Limnología y al Posgrado en Ciencias Biológicas de la UNAM y al CONACYT por los apoyos a VBG y ECL para la realización de estudios de posgrado.

## REFERENCIAS

Benzerara, K., F. Skouri-Panet, J. Li, C. Féraud, M. Gugger, T. Laurent, E. Couradeau, M. Ragon, J. Cosmidis, N. Menguy, I. Margaret-Oliver, R. Tavera, P. López-García & D. Moreira. 2014. Intracellular Ca-carbonate biomineralization is widespread in cyanobacteria. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 111: 10933-10938. Doi:10.1073/pnas.1403510111.

- Bosak, T., B. Liang, T.D. Wu, S.P. Templer, A. Evans, H. Vali, J.L. Guerin-Kern, V. Klepac-Ceraj, M.S. Sim & J. Mui. 2012. Cyanobacterial diversity and activity in modern conical microbialites. *Geobiology* 10: 384-401. Doi:10.1111/j.1472-4669.2012.00334.x.
- Brown, D.A., T.J. Beveridge, C.W. Keevil & B.L. Sherriff. 1998. Evaluation of microscopic techniques to observe iron precipitation in a natural microbial biofilm. *FEMS Microbiology Ecology* 26: 297-310. Doi:10.1111/j.1574-6941.1998.tb00514.x.
- Buick, R. 2001. Life in the Archaean, *In*: D.E.G. Briggs & P.R. Crowther. Eds. *Paleobiology II*. Blackwell Science Ltd, Malden. pp. 13-21.
- Choo, K., P. Snoeijs & M. Pedersén. 2002. Uptake of inorganic carbon by *Cladophora glomerata* (Chlorophyta) from the Baltic Sea. *Journal of Phycology* 38: 493-502. Doi:10.1046/j.1529-8817.2002.01083.x.
- Couradeau E, K. Benzerara, I. Estéve, D. Moreira, R. Tavera & P. López-García. 2013. Cyanobacterial calcification in modern microbialites at the submicrometer-scale. *Biogeosciences* 10: 5255-5266. Doi:10.5194/bg-10-5255-2013.
- Couradeau, E., K. Benzerara, D. Moreira & P. López-García. 2015. Protocols for the study of microbe-mineral Interactions in modern microbialites. *In*: T.J. McGenety, K.N. Timmis & B. Nogales. Eds. *Hydrocarbon and Lipid Microbial Protocols*. Springer Protocols Handbooks, Springer-Verlag Berlin Heidelberg. pp. 319-341.
- Diaspro, A., G. Chirico, C. Usai, P. Ramoino & J. Dobrucki. 2006. Photobleaching. *In*: J.B. Pawley. Ed. *Handbook of biological confocal microscopy*, Springer. pp. 690-702. ISBN 978-0-387-45524-2 <http://www.springer.com/us/book/9780387259215>. (Consultado el 26 de mayo 2017).
- Douglas, S. & D.D. Douglas. 2001. Structural and geomicrobiological characteristics of a microbial community from a cold sulfide spring. *Geomicrobiology Journal* 18: 401-422. Doi:10.1080/014904501753210567.
- Dupraz, C., R.P. Reid & P. Visscher. 2011. Microbialites, Modern. *In*: J. Reitner & V. Thiel. Eds. *Encyclopedia of Geobiology*. Encyclopedia of Earth Sciences Series, Springer Netherlands. pp. 617-635. <http://www.springer.com/la/book/9781402092114> (Consultado el 26 de mayo 2017).
- Freytet, P. & E.P. Verrecchia. 1998. Freshwater organisms that build stromatolites: a synopsis of biocrystallization by prokaryotic and eukaryotic algae. *Sedimentology* 45: 535-563. Doi:10.1046/j.1365-3091.1998.00155.x.
- Gérard, E., B. Ménez, E. Couradeau, D. Moreira, K. Benzerara, R. Tavera & P. López-García. 2013. Specific carbonate-microbe interactions in the modern microbialites of Lake Alchichica (Mexico). *The ISME Journal* 7 (10): 1997-2009. Doi:10.1038/ismej.2013.8.

- Golubić, S. 1976. Organisms that build stromatolites. *In*: M.R. Walter. Ed. *Stromatolites*, Development in sedimentology 20, Elsevier, Amsterdam. pp.113-126.
- Hofmann, H.J. 2000. Archean stromatolites as microbial archives. *In*: D.R.E. Riding & D.S.M. Awramik. Eds. *Microbial Sediments*. Springer Berlin-Heidelberg. pp.315-327. [http://link.springer.com/chapter/10.1007/978-3-662-04036-2\\_34](http://link.springer.com/chapter/10.1007/978-3-662-04036-2_34) (Consultado el 26 de mayo 2017).
- Inoué, S. 2006. Foundations of confocal scanned imaging in light microscopy. *In*: J. B. Pawley. Ed. *Handbook of Biological Confocal Microscopy*. Springer US. pp.1-19. [http://link.springer.com/chapter/10.1007/978-0-387-45524-2\\_1](http://link.springer.com/chapter/10.1007/978-0-387-45524-2_1) (Consultado el 26 de mayo 2017).
- Jerome, W.G., J. Fuseler & R.L. Price. 2011. Specimen preparation. *In*: R.L. Price & W.G. (Jay) Jerome. Eds. *Basic Confocal Microscopy*, Springer New York. pp. 61-77. [http://link.springer.com/chapter/10.1007/978-0-387-78175-4\\_4](http://link.springer.com/chapter/10.1007/978-0-387-78175-4_4) (Consultado el 26 de mayo 2017).
- Knoll, A.H. 2003. Biomineralization and evolutionary history. *Reviews in Mineralogy and Geochemistry* 54: 329-356. Doi:10.2113/0540329.
- Kupriyanova, E., A. Villarejo, A. Markelova, L. Gerashenko, G. Zavarzin, G. Samuelsson, D.A. Los & N. Pronina. 2007. Extracellular carbonic anhydrases of the stromatolite-forming cyanobacterium *Microcoleus chthonoplastes*. *Microbiology* 153: 1149-1156. Doi:10.1099/mic.0.2006/003905-0.
- Kupriyanova, E., M.A. Sinetova, S.M. Cho, Y.I. Park, D.A. Los & N.A. Pronina. 2013. CO<sub>2</sub>-concentrating mechanism in cyanobacterial photosynthesis: organization, physiological role, and evolutionary origin. *Photosynthesis Research* 117: 133-146. Doi:10.1007/s11120-013-9860-z.
- Kus, J. 2015. Application of confocal laser-scanning microscopy (CLSM) to autofluorescent organic and mineral matter in peat, coals and siliciclastic sedimentary rocks. A qualitative approach. *International Journal of Coal Geology* 137: 1-18. Doi:10.1016/j.coal.2014.10.014.
- Ludwig, R., F.A. Al-Horani, D. De Beer & H.M. Jonkers. 2005. Photosynthesis-controlled calcification in a hypersaline microbial mat. *Limnology and Oceanography* 50: 1836-1843.
- MacRae, C.M. & N.C. Wilson. 2008. Luminescence database I. Minerals and materials. *Microscopy and Microanalysis* 14: 184-204.
- Neu, T.R., S. Woelfl & J.R. Lawrence. 2004. Three-dimensional differentiation of photo-autotrophic biofilm constituents by multi-channel laser scanning microscopy (single-photon and two-photon excitation). *Journal of Microbiological Methods* 56: 161-172. Doi:10.1016/j.mimet.2003.10.012.
- Papineau, D., J.J. Walker S.J. Mojzsis & N.R. Pace. 2005. Composition and structure of microbial communities from stromatolites of Hamelin Pool in Shark Bay, Western Australia. *Applied and Environmental Microbiology* 71: 4822-4832. Doi:10.1128/AEM.71.8.4822-4832.2005.
- Pawley, J. 2000. The 39 steps: a cautionary tale of quantitative 3-D fluorescence microscopy. *Biotechniques* 28: 884-889.
- Ramírez, M., M. Hernández-Mariné, E. Novelo & M. Roldán. 2010. Cyanobacteria-containing biofilms from a Mayan monument in Palenque, Mexico. *Biofouling* 26: 399-409. Doi:10.1080/08927011003660404.
- Riding, R. 2000. Microbial carbonates: the geological record of calcified bacterial-algal mats and biofilms. *Sedimentology* 47: 179-214. Doi:10.1046/j.1365-3091.2000.00003.x.
- Rost, F.W.D. 1995. *Fluorescence microscopy*. Cambridge University Press. Cambridge.
- Seder-Colomina, M., A. Burgos, J. Maldonado, A. Solé & I. Esteve. 2012. The effect of copper on different phototrophic microorganisms determined in vivo and at cellular level by confocal laser microscopy. *Ecotoxicology* 22: 199-205. Doi:10.1007/s10646-012-1014-0.
- Shen, Y. & R. Buick. 2004. The antiquity of microbial sulfate reduction. *Earth-Science Reviews* 64: 243-272.
- Shiraishi, F., A. Bissett, D. de Beer, A. Reimer & G. Arp. 2008. Photosynthesis, respiration and exopolymer calcium-binding in biofilm calcification (Westerhöfer and Deinschwanger Creek, Germany). *Geomicrobiology Journal* 25: 83-94. Doi:10.1080/01490450801934888.
- Sinha, R.P., P. Richter, J. Faddoul, M. Braun & D.P. Häder. 2002. Effects of UV and visible light on cyanobacteria at the cellular level. *Photochemical & Photobiological Sciences* 1: 553-559.
- Solé, A., E. Diestra & I. Esteve. 2008. Confocal Laser Scanning Microscopy image analysis for cyanobacterial biomass determined at microscale level in different microbial mats. *Microbial Ecology* 57: 649-656. Doi:10.1007/s00248-008-9463-y.
- Waters, J.C. 2007. Live-cell fluorescence imaging. *Methods in Cell Biology* 81: 115-140.
- Winsborough, B.M. 2000. Diatoms and benthic microbial carbonates. *In*: D.R.E. Riding & D.S.M. Awramik. Eds. *Microbial Sediments*. Springer Berlin-Heidelberg. pp.76-83. [http://link.springer.com/chapter/10.1007/978-3-662-04036-2\\_10](http://link.springer.com/chapter/10.1007/978-3-662-04036-2_10) (Consultado el 26 de mayo 2017).
- Winsborough, B.M. & S. Golubić. 1987. The role of diatoms in stromatolite growth: Two examples from modern freshwater settings. *Journal of Phycology* 23: 195-201. Doi:10.1111/j.1529-8817.1987.tb04444.x.

Zavarzin, G.A. 2002. Microbial Geochemical Calcium Cycle. *Microbiology* 71: 1-17. Doi:10.1023/A:1017945329951.

Zippel, B. & T.R. Neu. 2011. Characterization of glycoconjugates of extracellular polymeric substances in tufa-associated biofilms by using fluorescence lectin-binding analysis. *Applied and Environmental Microbiology* 77: 505-516. Doi:10.1128/AEM.01660-10.

Recibido: 3 noviembre 2016

Revisado: 16 enero – 15 mayo 2017

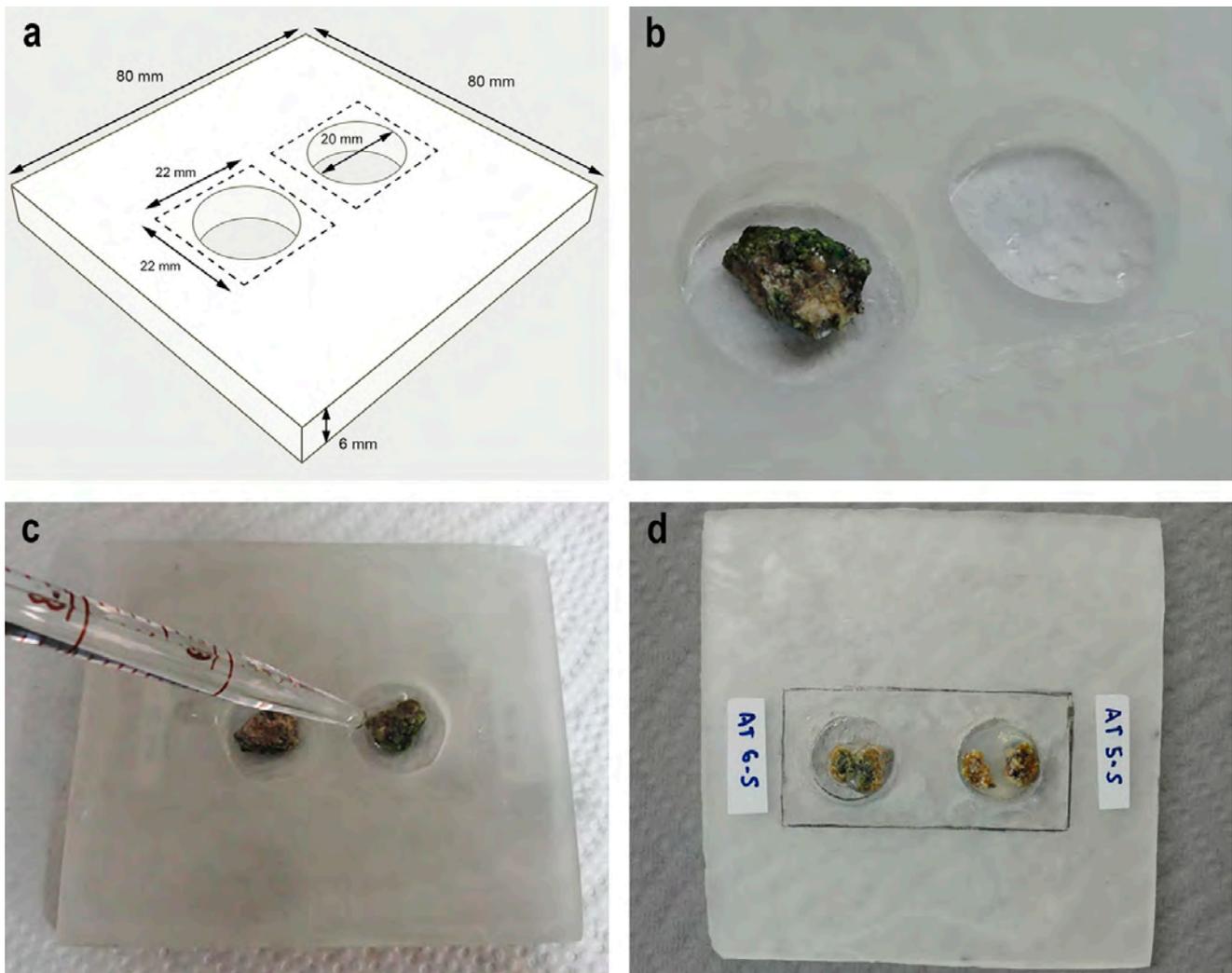
Corregido: 26 mayo 2017

Aceptado: 27 mayo 2017

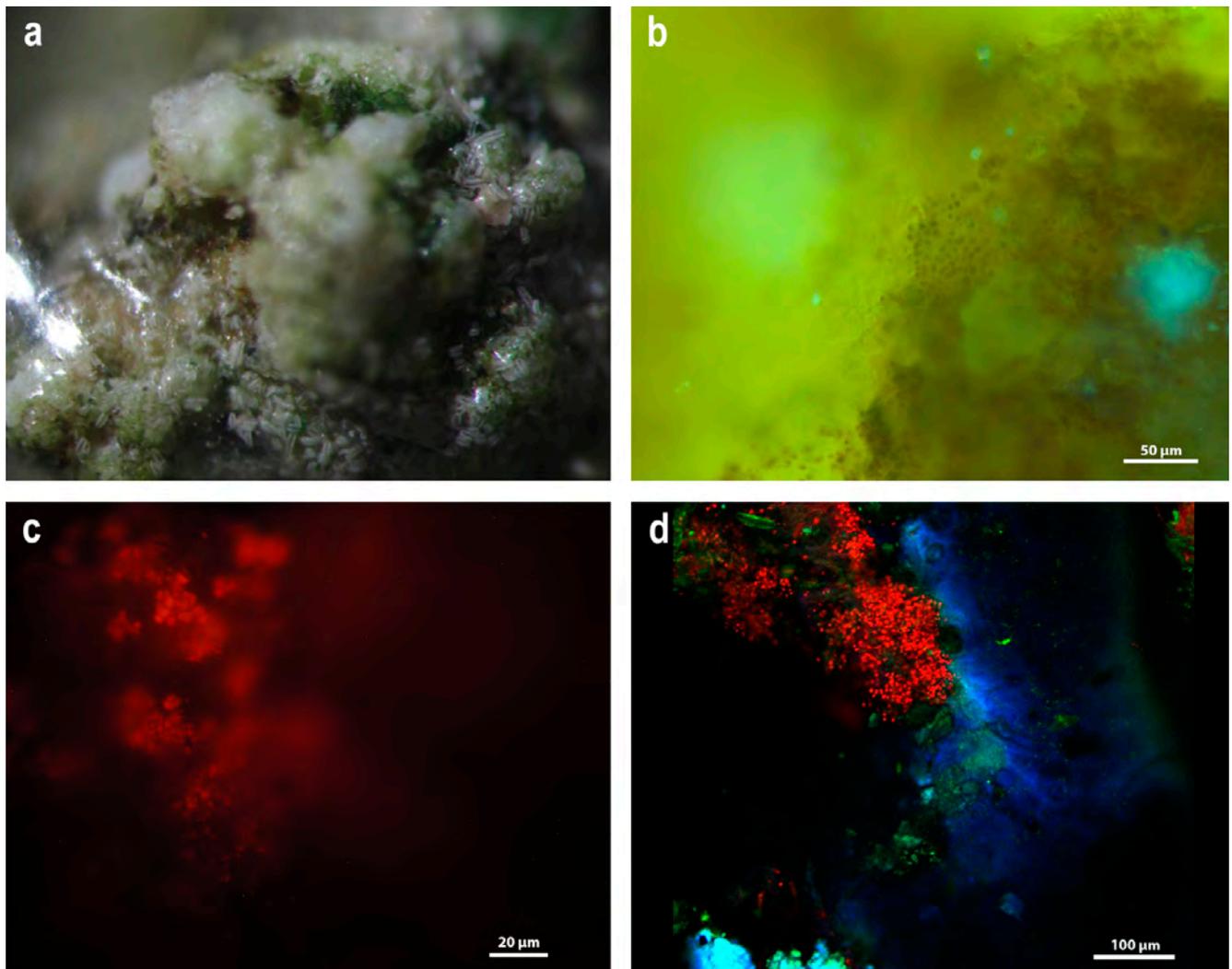
Revisores: Gilles Pierre René Levrès y Andrés Saralegui Amaro

**Cuadro 1.** Pigmentos autofluorescentes y los intervalos de absorbancia y fluorescencia que han sido propuestos para su observación.

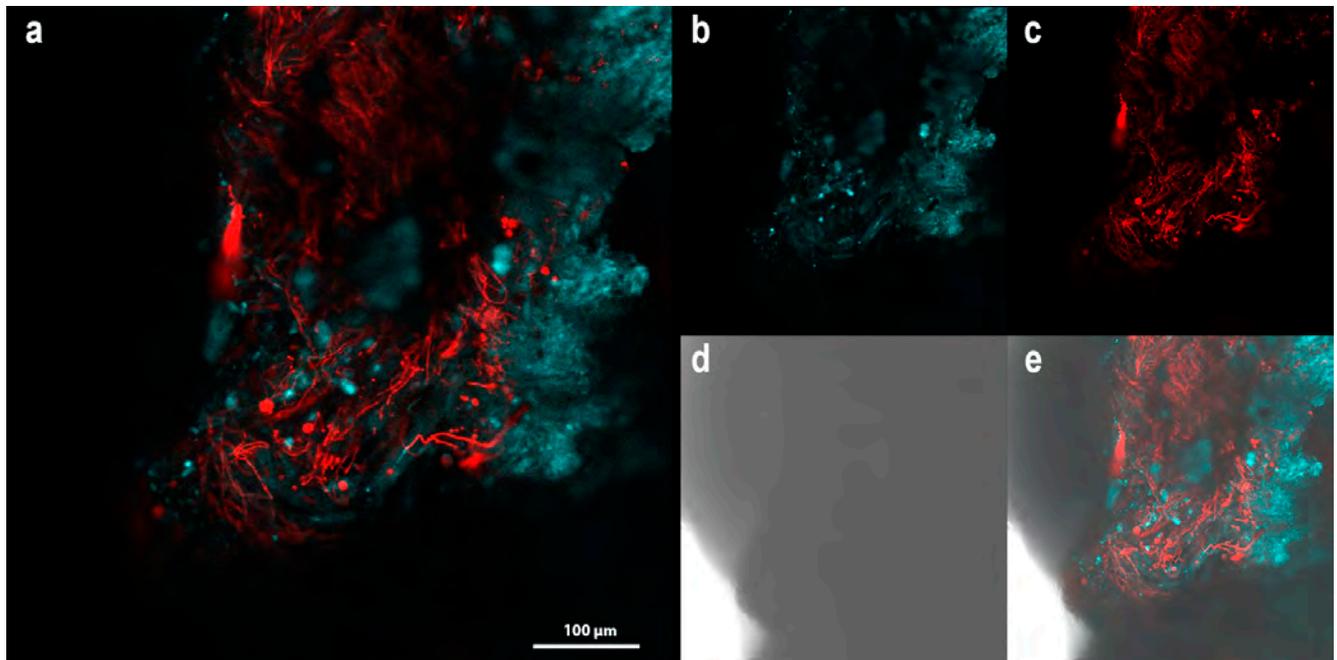
Pigmento	Absorbancia máxima (nm)	Fluorescencia máxima (nm)	Referencia
Clorofila a	[430 – 450]	485 y 730	Rost (1995)
	430	668	Couradeau <i>et al.</i> 2015
Ficobilinas	561	[570 – 615]	Ramírez <i>et al.</i> 2010
	561	[585 – 625]	Zippel & Neu 2011
Aloficocianina	647	660	Couradeau <i>et al.</i> 2015
Ficocianina	630	660	Rost 1995
	633	685	Papineau <i>et al.</i> 2005
	610	643	Couradeau <i>et al.</i> 2015
Ficoeritrocianina	590	[607 – 610]	Couradeau <i>et al.</i> 2015
Ficoeritrina	540	[650 – 660]	Rost 1995
	543	570	Papineau <i>et al.</i> 2005
	572	581	Couradeau <i>et al.</i> (2015)
Ficoeritrina tipo I	564	573	Couradeau <i>et al.</i> 2015



**Figura 1.** Dispositivo para soporte de muestras. **a)** Esquema en el que se indican las medidas. Las líneas punteadas muestran la localización de los cubreobjetos que sellan un lado de las perforaciones; **b)** Acercamiento de las perforaciones de 20 mm de diámetro, mostrando la colocación de un fragmento de microbialita; **c)** Llenado de las perforaciones con agua-agar; **d)** Fotografía de la placa terminada. La línea oscura muestra el margen de un cubreobjetos largo que también puede ser empleado.



**Figura 2.** Microfotografías de un fragmento de microbialita (Lago Atexcac, material original) montado en el soporte de muestras que aquí proponemos. **a)** Microscopía estereoscópica (Nikon SMZ1500). Se observan los talos de las microalgas (en verde) en estrecha relación con la fase lítica; **b)** Microscopía fotónica (Nikon Optiphot-2) con iluminación extra lateral. Son evidentes los talos de organismos cocoides (cianoprocariontes); **c)** Microscopía de epifluorescencia (Nikon Optiphot-2 con lámpara de mercurio y con un filtro de paso de banda de 365 nm, un espejo dicróico de 420 nm, y un filtro de barrera de corte de 418 nm para fluorescencia de clorofila a). Se muestran células de cianoprocariontes cocoides; **d)** Microscopía confocal (Olympus FV1000 multifotónico Upright BX61WI con un lente UPLFLN 10x con apertura numérica de 0.30). Las microalgas son evidentes al interior de la microbialita por la fluorescencia de sus pigmentos fotosintéticos (en rojo). El material fue excitado con láseres a 405, 488 y 635 nm y la fluorescencia fue recabada en los intervalos 425-475 nm (azul), 500-600 nm (verde) y 655-755 nm (rojo).



**Figura 3.** Micrografías confocal (Olympus FV1000 multifotónico Upright BX61WI con un lente UPLFLN 10x con apertura numérica de 0.30) de un fragmento de microbialita (Lago Atexcac, material original). Las microalgas son evidentes al interior de la microbialita por la fluorescencia de sus pigmentos fotosintéticos (en rojo), en azul es evidente la autofluorescencia de una molécula posiblemente mineral. El material fue excitado con láseres a 405 y 635 nm y la fluorescencia fue recabada en los intervalos 425-475 nm y 655-755 nm. a) Imagen compuesta por la fluorescencia en ambos intervalos; b) Fluorescencia en 425-475 nm (azul); c) Fluorescencia en 655-755 nm (rojo); d) Imagen del fragmento en campo claro; e) Fusión de la imagen de fluorescencia compuesta con la del campo claro.

# DIRECTORIO

## COMITÉ EJECUTIVO NACIONAL

Sociedad Mexicana de Ficología  
2014-2016

### Dr. Francisco F. Pedroche

Presidente  
Departamento de Ciencias Ambientales  
División Ciencias Biológicas y de la Salud. UAM-Lerma.  
e-mail: fpedroche@correo.ler.uam.mx

### Dr. Abel Sentfies Granados

Secretario Ejecutivo  
Departamento de Hidrobiología  
División Ciencias Biológicas y de la Salud.  
UAM-Iztapalapa.  
e-mail: asg@xanum.uam.mx

### Dra. María Luisa Núñez Reséndiz

Secretaria Académica  
Departamento de Hidrobiología  
División Ciencias Biológicas y de la Salud. UAM-Iztapalapa.  
Facultad de Ciencias, UNAM.  
e-mail: mlnr@ciencias.unam.mx

### M. en C. María Eugenia Zamudio

Secretaria Administrativa  
Departamento de Hidrobiología  
División Ciencias Biológicas y de la Salud.  
UAM-Iztapalapa  
e-mail: maruzarc@xanum.uam.mx

### Dr. Eberto Novelo

Secretario de Difusión y Extensión  
Facultad de Ciencias, UNAM  
(enm@ciencias.unam.mx)

### Delegados Regionales:

Norte: Dr. Luis Ernesto Aguilar Rosas (UABC)  
(aguilarl@uabc.edu.mx)

Centro: Dr. Gustavo Montejano Zurita (UNAM)  
(gmz@ciencias.unam.mx)

Sur: Dra. Yolanda Freile P. (CINVESTAV-Mérida)  
(freile@mda.cinvestav.mx)

Oriente: Dr. José Aké Castillo (UVer.)  
(aake@uv.mx)

Occidente: Dr. Edgar Francisco Rosas Alquicira  
(Universidad del Mar, campus Puerto Ángel, OAX.)  
(erosas@angel.umar.mx)

## CRÉDITO DE FOTO DE LA PORTADA

Tapete de cyanoprokaryotas de las microbioalitas de la Joya de Yuriria.  
El principal componente es *Scytonematopsis contorta* Vaccarino et Johansen.  
Contraste interdiferencial. 20x.  
Foto de Eleonor Cortés-López