

Aislamiento y caracterización de microalgas formadoras de tapetes microbianos asociados a un cultivo hidropónico de plantas halófitas

ANA MARÍA GIRALDO SILVA

Departamento de Biología. Centro de Biotecnología Marina.
Banco Español de Algas. Universidad de Las Palmas de Gran Canaria.

RESUMEN

Los tapetes microbianos, formados principalmente por microalgas, generan una matriz de polisacáridos que contribuye a la fertilización, estabilización y retención de agua en el suelo. Los tapetes microbianos pueden ser empleados como herramienta en el acondicionamiento de suelos y estimuladores del crecimiento en plantas superiores (como las halófitas), en regiones áridas o semiáridas. Las poblaciones naturales de microorganismos fotosintéticos que se encuentran en los tapetes de un cultivo hidropónico de plantas halófitas, fueron estudiadas mediante análisis microscópico y caracterización morfológica diferenciándose dos tipos de sustratos: volcánico y artificial. Los microorganismos predominantes en el tapete que crece sobre sustrato volcánico fueron diatomeas y cianoprocariotas filamentosas, principalmente de los géneros *Navicula*, *Pseudanabaena*, y *Microcoleus*. Por otra parte, las cianoprocariotas, tanto Chroococcales como Oscillatoriales, fueron dominantes en el tapete que crece sobre el sustrato artificial, observándose una mayor cobertura de los géneros *Chroococcus* y *Oscillatoria*. El sustrato volcánico (picón) presentó parches de color marrón oscuro y claro y el sustrato artificial (PVC) se caracterizó por presentar parches de color verde oscuro. Haciendo uso de diferentes técnicas de aislamiento, se obtuvieron seis cepas unialgales: *Lyngbya confervoides*, *Oscillatoria margaritifera*, *Pseudanabaena limnetica*, *Klebsormidium flaccidum*, *Chlorella* sp. y *Navicula* sp. Las cepas aisladas fueron caracterizadas morfológicamente e identificadas empleando taxonomía convencional. Especies de microalgas como las descritas en este trabajo, entre otras, pueden ser empleadas en el acondicionamiento y restauración de suelos. De esta forma, se plantea la agrobiotecnología como una aproximación realista e innovadora para la bioremediación de suelos degradados y la repoblación de zonas áridas y semiáridas.

Palabras clave: aislamiento, cepas unialgales, cianoprocariotas, clorófitas, diatomeas, halófitas, hidroponía, microalgas, tapete microbiano.

Dirigido por: Dra. Antera Martel Quintana

Isolation and Characterization of The Microbial Mats Associated to a Hydroponic Culture of Halophytic Plants

ABSTRACT

Microbial mats are composed mainly of microalgae embebed in a polysaccharide matrix that contribute to soil fertilization, stabilization and water retention. Microbial mats promote the growth of higher plants, such as halophytes, and could be used as a tool in the soil conditioning of arid and semiarid areas. The natural populations of photosynthetic microorganism found in the mat of a hydroponic culture of halophyte plants, both in a volcanic (picón) and an artificial (PVC) substrate, were studied by microscopical analysis and characterized morphologically. The mat associated to the volcanic substrate was dominated by diatoms and filamentous cyanoprokaryotas, mainly of the genera *Navicula*, *Pseudanabaena*, and *Microcoleus*. On the other hand, the mat associated to the artificioal substrate was dominated by cyanoprokaryotas Oscillatoriales and Chroococcales, showing a greater coverage of the genera *Chroococcus* and *Oscillatoria*. Volcanic substrate, showed dark and clear brown patches, while the artificial substrate was characterized by dark green patches. Finally, six unialgal strains were isolated using various techniques: *Lyngbya confervoides*, *Oscillatoria margaritifera*, *Pseudanabaena limnetica*, *Klebsormidium flaccidium*, *Chlorella* sp. and *Navicula* sp. The isolates, which were characterized morphologically and identified by conventional taxonomy, are proposed as a tool for soil conditioning and reforestation. The present study proposes a concrete approach from the agrobiotechnology into the bioremediation of degraded soils and reforestation of arid and semiarid areas.

Key words: chlorophytes, cyanoprokaryotes, diatoms, isolation, halophytes, hydropony, microalgae, microbial mat, unialgal strains.

INTRODUCCIÓN

Los tapetes microbianos o biopelículas son estructuras laminadas, formadas por comunidades estratificadas de microorganismos colonizadores, que se desarrollan en la interfase entre el agua y los sustratos sólidos. Requieren una base donde establecerse, ya que se constituyen por la unión de los microorganismos a las partículas salinas y a los sedimentos; su nexa común es una matriz de polisacáridos, ADN y proteínas que constituyen una sustancia polimérica extracelular (Fig. 1). El tipo de laminación está controlada por la dominancia de especies, la luz, la temperatura, la salinidad, el oxígeno disuelto y la presencia de sulfuros (Malam Issa *et al.*, 1999; Demergasso, *et al.*, 2003; Belnap y Lange, 2003; Harrison *et al.*, 2006). Las laminaciones tienen coloración, textura y humedad asociadas al desarrollo de microorganismos fotosintéticos.

Los microorganismos que forman los tapetes microbianos se encuentran ampliamente distribuidos en todo el mundo, tanto en ambientes marinos, como dulceacuícolas y terrestres, presentando amplia tolerancia al pH, temperatura,

salinidad, oxígeno, y concentración de CO₂ (Basanti y Gualtieri, 2006). La presencia de estos tapetes está restringida a ambientes extremos que incluyen ambientes marino costeros y ambientes hipersalinos (Bauld, 1984).

En ambientes áridos y semiáridos, los tapetes microbianos resultan de la colonización de la superficie del suelo por comunidades de microorganismos dominados por las cianoprocarotas, algas eucariotas y líquenes (Malam Issa *et al.*, 1999). Estos organismos fotosintéticos son los principales productores primarios y son los componentes mayoritarios de los tapetes microbianos (Callow, 1993). Como miembros de la comunidad microbiana del suelo, las microalgas son conocidas por la capacidad de contribuir a la fertilidad y estabilidad del mismo, mediante la fijación de nitrógeno y la secreción de polímeros extracelulares (Barclay y Lewin, 1985; Malam Issa *et al.*, 2001). La presencia de cianoprocarotas fijadoras de nitrógeno aumenta el contenido de nutrientes del suelo (Jeffries *et al.*, 1992), enriqueciéndolo con materia orgánica y favoreciendo la actividad biológica

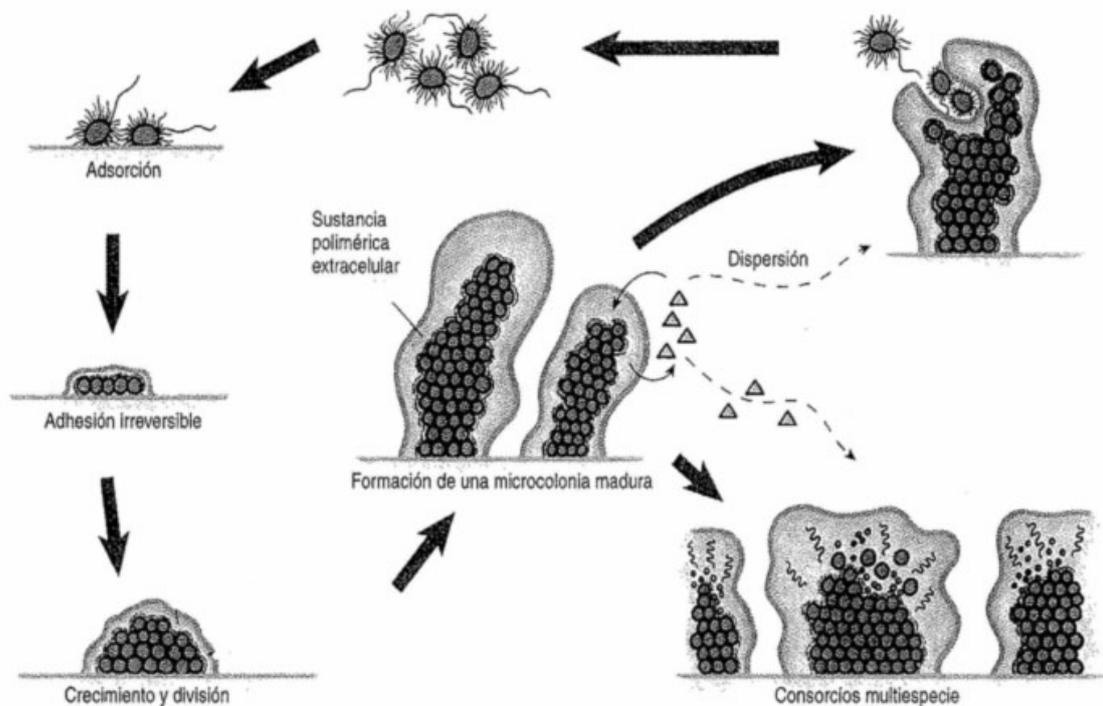


Figura 1. FORMACIÓN DE LOS TAPETES MICROBIANOS O BIOPELÍCULAS. Un tapete microbiano se forma cuando los microorganismos colonizadores se adsorben sobre una superficie biótica o inerte. La adsorción desencadena los primeros cambios fisiológicos que conducen al estilo biológico de película. Los microorganismos crecen y se dividen formando una colonia madura. En una colonia madura, los microorganismos producen una sustancia polimérica extracelular, una matriz de polisacáridos, ADN y proteínas que engloba la estructura de la microcolonia. Modificado de Harrison *et al.*, 2006

(Lange *et al.*, 1994). Los efectos beneficiosos de las microalgas sobre las propiedades físicas de los suelos han sido descritos en diferentes estudios (Cameron y Devaney, 1970; Belnap y Gardner, 1993; Malam Issa, *et al.*, 1999, 2001, 2007; Hu *et al.*, 2002). En ellos se afirma que un mayor porcentaje de cobertura de microalgas (especialmente las cianoprocariotas), contribuye al incremento en la estabilidad del suelo. Con el paso del tiempo y el crecimiento de las cianoprocariotas dentro del tapete, la estabilidad del suelo aumenta. Las cianoprocariotas excretan sustancias poliméricas que están compuestas principalmente por polisacáridos (Decho, 1990). Los polisacáridos actúan como compuesto aglutinante, ayudando a mantener las células adheridas a las capas superiores del suelo formando una malla (Lynch y Bragg, 1985; Barclay y Lewin, 1985, Belnap 1993, Malam Issa *et al.*, 1999, 2001). La morfología y excreciones poliméricas de las cianoprocariotas le proporcionan al suelo cohesión, resistencia a la erosión y además contribuyen al aumento de la retención del agua, debido a las propiedades higroscópicas de los polisacáridos (Decho, 1990, Belnap y Gardner, 1993; Harper y Pendleton, 1993; Verrecchia *et al.*, 1995; Malam Issa *et al.*, 1999).

El presente estudio tiene como objetivo caracterizar las poblaciones de dos tapetes microbianos presentes en un sistema de cultivo hidropónico de plantas halófitas, mediante el análisis microscópico de las poblaciones naturales y posterior aislamiento y cultivo de cepas provenientes de dichas poblaciones. El cultivo hidropónico de plantas halófitas fue desarrollado en el Centro de Biotecnología Marina (CBM) de la Universidad de Las Palmas de Gran Canaria. La implementación de este sistema de germinación de halófitas tiene como objetivo el establecimiento de un co-cultivo integrado, entre plantas halófitas y microalgas.

OBJETIVOS

1. Caracterizar mediante análisis microscópico las poblaciones naturales de los tapetes microbianos presentes en un cultivo hidropónico de plantas halófitas.
2. Establecer la composición y dominancia de las poblaciones naturales que forman los diferentes tapetes microbianos estudiados.
3. Aislar cepas unialgales de microalgas prove-

nientes de las poblaciones naturales de los tapetes microbianos.

METODOLOGÍA

Área de estudio

El sistema de cultivo hidropónico de plantas halófitas (familia Chenopodiaceae), se desarrolló en los invernaderos del CBM, ubicado en el Muelle de Taliarte, Gran Canaria. El sistema de cultivo comprende un conjunto de canales, que forman una estructura piramidal (Fig. 2). Las plantas halófitas crecen sobre dos tipos de sustrato: natural (picón) y artificial (PVC). El riego se lleva a cabo desde las 9:00 hasta las 17:00 horas, a intervalos de 15 minutos, con un medio de cultivo diseñado específicamente para el sistema (medio GPM; tabla 1).

Muestreo

Se determinó el tamaño del cuadrante mínimo óptimo de muestreo. El método consistió en muestrear con cuadrantes cuya superficie iba desde 0,25 cm² hasta 6,25 cm². El análisis de las desviaciones estándar de las diferentes áreas estandarizadas a 10 cm², estableció como tamaño óptimo el cuadrante de 2,25 cm². Para definir la mínima unidad muestral se realizó una curva de riqueza acumulada en función del número de unidades muestrales tomadas en cuenta. El punto de inflexión de la curva se tomó como el tamaño de muestreo adecuado (Krebs, 1998).

Se tomaron 2,25 cm² de tapete de microalgas creciendo sobre sustrato volcánico (picón; Fig. 3) y b) tapete microbiano creciendo sobre sustrato artificial (PVC; Fig. 5). Las zonas de muestreo fueron identificadas por color y apariencia del tapete. Las muestras fueron observadas al microscopio e identificadas a nivel de género/especie mediante taxonomía convencional.

Medios de cultivo

Para el aislamiento de las cepas unialgales a partir de las muestras naturales se emplearon cuatro medios de cultivo (tabla 1). Todos los ensayos con los diferentes medios de cultivo se llevaron a cabo por triplicado.



Figura 2. Sistema de cultivo hidropónico de plantas halófitas, desarrollado en el Centro de Biotecnología Marina, Gran Canaria. Las plantas halófitas de la familia Chenopodiaceae crecen sobre sustrato natural y artificial, en un sistema que comprende canales con una disposición en cascada.

Tabla 1. Medios de cultivo y concentraciones finales empleadas durante el proceso de aislamiento.

	F/2 <i>Guillard y Ryther, 1962</i>	AM <i>Medio CBM</i>	GPM <i>Medio CBM</i>	Extracto de suelo <i>Pringsheim, 1946</i>
NaNO ₃	880 µM	-	-	-
NaH ₂ PO ₄ · 2H ₂ O	36 µM	-	-	-
NaSiO ₃ · 9H ₂ O	106 µM	-	-	-
Na ₂ EDTA	4,36 µM	0,03µM	-	-
FeCl ₃ · 6H ₂ O	3,15 µM	-	-	-
CuSO ₄ · 5H ₂ O	0,04 µM	-	-	-
ZnSO ₄ · 7H ₂ O	0,08 µM	-	-	-
CoCl ₂ · 6H ₂ O	0,05 µM	7,7 × 10 ⁻⁶ µM	-	-
MnCl ₂ · 4H ₂ O	0,90 µM	9,1 × 10 ⁻⁴ µM	-	-
Na ₂ MoO ₄ · 2H ₂ O	0,03 µM	2,6 × 10 ⁻⁴ µM	-	-
Tiamina-HCl	29,6 mM	-	-	-
Biotina	2,050 nM	-	-	-
Cianocobalamina	0,369 nM	-	-	-
KNO ₃	-	3 µM	-	-
KHPO ₄	-	0,03 µM	-	-
MgSO ₄	-	0,1 µM	-	-
FeSO ₄ · 7 H ₂ O	-	0,03 µM	-	-
ZnCL2	-	3,8 × 10 ⁻⁵ µM	-	-
CaNO3	-	-	6,2 × 10 ⁻³ µM	-
Fe EDTA	-	-	5,7 × 10 ⁻⁵ µM	-
H ₃ PO ₃	-	-	3,7 × 10 ⁻² µM	-
Suelo de Jardín	-	-	-	12 gr
pH	8	6	6	7
Salinidad ppm	45	37	28	8

Aislamiento de cepas unialegales

Para el aislamiento de las cepas unialegales desde las muestras naturales se emplearon cinco técnicas de aislamiento:

1. Enriquecimiento según Hoshaw y Rosowski, 1973; Andersen, 2005.
2. Diluciones seriadas según Hoshaw y Rosowski, 1973; Andersen, 2005.
3. Capilaridad usando pipeta Pasteur según Pringsheim, 1946; Hoshaw y Rosowski, 1973; Stein, 1973; Surek y Melkonian, 2004; Andersen, 2005.
4. Siembra-rayados en agar según Hoshaw y Rosowski, 1973; Anderson, 2005.
5. Adhesión a vidrio cubreobjetos según Stein, 1973.

En todos los ensayos realizados las muestras fueron incubadas en cámara de cultivo a 25 °C, 57 µ moles fotones m⁻² sec⁻¹ y fotoperiodo 16:8 luz: oscuridad durante cuatro semanas. Además fueron observadas una vez por semana al microscopio.

Microscopia e identificación

Para el análisis de las poblaciones naturales y el seguimiento de los cultivos, se empleó:

- Microscopio óptico vertical (automático/digital Leica DM6000, equipado con una cámara Leica DFC 425).
- Estereomicroscopio Leica M165FC equipado con una cámara DFC 425C.

Los resultados fueron fotodocumentados. Las medidas taxonómicas se llevaron a cabo con el programa de análisis de imagen Leica LAS 3.0.

Las microalgas fueron identificadas siguiendo las claves taxonómicas: Komárek y Anagnostidis (2005) para cianoprocarotas; Bourrelly (1990), Ettl y Gartner (2009) para clorófitas y Krammer y Lange-Bertalot (2000) para diatomeas.

La composición de microalgas se expresó como el conjunto de los géneros de microalgas observadas en las poblaciones naturales de los tapetes microbianos estudiados. La dominancia de microalgas se expresó numéricamente basado en el porcentaje de cobertura, según el campo de



Figura 3. Tapete microbiano creciendo sobre sustrato volcánico. A. Muestra el sustrato volcánico muestreado. B. Se observa el color y características del tapete microbiano muestreado.

observación en el microscopio a una magnitud de 20× (Golubic, 1967).

RESULTADOS

La composición, el porcentaje de cobertura y la descripción taxonómica de los géneros observados al microscopio en las muestras naturales, se presentan en la tabla 2.

En el tapete microbiano que crece sobre sus-

trato volcánico, el grupo de microalgas dominante fueron las diatomeas de género *Navicula* (Fig. 4 B y C). También se observó en mayor proporción una cobertura de las cianoprocaritas de los géneros *Microcoleus*, *Pseudanabaena* (Fig. 4 A) y *Chroococcidiopsis* (Fig. 4 C). Los géneros *Lyngbya* (cianoprocariota) y *Chlorella* (clorófitas; Fig. 4 B), se observaron en menor proporción (tabla 2). Este tapete se caracterizó por presentar parches de color marrón claro y oscuro (Fig. 3).

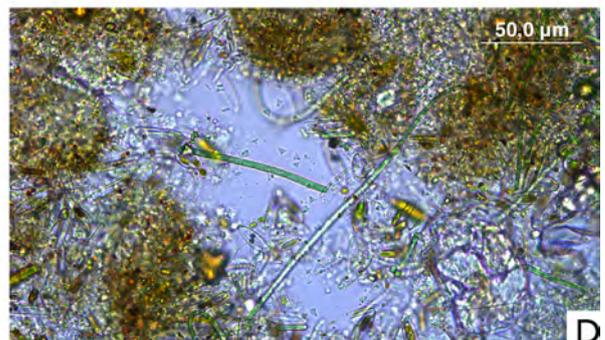
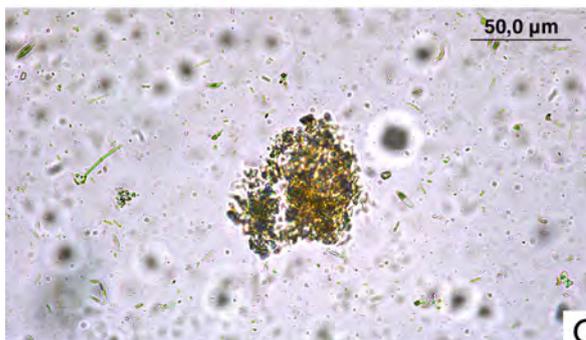
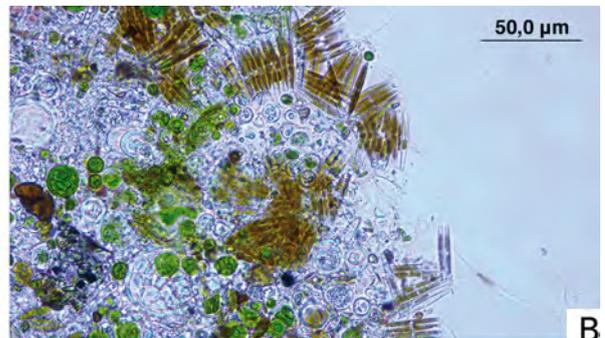


Figura 4. Población natural de microalgas creciendo sobre sustrato volcánico (picón). A. *Pseudanabaena*, B. *Chlorella* y *Navicula*, C. *Chroococcidiopsis*, D. Diatomeas.

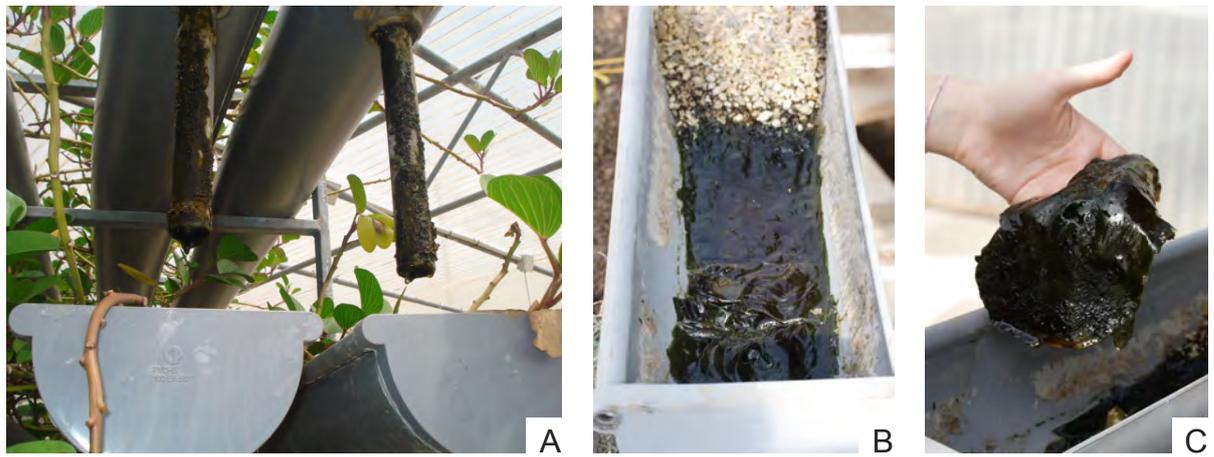


Figura 5. Tapete microbiano creciendo sobre sustrato artificial. A. Estructura piramidal sobre la cual crecen las plantas halófitas. B y C. Tapete de microalgas de color verde oscuro que se forma sobre los canales de PVC.

En el tapete microbiano que crece sobre sustrato artificial (PVC) dominaron las cianoprocariotas del género *Chroococcus* (del cual se observaron dos morfotipos; Fig. 6 A y B). Las cianoprocariotas filamentosas *Oscillatoria* (Fig. 6 F), *Microcoleus* (Fig. 6 D) y *Lyngbya* (Fig. 6 C),

también presentaron un porcentaje de cobertura representativo (tabla 2). Los géneros *Jaaginema*, *Limnothrix*, *Gloeocapsa* (Fig. 6 A) y *Navicula* mostraron porcentajes de cobertura menores al 25% (tabla 2). Este tapete presentó un color verde oscuro (Fig. 5).

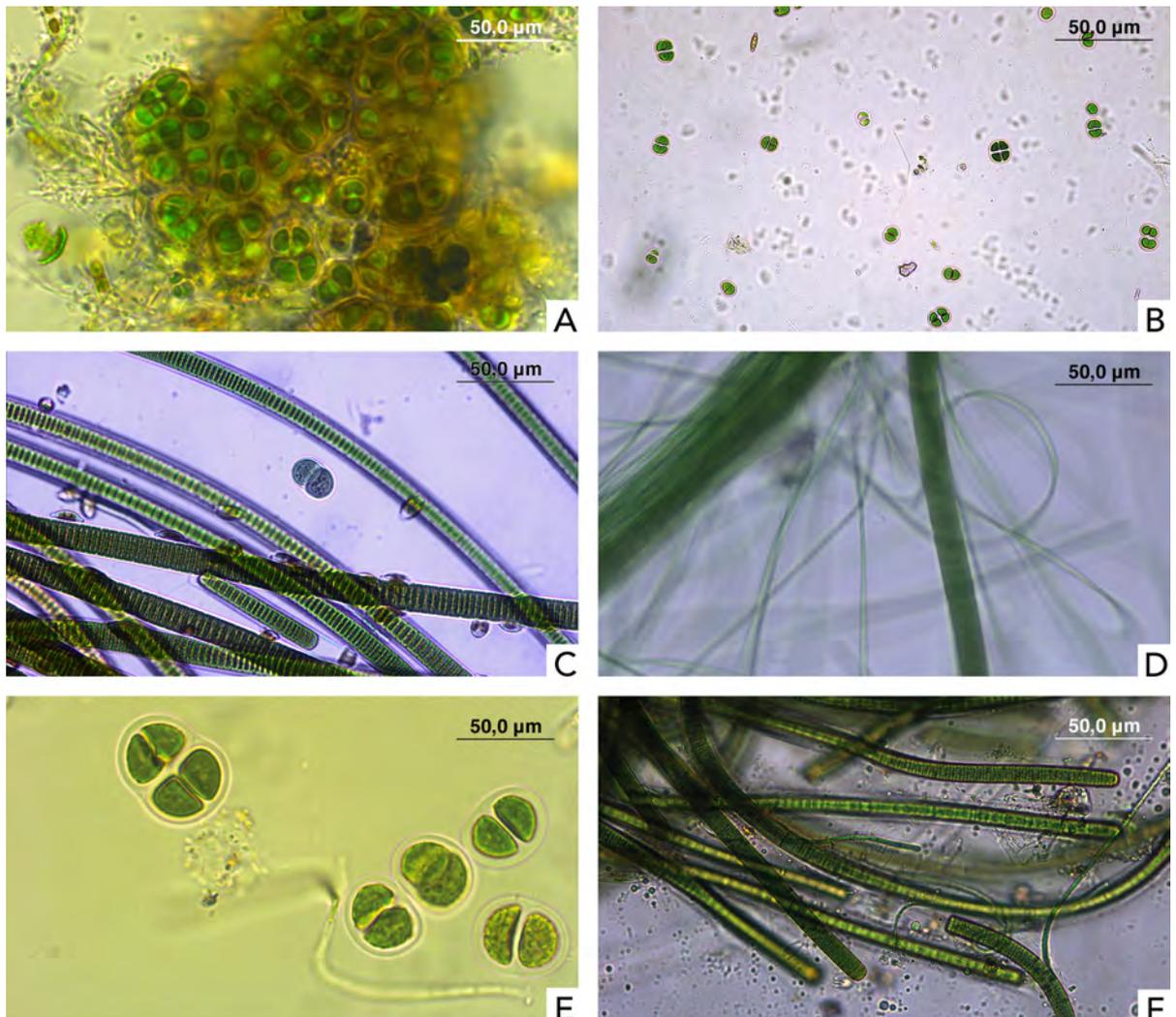


Figura 6. Población natural del tapete microbiano creciendo sobre sustrato artificial (PVC). A. *Gloeocapsa*, B y E. *Chroococcus*, C. *Lyngbya*, D. *Microcoleus*, F. *Oscillatoria*.

Tabla 2. Composición, cobertura y descripción taxonómica de las microalgas presentes en las poblaciones naturales que crecen sobre los tapetes microbianos del cultivo hidropónico de plantas halófitas. 5 = 75-100% de cobertura, 4 = 50-75% de cobertura, 3 = 25-20% de cobertura, 2 = 10-25% de cobertura, 1 < 10% de cobertura

Composición	Género	Tapete	Cobertura	Descripción	Referencia
Cianoprocariotas chroococcales	<i>Chroococcus</i>	Sustrato artificial	4	Forman pequeñas colonias de células, cada una de ellas con su propia vaina, con 2-16 células, ocasionalmente más numerosas, células irregulares, más o menos esféricas, que forman a menudo una nueva vaina cada vez que se dividen, de forma que un grupo de 4 células tiene células con 3 vainas diferentes. Las vainas son de color amarillo o incoloras. Algunas especies planctónicas tienen vacuolas de gas.	Komárek & Anagnostidis, 2005
	<i>Gloeocapsa</i>	Sustrato artificial	2	Unicelulares, coloniales, células encerradas en un mucílago de color amarillento, más o menos distantes unas de otras.	Komárek & Anagnostidis, 2005
	<i>Chroococciopsis</i>	Sustrato volcánico	3	Células esféricas, rara vez solitarias, formando colonias de forma irregular, los grupos de células están envueltos por una vaina delgada, firme e incolora.	Komárek & Anagnostidis, 2005
Cianoprocariotas filamentosas	<i>Oscillatoria</i>	Sustrato artificial	3	Tricomas cilíndricos, atenuados en los extremos, sin vaina, de forma recta o irregularmente curvada, con células más anchas que largas. El contenido de las células suele ser homogéneo, algunas veces granuladas, sin aerotopos.	Komárek & Anagnostidis, 2005
	<i>Jaaginema</i>	Sustrato artificial	1	Tricomas más o menos flexibles, sin vaina, no motiles, con células cilíndricas más largas que anchas.	Komárek & Anagnostidis, 2005
	<i>Limnothrix</i>	Sustrato artificial	2	Tricomas casi siempre solitarios, rectos, formados por células cilíndricas, más largas que anchas, con vaina hialina, motilidad nula o muy reducida.	Komárek & Anagnostidis, 2005
	<i>Lyngya</i>	Sustrato volcánico / sustrato artificial	1 / 3	Presenta tricomas cilíndricos que pueden ser o no atenuados en los extremos, con vaina (casi todas las veces), de forma recta o irregularmente curvada, con células varias veces más anchas que largas.	Komárek & Anagnostidis, 2005
	<i>Pseudanabaena</i>	Sustrato volcánico	2	Filamentos solitarios o aglomerados en forma de un tapete muy fino, ligeramente ondulada o arqueada, no ramificada, sin vaina, con células cilíndricas, siempre más largas que anchas.	Komárek & Anagnostidis, 2005
	<i>Microcoleus</i>	Sustrato volcánico / sustrato artificial	3 / 3	Filamentos solitarios o en matas, compuestos por una envoltura gelatinosa, generalmente incolora, homogénea, en la que están los tricomas dispuestos paralelamente.	Komárek & Anagnostidis, 2005
Chlorófitas	<i>Chlorella</i>	Sustrato volcánico	1	Células solitarias o agregadas en grupos pequeños, célula globosa o elipsoidal, cloroplasto único y parietal.	Bold y Wynne, 1985; Bourrelly, 1990
Diatomeas	<i>Navicula</i>	Sustrato volcánico / sustrato artificial	5 / 1	Individuos con valvas lanceoladas, estriadas transversalmente en la zona media, en sentido opuesto a los polos. Los extremos de la célula son redondeados.	Round et al., 2007; Ettl & Gartner, 2009

De los cuatro medios de cultivo empleados, solo se observó crecimiento algal en los experimentos realizados con medio GPM. De los 13 géneros observados en las muestras naturales, solo cuatro fueron aislados. Además, fueron aislados dos géneros que no se habían observado inicialmente en las muestras naturales. Todas las cepas obtenidas se aislaron mediante la combinación de las técnicas enriquecimiento, diluciones seriadas y aislamiento por capilaridad. Con las técnicas de aislamiento por siembra-rayado en agar y adhesión a vidrio cubreobjetos no se obtuvieron resultados positivos.

Los cultivos unialgales aislados del tapete creciendo sobre sustrato volcánico (picón) fueron:

- *Pseudanabaena limnetica* Komarek
- *Klebsormidium flaccidum* (Kützing) P.C.Silva, K.R.Mattox & W.H.Blackwell
- *Navicula* sp.
- *Chlorella* sp.

La cianoprocaríota *Pseudanabaena limnetica* y la clorófito *Klebsormidium flaccidum*, de las cuales se aislaron cepas unialgales, no fueron observadas en el análisis microscópico realizado a las muestras naturales. *Navicula* sp., aislada del tapete microbiano creciendo sustrato volcánico fue el único género aislado que corresponde al género dominante en la muestra natural.

Los cultivos unialgales aislados del tapete creciendo sobre sustrato artificial (PVC) fueron:

- *Lyngbya confervoides* C. Agardh ex Gomont
- *Oscillatoria margaritifera* Gomont

A continuación se presenta la descripción taxonómica de las diferentes especies aisladas:

- ***Pseudanabaena limnetica*** Komarek, 1974. Sinónimos: *Oscillatoria limnetica* Lemmermann 1900. Tricomas solitarios, ligeramente curvados, sin aerotopos, motil, células no atenuadas al final de los tricomas, células más largas que anchas, 1-2 µm de largo, 0,5-0,8 µm de ancho. Tricomas sin vaina (Fig. 7 A y B).
- ***Klebsormidium flaccidum*** (Kützing) P. C. Silva, K. R. Mattox y W. H. Blackwell 1972. Sinónimos: *Ulothrix flaccida* Kützing 1849, *Hormidium flaccidum* (Kützing) A. Braun

1876, *Stichococcus flaccidus* (Kützing) 1891, *Hormococcus flaccidus* (Kützing) Gay R. Chodat 1902, *Chlorhormidium flaccidum* (Kützing) Fott 1960. Filamentos largos, curvados, y libres, algo constreñidos en los septos; no presentan falsa ramificación. Las células son cilíndricas, 5-9 µm de anchas, 1-3 veces más largas que anchas, 10-14 µm de largas; cloroplastos con forma de riñón que cubren casi la mitad de la célula, provisto de un pirenoide. Género reportado como especie terrestre, aunque también se ha reportado en ambientes acuáticos, ya sea sumergidas o flotando (Masson *et al.*, sf). Especie cosmopolita (John, 2002; Fig. 7 C y D).

- ***Chlorella* sp.** Células pequeñas 4,8- 8,1 µm, esféricas a elipsoidales, solitarias la mayoría de las veces. Presenta un cloroplasto parietal con un pirinoide, células con pared delgada. (Bourrelly, 1990; Bold y Wynne, 1985; Fig 7 E y F).

- ***Navicula* sp.** Células solitarias, individuos con valvas lanceoladas, estriadas transversalmente en la zona media, en sentido opuesto a los polos. Los extremos de la célula son redondeados, 12,5 - 22,5 µm de largas. Tienen dos plastidios, uno a cada lado del plano apical, con un pirinoide en forma de bastón (Fig. 7 G y H).

- ***Lyngbya confervoides*** Agardh, C. Syst. Alg.: 73. 1824; según Gomont, M., Ann. Sci. Nat. Bot., Ser. 7, 16: 136, lám 3, figs. 5-6, 1892. (Geitler, 1932: 1061; Desikachary, 1959:314; Halperin, 1967: 297; Halperin, 1970: 52; Sant' Anna, 1970: 61). Filamentos dispuestos en fascículos o enmarañados, de color azul +/- verde oliva a verde intenso; vainas hialinas, incoloras, firmes, delgadas; tricomas no constrictos, células más anchas que largas, de 2-4 µm de largo, 11,3-13,5 µm de ancho con contenido citoplasmático y abundantes granulaciones, ápice no atenuado, célula apical con extremo redondeado. Es una especie típica de ambientes estuarinos y marinos, rara vez dulceacuícola. En Las Islas Canarias está descrita (Frémy y Borgesen 1936) (Komárek y Anagnostidis, 2005; Rodda y Parodi, 2005; http://www.algaebase.org/search/species/detail/?species_id=23787, 2010; Fig. 8 C y D).

- *Oscillatoria margaritifera* Kützing ex Gamont, 1892. Tricomas solitarios, ligeramente arqueados hacia los extremos, de color verde oliva. Tricomas redondeados hacia el final. Células más anchas que largas, 2,3- 3 μm de largas, 14,5- 15,2 μm de anchas, algunas veces granuladas. Especie marina, epifita de otras algas, piedras. En las islas canarias está descrita (Frémy y Borgesen, 1936) (Komárek

y Anagnostidis, 2005, http://www.algae-base.org/search/species/detail/?species_id=23790, 2011; Fig. 8 A y B).

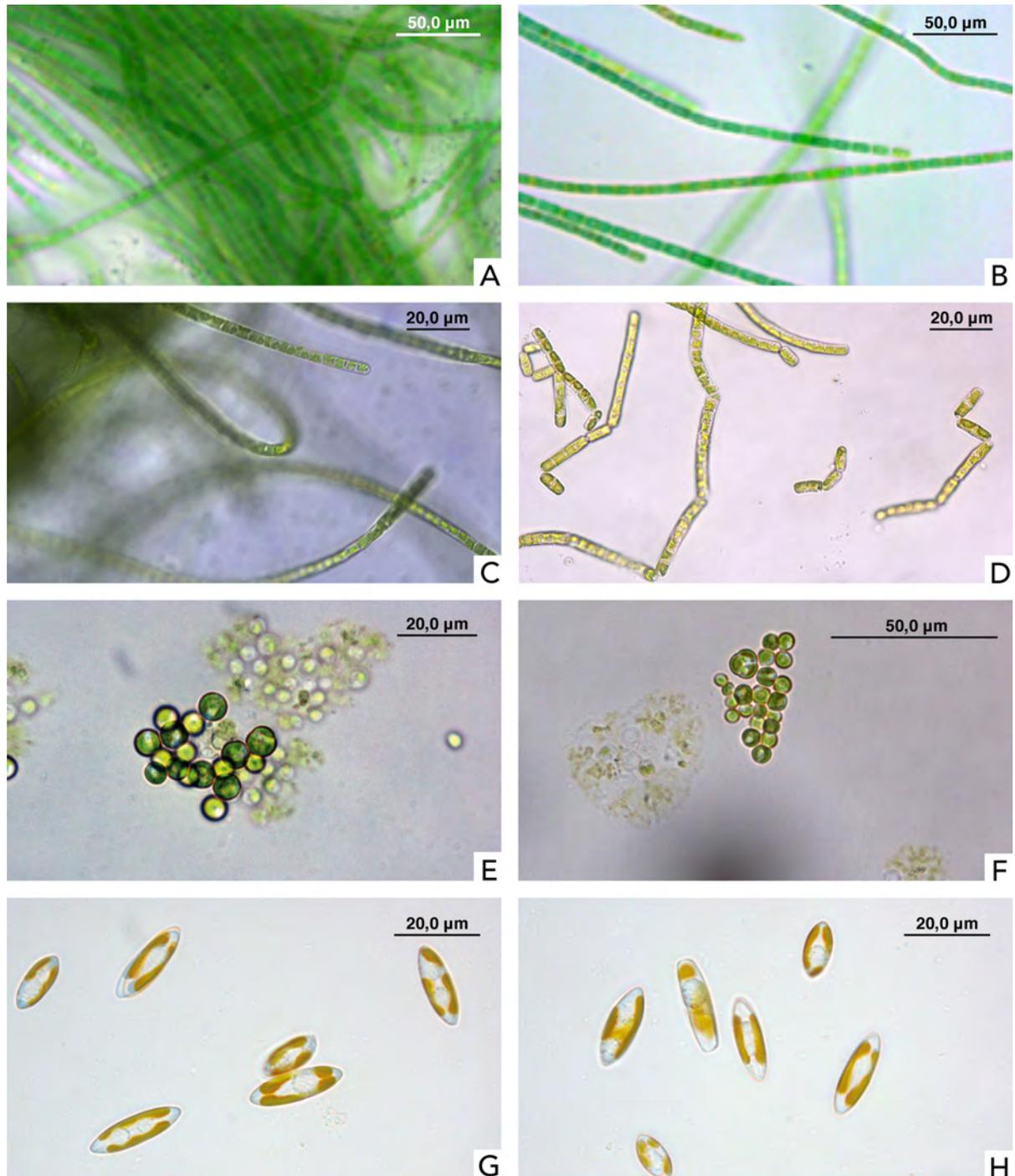


Figura 7. Microalgas aisladas del tapete creciendo sobre sustrato volcánico (picón). A y B. *Pseudanabaena limnetica*, C y D. *Klebsormidium flaccidum*, E y F. *Chlorella* sp., G y H. *Navicula* sp.

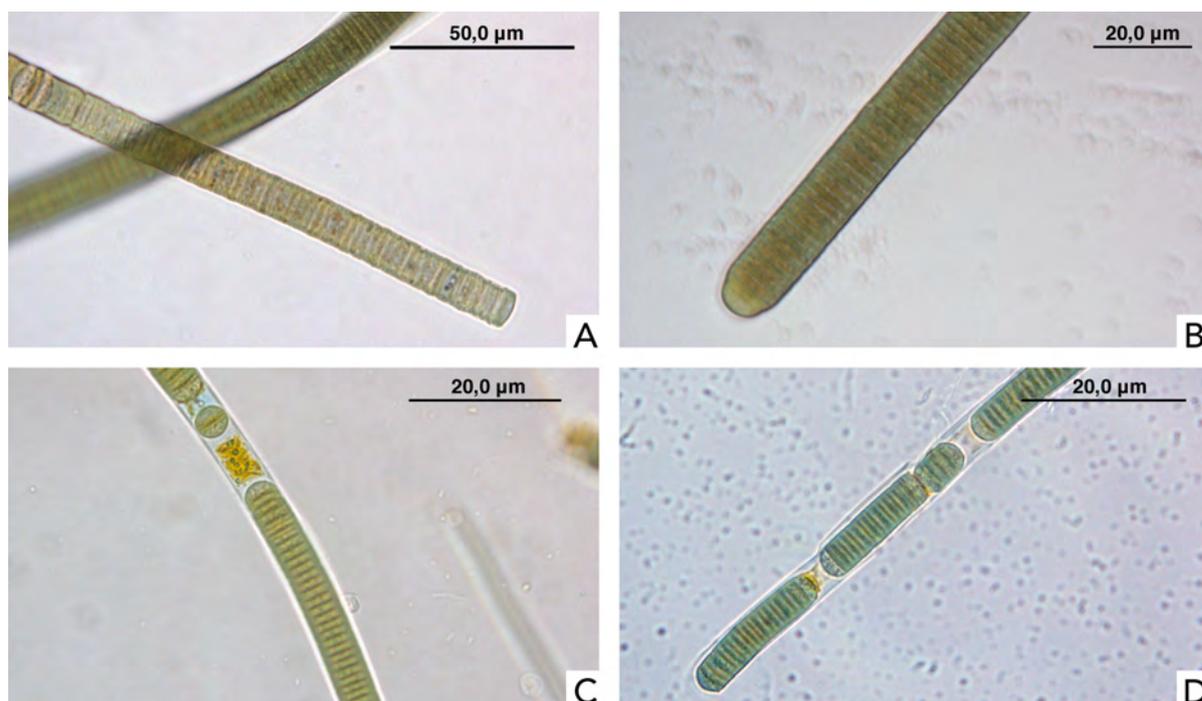


Figura 8. Cianoprocariotas filamentosas aisladas del tapete creciendo sobre sustrato artificial. A y B. *Oscillatoria margaritifera*, C y D. *Lynbya confervoides*.

DISCUSIÓN

Las características macroscópicas observadas en los tapetes microbianos estudiados, criterio tenido en cuenta para el muestreo, están estrechamente ligadas a la composición microbiana del mismo. Malamm Issa (1999); Richert *et al.*, (2006), describen las diferencias en cuanto al color y apariencia de los tapetes microbianos como punto de partida en sus estudios. En nuestro caso específico, el color verde oscuro y la apariencia enmarañada del tapete creciendo sobre sustrato artificial, está dada por su composición microbiana dominada por cianoprocariotas como *Oscillatoria*, *Jaagine-ma* y *Limnothrix*, cuyos tricomas se enredan entre sí, formando tapetes (Komárek y Anagnostidis, 2005). Igualmente, los parches de color marrón oscuro y claro que caracterizaron el tapete creciendo sobre sustrato volcánico, son un reflejo de su composición microbiana, dominada por diatomeas del género *Navicula*, de color pardo amarillento (Round *et al.*, 2007).

Las poblaciones naturales de microalgas creciendo sobre sustrato volcánico, y sustrato artificial, estuvieron dominadas por cianoprocariotas, en su mayoría filamentosas, estos resultados concuerdan con los obtenidos por otros autores en diferentes zonas áridas y semiáridas Malam Issa *et*

al., (1999), Garcia- Pinchel *et al.*, (2001), Sekar *et al.*, (2004), Richert *et al.*, (2006). Además de las cianoprocariotas, las demás microalgas observadas en este estudio han sido descritas como organismos formadores de tapetes microbianos. Su presencia, incluyendo los beneficios mencionados en el cuerpo del trabajo, contribuye al incremento de los nutrientes disponibles para la proliferación de plantas superiores, en este caso las halófitas. Estos resultados demuestran que los sustratos usados actualmente en el sistema de cultivo permiten el establecimiento de tapetes microbianos mucilaginosos. Lo expuesto anteriormente muestra que procesos como la inoculación de microalgas vivas al suelo (algalización), pueden ser una solución económica, fácil y realista para la bioremediación de suelos y la repoblación de zonas áridas y semiáridas (Rodgers *et al.*, 1979).

En poblaciones naturales de microalgas creciendo sobre sustratos artificiales (PVC), se han descrito tres fases de sucesión: la primera dominada por clorófitas, la segunda dominada por diatomeas y una tercera fase dominada por cianoprocariotas (Sekar *et al.*, 2004). El dominio de las cianoprocariotas en la fase tardía se atribuye a su capacidad de adherencia debido a la producción de mucílago (Silver, 1977; Huddon y Bourget, 1981; Korte Blinn, 1983; Sekar *et al.*, 2004). De

acuerdo con estos estudios, la población natural creciendo sobre sustrato artificial (PVC), está en una fase tardía de sucesión dominada por cianoprocariontes. Estudios anteriores (Campbell, 1979; Lange *et al.*, 1992; Johansen, 1993; Malam Issa *et al.*, 1999), obtuvieron resultados similares a los obtenidos en este trabajo. Dichos estudios, describen a las cianoprocariontes, principalmente filamentosas, como microalgas dominantes, creciendo sobre sustratos naturales de zonas áridas y semiáridas, bajo condiciones climatológicas que se asemejan a las simuladas en invernadero para el cultivo en estudio.

La composición microbiana de las poblaciones naturales de los tapetes estudiados, tanto en sustrato artificial como natural, estuvo representada por cianoprocariontes Chroococcales y Oscillatoriales, pero en ninguno de los casos se observaron cianoprocariontes Nostocales, las cuales fijan nitrógeno desde la atmósfera. Esta ausencia de cianoprocariontes Nostocales podría atribuirse a que en sistemas de suelo estas especies no son oportunistas y necesitan tiempo para establecerse.

Las cepas aisladas representan un subconjunto del total de microalgas observadas en las poblaciones naturales, y dentro de este subconjunto pueden aparecer cepas que en un principio no fueron observadas en las muestras naturales. Al igual que en los resultados obtenidos en este estudio, Richert *et al.*, (2006) describen que de siete cepas de microalgas aisladas desde una muestra natural, sólo tres fueron observadas al microscopio inicialmente. Los autores atribuyen este resultado a una presencia de estos géneros como componente menor de la población natural. Esto demuestra que el aislamiento directo de cepas, es insuficiente para caracterizar la diversidad microbiana, puesto que se “desprecia” la diversidad críptica, que puede ser tanto o más importante para la repoblación de tapetes naturales cuando se presentan cambios en las condiciones medioambientales.

El aislamiento de cepas de microalgas no observadas en las poblaciones naturales (diversidad críptica), puede atribuirse tanto al enriquecimiento empleando diferentes medios de cultivo, como a la técnica de aislamiento empleada. Andersen (2005), discute que el método de aislamiento por enriquecimiento contribuye a que organismos no observados inicialmente, pueden aparecer después de varios días. La adición de diferentes nu-

trientes (pH y salinidad diferentes), promueve el crecimiento microbiano, y establece una ventaja competitiva de unas especies frente a otras. En nuestro caso, los mejores resultados se obtuvieron con medio GPM. Además de ser este el medio de cultivo al que están expuestos continuamente los tapetes estudiados, es probable que sustancias orgánicas presentes en algunos de los otros medios de cultivo empleados en este estudio (vitaminas, compuestos nitrogenados), hayan contribuido al rápido crecimiento de bacterias, cambiando las condiciones del medio (volviéndolo anóxico y/o tóxico para las microalgas; Andersen, 2005).

Al igual que en los resultados obtenidos en este estudio, otros autores Almager *et al.*, (2004); Surek y Melkonian (2004); Zapomelova *et al.*, (2009); Kómarková *et al.*, (2009), obtuvieron resultados positivos empleando técnicas de aislamiento por enriquecimiento, diluciones seriadas y aislamiento por capilaridad. Estos mismos autores también obtuvieron resultados positivos empleando técnicas de aislamiento por siembra-rayado en agar (Almager *et al.*, 2004; Surek y Melkonian, 2004) y adhesión a vidrio cubreobjetos (Kómarková, comunicación personal, 2010). Sin embargo, con las técnicas de aislamiento por siembra-rayado en agar y adhesión a vidrio cubreobjetos no se obtuvieron resultados positivos en este estudio. En cuanto al aislamiento por siembra-rayado en agar el porcentaje de agar empleado (2%) pudo favorecer el crecimiento de hongos y bacterias antes que el de microalgas. Según Andersen (2005), un porcentaje más apropiado para este tipo de organismos oscila entre 0,8 y 1,5 %. Sin embargo, el mismo autor plantea que la concentración de agar no suele ser un factor determinante. Por otro lado, los resultados negativos obtenidos con la técnica adhesión a vidrio cubreobjetos, pueden deberse a la mayor exposición de las muestras al medio.

Actualmente, se está llevando a cabo la identificación de las cepas aisladas mediante técnicas de biología molecular, de acuerdo a Marin y Melkonian (2009), que consiste en la selección del locus que codifica al ARN ribosomal, tanto la subunidad pequeña (16S o 18S), como la grande (23S o 28S) así como las regiones intercalantes (ITS). Para aumentar la eficacia en la identificación y discriminación de las bases aisladas se determinará la estructura secundaria del ARN ribosomal (Coleman *et al.*, 2009) y se llevarán a cabo estu-

dios filogenéticos.

Los resultados preliminares de este trabajo fueron presentados en el International Symposium FloraMac celebrado en Ponta Delgada, Azores, Portugal. Septiembre 23-25 de 2010, con el título *Characterization of The Microalgal Crust Co-Cultivated from Marine Agronomy of Halophytes in Hydroponic System.*

CONCLUSIONES

1. Once géneros de microalgas fueron observados en las muestras naturales de los tapetes microbianos creciendo sobre sustrato volcánico (picón) y sustrato artificial (PVC), en el cultivo hidropónico de plantas halófitas. Cinco de los 11 géneros fueron observados exclusivamente en el sustrato artificial (*Chroococcus*, *Gloeocypsa*,

Oscillatoria, *Jaaginema* y *Limnothrix*), tres en el sustrato volcánico (*Chroococciopsis*, *Pseudanabaena* y *Chlorella*), y tres creciendo sobre los dos tipos de sustrato (*Lyngbya*, *Microcoleus* y *Navicula*).

2. La composición microbiana de los tapetes creciendo tanto sobre sustrato volcánico y sobre sustrato artificial estuvo dominada por cianoprocariontes filamentosas.
3. Se confirma que el color y la apariencia del tapete son parámetros que deben ser tomados como referencia a la hora de realizar un muestro para desarrollar estudios que incluyan la caracterización y descripción de tapetes microbianos.
4. Mediante la combinación de las técnicas de aislamiento-enriquecimiento, diluciones seriadas y aislamiento por capilaridad, se obtuvieron seis cultivos de cepas unialgales, con potencial en la regeneración de sustratos áridos y semiáridos.

BIBLIOGRAFÍA

- ANAGNOSTIDIS, K. & KOMÁREK, J. (1988). Modern approach to the classification system of Cyanophytes. 2-Oscillatoriales. *Arch. Hydrobiol. Suppl.* 80, 1-4 *Algol. Stud.* 50-53: 327-472.
- AGARDH, C. (1824) In: GUIRY, M.D. (2010). *Lyngbya confervoides*. Accessed through: World Register of Marine Species. Retrieved September 14, 2011. Available in the: <http://www.marinespecies.org/aphia.php?p=taxdetails&id=211665>
- ANDERSEN, R.A. (2005). *Algal Culturing Techniques*. Phycological society of America. 578 p
- BARCLAY, W.R. & LEWIN, R.A. (1985). Microalgal polysaccharide production for the conditioning of agricultural soils. *Plant and Soil.* 88: 159-169.
- BARSANTI L. & GUALTIERI P. (2006). *Algae. Anatomy, biochemistry, and Biotechnology*. Boca Raton, FL.; Taylor y Francis Group. 301 p.
- BAULD, J. (1984). Microbial mats in marginal marine environments: Shark Bay, Western Australia, and Spencer Gulf, South Australia. In: Cohen, Y.; Castenholz, R.W. & Halvorson, H.O. (eds). *Microbial mats stromatolites*. New York, USA.: Alan R. Liss, p. 39-58.
- BELNAP, J. (1993). Recovery rates of crytobiotic crusts: inoculant use and assessment methods. *Great Basin Nat.* 53: 89-95.
- BELNAP, J. & GARDNER, J.S. (1993). Soil microstructure in the soil of the Colorado plateau: the role of the cyanobacterium *Microcoleus vaginatus*. *Great Basin Nat.* 53: 40-47.
- BELNAP, J. & LANGE, O.L. (2003). *Biological Soil Crusts: Structure, Function, and Management*. 1sted. Ed. Berlin: Springer. 503 p.
- BOLD, H.C. & WYNNE, M.J. (1985). *Introduction to the Algae. Structure and reproduction*. Englewood Cliffs, New Jersey: Prentice-Hall, Inc., 720 pp., ISBN 0-13-47746-8.
- BOURRELLY, P. (1990). *Les algues d'eau douce. Initiation a la Systématique. I: Les Algues Vertes*. Paris: N. Boubée & Cie.
- BRAUN, A. (1876) In: GUIRY, M.D. (2010). *Lyngbya confervoides*. Accessed through: World Register of Marine Species . Retrieved September 14, 2011. Available in the: <http://www.marinespecies.org/aphia.php?p=taxdetails&id=211665>
- CALLOW, M.E. (1993). A review of fouling in freshwaters. *Biofouling.* 7:313-327.
- CAMERON, R.E. & DEVANEY, J.R. (1970). Antarctic soil algal crust: scanning electron and optical microscope study. *Trans. Amer. Microsc. Soc.* 39: 264-273.
- CAMPELL, E. (1979). Soil stabilization by prokaryotic desert crusts: implications for precambian land biota. *Progin Life.* 9: 335-348.
- CARAUS, I. (2002). The algae of Romania. *Studii si Cercetari, Universitatea Bacau, Serie: Biologie.* 7: 1-694.
- CHODAT, T.R. (1902) In: GUIRY, M.D. (2010). *Lyngbya confervoides*. Accessed through: World Register of Marine Species. Retrieved September 14, 2011. Available in the: <http://www.marinespecies.org/aphia.php?p=taxdetails&id=211665>
- COLEMAN, A.W. (2009). Is there a molecular key to the level of "biological species" in eukaryotes? A DNA guide. *Molecular Phylogenetics and Evolution.* 50: 197-203
- DECHO, A.W. (1990). Microbial exopolymer secretions in ocean environments: their role(s) in food webs and marine processes. *Oceanogr. Mar. Biol.* 28: 72-153.
- DEMERGASSO, C.; CHONG, G.; GALLEGUILLOS, L.; MARTÍNES, M. y ESTEVE, I. (2003). Tapetes microbianos del Salar de Llamará, norte de Chile. *Revista Chilena de Historia Natural.* 76: 485-499.

- DESIKACHARY, T.V. (1959). Cyanophyta. I.C.A.R. Monographs on algae. New Delhi: Indian Council. Agric. Res. 686 p.
- ETTL, H. & GÄRTNER, G. (2009). Süßwasserflora von Mitteleuropa, Bd: Chlorophyta 2: Tetrasporale, Chlorococcales, Gloeodendrales. 436 p.
- FOTT (1960) In: GUIRY, M.D. (2010). *Lyngbya confervoides*. Accessed through: World Register of Marine Species. Retrieved September 14, 2011. Available in the: <http://www.marinespecies.org/aphia.php?p=taxdetails&id=211665>
- FRÉMY, P. & BØRGESEN, F. (1936). Marine algae from the Canary Islands especially from Teneriffe and Gran Canaria IV. Cyanophyceae. *Kongelige Danske Videnskabernes Selskab, Biologiske Meddelelser* 12(5): 1-43.
- GAMONT (1892). Monographie des Oscillarées (Nosctocacées homocystées). *Annales des Sciences Naturelles, Botanique, Serie* 716:91-264, Plates 1-7.
- GARCÍA-PINCHEL, F.; LÓPEZ-CORTÉS, A. & NÜBEL, U. (2001). Phylogenetic and morphological diversity of Cyanobacteria in soil desert crusts from the Colorado Plateau. *Appl. Environ. Microbiol.*, 67: 1902-1910.
- GEITLER, L. (1932). Cyanophyceae. In: Kolkwitz, R. (ed.). *Rabenhorst's Kryptogamen Flora von Deutschland, Österreich und der Schweiz*. 14: 1-1196.
- GOLUBIC, S. (1967). Algen vegetation der felsen, Eine ökologische Algenstudie im dinarischen Karstgebiet, Binnengewässer 23. Stuttgart: Schweizerbart'sche Verlagsbuchhandlung.
- GUILLARD, R.R.L. & RHYTHER, J.H. (1962). Studies of marine planktonic diatoms. I. *Cyclotella nana* Hustedt and *Detonula confervacea* Cleve. *Can. J. Microbiol.* 8: 229-239.
- HALPERIN, D.R. (1967). Cianofíceas marinas de Puerto Deseado (Provincia de Santa Cruz, Argentina) II. *Darwiniana* 14: 273-354.
- HALPERIN, D.R. (1970). Cianofíceas marinas del Chubut (Argentina) I. Golfo San José, Golfo Nuevo y alrededores de Rawson. *Physis*. 30: 33-96.
- HARPER, K.T. & PENDLETON, R.L. (1993). Cyanobacteria and Cyanolichens: can they enhance availability of essential minerals for higher plants? *Great Basin Naturalist*. 53: 89-95.
- HARRISON, J.J.; RAYMOND, J.T.; MARQUES, L.R. y CERI, H. (2006). Biopelículas. Los avances en el conocimiento de estas comunidades microbianas están desencadenando una revolución que puede transformar la microbiología. *Investigación y Ciencia*. 76 -83.
- HOSHAW, R. & ROSOWAKI, J. (1973). Methods for microscopic algae. In: RIPPKA, R. (1988). Isolation and Purification of Cyanobacteria. *Experientia* 49: 825-829.
- HU, C.; LIU, Y.; SONG, L. & ZHANG, D. (2002). Effect of desert soil algae on the stabilization of fine sands. *Journal of Applied Phycology*. 14: 281-292.
- HUDDON, C. & BOUGET, E. (1981). Initial colonization of artificial substrate: community development and structure studied by scanning electron microscopy. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.* 59: 1371-1384.
- JEFFRIES, D.L.; KLOPATEC, J.M.; LINK, S.O. & BOLTON, J.R. (1992). Acetylene reduction by cryptogamic crusts from abluclbrush community as related to resaturation and dehydration. *Soil. Bio. Biochem.* 24:1101-1105.
- JOHANSEN, J.R. (1993). Cryptogamy crusts of semiarid and arid lands of North America. *J. Phycol.* 29:140-147.
- JOHN, D.M. (2002). Orders Chaetophorales, Klebshormidiales, Microsporales, Ulotrichales. In: *The Freshwater Algal Flora of the British Isles. An identification guide to freshwater and terrestrial algae*. (JOHN, D.M.; WHITTON, B.A. & BROOK, A.J. Eds), pp. 433-468. Cambridge: Cambridge University Press.

- KÓMÁREK (1974) In: GUIRY, M.D. (2010). *Lyngbya confervoides*. Accessed through: World Register of Marine Species. Retrieved September 14, 2011. Available in the: <http://www.marinespecies.org/aphia.php?p=taxdetails&id=211665>
- KÓMÁREK, J. & ANAGNOSTIDIS, H. (2005). Cynoprokaryota, 2, Oscillatoriales. In: *Süßwasserflora von Mitteleuropa*, Col. 19/2.
- KOMÁRKOVÁ, J.; JEZBEROVÁ, J.; KOMÁREK, O. & ZAPOMELOVA, E. (2010). Variability of *Chroococcus* (Cyanobacteria) morphospecies with regard to phylogenetic relationship. *Hydrobiologia*. 639: 69-83.
- KORTE, V.L. & BLINN, W.D. (1983). Diatom colonization on artificial substrata in pool and riffle zones studies by light and scanning electron microscopy. *Journal of Phycology. An International Journal of Algal Research*. 19(3): 332-341.
- KRAMMER, K. & LANGE-BERTALOT, H. (2000). Bacillariophyceae 3. Teil, Centrales, Fragilariaceae, Eunotiaceae. Ergänzte und korrigierte 2. Auflage. – In: Ettl, H., Gerloff, J., Heynig, H. & Mollenhauer, D. (eds): Süßwasserflora von Mitteleuropa. 2 (3) ed. 2. Spektrum, Heidelberg & Berlin.
- KÜTZING (1891). SILVA, P.C.; MATTOX, K.R. & BLACKWELL, W.H. (1972). In: GUIRY, M.D. & GUIRY, G.M. (1984). *AlgaeBase*. World-wide electronic publication, National University of Ireland, Galway. Retrieved September 14, 2011. Available in the: <http://www.algaebase.org>
- KÜTZING (1849). SILVA, P.C.; MATTOX, K.R. & BLACKWELL, W.H. (1972). In: GUIRY, M.D. & GUIRY, G.M. (1984). *AlgaeBase*. World-wide electronic publication, National University of Ireland, Galway. Retrieved September 14, 2011. Available in the: <http://www.algaebase.org>
- LANGE, S.; ROZARIO, C. & MÜLLER, M. (1994). Primary structure of the hydrogenosomal adenylate kinase of *Trichomonas vaginalis* and its phylogenetic relationships. *Mol Biochem Parasitol*, 66: 297–308.
- LEMMERMAN (1900). In: GUIRY, M.D. & GUIRY, G.M. (1984). *AlgaeBase*. World-wide electronic publication, National University of Ireland, Galway. Retrieved September 14, 2011. Available in the: <http://www.algaebase.org>
- LYNCH, J.M. & BRAGG, E. (1985). Microorganisms and soil aggregate stability. *Adv. Soil Sci.*, 2: 134–170.
- MALAM ISSA, O.; TRICHET, J.; DÉFARGE, C.; COUTÉ, A. & VALENTIN, C. (1999). Morphology and microstructure of microbiotic soil crust on a tiger bush sequence (Niger, Sahel). *Catena*. 37: 175-196.
- MALAM ISSA, O.; BISSONNAIS, Y.; DÉFARGE, C. & TRICHENT, J. (2001). Role of a cyanobacterial cover on structural stability of sandy soils in the Sahelian part of western Niger. *Geoderma* 101:15–30.
- MALAM ISSA, O.; DÉFARGE, C.; BISSONNAIS, Y.; MARIN, B.; DUVAL, O.; BRUAND, A.; D'ACQUI, L.; NORDENBERG, S. & ANNERMAN, M. (2007). Effects of the inoculation of cyanobacteria on the microstructure and structural stability of a tropical Soil. *Plan. and Soil*. 290: 209-219.
- MARIN, B. & MELKONIAN, M. (2009). Molecular Phylogeny and Classification of the Mamiellophyceae class. Nov. (Chlorophyta) based on Sequence Comparisons of the Nuclear- and Plastid-encoded rRNA Operon. *Protist* 161, 304-336.
- MASSON, M.; ALBERGHINA J. & VIGNA, S. (sf). Ultraestructura y biología de dos especies pertenecientes al género *Klebsormidium* (Charophyceae, Chlorophyta). Laboratorio de Fisiología y Cultivo experimental. Buenos Aires: UBA. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales.
- PRINGSHEIM, E.C. (1912). Die Kultur von algen in agar. *Beitr. Biol. Pflanz*. 11: 305-33.
- PRINGSHEIM, E.C. (1946). Pure cultures of algae. Cambridge Univ. Press, London, 119 p.

- RICHERT, L.; GOLUBIC, S.; GUÉDÉS, R.; HERVÉ, A. & PAYRI, C. (2006). Cyanobacteria populations that build "Kapora" microbial mats in Rangiroa, Tuamotu Archipelago, French Polynesia. *Eur. J. Phycol.* 42(3): 259-279.
- RODDA, C. y PARODI, E. (2005). Cyanophyceae Epipelicas de la Marisma "El Cangrejal" en el estuario de Bahía Blanca (Buenos Aires, Argentina). *Bol. Soc. Argent. Bot.* 40 (3-4): 157-168.
- RODGERS, G.A.; BERGMAN, E.; HENRIKSON, E. & UDRIS, M. (1979). Utilization of blue-green algae as a biofertilizers. *Plant and Soil* 52, 99-107.
- ROUND, F.E.; CRAWFORD, R.M. & MANN, D.G. (1990). The diatoms, biology and morphology of the genera. Cambridge University Press, Cambridge. 747 p.
- SANT'ANNA, C.L. (1997). Cyanophyceae marinhas bentônicas da região de Ubatuba, SP, Brasil. *Hoehnea*. 24(2): 57-74.
- SEKAR, R.; VENUGOPALAN, V.P.; NANDAKUMAR, K.; NAIR, K.V.K. & RAO, V.N.R. (2004). Early stages of biofilm succession in a lentic freshwater environment. *Hydrobiologia*. 512: 97-108.
- SILVA, P.C.; MATTOX, K.R. & BLACKWELL, W.H., JR. (1972). The generic name Hormidium as applied to green algae. *Taxon* 21: 639-645.
- SILVER, P.A. (1977). Comparison of attached diatom communities on natural and artificial substrates. *J. Phycol.* 13: 402-406.
- STEIN, J.R. (1973). Handbook of Phycological Methods. Culture methods y growth measurements. London: Cambridge University Press. 457 p.
- SUREK, B. & MELKONIAN, M. (2004). Culture Collections of algae: Increasing accessibility and Exploring Algal Biodiversity. *Nova Hedwigia*. 79: 77-92.
- VERRECHIA, E.; YAIR, A.; KRIDON, G.J. & VERRECHIA, K. (1995). Physical properties of the psammophile cryptogamic crusts and their consequences to the water regime of sandy soils, north-western. Negev. Desert. Israel. *J. Arid. Envir.* 29:427-437.
- ZAPOMELOVÁ, E.; REHAKOVA, K.; JEZBEROVA, J. & KOMARKOVÁ, J. (2010). Polyphasic characterization of eight planktonic *Anabaena* strains (Cyanobacteria) with reference to the variability of 61 *Anabaena* populations observed in the field. *Hydrobiologia* 639: 99-113.
-