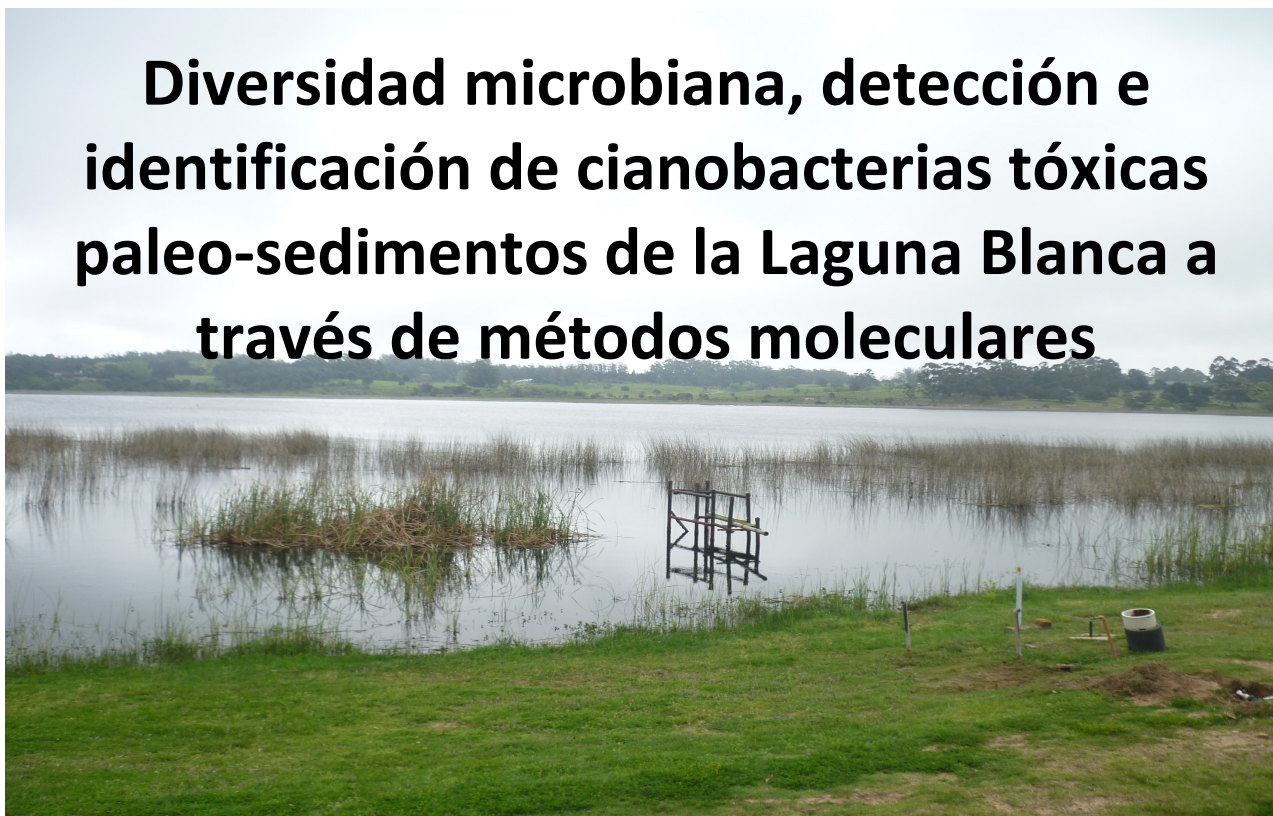




TESIS DE GRADO
LICENCIATURA EN BIOQUIMICA

Diversidad microbiana, detección e identificación de cianobacterias tóxicas paleo-sedimentos de la Laguna Blanca a través de métodos moleculares



Gabriela Martínez de la Escalera Siri

Orientadora:

Dra. Claudia Piccini
Departamento de Microbiología
Instituto de Investigaciones Biológicas Clemente Estable

Coorintador:

Dr. Dermot Antoniades
Sección Limnología
Facultad de Ciencias, Universidad de la República

Laboratorio de ejecución:

Departamento de Microbiología
Instituto de Investigaciones Biológicas Clemente Estable

Junio 2013

ÍNDICE

Página

ÍNDICE.....	1
RESUMEN.....	4
INTRODUCCIÓN.....	6
Cianobacterias y sus floraciones en ecosistemas acuáticos.....	6
<i>Cylindrospermopsis raciborskii</i>	8
Paleolimnología.....	9
Marcadores moleculares de diversidad bacteriana y <i>fingerprinting</i>	12
Laguna Blanca.....	15
HIPÓTESIS Y OBJETIVO.....	16
Hipótesis.....	16
Objetivo general.....	16
Objetivos específicos.....	16
METODOLGÍA.....	17
Estrategia de la investigación.....	17
<i>Sitio de estudio</i>	18
<i>Muestreo</i>	18
<i>Materia orgánica y clorofila a total</i>	18
<i>Extracción y purificación de ADN en muestras de sedimento</i>	19
<i>PCR (reacción en cadena de la polimerasa) de los ITS</i>	20

<i>RISA</i>	21
<i>DGGE</i>	22
<i>Análisis de las imágenes de fingerprinting</i>	22
<i>Biblioteca de clones</i>	22
Obtención de células competentes.....	22
Preparación del fragmente de ADN a clonar.....	23
Ligación.....	23
Transformación.....	23
<i>Secuenciación y análisis filogenético de las secuencias</i>	24
<i>Análisis estadísticos</i>	25
RESULTADOS	26
Análisis de la materia orgánica y clorofila <i>a</i> total.....	26
Obtención de ADN a partir de muestras de sedimento de la Laguna Blanca.....	27
Análisis de la comunidad microbiana.....	29
1) <i>Obtención de amplicones correspondientes al ITS del operón ribosomal</i>	29
2) <i>Análisis de la comunidad microbiana mediante RISA</i>	29
3) <i>Análisis de la comunidad microbiana mediante DGGE</i>	31
4) <i>Estudios de la diversidad microbiana mediante secuenciación del ITS</i>	33
5) <i>Identificación de cianobacterias</i>	35
DISCUSIÓN	37
CONCLUSIONES	46
PERSPECTIVAS	47

AGRADECIMIENTOS.....48

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....49

ANEXO.....59

RESUMEN

Las cianobacterias y sus floraciones son causa de preocupación ya que pueden producir toxinas (cianotoxinas) que afectan negativamente otros organismos presentes en el medio acuático, así como también al ser humano. Una de las especies que ha llamado la atención científica reciente es *Cylindrospermopsis raciborskii* (Orden Nostocales) por su comportamiento invasor. Se ha descrito que las poblaciones uruguayas producen saxitoxina (neurotoxina). Algunas hipótesis actuales proponen que las floraciones tóxicas de esta especie es un fenómeno que está en aumento en las últimas décadas, pero existen pocos registros limnológicos históricos de larga data para determinar cuánto ha cambiado su comportamiento. El estudio de los archivos sedimentarios de ecosistemas acuáticos puede brindar información sobre el pasado del ecosistema, sobre cambios en los impactos antropogénicos, en el clima y el ambiente, y sobre las respuestas y las interacciones de los organismos frente a estos cambios. El objetivo de este estudio fue analizar la presencia de cianobacterias potencialmente tóxicas, así como conocer la diversidad bacteriana en muestras de sedimentos de la Laguna Blanca correspondientes a los últimos siglos. Este ecosistema tiene registros de floraciones de *C. raciborskii*, entre otras cianobacterias, en los últimos 20 años. El estudio se basó en la comparación de la diversidad bacteriana de muestras de un testigo de sedimento de la Laguna Blanca a través de la extracción de ADN y distintos métodos de *fingerprinting* (huellas dactilares), RISA y DGGE, empleando la región intergénica transcrita (ITS) que se encuentra entre los genes 16S y 23S del operón ribosomal. De acuerdo a una datación previa, las muestras de sedimento analizadas correspondieron aproximadamente a los años 1800, 1820, 1995 y 2008. En este trabajo se extrajo por primera vez ADN de paleo-sedimento de un sistema acuático de Uruguay y se logró amplificar la región ITS de todas las muestras. Se observó que los patrones del ensamblaje bacteriano de las muestras correspondientes a los años más recientes (~1995 y ~2008) tenían más similitud entre sí que con las muestras más antiguas (~1800 y ~1820), siendo los patrones de estas últimas también más similares entre sí que con las recientes. A partir del ADN obtenido de las muestras más recientes se generó una biblioteca de clones de la región ITS, cuyas secuencias y posterior análisis filogenético revelaron la presencia de las cianobacterias: *Geitlerinema* sp. y *C. raciborskii*. La diversidad microbiana fue relacionada con alteraciones ocurridas en la laguna y su cuenca, como el aumento de la urbanización en la zona de la laguna y la remoción de tierra de la cuenca. Este estudio brinda información relevante para comprender la presencia de *C. raciborskii* y otras cianobacterias, y señala la importancia de

bioindicadores moleculares como una técnica sensible y promisorio para trazar cianobacterias en estudios de reconstrucción histórica.

INTRODUCCIÓN

Cianobacterias y sus floraciones en ecosistemas acuáticos

El agua es un recurso esencial para el desarrollo y supervivencia de las poblaciones humanas que está sufriendo la presión antropogénica en todo el mundo. Uno de los eventos que afecta el agua es el incremento en la frecuencia e intensidad de las floraciones de cianobacterias (crecimiento poblacional abrupto y masivo). Las cianobacterias son procariotas fotosintéticos aeróbicos y son los organismos fotosintetizadores más antiguos del planeta, lo que les ha permitido colonizar con éxito diversos tipos de ecosistemas. Además de ser relevantes desde el punto de vista ambiental, son también elementos claves para comprender la evolución de la vida en la Tierra, ya que fueron los organismos responsables de crear la atmósfera oxidante mediante la fotosíntesis con liberación de oxígeno (Whitton y Potts, 2000; Tomitani et al., 2006).

Las cianobacterias son un grupo diverso que incluye formas unicelulares, filamentosas y coloniales (Saker et al., 2009). Algunas especies de cianobacterias tienen la capacidad de fijar nitrógeno atmosférico (N_2) mediante células especializadas denominadas heterocitos; esta capacidad es exclusiva de las cianobacterias, lo que les otorga una ventaja sobre otros grupos a la hora de colonizar diversos ambientes, incluso en aquellos donde la concentración de nitrógeno es baja. Las cianobacterias que viven en sistemas acuáticos tienen la capacidad de regular su posición en la columna de agua mediante la presencia de vesículas de gas. Gracias a estos organelos, estos microorganismos pueden cambiar su exposición a la luz, reduciendo la mortalidad por sedimentación y tienen acceso temporal a capas profundas de la columna de agua con mayor disponibilidad de nutrientes (Oliver y Ganf, 2000). Además, varias especies de cianobacterias presentan estructuras de resistencia (acinetes o acinetos) que se forman durante períodos de estrés ambiental. Los acinetes son de gran tamaño en relación a las células, ya que poseen una pared celular engrosada y una alta acumulación de reservas de energía como almidón y lípidos, así como gránulos de cianoficina como fuente de nitrógeno (Castenholz y Waterbury, 1989). Se ha descrito que el ADN de una población puede conservarse en estas estructuras en el sedimento por períodos prolongados sin ser degradado (Lindahl, 1993; Poinar et al., 1996; Willerslev et al., 2004).

El principal factor que favorece el desarrollo de floraciones de cianobacterias es la eutrofización del cuerpo de agua, a lo que se le suma el efecto del cambio climático (Reynolds, 1984; Paerl y Huisman, 2008). La eutrofización es el enriquecimiento de nutrientes en un ecosistema acuático (Lampert y Sommers, 2007), donde estos nutrientes (principalmente fósforo y nitrógeno) pueden provenir de forma tanto natural como antrópico. Estos nutrientes provienen de aportes puntuales de aguas residuales domésticas o industriales no tratadas, vertidas directa o indirectamente a los sistemas acuáticos y de aportes difusos de aguas provenientes por erosión de suelos de áreas cultivadas y fertilizadas, de suelos deforestados o de campos con ganadería.

Las floraciones se pueden formar en períodos de horas a días y generalmente desaparecen en un plazo similar. Sin embargo, algunas pueden permanecer por períodos más largos como todo un verano, durante todo el año, o incluso en forma permanente dependiendo del sistema acuático en el que ocurran. Son muchas las especies de cianobacterias que desarrollan floraciones en ambientes de agua dulce, salobre o marina, destacándose los géneros *Microcystis*, *Anabaena*, *Aphanizomenon*, *Planktothrix*, *Cylindrospermopsis* y *Nodularia* por ser los más frecuentes.

Las floraciones de cianobacterias producen cambios drásticos en la estructura de la comunidad de fitoplancton, además alteran las interacciones bióticas en el ecosistema disminuyendo la diversidad biológica en los distintos niveles tróficos (Lehman et al., 2010). Otra consecuencia importante es la pérdida de la calidad de agua debida al olor y aspecto desagradables generados por la gran cantidad de biomasa (Scheffer et al., 1997; Huisman y Hulot, 2005). Las floraciones pueden ser evidentes a simple vista por la coloración generalmente verde, por formar una capa densa de algunos centímetros de espesor, o por la turbidez del agua. Esas grandes acumulaciones de biomasa de cianobacterias mueren y sedimentan, luego son descompuestas por la microbiota heterótrofa. Esto genera que la transparencia del agua disminuya y que el oxígeno se agote en los niveles más profundos del sistema acuático, ocasionando la muerte de los peces y otros organismos que viven próximos al sedimento. Esta serie de eventos a su vez puede alterar los ciclos de nutrientes y de la trama trófica acuática.

Un motivo importante de preocupación por las floraciones de cianobacterias es que estos organismos pueden producir toxinas (cianotoxinas). La mayoría de las cianotoxinas se han descrito como metabolitos secundarios ya que no son empleadas por el organismo en su metabolismo

primario (Carmichael, 1992). Sin embargo, Orr y Jones (1998) postulan que la producción de cianotoxinas podría estar acoplada a la división celular y por lo tanto las cianotoxinas podrían ser un metabolito esencial para las cianobacterias. Teniendo en cuenta la alta concentración de biomasa y la presencia de cianotoxinas, las floraciones pueden representar un problema para los otros organismos presentes en el medio acuático, así como también para el ser humano (Chorus y Bartram, 1999; Chorus et al., 2000; Carmichael, 2001).

En Uruguay la eutrofización de sistemas de agua dulce ha aumentado en los últimos tiempos como consecuencia de la creciente producción agrícola-ganadera y la urbanización. Las primeras floraciones de cianobacterias en Uruguay se detectaron en 1982 y desde entonces se han vuelto un fenómeno frecuente en distintos tipos de agua de nuestro país, como ser ríos (Río Uruguay), estuarios (Río de la Plata), lagos y lagunas (Bonilla et al., 1995; Pérez et al., 1999; Bonilla y Conde, 2000; De León y Yunes, 2001; Kruk y De León, 2002; Kruk et al., 2003; Bonilla et al., 2006; Vidal y Kruk, 2008). El primer registro de floraciones de cianobacterias en cuerpos de agua de nuestro país fue de *Microcystis aeruginosa*, especie que puede producir microcistina (cianotoxina hepatotóxica). Algunos estudios recientes reportaron la presencia de floraciones de *Cylindrospermopsis raciborskii* en lagos someros (Vidal y Kruk, 2008) y en el Río Uruguay (CARU, 2013).

Cylindrospermopsis raciborskii

Cylindrospermopsis raciborskii es una cianobacteria filamentosa perteneciente al orden Nostocales que forma floraciones potencialmente tóxicas en ecosistemas de agua dulce. *C. raciborskii* fue reportada por primera vez en 1912 en Java, Indonesia y por lo tanto se ha clasificado como una especie tropical (Woloszynka, 1912). Esta especie ha llamado el interés científico debido a que ha comenzado a expandirse desde zonas tropicales hacia regiones subtropicales y templadas (Padisak, 1997; Hamilton et al., 2005; van Vuuren y Kriel, 2008; Kaštovsky et al., 2010) donde es capaz de establecerse y generar grandes poblaciones, incluso puede dominar el fitoplancton (Briand et al., 2004; Nixdorf et al., 2003). En América del Sur ha sido reportada en Brasil, Argentina y Uruguay (Zalocar et al., 1998; Tucci y Sant'Anna, 2003; Vidal y Kruk, 2008; Bonilla, 2009). Su extensa distribución sugiere que tiene una gran capacidad de adaptación fisiológica a diversos

rangos de condiciones ambientales como luz, temperatura, y concentración de nutrientes (Briand et al., 2004; Bonilla et al., 2012). Tiene ventajas competitivas frente a otros organismos en condiciones de deficiencia de nutrientes debido a que posee una alta velocidad de incorporación de fosfato, aún cuando se encuentra a bajas concentraciones, así como una gran capacidad de acumulación de gránulos de polifosfato (Isvanovics et al., 2000). Se ha demostrado que *C. raciborskii* es capaz de dominar, en abundancia, el fitoplancton bajo condiciones fluctuantes y esporádicas de fosfato (Posselt et al., 2009). Además, por tener la capacidad de regular su flotabilidad puede acceder fácilmente a nutrientes que se liberan desde el sedimento. Esta capacidad de adaptación a diferentes ambientes se refleja en las características morfológicas y fisiológicas que posee, como ser la presencia de heterocitos, acinetes y vacuolas de gas (Padisák, 1997).

La extensa distribución de *C. raciborskii* también es atribuida al cambio climático (Padisák, 1997; Paerl y Huisman, 2008; Sinha et al., 2012). La plasticidad fenotípica de esta especie le permite adaptarse a condiciones de poca luz, que es característico de aguas eutróficas, a distintas temperaturas por encima de 20°C y sobrevivir a condiciones adversas mediante la formación de células especializadas, como los acinetes (Wiedner et al., 2007; Piccini et al., 2011). Estas características sugieren que aguas eutróficas y el cambio climático favorecerían la proliferación de *C. raciborskii* (Paerl y Huisman, 2008; Sinha et al., 2012).

C. raciborskii puede producir cianotoxinas, cylindrospermopsina la cual es una hepatotoxina que produce lesiones graves en el hígado, riñón, bazo, pulmón e intestino de mamíferos; y saxitoxina, una neurotoxina del tipo paralizante que bloquea los canales de sodio (Codd et al., 2005). En nuestro país existen varios registros de floraciones de *C. raciborskii* productoras de saxitoxina, en lagos y lagunas de uso recreativo y para potabilizar en Canelones, Maldonado y Rocha (Vidal y Kruk, 2008; Fabre et al., 2010; Bonilla et al., 2012).

Paleolimnología

El depósito cronológico de materiales en los cuerpos de agua es llamado proceso de sedimentación y gracias a él es posible obtener información sobre el pasado del ecosistema

acuático y sobre los cambios ambientales que éste ha sufrido (Margalef, 1983). Los depósitos de sedimentos funcionan como un registro continuo de los eventos que han ocurrido en un lago y su cuenca, grabando eventos tanto autóctonos como alóctonos a través de diversos marcadores biológicos, químicos y físicos (Margalef, 1983; Callender, 2000). Los lagos son sensibles a cambios climáticos y pueden proporcionar registros excelentes de condiciones ambientales del pasado (Smol, 2008). En comparación con los ecosistemas marinos, muchos lagos se caracterizan por la alta tasa de sedimentación que ofrece posibilidades de obtener alta resolución en las reconstrucciones paleoambientales. Además pueden presentar en la columna de agua fondo anóxico, lo que aumenta el potencial de conservación de la materia orgánica y ADN (Bird, 1991). Mediante análisis de sedimentos es posible realizar inferencias sobre cambios del estado trófico del sistema, sobre sus condiciones antes del impacto humano y el efecto de las actividades en el lugar o en su cuenca de drenaje (Smol, 1992; Hodgson et al., 1996; Kaupplia, et al., 2002; Miettinen et al., 2002). Además se emplea en estudios ecológicos para comprender el funcionamiento del sistema biológico a lo largo de una escala de tiempo y bajo variadas condiciones ambientales. Comprender cómo el ecosistema responde a grandes cambios es importante para tratar de analizar cómo los organismos interaccionan y se adaptan a los cambios ambientales, permitiendo además la reconstrucción de condiciones climáticas pasadas (Smol, 2008).

Los estudios paleolimnológicos emplean información química, física y biológica del registro sedimentario de sistemas acuáticos (Smol, 1992). Para ello es necesaria la toma de testigos de sedimento y el análisis de la variación estratigráfico de diversas variables como materia orgánica, clorofila, diversidad de organismos fósiles, entre otras. Los testigos de sedimentos extraídos son datados a fin de relacionar las variaciones encontradas con la cronología de los sucesos pasados.

La materia orgánica preservada en sedimentos es un indicador directo de las condiciones ambientales en el momento de su deposición y se emplea en estudios paleoambientales para determinar la evolución trófica de los sistemas acuáticos (Dean, 1999). Mediante esta técnica es posible inferir los eventos de empobrecimiento o enriquecimiento orgánico ocurridos en el pasado (Lami et al., 1994), así como los efectos de las actividades humanas (Meyers y Lallier – Vergés, 1999).

Existen componentes individuales preservados en los sedimentos que pueden atribuirse a organismos, grupo de organismos o a procesos particulares como la fotosíntesis. Estos componentes son llamados “biomarcadores” (Peters et al., 2005) y permiten el estudio de condiciones ambientales pasadas, así como definir la presencia de determinados grupos de algas y microorganismos. Las diatomeas, por ejemplo, son muy usadas en estudios paleolimnológicos porque sus paredes celulares son de sílice, la cual se preserva en los sedimentos por mucho tiempo. También los heterocistos producidos por cianobacterias pueden ser preservados en los sedimentos y proveen importante información sobre la abundancia de estos organismos en el pasado. Existen biomarcadores específicos para determinados organismos, por ejemplo, los carotenoides son utilizados como biomarcadores de diferentes tipos de especies de fotoautótrofos y la clorofila el cual está presente en todos los productores primarios.

El análisis del ADN en muestras de paleo-sedimento es una herramienta nueva que ha sido poco utilizada pero con resultados exitosos para analizar las diferentes especies presentes en el sedimento como respuesta a cambios ambientales, tanto en ecosistemas terrestres (Willerslev et al., 2007) como marinos (Boere et al., 2009; Coolen et al., 2007; 2009; Coolen y Overmann, 2007; Manske et al., 2008). Mientras que los carotenoides y la clorofila no pueden ser utilizados como biomarcadores para diferenciación taxonómica a nivel de especie, el ADN sí puede brindar esta información. Utilizando el ADN como marcador se pueden estudiar especies fósiles muy antiguas, ya que se pueden conservar los ácidos nucleicos dentro de estructuras de resistencia que presentan algunos organismos (Lindahl, 1993; Poinar et al., 1996; Willerslev et al., 2004). Diversos estudios paleolimnológicos se han realizado utilizando ADN. En el 2004 Coolen y colaboradores afirman que el ADN fósil sirve como biomarcador; en este estudio los autores utilizaron el ADN ribosomal de algas planctónicas fotótrofas recuperado del sedimento de un lago de la Antártida para determinar la estructura de la comunidad de algas e identificarlas. En el estudio realizado por Coolen y Overmann en el 2007 se utiliza el ADN extraído de los sedimentos de una laguna para determinar la diversidad de bacterias verdes del azufre y de esta forma lograr reconstruir en más detalle las condiciones paleoecológicas. Otro estudio realizado por Manske y colaboradores en el año 2008 mediante análisis basados en el ADN de bacterias verdes del azufre, se aproximan al origen de las mismas, concluyendo que el ADN fósil permite una mayor interpretación y reconstrucción de las condiciones ambientales pasadas.

La degradación del ADN en fragmentos cortos puede ocurrir en los primeros 100 años luego de la deposición de éste (Coolen y Overmann, 1998). Por lo tanto, sólo fragmentos cortos de menos de 500 pares de bases (pb) pueden ser analizados por medio de métodos moleculares (Coolen y Gibson, 2009). Las condiciones sedimentarias que favorecen a la preservación del ADN incluyen ambientes fríos, anóxicos y sin luz (Coolen et al., 2004). Cuando se trabaja con ADN es importante tener en cuenta a los organismos metabólicamente activos que se encuentran en las profundidades de la columna de agua y en los sedimentos, los cuales contribuyen a pool de ADN. A pesar de esto, el análisis del ADN fósil es considerado una aproximación muy poderosa para examinar la composición de las especies de los ecosistemas acuáticos y así poder reconstruir el pasado del ecosistema.

Debido al pequeño tamaño de las regiones ITS (500-600 pb) los estudios de paleolimnología basados en ADN se pueden enfocar en esta región de la molécula. Esta secuencia presenta un alto grado de heterogeneidad, ya que no forma parte del ribosoma y por tanto está sujeta a una mayor tasa de mutaciones; por lo tanto es útil para capturar la diversidad generada más recientemente en la evolución (Woese, 1987; Fisher, 1999). Además, existe un gran número de secuencias de ITS publicadas (Janse et al., 2003) lo cual es una ventaja a la hora del análisis de la misma.

Marcadores moleculares de diversidad bacteriana y *fingerprinting*

Por lo general, el marcador molecular más empleado para realizar estudios de riqueza y diversidad bacteriana es el gen que codifica para la subunidad menor del ribosoma bacteriano (ARNr 16S). Por ser parte de la maquinaria para la síntesis proteica éste presenta regiones de su secuencia conservadas y por tanto comunes a la mayoría de los organismos (Woese, 1987), así como regiones variables e hipervariables que permiten realizar estudios filogenéticos detallados. Además, al emplearse comúnmente como marcador taxonómico existen bases de datos conteniendo un número relevante de secuencias. En la base de datos Ribosomal Database Project existen 2.639.157 secuencias de ARNr 16S (Olsen, 1986; Pace, 1986; Schmidt, 1991; Cole et al., 2009).

El uso del ARNr 16S como marcador molecular para identificar poblaciones o especies bacterianas

se usa rutinariamente en estudios de ecología microbiana (Wise et al., 1999; Lee et al., 2000; Cho et al., 2003). Una de las estrategias empleadas es el clonado de productos de PCR a partir de ADN obtenido del ambiente para explorar la diversidad de las comunidades microbianas sin necesidad de cultivarlas. Sin embargo, aunque esta aproximación es exitosa, a veces no es práctica ni está disponible para realizar estudios de dinámicas complejas de las comunidades microbianas. Por este motivo, las técnicas de huella genética o *fingerprinting* se consideran más informativas y de más fácil acceso.

Además del gen para el ARNr 16S, últimamente se ha comenzado a usar como marcador molecular de diversidad bacteriana el espaciador intergénico transcrito que se encuentra entre los genes 16S y 23S del operón ribosomal, o ITS (internal transcribed spacer) (Srivastava y Schlessinger, 1990). Esta secuencia no forma parte del ribosoma y por tanto está sujeta a una mayor tasa de mutaciones. Por este motivo se ha propuesto su gran utilidad para realizar estudios a nivel intra específico y para capturar la diversidad generada más recientemente en la evolución (Fisher, 1999; Woese, 1987). Esta característica, sumada al creciente número de secuencias de ITS publicadas, hace de esta región del genoma un blanco adecuado para un análisis de alta resolución de *fingerprinting* de cianobacterias.

Uno de los métodos de *fingerprinting* para analizar la diversidad bacteriana empleado es el denominado RISA (rRNA intergenic spacer analysis). Éste se ha utilizado para examinar la diversidad microbiana en suelos (Borneman et al., 1997), la rizosfera (Robledo et al., 1998) y los ambientes marinos (Acinas et al., 1999). El método involucra la amplificación de la región ITS del ADN total de la comunidad bacteriana. La región ITS tiene una gran heterogeneidad en la longitud y secuencia nucleotídica; ambas variaciones han sido utilizadas para distinguir y relacionar especies bacterianas (Navarro et al., 1992; Scheinert et al., 1996; Aubel et al., 1997; Hansen et al., 1998; Maes et al., 1997). En RISA el espaciador intergénico de las distintas especies de la comunidad bacteriana se diferencian según la longitud del fragmento. Con los amplicones de ITS obtenido por PCR (conteniendo una mezcla de fragmentos de ITS de los distintos miembros de la comunidad bacteriana) se realiza una electroforesis en gel de acrilamida. El resultado es un patrón de bandas que proporciona un perfil específico para la comunidad, ya que cada banda de ADN corresponde al menos a un organismo del conjunto original de la comunidad.

Otro de los métodos más empleado para el análisis de la diversidad microbiana y composición de las comunidades es la electroforesis en geles con gradiente desnaturizante, DGGE (denaturing gradient gel electrophoresis por su sigla en inglés) (Muyzer et al., 1993). Esta es una técnica mediante la cual se separan moléculas de ADN que posean, por ejemplo, el mismo tamaño pero distintas secuencias de bases gracias a diferencias en sus propiedades de desnaturalización, lo que resulta en variaciones en la distancia de migración en gradientes químicos (técnica DGGE) o de temperatura (técnica TGGE) (McCaig et al., 2001). Teóricamente, el DGGE puede separar moléculas de ADN cuyas secuencias difieren en tan sólo un par de bases.

Tanto el DGGE como el TGGE son métodos generalmente empleados para detectar cambios en las poblaciones microbianas a lo largo del tiempo y/o bajo diferentes condiciones ambientales o experimentales. Son técnicas rápidas, relativamente sencillas y permiten el análisis simultáneo de un gran número de muestras, lo cual hace posible la comparación estadística de la diversidad genética de comunidades microbianas de diferentes hábitats, entre otras aplicaciones (Muyzer, 1998). Por lo tanto, el DGGE es un método que permite comparaciones rápidas, reproducibles y a costos más bajos que otras técnicas. Además, permite realizar cuantificaciones relativas de la abundancia de cada banda (que corresponde a un filotipo bacteriano) en una muestra mediante la comparación de la intensidad de bandas individuales en los geles (McCaig et al., 2001; Kirk et al., 2004).

En comparación con el método RISA, el DGGE presenta mayor poder de resolución, debido a que por el método RISA los fragmentos son separados por su longitud y en el DGGE los fragmentos se separan no sólo por su longitud, sino también por su secuencia. Por lo tanto, fragmentos que poseen igual longitud y distinta secuencia pueden separados por el método DGGE. Es así que, especies diferentes que poseen el mismo largo del fragmento a analizar pero con distinta secuencia, por el método RISA, sólo se va detectar una única banda.

La extracción de ADN a partir de sedimentos, así como la amplificación del ITS por PCR y su posterior aplicación a RISA y DGGE constituye una herramienta útil y disponible en el Depto. de Microbiología del IIBCE, a través de la cual se podrá analizar y comparar la diversidad de cianobacterias y bacterias heterótrofas presentes en muestras de sedimento de distinta antigüedad.

Laguna Blanca

La Laguna Blanca ubicada en el departamento de Maldonado, principal área turística del Uruguay (34° 54' S; 54° 50' O), es un lago somero costero de origen natural con una profundidad máxima entre 2,1 y 3,2 m, y presenta un área total de 28,7 há (Pacheco et al., 2010; Vidal y Kruk, 2008). La temperatura del cuerpo de agua varía entre 27,1 y 11,2 °C y presenta una concentración de fósforo total y clorofila *a* de aproximadamente de 107,4 µg/L y 36,4 µg/L respectivamente (Pacheco et al., 2010; Vidal y Kruk, 2008). Debido a estas características se la considera un lago eutrófico-hipereutrófico (Pacheco et al., 2010). Los principales usos de la laguna y su cuenca son: ganadería extensiva, urbanización, forestación y principalmente extracción de agua para potabilizar. Los grupos y géneros dominantes de fitoplancton son las cianobacterias filamentosas y el picoplancton, las especies dominantes son: *Microcystis aeruginosa*, *Aphanocapsa* spp., *Anabaena* spp. y *Cylindrospermopsis raciborskii* (Mazzeo et al., 2003). Esta laguna ha tenido registros de floraciones de la cianobacteria *Cylindrospermopsis raciborskii* desde hace varios años. Las mismas han desaparecido por algún período y luego han vuelto a aparecer. En 1997 la laguna se secó por extracción de agua. Entre los años 1998-2000 la laguna volvió a llenarse, registrándose poco tiempo después floraciones de cianobacterias, *C. raciborskii* y *Microcystis* sp. entre los años 2003 y 2007 (Vidal y Kruk, 2008) y en verano de los años 2011 y 2012 se ha registrado la presencia de *C. raciborskii* (Sarhou, en preparación).

HIPÓTESIS Y OBJETIVO

Hipótesis

El empleo de métodos moleculares basados en el uso de ADN presente en muestras de paleo-sedimentos permite analizar la diversidad microbiana, detectar la presencia de cianobacterias tóxicas en el pasado de una laguna e inferir alteraciones ocurridas en el pasado de la misma.

Objetivo general

El objetivo general de este proyecto es analizar la diversidad de la comunidad microbiana en muestras de los sedimentos de Laguna Blanca, con énfasis en la detección e identificación de cianobacterias tóxicas.

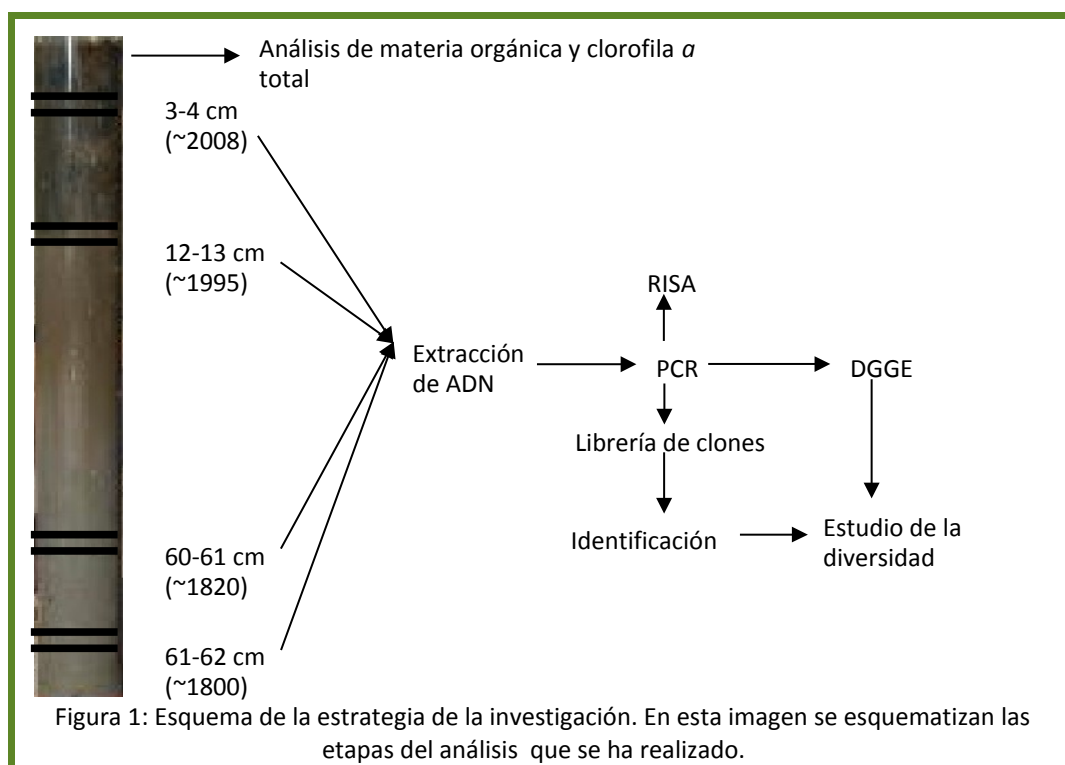
Objetivos específicos

- 1) Obtener ADN a partir de muestras de paleo-sedimento de la Laguna Blanca cuya cantidad y calidad permita su aplicación en PCR.
- 2) Optimizar un protocolo de PCR para amplificar la región ITS de cianobacterias y obtención de los amplicones.
- 3) Conocer los perfiles de diversidad de especies presentes en la muestra mediante RISA y DGGE.
- 4) Conocer la identidad de microorganismos presentes en las muestras mediante la construcción de una biblioteca de clones de la región ITS.
- 5) Contextualizar los resultados de ADN comparando los mismos con otros indicadores paleolimnológicos ya estudiados en la Laguna Blanca.

METODOLOGÍA

Estrategia de la investigación

Para lograr cumplir el objetivo de la propuesta se utilizó un testigo de sedimento de la Laguna Blanca tomado en junio del 2009 por investigadores de la Sección de Limnología de la Facultad de Ciencias. En base a resultados de estudios paleolimnológicos previos que se realizaron en esta laguna por García-Rodríguez y colaboradores en el año 2002, se seleccionaron cuatro profundidades para realizar los análisis moleculares. Las cuatro muestras se analizaron mediante métodos de *fingerprinting* del ITS, a través de la extracción de ADN fósil, amplificación por PCR y posterior RISA y DGGE para analizar la diversidad microbiana (comprendiendo cianobacterias y bacterias heterótrofas). A través de la librería de clones y posterior secuenciación se identificaron especies de cianobacterias (figura 1).



Sitio de estudio – La Laguna Blanca es una laguna de origen natural ubicada en el Departamento de Maldonado, 34° 54'S; 54° 50'O. Se caracteriza por ser un lago somero eutrófico-hipereutrófico, las especies de cianobacterias dominantes son: *Microcystis aeruginosa*, *Aphanocapsa* spp., *Anabaena* spp. y *Cylindrospermopsis raciborskii* y ha presentado floraciones de *Cylindrospermopsis raciborskii* productoras de saxitoxina.

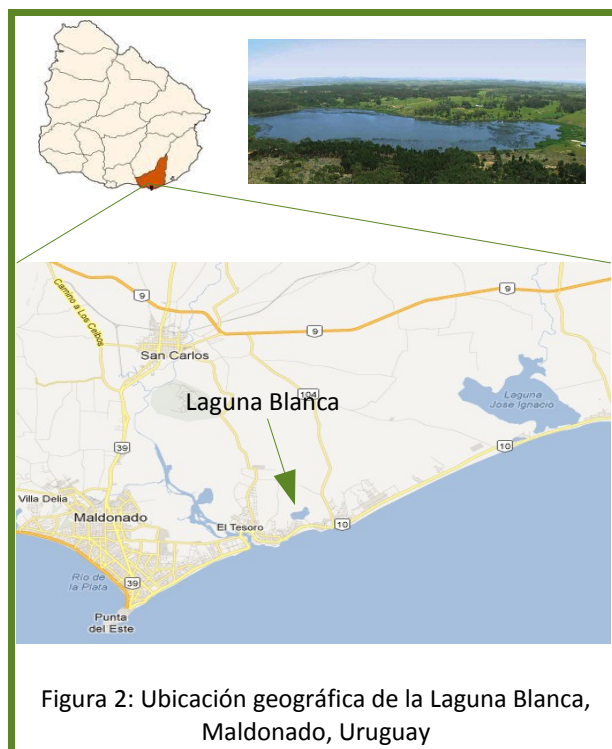


Figura 2: Ubicación geográfica de la Laguna Blanca, Maldonado, Uruguay

Muestreo – Para los estudios moleculares de este trabajo se emplearon como muestras secciones del testigo correspondientes a 3-4 cm, 12-13 cm, 60-61 cm y 61-62 cm, las cuales de acuerdo a García-Rodríguez et al. (2002) corresponden aproximadamente a los años 2008, 1995, 1820 y 1800 respectivamente.

Materia orgánica y clorofila a total – Se realizó el análisis del contenido de materia orgánica (MO) en muestras obtenidas del testigo como indicador del estado trófico utilizando el método “Loss-on-Ignition” (LOI) (Dean, 1974). Este método está basado en un calentamiento secuencial de

las muestras en un horno. Como primer paso se determinó el peso húmedo de las muestras de sedimento para luego secarlas a 110°C por 12hs. Obtenido el peso seco, cada muestra se quemó a 550°C por 15min. Las muestras se pesaron nuevamente y se determinó el porcentaje de MO de la siguiente forma:

$$\%MO_{550} = (\text{peso seco} - \text{peso de la muestra quemada}) / (\text{peso seco} \times 100)$$

Asimismo, se cuantificó la clorofila *a* total en las mismas muestras, utilizando acetona 90% como solvente y empleando un método basado en espectrofotometría (Jeffrey et al., 1997), para utilizarla como indicador de biomasa total de productores primarios. Primeramente, se tomaron las muestras de sedimento de peso conocido de diferentes profundidades, las que se liofilizaron durante 24hs. Una vez liofilizadas, se agregaron 5ml de acetona 90% a cada muestra y se sonicaron durante 30s a 4 watts. Las muestras se guardaron por 20hs a 4°C. Posteriormente, se realizó una centrifugación por 5min a 40000rpm, se colectó el sobrenadante y se leyó su absorbancia a 750 y 665 nm en un espectrofotómetro. En todo momento se trabajó con luz tenue y conservando los tubos con las muestras en frío. La concentración de clorofila *a* total se calculó utilizando la siguiente ecuación (Jeffrey et al., 1997):

$$Clo\ a\ (\mu g/g\ \text{peso seco}) = (((11,6 \times (\text{Abs}665 - \text{Abs}750))) \times \text{Vol agregado de solvente} / \text{peso seco}) \times \text{dilución}$$

Extracción y purificación de ADN en muestras de sedimento – El ADN se extrajo de las muestras correspondientes a los años ~2008, ~1995, ~1820 y ~1800, mediante la técnica desarrollada por Zhou et al., 1996. Se colocó 17,5ml de buffer de extracción a cada una de las muestras, se agregó 67,5μl de proteinasa K (10 mg/ml) y se incubó a 37°C por 30min con agitación. Pasada la incubación se agregó 1,9ml SDS (20%) y se incubó nuevamente a 65°C por 2hs en agitación. Luego las muestras se centrifugaron a 10000rpm por 10min a temperatura ambiente. Se transfirió el sobrenadante, se agregó un volumen igual de cloroformo/isoamilacohol y se centrifugó a 13000rpm por 10min. Se colectó la fase acuosa y se repitieron los pasos del agregado de cloroformo/isoamilacohol y centrifugación tres veces. Utilizando 0,6 vol. de isopropanol se precipitó el ADN y se incubó a temperatura ambiente por 1h para luego centrifugar a 30000rpm por 30min. Se descartó el sobrenadante, se lavó el pellet con 10ml de etanol 70% (v/v) frío y se

centrifugó a 18000rpm por 15min. El pellet se dejó resuspendiendo con agua milliQ durante toda la noche a 4°C. Por último se incubó la solución de ADN a 37°C por 30min y se transfirió a un tubo de microcentrífuga estéril. En el anexo se encuentra la preparación de las soluciones utilizadas. La pureza del ADN se determinó empleando un espectrofotómetro para micro-volúmenes (Nanodrop).

PCR (reacción en cadena de la polimerasa) de los ITS – Se empleó la técnica de PCR convencional, la cual se puso a punto utilizando *primers* específicos para lograr amplificar regiones ITS de cianobacterias (Itean et al., 2000) (Tabla 1).

Tabla 1: Secuencias de los *primers forward* (322) y *reverse* (340) usados para la amplificación de la región ITS.

Primer	Secuencia
322 Forward	5'-TGT ACA CAC CGC CCG TC -3'
340 Reverse	5'-CTC TGT GTG CCT AGG TAT CC-3'

La amplificación de las muestras correspondientes a los años 2008 y 1995 se realizó en un volumen total de 25 µl, conteniendo 1x PCR buffer, 1 U de *Taq* polimerasa, 0.2 mM de cada uno de los cuatro dNTPs, 3,5 mM MgCl₂, 0.4 µM de cada *primer*, 0.5 µl de seroalbumina bovina (BSA, 30 mg/ml), ya que evita la inhibición de la interacción entre el ADN y la *Taq* polimerasa (Woide et al., 2010), y 2 µl de ADN. Para las muestras correspondientes a los años ~1820 y ~1800 fue necesario la adición de un volumen de 3 µl de dimetilsulfóxido (DMSO) el cual previene la formación de estructuras secundarias (Mamedov et al., 2008). Como control positivo se utilizó ADN de la cepa MVCC14 de *Cylindrospermopsis raciborskii* aislada de la Laguna Blanca (Vidal y Kruk, 2008).

Los tubos fueron brevemente centrifugados y se colocaron en el termociclador (*Applied Biosystems 2720 Thermal Cycler*) utilizando las siguientes condiciones (Tabla 2):

Tabla 2: Condiciones utilizadas para realizar los análisis por PCR.

	Temperatura °C	Tiempo	} 33 ciclos
Desnaturalización inicial	94	5 min	
Desnaturalización	94	30 seg	
Hibridación	48	30 seg	
Extensión	72	1 min	
Extensión final	72	10 min	

La presencia o ausencia de los productos de PCR se determinó mediante la electroforesis con geles de agarosa al 1%. Los geles se prepararon utilizando 1g de agarosa en 100 mL de buffer TBE 0,5X y se disolvieron en microondas. Una vez disuelta la agarosa se esperó a que alcanzara aproximadamente una temperatura de 45°C, luego se procedió a agregarla en el soporte para el armado del gel y se esperó aproximadamente media hora para que solidificara. Para la corrida se cargó 8µl de la muestra con 2µl de buffer de carga 5X, la misma se realizó en buffer TBE 0,5X por 20 minutos a 110V. Los geles fueron teñidos con Gelred 3X durante media hora, se visualizaron en transiluminador UV y se tomó registro fotográfico digital.

RISA – Utilizando los productos de PCR obtenidos se llevó a cabo la técnica RISA (análisis del espaciador intergénico del ARN ribosomal). Los productos de amplificación obtenidos previamente se corrieron a 70V por 12 horas en un gel de acrilamida (6%) en buffer TAE 1X. En el anexo se encuentra la preparación de las soluciones para llevar a cabo la técnica. Para el armado del gel se mezcló 25ml de acrilamida 6% con 191µl de persulfato de amonio (APS) 10% y 15µl TEMED, se coló una capa de butanol y se dejó polimerizar por 60min. Pasados los 60min se retiró el butanol y se lavó con agua miliQ. Luego se preparó una solución de acrilamida en la parte superior del gel conteniendo 2ml acrilamida 6%, 2µl APS y 2µl TEMED e inmediatamente se colocó el peine. Se dejó polimerizar por 15min, se retiró el peine y se lavó con agua miliQ. Las muestras se colocaron en los pocillos de los geles mezclando 8µl de muestra y 2µl de buffer de carga 5x. Transcurrida la corrida los geles se revelaron con SYBR green el cual es un agente intercalante y se tomaron fotos en el escáner de geles FujiFilm Starion FLA 9000 Image Scanner (EquipNet).

DGGE – El ADN obtenido se amplificó empleando *primers* específicos para la región ITS, conteniendo uno de ellos una secuencia GC o “grampa”: *primer forward* 322, 5'-TGT ACA CAC CGC CCG TC CGC CCG CCG CGC GCG GCG GGC GGG-3', para evitar la completa desnaturalización de los amplicones. Los productos de amplificación obtenidos se corrieron en un gel de acrilamida (6%) con un gradiente de urea de 70% a 40%, a 70V y 60°C por 16 horas en buffer TAE 1X. Para el armado del gel se preparó en la parte inferior un gel mas concentrado conteniendo 2ml de acrilamida 0% desnaturalizante, 30µl APS 10% y 14µl TEMED el cual se dejó polimerizar por 15min. Para armar el gel con el gradiente desnaturalizante se mezcló dos soluciones conteniendo, una 9ml de la solución 40% desnaturalizante con 69µl APS y 5,4µl TEMED y la otra 9ml de la solución 70% desnaturalizante con 69µl APS, 5,4µl TEMED y 30µl de colorante. Luego de preparado el gel con el gradiente se agregó una capa de butanol por encima y se dejó polimerizar por 60min aproximadamente. Pasado los 60min se retiró el butanol y se lavó con agua miliQ. En la parte superior del gel se colocó aproximadamente 2ml de una solución de acrilamida 0% desnaturalizante con 20µl APS y 2µl TEMED e inmediatamente se colocó el peine. Se dejó polimerizar por 15min, se retiró el peine y se lavó con agua miliQ. Las muestras se colocaron en los pocillos de los geles mezclando 8µl de muestra y 2µl de buffer de carga 5x. Luego de la corrida los geles se tiñeron con SYBR green (agente intercalante) y se tomaron fotos en el escáner de geles FujiFilm Starion FLA 9000 Image Scanner (EquipNet).

Análisis de las imágenes de fingerprinting – Las imágenes de los geles de *fingerprinting* se analizaron con el programa GelCompare II (versión 6,5, Applied Maths). Se determinó la similitud entre los patrones de bandas mediante el método UPGMA (Sneath y Sokal 1973) y la riqueza como número de bandas utilizando el programa Past (Hammer et al., 2001).

Biblioteca de clones – Se generaron bibliotecas de clones del ITS a partir de las muestras de 3-4 cm de profundidad (~2008) y 12-13 cm de profundidad (~1995). El material utilizando para realizar la biblioteca de clones se encuentra detallada en el anexo.

Obtención de células competentes

Se prepararon células competentes utilizando un método químico a partir de la cepa *Escherichia*

coli TOP10. Se inocularon 50ml de medio líquido “*Luria Bertani*” (LB) con cultivo fresco de células *E.coli* TOP10 y se incubó a 37°C hasta alcanzar una densidad óptica OD₆₀₀ de 0,4. Luego las células se centrifugaron a 8000rpm durante 10min y el pellet resultante se resuspendió en 25ml de cloruro de calcio (CaCl₂) 50mM frío. Las células se centrifugaron nuevamente a 6000rpm durante 8min a 4°C, se descartó el sobrenadante y se resuspendió el pellet en 20ml de CaCl₂ 50mM frío. Las células se incubaron en hielo durante 30min, luego se centrifugaron por 8min a 6000rpm y se descartó el sobrenadante. Por último se resuspendió el pellet en 2ml de CaCl₂ 50mM frío y se agregó 650µl de glicerol 40%. La suspensión bacteriana se repartió en alícuotas de 200µl y se guardaron a -80°C. El procedimiento se realizó siempre en condiciones de esterilidad.

Preparación del fragmento de ADN a clonar

Los amplicones de ITS correspondientes se eluyeron de los geles de agarosa 1% con el kit QIAgen gel extraction. Se recortaron las bandas de ADN del gel, se pesaron y por diferencia de peso con el tubo *eppendorf* vacío se obtuvo el peso de la agarosa recortada. La purificación de los productos de PCR se realizó siguiendo el protocolo descrito por el fabricante del kit utilizado.

Ligación

Se ligaron los productos de PCR purificados a un vector pGEM-T easy (Promega) el cual contiene el gen de resistencia para ampicilina (Figura 1 del anexo). Se preparó la mezcla de ligación en un tubo *eppendorf* conteniendo: 5µL de solución tampón de ligación 2X, 1µL del vector pGEM-T (50 ng/µL), 3 µL del producto de ITS obtenido por PCR y 1µL de ligasa T4. La mezcla se incubó a 4°C toda la noche.

Transformación

El vector pGEM-T easy conteniendo el fragmento de ITS fue incorporado en células *E. coli* TOP10 mediante transformación. Con este fin se les agregó 2 µL de la mezcla de ligación a 50µL de células

competentes sin retirarla del hielo, se mezcló suavemente y se incubaron en hielo por 20min. Luego se dio un golpe de calor a 42°C por 45seg e inmediatamente se colocaron en hielo por 2min. Se agregaron 950µL de medio LB y se incubó por una hora y media en agitación a 37°C. Se plaquearon 100µL de los transformantes en placas de LB-Agar con ampicilina y X-gal previamente preparadas y se incubaron en estufa a 37°C durante 24 horas. Al incorporar la ampicilina en el medio de cultivo se van a seleccionar aquellas células que incorporaron el vector. El X-gal es el sustrato de la enzima beta-galactosidasa (*lacZ*), el cual toma una coloración azul intenso cuando es procesado por la enzima. Cuando el inserto se liga al vector lo va a hacer interrumpiendo el gen *lacZ* y por lo tanto no se observa coloración azul en la colonia. Por lo tanto, se seleccionaron las colonias que contenían el vector con inserto por su coloración blanca. Se verificó la presencia del inserto mediante PCR utilizando *primers* específicos del vector (M13) (Tabla 3), con las mismas condiciones que el PCR realizado para los ITS.

Tabla 3: Secuencias de los *primers* M13 *froward* y *reverse* utilizados para la verificación del inserto y secuenciación del mismo.

Primer	Secuencia
M13 <i>Forward</i>	5'-GTAAAACGACGGCCAG-3'
M13 <i>Reverse</i>	5'-CAGGAAACAGCTATGAC-3'

Secuenciación y análisis filogenético de las secuencias – A partir de la biblioteca de clones de ITS se seleccionaron al azar 36 y 46 colonias de la muestra de ~2008 y ~1995 respectivamente para su identificación mediante secuenciación utilizando los *primers* M13 (MACROGEN INC, Corea). Una vez obtenidas las secuencias se editaron y compararon con la base de datos GenBank para conocer su identidad. Las secuencias correspondientes a cianobacterias fueron seleccionadas para estudios posteriores de filogenia. Para realizar los análisis filogenéticos, se construyó una base de datos de secuencias de ITS correspondientes a cianobacterias a partir de secuencia de ITS de la base de datos GenBank. Una vez alineadas con las secuencias obtenidas en este trabajo, se generaron árboles filogenéticos basados en el test de Máxima Verosimilitud (Tamura et al., 2011; Yang, 1999) utilizando el programa MEGA 5.

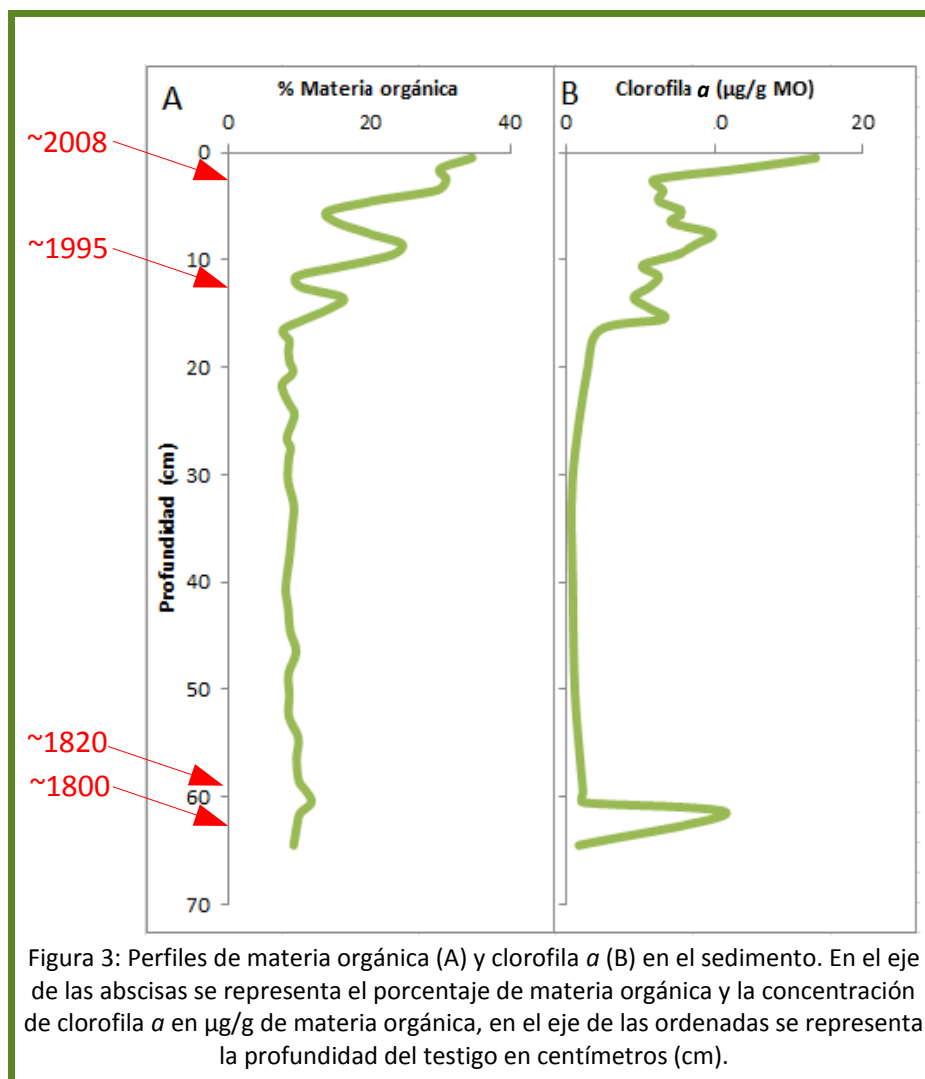
Análisis estadísticos – Se realizó un análisis de correlación entre la materia orgánica total y la clorofila *a* utilizando 23 muestras. Se utilizó el análisis de correlación no paramétrica (Spearman), previamente se determinó si los datos cumplen con el supuesto de normalidad y homogeneidad de varianza. Los análisis estadísticos se realizaron empleando el programa STATISTICA 7.0.

RESULTADOS

Análisis de la materia orgánica y clorofila *a* total

De acuerdo a los resultados obtenidos, el contenido de materia orgánica del testigo mostró que entre los 16 cm y 65 cm (correspondiente al período más antiguo) el porcentaje de materia orgánica es bajo con respecto al resto del testigo. A los 16 cm se observa que la materia orgánica comienza a aumentar hasta la superficie (correspondiente al período más reciente). En relación a las muestras de mayor profundidad se destaca un pequeño aumento de la materia orgánica en los centímetros 60-61 (~1820) (figura 3A). Al igual que el resultado de materia orgánica, los valores de clorofila *a* fueron mínimos desde los 65 cm hasta los 16 cm de profundidad y aumentan hasta la superficie, registrando valores máximos en los primeros centímetros. En las muestras de mayor profundidad también se detectó un aumento de clorofila *a* en los centímetros 61-62 (~1800) (figura 3B). Teniendo en cuenta estos resultados junto con el trabajo paleolimnológico realizado por García-Rodríguez y colaboradores en el año 2002 en esta laguna, se seleccionaron estratégicamente cuatro profundidades correspondientes a los años ~2008, ~1995, ~1820 y ~1800, las cuales presentan variaciones de porcentaje de materia orgánica y clorofila *a* total, para los análisis moleculares.

Para determinar si existe una correlación entre la materia orgánica y clorofila *a* y así saber si la materia orgánica provendría mayoritariamente de los productores primarios, se utilizó el análisis de correlación no paramétrica (Spearman) debido a que los datos no cumplieron con los supuestos de la estadística paramétrica (distribución normal y homogeneidad de varianzas). Estos análisis estadísticos demostraron que existe una correlación entre ambas variables, la cual fue positiva y significativa ($r_s = 0,88$; $p < 0,05$).



Obtención de ADN a partir de muestras de sedimento de la Laguna Blanca

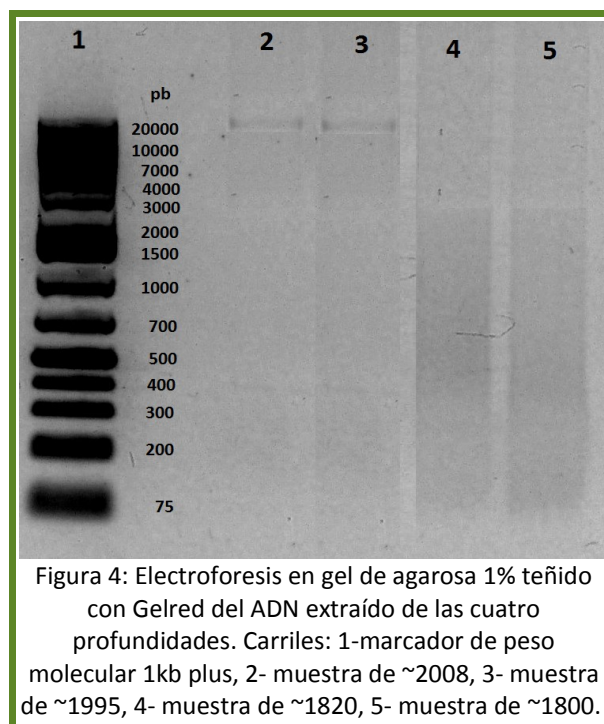
El método de extracción empleado permitió la obtención de ADN de todas las muestras (Tabla 4, Figura 4).

Con estos resultados se puede destacar que la muestra más reciente (~2008) presenta la concentración más alta de ADN ($72,05 \mu\text{g/g}$ de peso seco), siguiendo la de la muestra de ~1995 ($29,53 \mu\text{g/g}$ de peso seco). Comparando entre muestras, los años ~2008 y ~1995 fueron las que presentaron mayor concentración respecto a las más antiguas, ~1820 y ~1800, en éstas últimas sus concentraciones fueron similares entre sí, de $3,09$ y $4,25 \mu\text{g/g}$ de peso seco respectivamente. La electroforesis del ADN (Figura 4) muestra la integridad del mismo. Se puede ver que el ADN de

las muestras más recientes presentan un peso molecular mayor a 20000 pb, en cambio los fragmentos de ADN obtenidos de las muestras más antiguas se encuentra entre 400 y 3000 pb.

Tabla 4: Concentración de ADN total en $\mu\text{g/g}$ de peso seco de las cuatro profundidades seleccionadas del testigo de sedimento, ~2008 (3-4 cm de profundidad), ~1995 (12-13 cm de profundidad), ~1820 (60-61 cm de profundidad), ~1800 (61-62 cm de profundidad)

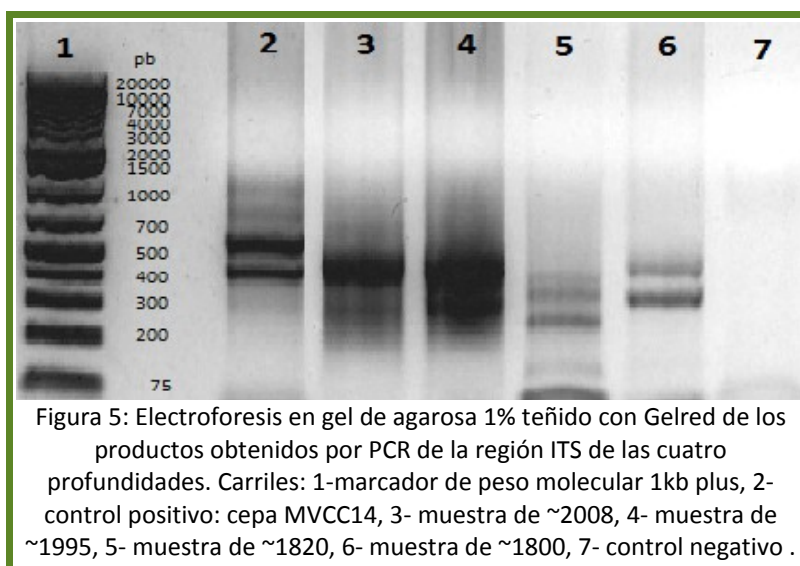
Muestras	[ADN] $\mu\text{g/g}$ de peso seco
~2008	72,05
~1995	29,53
~1820	3,09
~1800	4,25



Análisis de la comunidad microbiana

1) Obtención de amplicones correspondientes al ITS del operón ribosomal

Luego de ajustar las condiciones de PCR para cada muestra se obtuvieron productos de amplificación en el rango entre 400 y 700 pares de bases en cada muestra, incluso en el control positivo (Figura 5).



2) Análisis de la comunidad microbiana mediante RISA

La evaluación de los patrones de bandas de amplicones de ITS obtenidos de los geles de acrilamida 6% (Figura 6 y 7) mostró que existe una alta similitud entre los patrones de las muestras más recientes y entre las muestras más antiguas. En la tabla 2 se muestran los valores de porcentaje de similitud entre cada año obtenidos con el programa Gelcompare. El porcentaje de similitud entre los patrones de bandas de las muestras más recientes es de un 80,7%. Los patrones de bandas de las muestras de ~1820 y ~1800 presentan una similitud de un 100% y entre las muestras de los años más antiguos y los más recientes la similitud es de 63,2% (Tabla 5).

Los valores de riqueza (calculados como número de bandas) fueron: 29, 28, 15 y 15 para las muestras de ~2008, ~1995, ~1820 y ~1800 respectivamente.

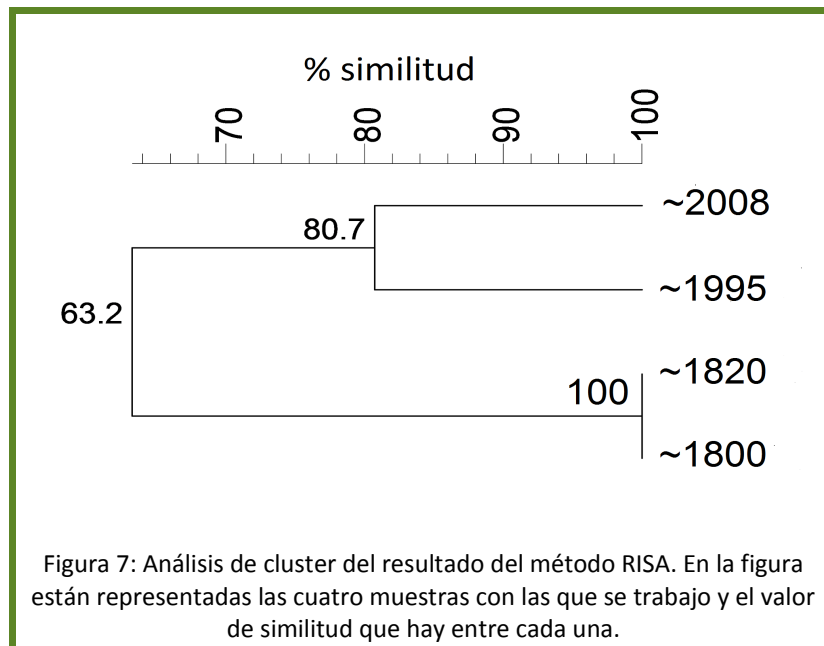
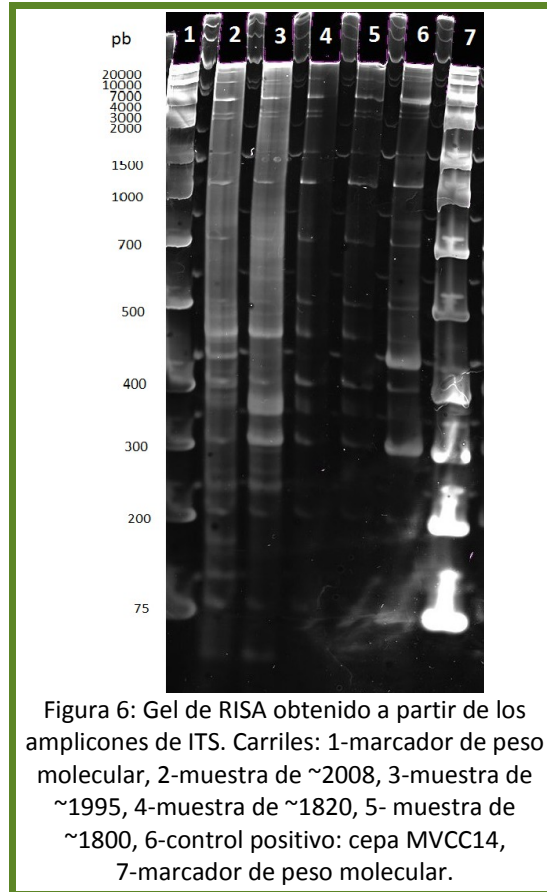


Tabla 5: Matriz de similitud de la composición microbiana entre los diferentes años: ~2008, ~1995, ~1820 y ~1800; realizado con los resultados del método RISA.

% similitud				
Muestras	~2008	~1995	~1820	~1800
~2008	100			
~1995	80.71	100		
~1820	65.12	63.64	100	
~1800	60.47	63.64	100	100

3) Análisis de la comunidad microbiana mediante DGGE

El análisis de DGGE dio lugar a patrones de bandas en todas las muestras. Los perfiles de bandas de ITS obtenidos en cada estrato (Figura 8) fueron diferentes en cada muestra. El análisis de cluster y los valores de porcentaje de similitud obtenidos (Figura 9 y Tabla 6) muestran que los patrones obtenidos de las muestras más recientes son similares en un 89%. Los patrones de bandas de la muestra del año ~1820 presenta un 54% de similitud con las muestras más recientes. Además, el porcentaje de similitud entre los patrones de bandas de ~1800 con las demás muestras es de 22%. Los años ~2008 y ~1995 presentan un alto valor de riqueza, de 39, en comparación con ~1820 y ~1800 para los cuales los valores fueron de 27 y 5 respectivamente.

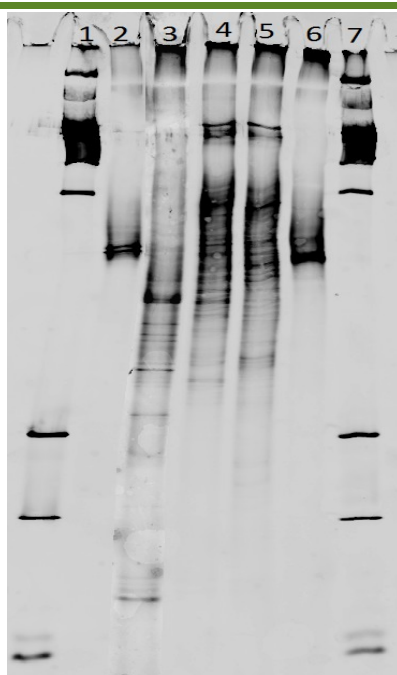


Figura 8: Gel de DGGE obtenido a partir de los amplicones de ITS. Carriles: 1-marcador de peso molecular, 2-muestra de ~1800, 3-muestra de ~1820, 4-muestra de ~1995, 5-muestra de ~2008, 6-control positivo (cepa MVCC14), 7-marcador de peso molecular.

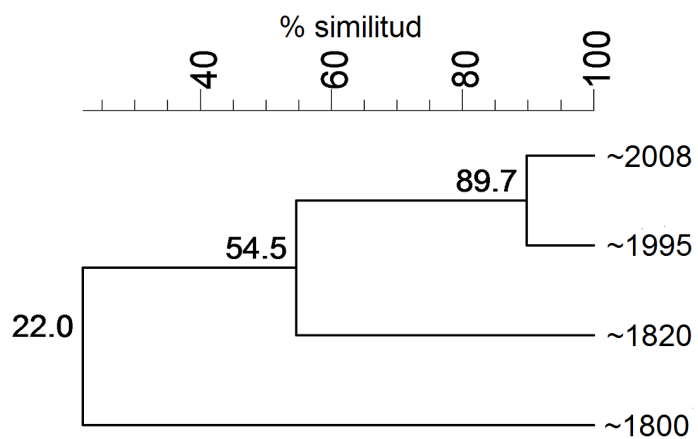


Figura 9: Análisis de cluster del resultado del método DGGE. En la figura están representadas las cuatro muestras con las que se trabajó y el valor de similitud que hay entre cada una.

Tabla 6: Matriz de similitud de la composición microbiana entre los diferentes años: ~2008, ~1995, ~1820 y ~1800; realizado con los resultados del método DGGE.

% similitud				
Muestras	~2008	~1995	~1820	~1800
~2008	100			
~1995	89.75	100		
~1820	54.55	54.55	100	
~1800	22.73	18.19	25.00	100

4) Estudios de la diversidad microbiana mediante secuenciación del ITS

Los clones seleccionados de las bibliotecas correspondientes a los años ~2008 y ~1995 se secuenciaron e identificaron mediante la comparación con la base de datos GenBank (Tabla 7). Se seleccionaron al azar 36 clones pertenecientes a la muestra del año ~2008 de los cuales 12 se relacionaron con bacterias heterótrofas y una se identificó como cianobacteria. En el caso de la muestra de ~1995 se seleccionaron 46 clones para la secuenciación, de los cuales 24 se relacionaron con bacterias heterótrofas y 3 se identificaron como cianobacterias. La mayoría de las bacterias heterótrofas detectadas fueron bacterias que se afiliaron con géneros no cultivados. El porcentaje de similitud entre los clones y su respectivo pariente más cercano superó el 80 % para todos los casos.

Tabla 7: Diversidad de bacterias heterótrofas identificadas mediante secuenciación de los fragmentos de ITS de las muestras de ~2008 y ~1995. En la tabla se representa el nombre del clon, la muestra a la cual pertenece, el pariente más cercano junto con su número de acceso, el origen del mismo y el porcentaje de similitud brindado por NCBI-blast.

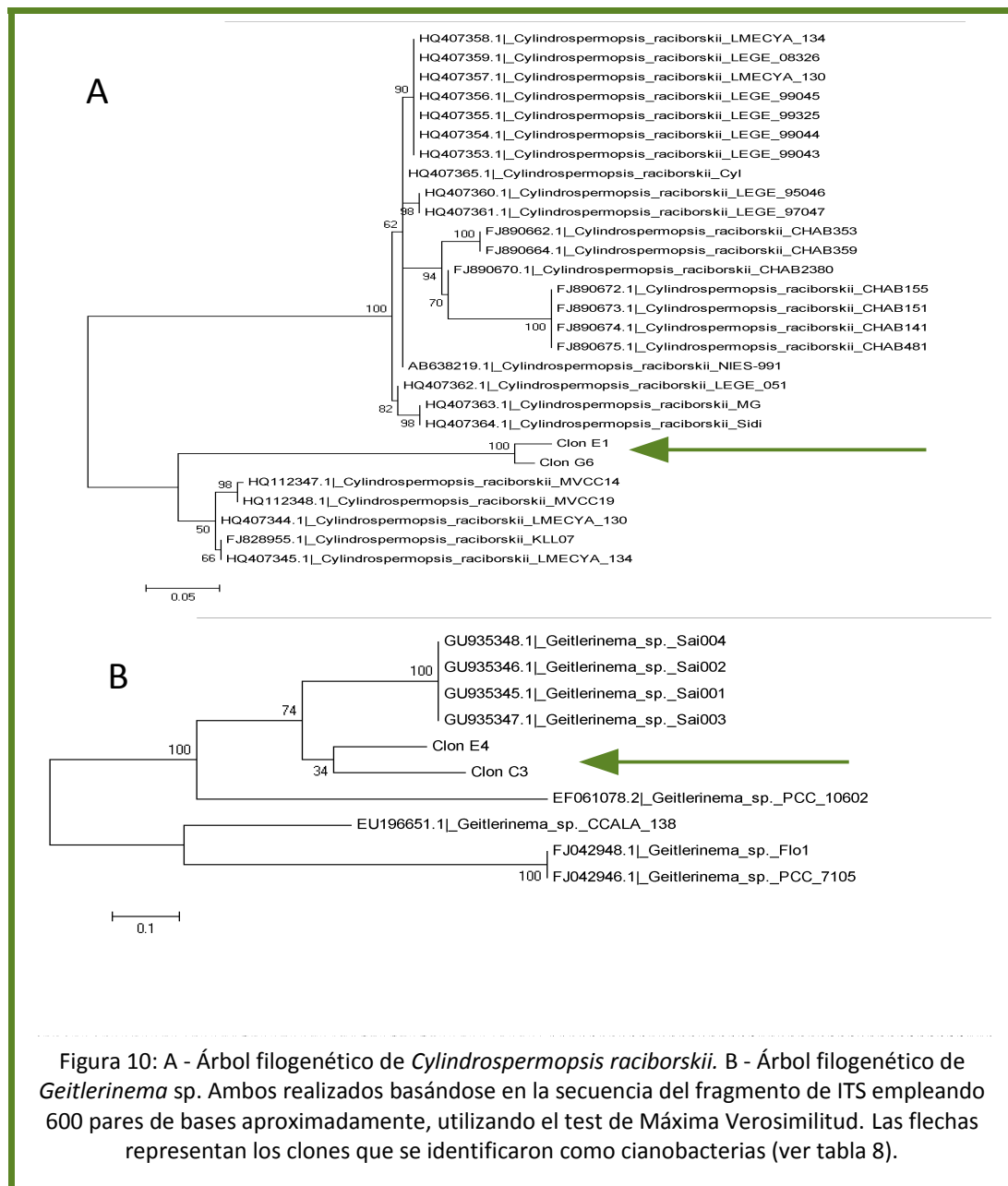
Clon	Muestra	Pariente más cercano (número de acceso)	Origen del pariente más cercano	% similitud
A2	~2008	<i>Methylobacterium alcaliphilum</i> (FO082060)	Ambientes salinos	94
A3		Uncultured bacterium (FJ550694)	Sedimento	85
B2		Uncultured bacterium (JN590900)	Vegetal	85
B5		Uncultured bacterium (KC541092)	Sedimento	94
B6		Uncultured bacterium (AM490733)	Vegetal	92
B7		Uncultured bacterium (AJ937676)	Sedimento	80
B11		Uncultured bacterium (AJ306781)	Sedimento	88
B12		Uncultured bacterium (JN417559)	Sedimento	88
C1		Uncultured bacterium (JN178355)	Sistema acuático	98
C4		Uncultured bacterium (AJ937676)	Sedimento	80
C10		Uncultured bacterium (AJ937676)	Sedimento	81
C12		Uncultured bacterium (DQ058673)	Sistema acuático	83
D2	~1995	Uncultured bacterium (AJ937676)	Sedimento	80
D3		Uncultured Nitrospirae bacterium (AY868811)	Sistema acuático	87
D6		Uncultured beta proteobacterium (FM206221)	Sistema acuático	94
D7		Gamma proteobacterium (FJ178095)	Sedimento	98
D8		Uncultured Actinomycetales bacterium (FJ552599)	Sedimento	92
D10		Uncultured bacterium (FJ545469)	Sistema acuático	95
E5		<i>Methylobacterium methanica</i> (CP002738)	Sistema acuático	80
E8		Uncultured Actinomycetales bacterium (FJ552599)	Sedimento	93
E10		Uncultured bacterium (HQ715921)	Sistema acuático	90
E12		Uncultured sludge bacterium (AF234759)	Sedimento	89
F2		Uncultured bacterium (FN434773)	Sistema acuático	94
F3		Uncultured bacterium (JF346070)	Sistema acuático	99
F4		Uncultured Crater Lake bacterium (AF316773)	Sistema acuático	97
F6		<i>Ignavibacterium album</i> (CP003418)	Sistema acuático	90
F10		Uncultured Desulfuromonadales bacterium (FJ552075)	Sedimento	85
F11		Uncultured Chloroflexi bacterium (GQ406182)	Sistema acuático	94
G3		Uncultured bacterium (JF346070)	Sistema acuático	99
G5		Uncultured bacterium (AJ937676)	Sedimento	80
G7		Uncultured beta proteobacterium (FM206210)	Sistema acuático	91
G9		Uncultured Desulfuromonadales bacterium (FJ552075)	Sedimento	88
G11		Uncultured bacterium (KC331500)	Sedimento	94
G12		Uncultured Desulfuromonadales bacterium (FJ552075)	Sedimento	86

5) Identificación de cianobacterias

En base a la biblioteca de clones se identificaron aquéllas cuya secuencia correspondió a cianobacterias. Se construyó un árbol filogenético (Figura 10) utilizando el programa MEGA 5. Se identificaron dos especies de cianobacterias: *Geitlerinema* sp. y *Cylindrospermopsis raciborskii* (Tabla 8). *Geitlerinema* sp. fue detectada en las muestras de ~2008 y ~1995, mientras que *Cylindrospermopsis raciborskii* sólo estaba presente en la muestra de ~1995. La identificación se realizó con la base de datos NCBI (*National Center for Biotechnology Information*, www.ncbi.nlm.nih.gov) utilizando la herramienta BLAST (*Basic Local Alignment Search Tool*) de la base de datos. Para cada resultado el porcentaje de similitud brindado por esta base de datos fue alto superando el 80% y en algunos casos alcanzando el 100 % (Tabla 8). En el árbol filogenético se demuestra el parentesco entre especies conocidas de *Cylindrospermopsis raciborskii* y *Geitlerinema* sp. con los clones (Figura 10A y 10B respectivamente).

Tabla 8: Especies de cianobacterias identificadas mediante la secuenciación de los fragmentos de ITS de las muestras de ~2008 y ~1995. En la tabla se representa el nombre del clon, la muestra a la cual pertenece, el pariente más cercano junto con su número de acceso y el porcentaje de similitud brindado por NCBI-blast.

Nombre del clon	Muestra	Pariente más cercano (número de acceso)	% similitud
C3	~2008	<i>Geitlerinema</i> sp. (FM210758)	100
E4	~1995	<i>Geitlerinema</i> sp. (FM210758)	95
E1	~1995	<i>Cylindrospermopsis raciborskii</i> (HQ112348)	94
G6	~1995	<i>Cylindrospermopsis raciborskii</i> (HQ407347)	83



DISCUSIÓN

En este trabajo se evaluó la utilidad del ADN presente en muestras de paleo-sedimentos de un lago subtropical como biomarcador para estudios paleolimnológicos. Se analizó la diversidad microbiana en cuatro profundidades diferentes y se realizaron perfiles de clorofila *a* total y materia orgánica. Con los resultados obtenidos podemos ver que el perfil de clorofila *a* total tuvo una correlación significativa con la materia orgánica. La clorofila *a* es un buen indicador de los cambios en la biomasa de productores primarios y del estado trófico del sistema, ya que la clorofila *a* es un pigmento característico de los mismos (macrófitas, fitoplancton y perifiton). La materia orgánica en los lagos someros proviene de diferentes fuentes (Kalff, 2002), en el caso particular de la Laguna Blanca se ha descrito que estuvo dominada por macrófitas (principalmente entre los años 1967 y 1998) (Mazzeo et al., 2003) y a partir del año 2003 se registraron floraciones de cianobacterias (Vidal y Kruk, 2008). Aunque el origen de la clorofila *a* puede ser atribuida a plantas terrestres y la materia orgánica puede ser tanto autóctona como alóctona, la correlación observada entre la materia orgánica y clorofila *a* sugiere que los productores primarios de la laguna son los que aportan más a la producción total del sistema.

Se puede observar en los perfiles de materia orgánica y clorofila *a* que a partir de los 16 cm del testigo ambas variables comienzan a aumentar hasta la superficie, indicando un incremento en la biomasa de productores primarios, principalmente fitoplancton debido a los reportes de floraciones de cianobacterias (Vidal y Kruk, 2008), y un cambio en el estado trófico del sistema. Además, en los perfiles se observan valores máximos en la superficie del testigo y un pico a los 8-9 cm de profundidad en ambas variables. Como antecedente sabemos que la laguna en 1997 se secó debido a una severa sequía y un alto consumo de agua, lo que provocó una reducción del área de la laguna de un 30% (García-Rodríguez et al., 2002). A partir de 1998 las precipitaciones aumentaron contribuyendo al llenado de la laguna. García-Rodríguez et al. (2002) observaron que en 1998 aumentó la tasa de sedimentación debido a un aumento en las precipitaciones. En épocas de altas precipitaciones aumentan los procesos de escorrentía y erosión en la zona, incrementando los aportes externos. Teniendo en cuenta estos antecedentes y los perfiles obtenidos, luego del llenado de la laguna ocurrieron floraciones de fitoplancton, como lo indica el pico de pigmentos a los 8-9 cm, lo cual coincide con los resultados reportados por García-Rodríguez et al. (2002). El aumento de clorofila *a* en los primeros centímetros del testigo (~2008)

también podría representar floraciones de fitoplancton, ya que estudios realizados en esta laguna por Vidal y Kruk (2008) han registrado floraciones de cianobacterias entre el 2003 al 2007, cercano a la fecha aproximada del aumento de la concentración de clorofila *a*.

Por otro lado, desde los 16 cm (años antes de 1995) hasta la profundidad máxima del testigo (65 cm) el porcentaje de materia orgánica y la concentración de clorofila *a* fueron mínimas. Entonces, hasta el año ~1995 la laguna presentaba un nivel trófico relativamente bajo. En los 61-62 cm de profundidad del testigo (~1800) se observó un aumento en la concentración de clorofila *a*, sugiriendo que en el año ~1800 hubo un incremento en la cantidad de productores primarios. Este aumento de los productores primarios pudo deberse a cambios ambientales o impactos antropogénicos que generaron condiciones favorables, como aumento de nutrientes. Luego de este aumento de productores primarios se vio aumentado el porcentaje de materia orgánica a los 60-61 cm del testigo (~1820) la cual puede ser consumida por la bacterias heterótrofas ("loop" microbiano) (Sherr y Sherr, 1988).

Otros autores utilizan la materia orgánica y los pigmentos como indicadores del estado trófico. Por ejemplo, Riedinger-Whitmore et al., (2005) estudió una serie de lagos subtropicales dominados por floraciones de cianobacterias, donde encontró una alta relación entre la eutrofización y la clorofila. Engstrom et al. (2006) pudo constatar que en un lago subtropical de Estados Unidos la eutrofización se ve reflejada en un aumento de la materia orgánica y en los pigmentos fósiles.

En el presente trabajo se extrajo por primera vez ADN de paleo-sedimento de un sistema acuático de Uruguay, el cual fue utilizado para análisis moleculares. Las concentraciones de ADN obtenidas de las muestras de sedimento de la Laguna Blanca fueron superiores a 3,00 µg/g de peso seco, los cuales se asemejan a datos reportados en otros trabajos (Dell'Anno et al., 1998, Coolen y Overmann, 1998; Coolen et al., 2009), donde también se observó que la cantidad de ADN recuperado disminuyó con la profundidad del sedimento. La electroforesis en gel de agarosa del ADN total extraído de cada estrato (Figura 3) muestra que el ADN presente en los sedimentos más antiguos se encuentra más degradado que el de las muestras superficiales, donde se detecta una única banda de alto peso molecular. Los años más antiguos contienen ADN degradado de diferentes pesos moleculares, entre 400 y 3000 pb, en cambio las muestras más recientes poseen ADN mayor a 20000 pb. La eficiente preservación de ADN en sedimentos de la Laguna Blanca se puede atribuir a las condiciones anóxicas y a una alta concentración de materia orgánica en el

sedimento (Coolen y Gibson, 2009), lo que lleva a confirmar que la laguna presenta un alto nivel trófico. La forma en la que el ADN se conserva y los factores que controlan la preservación de ADN permanecen en gran medida desconocidos (Coolen y Gibson, 2009). A lo largo del tiempo se han ido desarrollado varios métodos para el uso del ADN fósil, se han propuesto posibles soluciones para los diferentes tipos de daño que puede presentar el ADN, como ser daño oxidativo, degradación del ADN por nucleasas luego de su deposición, daño por hidrólisis (Rizzi et al., 2012). Un estudio realizado por Coolen y Overmann 1998 mostró que la mayoría del ADN genómico es degradado a fragmentos más cortos (aproximadamente 500 pb) dentro de los primeros 100 años después de la deposición. En el estudio realizado por Boere et al., (2011), en el cual se utilizó un testigo de 113 cm, la cantidad de ADN, de bacterias verdes del azufre, mayor a 23 kb se mantuvo entre un 30-55% en todo el largo del testigo y sólo entre un 0-10% de fragmentos de tamaño de 2,2-0,7 kb y menor 0,7 kb. En general concentraciones altas de ADN fósil en muestras de testigos de sedimentos menores a 200 años posiblemente estén vinculadas con un aumento de la población cerca de la laguna, lo que ocasiona un impacto antropogénico sobre la laguna y como consecuencia un aumento del estado trófico del ecosistema acuático (Boucherle y Züllig, 1988).

El análisis de los amplicones de ITS obtenidos de cada muestra mostró que en los años ~2008 y ~1995 no hubo inhibición de la polimerasa debido a contaminantes. En cambio, en las muestras de sedimento de los años ~1820 y ~1800 fue necesario la utilización de DMSO para obtener una buena amplificación (Pomp y Medrano, 1991). Los sedimentos más antiguos pueden presentar altas concentraciones de componentes que provoquen la inhibición de PCR, como ser los ácidos húmicos presentes en el sedimento.

Los patrones de bandas obtenidos por los dos métodos de *fingerprinting* mostraron ser similares entre los dos estratos más recientes (~2008 y ~1995) y entre los más antiguos (~1820 y ~1800), sugiriendo que la composición del ensamblaje bacteriano se mantuvo durante los respectivos períodos de tiempo. Ambas técnicas de análisis de diversidad microbiana utilizadas (RISA y DGGE) presentan diferentes niveles de resolución. La técnica DGGE, en la cual los fragmentos son separados no sólo por su longitud sino también por la secuencia, brinda resultados más detallados. La secuencia de ITS es utilizado como marcador molecular de diversidad bacteriana ya que contiene información filogenética y al no formar parte del ribosoma esta sujeta a una mayor tasa de mutaciones. Por lo tanto, con esta secuencia es posible capturar los cambios evolutivos

más recientes. Al utilizar los fragmentos de ITS en el análisis de DGGE podemos determinar la diversidad generada más recientemente en la evolución. Utilizando ambos métodos moleculares de diversidad microbiana se pudo ver diferencias entre las comunidades microbianas de los distintos años (Figura 6 y 8), en donde los años más recientes presentan mayor valor de riqueza. Las especies microbianas presentes en la muestra del año ~1800 también son compartidas por las otras tres muestras (~1820, ~1995 y ~2008), a su vez la comunidad microbiana de la muestra ~1820 también está presente en las dos muestras más recientes (~1995 y ~2008). Las especies detectadas en ~1800 y ~1820 lograron prevalecer hasta ~2008. Cabe destacar que en el caso del análisis de diversidad microbiana por DGGE, la muestra correspondiente a ~1800 mostró valores de riqueza (como número de bandas) menores a los encontrados por RISA. Este hallazgo es llamativo, ya que se esperaba encontrar igual o mayor número de bandas debido a la mayor resolución que posee la técnica de DGGE. Esta observación probablemente se haya debido a una baja concentración de muestra sometida a electroforesis en el DGGE, lo cual dificultó o imposibilitó su detección con la tinción empleada.

En los ecosistemas acuáticos las bacterias transforman la materia orgánica disuelta (MOD) en materia orgánica particulada (MOP). La transferencia de la materia orgánica desde la trama trófica microbiana a los niveles tróficos superiores es conocida como “loop” microbiano, donde las bacterias tienen un rol central en la re-introducción de la materia orgánica en suspensión hacia los niveles tróficos más altos (Sherr y Sherr, 1988). La abundancia de los grupos bacterianos es afectada por varios factores incluyendo la composición y concentración de la materia orgánica disuelta. Esto puede controlar la tasa de crecimiento, la biomasa y la estructura de la comunidad bacteriana (Rossello-Mora et al., 1999; Eilers et al., 2000; Covert y Mora, 2001; Fandino et al., 2001; Muylaert et al., 2002; Findlay et al., 2003). La materia orgánica puede provenir de fuentes tanto autóctonas como alóctonas. Se ha visto que distintas fuentes de materia orgánica al igual que distintos taxones de fitoplancton proporcionan sustratos para las bacterias que difieren en su composición química lo que genera cambios en su composición (Sundh, 1992; Lindström, 2001; Benner, 2002, 2003). Además los distintos grupos bacterianos pueden responder y utilizar diferente la MOD (Cottrell y Kirchman, 2000; Martínez et al., 1996; Kirchman, 2002). No sólo la MOD puede provocar cambios en las comunidades microbianas, las propiedades químicas del agua (Methé y Zehr, 1999), la presencia de predadores (Lindström, 2000; Höfle et al., 1999), o también la incorporación de bacterias alóctonas al sistema pueden alterar la composición de dicha

comunidad (Lindström, 2001). Sin perder de vista que el ADN sufre procesos de degradación y que esto puede influir en la recuperación del mismo, en este trabajo se detectaron cambios en la comunidad microbiana en los diferentes años analizados, donde se observó un aumento de la riqueza microbiana desde ~1800 hacia los años más recientes. Esto se puede adjudicar a diferentes factores, como ser a la temperatura de la columna de agua, al estado de eutrofización de la laguna y a la concentración y origen de materia orgánica. El porcentaje de materia orgánica ha ido aumentando desde la profundidad del testigo hasta la superficie; en años posteriores a 1995 la materia orgánica disuelta comienza a aumentar hasta la superficie del testigo donde se registraron alteraciones en la comunidad microbiana. Además, en el año ~1820 hay un leve aumento en el porcentaje de la materia orgánica (Figura 3A) lo cual coincide con un cambio notorio en la comunidad microbiana entre las muestras de ~1800 y ~1820 (Figura 8).

Los carotenoides y la clorofila son pigmentos encontrados en algas y macrófitas; estos biomarcadores son muy utilizados en estudios paleolimnológicos. Algunos carotenoides son marcadores de cianobacterias, ya que las mismas contienen carotenoides que no producen otros organismos fotosintéticos. Los mismos pueden ser bien preservados en los sedimentos de los lagos, y su concentración total es proporcional a la productividad del lago en el momento de su deposición (Swain, 1985; Sanger, 1988). Los carotenoides y clorofila en el sedimento han sido utilizados para documentar cambios históricos de abundancias de cianobacterias y algas (Leavitt y Carpenter, 1990; Hickman y Schweger, 1991; Leavitt, 1993). Sin embargo, estos biomarcadores no permiten la identificación de las especies presentes en el sedimento; en cambio, mediante la utilización del ADN, sí se puede lograr. Si el ADN y los carotenoides se encuentran igualmente conservados se espera que los perfiles de concentración tengan la misma tendencia. En el trabajo realizado por Boere et al., (2011) no se ha encontrado esta correlación entre el ADN fósil y carotenoides, ellos atribuyen a este resultados que los carotenoides fueron degradados. Se ha encontrado que la hidrogenación conduce a la formación de carotenoides reducidos, proceso que explica la pérdida de los carotenoides (Coolen et al., 2006). Además, Boere et al. (2011) compara la preservación del ADN de diferentes organismos del sistema acuático: diatomeas, dinoflagelados y las bacterias verdes del azufre en donde concluye que el ADN de este último organismo fue el mejor preservado. Por lo tanto, Boere et al., (2011) afirman que el ADN fósil en los sedimentos parece ser menos propenso a la degradación que los carotenoides y representan una herramienta más fiable cuantitativa y cualitativamente para el estudio de las poblaciones microbianas pasadas.

El análisis de la diversidad microbiana mediante secuenciación mostró que en los años ~2008 y ~1995 hay una gran diversidad de bacterias heterótofas y cianobacterias. Las cianobacterias identificadas fueron *Cylindrospermopsis raciborskii* y *Geitlerinema* sp., estos resultados demuestran la buena calidad e integridad de los fragmentos del ADN preservado en los sedimentos. Según estudios realizados por Sarthou (en preparación) en el verano de 2011 se ha encontrado *Planktolyngbya limnetica*, *Aphanizomenon* cf. *gracile*, *Cylindrospermopsis raciborskii* y *Aphanocapsa* cf. *delicatissima*. En otoño e invierno del mismo año dominaba *Mougeotia* sp., aunque había presencia de *Cylindrospermopsis raciborskii*. En verano de 2012 la principal especie presente fue *Planktolyngbya limnetica* y también se encontró en menor proporción *Aphanizomenon* cf. *gracile* y *Cylindrospermopsis raciborskii*. En invierno, otoño y primavera de 2012 dominaba *Mougeotia* sp., y además había una gran diversidad de especies incluyendo la presencia de *C. raciborskii*. En relación a estos datos vemos que la presencia de *C. raciborskii* se mantuvo durante los años 2011 y 2012.

Debido a que algunas especies de cianobacterias como *Cylindrospermopsis raciborskii* producen acinetes que permiten la conservación del ADN, se podría atribuir a éstos el origen del ADN presente en los estratos más antiguos (Lindahl, 1993; Poinar et al., 1996; Willerslev et al., 2004). Las cianobacterias las generan con el fin de asegurar su supervivencia cuando las condiciones se vuelven desfavorables, por ejemplo, cambios en las concentraciones de nutrientes, a la falta de luz, o la disminución de la temperatura del agua (Nichols y Adams, 1982; Whitton, 1992). Otros autores han correlacionado la presencia de acinetes en muestras de sedimentos con la disminución de las concentraciones de nitrógeno total y fósforo total (Demeter, 1956; Wolk, 1965; Gentile y Maloney, 1969). En la Laguna Blanca, según García-Rodríguez et al. (2002) se ha visto que la concentración de nitrógeno y fósforo aumenta en sedimentos más recientes. Por lo tanto, es posible la formación de acinetes en los años más antiguos sugiriendo que la preservación del ADN en las muestras de sedimento de los años ~1820 y ~1800 pudo deberse a los mismo. En cambio, en años más recientes la posibilidad de formación de acinetes es menor debido al aumento de nitrógeno y fósforo, esto sugiere que el ADN encontrado en las muestras de sedimento de ~2008 y ~1995 proviene principalmente de organismos que no han sido degradados. Para confirmar lo dicho anteriormente se debería hacer un conteo de los acinetes en cada muestra y así poder relacionarlo con las concentraciones de ADN. El conteo, mediante microscopia, de los acinetes presentes en el sedimento puede utilizarse para obtener una estimación aproximada de las

abundancias pasadas de cianobacterias. Cuando se usa junto con otros microfósiles y parámetros químicos es posible obtener una estimación fiable de si la producción pasada estaba aumentando o disminuyendo o si existen cambios en la limitación de nutrientes (Räsänen et al., 2006). Por otro lado, también existen cianobacterias que no producen acinetes, pero podrían estar presentes y no dejar un registro fósil directo. Por lo tanto, se debe utilizar otro biomarcador para poder detectar su presencia. En ese caso el ADN fósil podría ser muy útil ya que se podría conservar no sólo en los acinetes sino también en células vegetativas o filamentos que no fueron degradados. En este trabajo pudimos detectar, utilizando el ADN, la presencia de una cianobacteria que no forma acinetes (*Geitlerinema* sp.). Su ADN quizás fue conservado por sus células vegetativas, las cuales son estructuras resistentes. Por lo tanto, el ADN fósil se validó como herramienta para la detección e identificación de cianobacterias fósiles en un ambiente subtropical. Algunas de las especies de fitoplancton encontradas por Sarthou en 2011 y 2012 tienen la capacidad de formar acinetes. Éstas son: *Aphanizomenon* cf. *gracile* y *Cylindrospermopsis raciborskii*. Por este motivo las probabilidades de encontrar ADN de estas dos cianobacterias en los primeros centímetros del sedimento van a ser mayores, ya que el mismo puede ser conservado en los acinetes.

Los cambios en la clorofila *a*, materia orgánica junto a la presencia de la cianobacteria *Cylindrospermopsis raciborskii* detectada en el año ~1995, indican que el estado trófico de la laguna comienza a aumentar poco antes de 1995 (12 cm). A su vez, los análisis de diversidad microbiana indicaron que la misma cambió en ~1995 y ~2008 en comparación con los años más antiguos. La diversidad microbiana entre los años más recientes fue similar, presentando un 89% de similitud aproximadamente. Esto apoya la hipótesis planteada en este trabajo: mediante el ADN fósil se pudo determinar la diversidad microbiana de diferentes años y detectar la presencia de cianobacterias; además el análisis del ADN fósil de distintas profundidades reflejó alteraciones ocurridas en el pasado la laguna. El aumento del porcentaje de materia orgánica y clorofila *a* a los 60 cm de profundidad del testigo podría estar correlacionada con el cambio en la comunidad microbiana entre los años ~1800 y ~1820 (Figura 8). La diversidad microbiana cambia notoriamente de ~1800 a ~1820, presentando entre ambas un 25% de similitud (Tabla 6). Este resultado apoya la hipótesis propuesta en este trabajo: mediante la diversidad microbiana obtenida a partir del ADN fósil fue posible detectar cambios en el pasado de la laguna.

En general otros estudios paleolimnológicos que utilizan el ADN fósil como herramienta, sólo

estudian algunos grupos bacterianos o específicamente determinadas especies bacterianas (ej: Coolen y Oermann, 2007; Coolen et al., 2004). Coolen y Overmann (2007) utilizaron el ADN fósil y DGGE para determinar la diversidad de bacterias verdes del azufre y de esta forma reconstruir las condiciones paleoecológicas en más detalle. Con los distintos perfiles obtenidos y la identificación de la diversidad de bacterias Coolen y Overmann (2007) estimaron en qué momento de la historia del sistema acuático apareció este grupo bacteriano y aproximan a qué se debe su aparición. Otro estudio realizado en un lago de la Antártida por Coolen y colaboradores en el año 2004 empleó el ADN ribosomal de algas planctónicas fotótrofas y DGGE. La estructura de dicha comunidad varió en relación a la evolución del lago. Se han visto cambios en la comunidad en el momento en que el lago dejó de tener influencia de agua salobre. Además, bacterias verdes de azufre fueron encontradas en el período en que el agua de deshielo comenzó a entrar al lago provocando una estratificación del mismo y una termoclina estable.

En el año 2002 García-Rodríguez y colaboradores realizaron un estudio paleolimnológico en la Laguna Blanca empleando un testigo de 150 cm de largo tomado en Mayo del 2000 el cual fue datado. En dicho estudio, los perfiles de materia orgánica y clorofila reportados son similares a los obtenidos en el presente trabajo, observando que en años previos a 1995 se comienza a registrar un aumento de la materia orgánica hasta el presente. García-Rodríguez et al. (2002) destacan que el período de aumento de la materia orgánica coincide con un gran desarrollo del turismo y urbanización. Durante los últimos 20 años aproximadamente, casas y hoteles han sido construidos cercanos a las orillas de la laguna. Debido a esto, pueden haber ocurrido impactos humanos como generación de aguas residuales y eliminación de basura, los cuales se ven reflejados en los cambios en las variables químicas del testigo donde se ve aumentada la materia orgánica y los pigmentos. Esto sugiere que la variación de la comunidad microbiana y el aumento de la riqueza observado hacia los años más recientes pueden ser debido a la eutrofización de la laguna causada por el desarrollo de la urbanización en la zona. Previo a ese aumento abrupto de la materia orgánica y pigmentos, el nivel trófico de la laguna era bajo. Al igual que en el presente trabajo, García-Rodríguez et al. (2002) detectaron un pico de materia orgánica y clorofila a los 60 cm de profundidad. Estos autores relacionan esta variación a la remoción de tierra en la parte norte de la cuenca del lago, que fue utilizada para la construcción de carreteras y viviendas; proponen que debido a dicha remoción se generaron cambios en la litología del sedimento y en la composición de la comunidad de diatomeas. Las diferencias encontradas de la comunidad microbiana en los

años ~1820 y ~1800 podría estar relacionada con la remoción de tierra de la cuenca lo que pudo haber provocado, por ejemplo, cambios en el aporte de materia orgánica y nutrientes.

Los hallazgos descritos en este trabajo son coherentes con los resultados reportados por García-Rodríguez et al. (2002). Teniendo en cuenta los antecedentes de esta laguna y los cambios observados a nivel de la clorofila *a*, materia orgánica y diversidad microbiana, se puede inferir que hubo alteraciones sobre la laguna y su cuenca a partir de años anteriores a 1995 que provocó un aumento de clorofila *a*, materia orgánica y abundancia microbiana, llevando a que el sistema se vuelva hipereutrófico. Mediante la utilización del ADN presente de muestras de paleo-sedimento junto con el estudio de otras variables paleo-limnológicas es posible la reconstrucción del pasado de la Laguna Blanca. Por otro lado el ADN permite la identificación de microorganismos a nivel especie y así determinar la composición exacta de comunidad microbiana. Además, las variaciones de la comunidad microbiana se pueden relacionar con alteraciones ocurridas sobre la laguna.

CONCLUSIONES

Utilizando el ADN fósil presente en muestras de sedimento de la Laguna Blanca fue posible analizar la diversidad microbiana, incluyendo bacterias heterótrofas y cianobacterias, además de determinar e identificar especies de cianobacterias. Las diferencias en la diversidad microbiana de cada año se pudieron relacionar con alteraciones que ha sufrido el sistema acuático. El cambio en la diversidad microbiana entre los años ~1800 y ~1820 fue relacionado con alteraciones en el uso de la cuenca de la laguna, lo que provocó también un aumento de productores primarios y de materia orgánica. En los años más recientes (~1995 y ~2008) la comunidad microbiana ha cambiado notoriamente en comparación con los años más antiguos (~1820 y ~1800) lo que está relacionado con un aumento de estado trófico de la laguna que se refleja en un aumento de la producción primaria. Además, en las muestras correspondientes a los años ~2008 y ~1995 se ha logrado identificar una especie de cianobacteria tóxica, *Cylindrospermopsis raciborskii*, de la cual se han registrado floraciones desde el 2003 en este sistema. Por lo tanto, el ADN, además de la materia orgánica y la clorofila *a*, mostró ser buen indicador para determinar el estado trófico y cambios ambientales de la laguna. Mediante los resultados obtenidos en el presente trabajo se concluye que el ADN presente en muestras de paleo-sedimento es un buen biomarcador para estudios paleolimnológicos, por el cual se puede inferir cambios en la comunidad microbiana, detectar e identificar especies de cianobacterias, determinar alteraciones en el estado trófico del sistema y relacionarlos con cambios ambientales que ha sufrido el sistema acuático. Este trabajo contribuye al conocimiento sobre la ecología microbiana de la Laguna Blanca, proporcionando nueva información para la reconstrucción de la dinámica de las poblaciones bacterianas en un enfoque paleolimnológico. Los estudios paleolimnológicos son una herramienta muy útil en lagos donde no haya antecedentes o estudios a largo plazo. Los datos paleolimnológicos pueden ser utilizados para reconstruir la historia de un sistema y generar predicciones a futuro.

PERSPECTIVAS

Se planea continuar y avanzar en este estudio en el marco de una Tesis de Maestría, ya que en este trabajo sólo se realizó un análisis cualitativo y sería fundamental contar con datos cuantitativos. Para ello se tomará un nuevo testigo de la Laguna Blanca y se extraerán muestras de diferentes profundidades para realizar perfiles de materia orgánica y clorofila, analizar la diversidad microbiana y detectar la presencia de cianobacterias tóxicas en los distintos estratos. El objetivo de esta detección es poder trazar la presencia de cianobacterias tóxicas productoras de floraciones en el pasado. La técnica que se va a emplear para la cuantificación será PCR en tiempo real. Para la cuantificación relativa de *C. raciborskii* se emplearía el gen *sxtU* involucrado en la síntesis de la saxitoxina. El conocimiento del momento de aparición de cianobacterias tóxicas como *C. raciborskii* en la Laguna Blanca servirá como punto de partida para evaluar las condiciones que han llevado a su proliferación en el pasado y compararlas con las presentes. Así se reconstruirá con mayor precisión la historia de la laguna y la información generada se podrá emplear como herramienta para la evaluación y monitoreo de la misma.

AGRADECIMIENTOS

En primer lugar le quisiera agradecer especialmente a mi madre, a mi padre y a mi hermano por todo la ayuda, apoyo, cariño y confianza que me han brindado todos estos años.

Le agradezco especialmente a mi tutora Claudia, por haberme enseñando y haber compartido todo su conocimiento, por las oportunidades que me ha brindado y por todo el tiempo dedicado. Gracias también a mi co-tutor Dermot por su ayuda y por haberme introducido a la paleolimnología.

También, gracias a mis abuelos, Tata y Lala, y a mi tía Ali por todo el apoyo y cariño. Un agradecimiento especial para mi abuela por todas las cosas ricas que me ha hecho para compartir con mis compañeros.

Gracias a mis profesores de orfebrería, Gastón e Inés, y a todas mis compañeras: Marisa, Ana, Martha, Guiomar y a la nueva generación de orfebres por haberme acompañado en toda la carrera y hacer que las tardes de los jueves sean las más divertidas.

A la colonia, por toda la ayuda brindada, por hacer que las horas de trabajo sean divertidas y por hacerme sentir parte del grupo, en especial a mis compañeros del grupo de Ecología Acuática Microbiana: Paula, Marti y Germán. A la actriz Sofi por toda su buena onda. También a las abejas Belén, por toda la ayuda con el DGGE, y Dani por todo su apoyo.

Al grupo CSIC-Ecología y Fisiología del Fitoplancton.

Finalmente, agradezco a la ANII por la financiación de mi beca de iniciación a la investigación.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Acinas, S. G., Anton, J., & Rodriguez-Valera, F. 1999.** Diversity of freeliving and attached bacteria in offshore western Mediterranean waters as depicted by analysis of genes encoding 16S rRNA. *Appl. Environ. Microbiol.*, 65: 514-522.
- Aubel, D., Renaud, F. N. R., & Freney, J. 1997.** Genomic diversity of several *Corynebacterium* species identified by amplification of the 16S-23S rRNA gene spacer regions. *Int. J. Syst. Bacteriol.*, 47: 767-772.
- Benner, R. 2002.** Chemical composition and reactivity. En: Biogeochemistry of marine dissolved organic matter. Hansell, D. A., Carlson, C. A. (Eds.). Academic Press, New York, pp. 59–90.
- Benner, R. 2003.** Molecular indicators of bioavailability of dissolved organic matter. En: Aquatic ecosystems: interactivity of dissolved organic matter. Findlay S.E.G., Sinsabaugh R.L. (Eds.). Academic Press, San Diego, pp. 121–137.
- Bird, M.I., Chivas, A.R., Radnell, C.J., & Burton, H.R. 1991.** Sedimentological and stableisotope evolution of lakes in the Vestfold Hills, Antarctica. *Palaeogeography, Palaeoclimatology, Palaeoecology*, 84: 109-130.
- Boere, A., Abbas, B., Rijpstra, W. I. C., Versteegh, G. J. M., Volkman, J. K., Sinninghe Damsté, J. S. & Coolen, M. J. L. 2009.** Late-Holocene succession of dinoflagellates in an Antarctic fjord using a multi-proxy approach: paleoenvironmental genomics, lipid biomarkers, and palynomorphs. *Geobiology*, 7: 265-281.
- Boere, A., Sinninghe Damsté, J. S., Rijpstra, W. I. C., Volkman, J. K., & Coolen, M. J. L. 2011.** Source-specific variability in post-depositional DNA preservation with potential implications for DNA based paleoecological records. *Organic Geochemistry*, 42: 1216-1225.
- Bonilla, S. 2009.** Cianobacterias planctónicas del Uruguay, manual para la identificación y medidas de gestión. Documento técnico PHI-LAC, N°16.
- Bonilla, S. & Conde, D. 2000.** El fitoplancton como descriptor sensible de cambios ambientales en las lagunas costeras de la Reserva Banados del Este. *Probides/UNESCO*, 31: 63-7.
- Bonilla, S., Conde, D., Aubriot, L., Rodriguez-Gallego, L., Piccini, C., Meerhoff, E., Rodriguez, L., Gomez, P. & Machado, I. 2006.** Procesos estructuradores de las comunidades biológicas en lagunas costeras de Uruguay. En: Bases para la conservación y el manejo de la costa Uruguaya. Menafrá R., Rodríguez-Gallego L., Scarabino F. & Conde D. (Eds.) Montevideo, Vida Silvestre/US-Fish Wildlife Service: 611-630.
- Bonilla, S., Perez, M. C. & De Leon, L. 1995.** Cianofíceas Planctónicas del Lago Ton-Ton, Canelones, Uruguay. *Hoehnea*, 21: 185-192.
- Bonilla, S., Aubriot, L., Soares, M. C. S., Gonzalez-Piana, M., Fabre, A., Huszar, V. L. M., Lüring, M., Antoniadis, D., Padisák, J., & Kruk, C. 2012.** What drives the distribution of the bloom-forming cyanobacteria *Planktothrix agardhii* and *Cylindrospermopsis raciborskii*? *Microbiology Ecology*, 79: 594-607.
- Borneman, J., & Triplett, E. W. 1997.** Molecular microbial diversity in soils from Eastern Amazonia: evidence for unusual microorganisms and population shifts associated with deforestation. *Appl.*

Boucherle, M. M., & Züllig, H. 1988. Lago Cadagno: an environmental history. En: Lake, Mire and River Environments During the Last 15000 Years. Lang G., Schlüchter C. (Eds.) pp. 229.

Briand, J., Leboulanger, C., Humbert, J., Bernard, C., & Dufour, P. 2004. *Cylindrospermopsis raciborskii* (Cyanobacteria) invasion at mid-atitudes: selection, wide physiological tolerance, or global warming? *Journal of Phycology*, 40: 231-238.

Callender, E. 2000. Geochemical effects of rapid sedimentation in aquatic systems: minimal diagenesis and preservation of historical metal signatures. *Journal of Paleolimnology*, 23: 243-260.

Carmichael, W. W. 1992. Cyanobacteria secondary metabolites? the cyanotoxin. *J. Appl. Microbiol.*, 72: 445-459.

Carmichael, W. W. 2001. The cyanotoxins: bioactive metabolites of cyanobacteria: occurrence, ecological role, taxonomic concerns and effects on humans. *Journal of Phycology*, 37: 9-10.

CARU, Comisión Administradora del Río Uruguay, 2013. Programa de vigilancia de playa, comunicado semanal, 26 Abril 2013.

Castenholz, R. W. & J. W. Waterbury, 1989. Cyanobacteria. En: Bergey's Manual of Systematic Bacteriology. Staley, J. T., Bryant, M. P. Pfennig, N. & Holt, J. G. (Eds), The Williams & Wilkins Co., Baltimore: 1710–1727.

Cho, H. B., Lee, J. K., & Choi, Y. K. 2003. The Genetic Diversity Analysis of the Bacterial Community in Groundwater by Denaturing Gradient Gel Electrophoresis (DGGE). *The Journal of Microbiology*, 41: 327-334.

Chorus, I. & Bartram, J. 1999. Toxic cyanobacteria in water. A guide to their public health consequences, monitoring and management. WHO. E&FN Spon. London and New York. pp. 416.

Chorus, I., Falconer, I. R., Salas, H. J., & Bartram, J. 2000. Health risks caused by freshwater cyanobacterian in recreational waters. *J. Toxicol. Environm. Health.*, 3: 323-347.

Codd, G. A., Lindsay, J., Young, F. M., Morrison, L. F., & Metcalf, J. S. 2005. Harmful Cyanobacteria: from mass mortalities to management measures. En: Harmful Cyanobacteria. Huisman, J., Matthijs, H. C. P., Visser, P. M., (Eds.) Vol. 3, Springer, pp. 1-23.

Cole, J. R., Wang, Q., Cardenas, E., Fish, J., Chai, B., Farris, R. J., Kulam-Syed-Mohideen, A. S., McGarrell, D. M., Marsh, T., Garrity, G. M., & Tiedje, J. M. 2009. The Ribosomal Database Project: improved alignments and new tools for rRNA analysis. *Nucleic Acids Research*, 37: D141-D145.

Coolen, M. J. L. & Overmann, J., 2007. 217 000-year-old DNA sequences of green sulfur bacteria in Mediterranean sapropels and their implications for the reconstruction of the paleoenvironment. *Environmental Microbiology*. 9: 238-249.

Coolen, M. J. L., Muyzer, G., Schouten, S., Volkman, J. K. & Sinninghe Damsté, J. S. 2006. Sulfur and methane cycling during the Holocene in Ace Lake (Antarctica) revealed by lipid and DNA stratigraphy. En: Past and Present Water Column Anoxia. Neretin, L.N. (Eds.) pp. 41–65.

Coolen, M. J. L., Volkman, J. K., Abbas, B., Muyzer, G., Schouten, S. & Sinninghe Damsté, J. S.

- 2007.** Identification of organic matter sources in sulfidic late Holocene Antarctic fjord sediments from fossil rDNA sequence analysis. *Paleoceanography*, 22: PA2211, doi:10.1029/2006PA001309.
- Coolen, M. J. L. & Gibson, J. A. E. 2009.** Ancient DNA in lake sediment records. *PAGES News*. 17: 104-106.
- Coolen, M. J. L., Muyzer, G., Rijpstra, W. I. C., Schouten, S., Volkman, J. K. & Sinninghe Damsté, J. S. 2004.** Combined DNA and lipid analyses of sediments reveal changes in Holocene haptophyte and diatom populations in an Antarctic lake. *Earth and Planetary Science Letters*, 223: 225-239.
- Coolen, M. J. L. & Overmann, J. 1998.** Analysis of subfossil molecular remains of purple sulfur bacteria in a lake sediment. *Applied and Environmental Microbiology*, 64: 4513-4521.
- Coolen, M. J. L., Saenz, J. P., Giosan, L., Trowbridge, N. Y., Dimitrov, P., Dimitrov, D. & Eglinton, T. I. 2009.** DNA and lipid molecular stratigraphic records of haptophyte succession in the Black Sea during the Holocene. *Earth and Planetary Science Letters*, 284: 610-621.
- Cottrell, M. T. & Kirchman D. L. 2000.** Natural assemblages of marine proteobacteria and members of the *Cytophaga- Flavobacter* cluster consuming low- and high- molecularweight dissolved organic matter. *Appl. Environ. Microbiol.*, 66:1692-1697.
- Covert, J. S. & Moran, M. A. 2001.** Molecular characterization of estuarine bacterial communities that use high- and lowmolecular weight fractions of dissolved organic carbon. *Aquat. Microb. Ecol.*, 25: 127-139.
- De León, L. & J. Yunes. 2001.** First report of a *Microcystis aeruginosa* toxic bloom in La Plata River. *Environ. Toxicol.*, 16: 110-112.
- Dean, W. 1974.** Determination of carbonate and organic matter in calcareous sediments and sedimentary rocks by loss on ignition; comparison with other methods. *Journal of Sedimentary Research*, 44: 242-248.
- Dean, J. M., Kemp, A. E. S., Bull, D., Pike, J., Patterson, G., & Zolitschka, B. 1999.** Taking varves to bits: Scanning electron microscopy in the study of laminated sediments and varves. *Journal of Paleolimnology*, 22: 121-136.
- Dell'Anno, A., Fabiano, M., Duineveld, G. C. A., Kok A. & Danovaro, R. 1998.** Nucleic Acid (DNA, RNA) Quantification and RNA/DNA Ratio Determination in Marine Sediments: Comparison of Spectrophotometric, Fluorometric, and HighPerformance Liquid Chromatography Methods and Estimation of Detrital DNA. *Appl. Environ. Microbiol.*, 64: 3238-3245.
- Demeter, O. 1956.** Über Modifikationen bei Cyanophyceen. *Archives of Microbiology*. 24: 105-133.
- Engstrom, D., Schotter, S., Leavitt, P. & Havens, K. 2006.** A re-evaluation of the cultural eutrophication of Lake Okeechobee using multiproxy sediment record. *Ecological Applications*, 16: 1194-1206.
- Eilers, H., Pernthaler, J. & Amann, R. 2000.** Succession of pelagic marine bacteria during enrichment: a close look at cultivation- induced shifts. *Appl. Environ. Microbiol.*, 66: 4634-4640.

Fabre, A., Carballo, C., Hernández, E., Piriz, P., Bergamino, L., Mello, L., González, S., Pérez, G., León, J. G., Aubriot, L., Bonilla, S. & Kruk, C. 2010. El nitrógeno y la relación zona eufótica/zona de mezcla explican la presencia de cianobacterias en pequeños lagos subtropicales, artificiales de Uruguay. *Pan-American Journal of Aquatic Sciences.*, 5: 112-125.

Fandino, L. B., Riemann, L., Steward, G. F., Long, R. A. & Azam, F. 2001. Variations in bacterial community structure during a dinoflagellate bloom analyzed by DGGE and 16S rDNA sequencing. *Aquat. Microb. Ecol.*, 23: 119-130.

Findlay, S. E. G. 2003. Bacterial response to variation in dissolved organic matter. En: Aquatic ecosystems: interactivity of dissolved organic matter. Findlay, S. E. G., Sinsabaugh, R. L. (Eds.) Academic Press, San Diego, pp. 363-379.

Fisher, M. M. & Triplett, E. W. 1999. Automated approach for ribosomal intergenic spacer analysis of microbial diversity and its application to freshwater bacterial communities. *Appl. Environ. Microbiol.*, 65: 4630-4636.

García-Rodríguez, F., Mazzeo, N., Sprechmann, P., Metzeltin, D., Sosa, F., Treutler, H.C., Renom, M., Scharf, B. & Gaucher, C. 2002. Paleolimnological assessment of human impacts in Lake Blanca, SE Uruguay. *Journal of Paleolimnology*, 28: 457-468.

Gentile, J. H. & Maloney, T. E. 1969. Toxicity and environmental requirements of a strain of *Aphanizomenon flosaquae*. *Canadian Journal of Microbiology*, 15: 165–173.

Hammer, Q., Harper, D. A., & Ryan, P. D. 2001. PAST: paleontological statistics software package for education and data analysis. *Palaeontologia electronica*, 4: 9.

Hamilton, P., Ley, L., Dean, S. & Pick, F. 2005. The occurrence of the cyanobacterium *Cylindrospermopsis raciborskii* in Constance Lake: an exotic cyanoprokaryote new to Canada. *Phycologia*, 44: 17-25.

Hansen, M. C., Tolker-Nielsen, T., Givskov, M. & Molin, S. 1998. Biased 16S rDNA PCR amplification caused by interference from DNA flanking the template region. *Microbiol. Ecol.*, 26:141-149.

Hickman, M. & Schweger, C. E. 1991. Oscillaxanthin and myxoxanthophyll in two cores from lake Wabamun, Alberta Canada. *Journal of Paleolimnology*, 5:127-137.

Hodgson, D., Tyler, P. & Vyverman, W. 1996. The palaeolimnology of Lake Fidler, a meromictic lake in south-west Tasmania and the significance of recent human impacts. *Journal of Paleolimnology*, 18: 313-333.

Höfle, M. G., Haas, H. & Dominik, K. 1999. Seasonal dynamics of bacterioplankton community structure in a eutrophic lake as determined by 5S rRNA analysis. *Appl. Environ. Microbiol.*, 65: 3164-3174.

Huisman, J. & Hulot, F. D. 2005. Population dynamics of harmful cyanobacteria: factors affecting species composition. En: Harmful cyanobacteria. Huisman, J., Matthijs, H. C. P. & Visser, P. M. (Eds.). Springer, pp. 143.

Istvánovics, V., Shafik, H. M., Présing, M. & Juhos, S. 2000. Growth and phosphate uptake kinetics of the cyanobacterium *Cylindrospermopsis raciborskii* (Cyanophyceae) in throughflow cultures. *Freshwater Biology*, 43: 257-275.

Iteman, I., Rippka, R., Tandeau de Marsac, N. & Herdman, M. 2000. Comparison of conserved structural and regulatory domains within divergent 16S rRNA-23S rRNA spacer sequences of cyanobacteria. *Microbiology*, 146: 1275-1286.

Janse, I., Meima, M., Edwin, W., Kardinaal, A. and Zwart, G., 2003. High-Resolution Differentiation of Cyanobacteria by Using rRNA-Internal Transcribed Spacer Denaturing Gradient Gel Electrophoresis, *Applied and Environmental Microbiology*, 69: 6634–6643.

Jeffrey, S., Mantoura, R. & Wright, S. 1997. Phytoplankton pigments in oceanography: guidelines to modern methods. UNESCO Pub.

Kalff, J. 2002. Limnology: Inland water ecosystems. New Jersey: Prentice Hall, Vol. 592.

Kaštovský, J., Hauer, T., Mareš, J., Krautová, M., Bešta, T., Komárek, J., Desortová, B., Heteša, J., Hindaková, A., Houk, V., Janeček, E., Kopp, R., Marvan, P., Pummann, P., Skacelová, O. & Zapomělová E. 2010. A review of the alien and expansive species of freshwater cyanobacteria and algae in the Czech Republic. *Biological Invasions*, 12: 3599-3625.

Kaupplia, T., Moisio, T. & Salonen, T. P. 2002. A diatom-based inference model for autumn epilimnetic total phosphorus concentration and its application to a presently eutrophic boreal lake. *Journal of Paleolimnology*, 27: 261-273.

Kirchman, D. L. 2002. The ecology of *Cytophaga-Flavobacteria* in aquatic environments. *Microb Ecol* 39: 91-100.

Kirk, J. L., Beaudette L. A., Hart, M., Moutoglis, P., Klironomos, J. N., Lee, H. & Trevors, J. T. 2004. Methods of studying soil microbial diversity. *Journal of Microbiological Methods*, 58: 169-188.

Kruk, C., Vidal, L. & Hein, V. 2003. Floraciones de microalgas en sistemas continentales del Uruguay. I Encuentro de Ecología del Uruguay, Montevideo, Libro de Resúmenes. Facultad de Ciencias.

Kruk, C. & De Leon, L. 2002. Asociaciones de fitoplancton en lagos y embalses del Uruguay: validación y aplicación a la gestión de sistemas acuáticos. En: El agua en Iberoamérica: de la limnología a la gestión en Sudamérica. Fernández-Cirelli, A. & Chalar, G. (Eds.) CYTED XVII y CETA: 143-155.

Lami, A., Niessen, F., Guilizzoni, P., Mesaferro, J. & Belis, C. A. 1994. Paleolimnological studies of the eutrofication of volcanic Lake Albano (Central Italy). *Journal of Paleolimnology*, 10: 181-197.

Lampert, W. & Sommers, U. 2007. Libro: *Limnoecology: the ecology of lakes and streams*. Segunda edición. New York: Oxford University Press.

Leavitt, P. R. & Carpenter, S. R. 1990. Aphotic pigment degradation in the hypolimnion: Implications for sedimentation studies and paleolimnology. *Limnol. Oceanogr*, 35: 520-534.

Leavitt, P. R. 1993. A review of factors that regulate carotenoid and chlorophyll deposition and fossil pigment abundance. *Journal of Paleolimnology*, 9: 109-127.

Lee, D. H., Noh, S. A., & Kim, C. K. 2000. Development of molecular biological methods to analyze bacterial species diversity in freshwater and soil ecosystems. *J. Microbiol*, 38, 11-17.

Lehman, P., Teh, S., Boyer, G., Nobriga, M., Bass, E. & Hogle, C. 2010. Initial impacts of *Microcystis aeruginosa* blooms on the aquatic food web in the San Francisco Estuary. *Hydrobiologia*, 637:

Lindahl, T. 1993. Instability and decay of the primary structure of DNA. *Nature* 362: 709–715.

Lindström, E. S. 2000. Bacterioplankton community composition in five lakes differing in trophic status and humic content. *Microbial Ecology*, 40: 104-113.

Lindström, E. S. 2001. Investigating Influential Factors on Bacterioplankton Community Composition: Results from a Field Study of Five Mesotrophic Lakes. *Microbial Ecology*, 42: 598-605.

Maes, N., Gheldre, Y. D., Ryck, R. D., Vanechoutte, M., Meugnier, H., Etienne, J. & Struelens, M. J. 1997. Rapid and accurate identification of *Staphylococcus* species by tRNA intergenic spacer length polymorphism analysis. *J. Clin. Microbiol.*, 35: 2477-248.

Mamedov, T. G., Pienaar, E., Whitney, S. E., TerMaat, J. R., Carvill, G., Goliath, R., Subramanian, A. & Viljoen, H. J. 2008. A fundamental study of the PCR amplification of GC-rich DNA templates. *Computational Biology and Chemistry*, 32: 452-457.

Manske, A. K., Henssge, U., Glaeser, J. & Overmann, J. 2008. Subfossil 16S rRNA gene sequences of green sulfur bacteria in the Black Sea and their implications for past photic zone anoxia. *Applied and Environmental Microbiology*, 74: 624-632.

Margalef, R. 1983. Limnología. Ediciones Omega, Barcelona.

Martinez, J., Smith, D. C., Steward, G. F. & Azam, F. 1996. Variability in ectohydrolytic enzyme activities of pelagic marine bacteria and its significance for substrate processing in the sea. *Aquat. Microb. Ecol.*, 10: 223-230.

Mazzeo, N., Rodríguez-Gallego, L., Kruk, C., Meerhoff, M., Gorga, J., Lacerot, L., Quintans, F., Loureiro, M., Larrea, D. & García-Rodríguez, F. 2003. Effect of *Egeria densa* Planch. beds on a shallow lake without piscivorous fish. *Hydrobiologia* 0: 1-12.

McCaig, A. E., Glover L. A. & Prosser, J. I. 2001. Numerical analysis of grassland bacterial community structure under different land management regimes by using 16S ribosomal DNA sequence data and denaturing gradient gel electrophoresis banding patterns. *Applied and Environmental Microbiology*, 47: 4554-4559.

Methé, B. A. & Zehr, J. P. 1999. Diversity of bacterial communities in Adirondack lakes: do species composition reflect lake water chemistry? *Hydrobiologia*, 401: 77-96.

Meyers, P. A. & Lallier-Vergés, E. 1999. Lacustrine sedimentary organic matter records of late quaternary paleoclimates. *Journal of Paleolimnology*, 21: 345-372.

Miettinen, J., Groelund, E., Simola, H. & Huttunen, P. 2002. Paleolimnology of lake Peine-Kuppalanlampi-Kurkijoki, Karelian Republic of Russia: isolation history, lake ecosystem development and long-term agricultural impact. *Journal of Paleolimnology*, 27: 29-44.

Muylaert, K., Van der Gucht, K., Vloemans, N., De Meester, L., Gillis, M. & Vyverman, W. 2002. Relationship between bacterial community composition and bottom-up versus topdown variables in four eutrophic shallow lakes. *Appl Environ Microbiol.*, 68: 4740-4750.

Muyzer, G., De Waal, E. C. & Uitterlinden, A. G. 1993. Profiling of complex microbial

populations by denaturing gradient gel electrophoresis analysis of polymerase chain reaction-amplified genes coding for 16S rRNA. *Appl. Environ. Microbiol*, 59: 695-700.

Muyzer, G. & Smalla, K. 1998. Application of denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) and temperature gradient gel electrophoresis (TGGE) in microbial ecology. *Antonie van Leeuwenhoek*, 73: 127–141.

Navarro, E., Simonet, P., Normand, P. & Bardin, R. 1992. Characterization of natural populations of *Nitrobacter* spp. using PCR/RFLP analysis of the ribosomal intergenic spacer. *Arch. Microbiol*, 157: 107-115.

Nichols, J. M. & Adams, D. G. 1982. Akinetes. En: Carr, N. G. & Whitton B. A. (Eds.), *The Biology of Cyanobacteria*. Blackwell Scientific Publications Oxford, pp. 387-412.

Nixdorf, B., Mischke, U. & Rucker, J. 2003. Phytoplankton assemblages and steady state in deep and shallow eutrophic lakes an approach to differentiate the habitat properties of Oscillatoriales? *Hydrobiologia*, 502: 111-121.

Oliver, R. L. & Ganf, G. G. 2000. Freshwater blooms. En: *The Ecology of Cyanobacteria*. Whitton, B. A. & Potts, M. (Eds.) Dordrecht, London, Boston: Kluwer Academic Publishers, pp. 149-194.

Olsen, G. J., Lane, D. J., Giovannoni, S. J. & Pace, N. R. 1989. Microbial ecology and evolution: A ribosomal RNA approach. *Ann. Rev. Microbiol*, 40: 337-365.

Orr, P. T. & Jones, G. J. 1998. Relationship between microcystin production and cell division rates in nitrogen-limited *Microcystis aeruginosa* cultures. *Limnology and Oceanography*, 43: 1604-1614.

Pace, N. R., Stahl, D. A., Lane, D. J. & Olsen, G. J. 1986. The analysis of natural microbial communities by ribosomal RNA sequences. *Adv. Microb. Ecol*, 9: 1-55.

Pacheco, J. P., Iglesias, C., Meerhoff, M., Fosalba, C., Goyenola, G., Teixeira de Mello, F., García, S., Gelós, M. & Garcia-Rodríguez, F. 2010. Phytoplankton community structure in five subtropical shallow lakes with different trophic status (Uruguay): a morphology based approach. *Hydrobiologia*, 646: 187-197.

Padisák, J. 1997. *Cylindrospermopsis raciborskii* (Woloszyska) Seenayya et Subba Raju, an expanding, highly adaptive cyanobacterium: worldwide distribution and review of its ecology. *Archiv für Hydrobiologie Supplement*, 107: 563-593.

Paerl, H. & Huisman, J. 2008. Blooms like it hot. *Science*, 320: 57-58.

Perez, M. C., Bonilla, S., De Leon, L., Smarda J. & Komarek, J. 1999. A bloom of *Nodularia baltica-spumigena* group (Cyanobacteria) in a shallow coastal lagoon of Uruguay, South America. *Algological Studies*, 93: 91-101

Peters, K. E., Walters, C. C. & Moldowan, J. M., 2005. *The Biomarker Guide: Biomarkers and Isotopes in Petroleum Exploration and Earth History*. Cambridge University Press, New York.

Piccini, C., Aubriot, L., Fabre, A., Amaral, V., Gonzalez-Piana, M., Giani, A., Figueredo, C. C., Vidal, L., Kruk, C. & Bonilla, S. 2011. Genetic and eco-physiological differences of South American *Cylindrospermopsis raciborskii* isolates support the hypothesis of multiple ecotypes. *Harmful Algae*, 10: 644-653.

Pomp, D. & Medrano, J. F. 1991. Organic solvents as facilitators of polymerase chain reaction. *BioTechniques*, 10: 58-59.

Poinar, H. N., Höss, M., Bada, J. L. & Pääbo, S. 1996. Amino acid racemization and the preservation of ancient DNA. *Science*, 272: 864-866.

Posselt, A. J., Burford, M. A. & Shaw, G. 2009. Pulses of phosphate promote dominance of the toxic cyanophyte *Cylindrospermopsis raciborskii* in a subtropical water reservoir. *Journal of Phycology*, 45: 540-546.

Räsänen, J., Kaupila, T. & Vuorio, K. 2006. Sediment and phytoplankton records of the cyanobacterial genus *Anabaena* in boreal Lake Pyhäjärvi. *Hydrobiologia*, 568: 455-465.

Reynolds, C. S. 1984. The Ecology of Freshwater Phytoplankton. Cambridge. Cambridge University Press, pp. 390.

Riedinger-Whitmore, M., Whitmore, T., Smoak, J., Brenner, M., Moore, A., Curtis, J. & Schelske, C. 2005. Cyanobacterial proliferation is a recent response to eutrophication in many Florida Lakes: a paleolimnological assessment. *Lake and Reservoirs Management*, 21: 423-435.

Rizzi, E., Lari, M., Gigli, E., De Bellis, G. & Caramelli, D. 2012. Ancient DNA studies: new perspectives on old samples. *Genetics Selection Evolution*, 44: 21.

Robleto, E. A., Borneman, J. & Triplett, E. W. 1998. Effects of bacterial antibiotic production on rhizosphere microbial communities from a culture-independent perspective. *Appl. Environ. Microbiol.*, 64: 5020-5022.

Rosselló-Mora, R., Thamdrup, B., Schäfer, H., Weller, R. & Amann, R. 1999. The response of the microbial community of marine sediments to organic carbon input under anaerobic conditions. *Syst. Appl. Microbiol.*, 22: 237-248.

Saker, M., Moreira, C. & Martins, J. 2009. DNA profiling of complex bacterial populations: toxic cyanobacterial blooms. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 85: 237-252.

Sanger, J. E. 1988. Fossil pigments in paleoecology and paleolimnology. *Paleogeog., Paleoclim. and Paleoecol.*, 62: 343-359.

Sarthou, F. (en preparación). Predicción de cianobacterias: efecto de la eutrofización y la variabilidad climática. Proyecto de Maestría PEDECIBA Geociencias, Universidad de la República.

Scheffer, M., Rinaldi, S., Gragnani, A., Mur, L. & van Nes, E. 1997. On the dominance of filamentous Cyanobacteria in shallow, turbid lakes. *Ecology*, 78: 272-282.

Scheinert, P., Krause, R., Ullman, U., Soller, R., & Krupp, G. 1996. Molecular differentiation of bacteria by PCR amplification of the 16S-23S rRNA spacer. *J. Microbiol. Methods*, 26: 103-117.

Schmidt, T. M., De Long, E. F., Pace, N. R. 1991. Analysis of marine picoplankton community by 16S rRNA gene cloning and sequencing. *J. Bacteriol.*, 173: 4371-4378.

Sherr, E. B. & Sherr, B. F. 1988. Role of microbes in pelagic food webs: A revised concept. *Limnology and Oceanography*, 33: 1225-1227.

- Sinha, R., Pearson, L. A., Davis, T. W., Burford, M. A., Orr, P. T. & Neilan, B. A., 2012.** Increased incidence of *Cylindrospermopsis raciborskii* in temperate zones e Is climate change responsible?. *Water Research*, 46: 1408-1419.
- Smol, J.P. 1992.** Paleolimnology: an important tool for effective ecosystem management. *J. Aquat. Eco. Health*, 1: 49-58.
- Smol, J.P. 2008.** Pollution of Lakes and Rivers: A Paleoenvironmental Perspective. 2nd edition. Wiley-Blackwell Publishing, Oxford. 383 pp.
- Sneath, P. H. A. & Sokal, R. R. 1973.** Numerical Taxonomy. Freeman, San Francisco.
- Srivastava, A. K. & Schlessinger, D. 1990.** Mechanism and regulation of bacterial ribosomal RNA processing. *Annu Rev Microbiol*, 44: 105±129.
- Sundh, I. 1992.** Biochemical composition of dissolved organic carbon released from natural communities of lake phytoplankton. *Arch. Hydrobiol.* 125: 347-369.
- Swain, E. B. 1985.** Measurement and interpretation of sedimentary pigments. *Freshwat. Biol.*, 15: 53-75.
- Tamura, K., Peterson, D., Peterson, N., Stecher, G., Nei, M., & Kumar, S. 2011.** MEGA5: Molecular Evolutionary Genetics Analysis using Maximum Likelihood, Evolutionary Distance, and Maximum Parsimony Methods. *Molecular Biology and Evolution* (submitted).
- Tomitani, A., Knoll, A. H., Colleen, M., Cavanaugh, C. M. & Ohno, T. 2006.** The evolutionary diversification of cyanobacteria: Molecular–phylogenetic and paleontological perspectives. *PNAS*, 103: 5442-5447.
- Tucci, A. & Sant’Anna, C. 2003.** *Cylindrospermopsis raciborskii* (Woloszynska) Seenayya & Subba Raju (Cyanobacteria): variação semanal e relações com fatores ambientais em um reservatório eutrófico, São Paulo, SP, Brasil. *Revista Brasileira de Botânica*, 26: 97-112.
- van Vuuren, S. & Kriel, G. 2008.** *Cylindrospermopsis raciborskii*, a toxic invasive cyanobacterium in South African fresh waters. *African Journal of Aquatic Science*, 33: 17-26.
- Vidal, L. & Kruk, C. 2008.** *Cylindrospermopsis raciborskii* (Cyanobacteria) extends its distribution to Latitude 34°53’S: taxonomical and ecological features in Uruguayan eutrophic lakes. *Pan-American Journal of Aquatic Sciences*, 3: 142-151.
- Whitton, B. A., 1992.** Diversity, ecology, and taxonomy of the cyanobacteria. In Mann, N. H. & N. G. Carr (eds), *Photosynthetic Prokaryotes*. Plenum New York: 1-51.
- Whitton, B. & Potts, M. 2000.** The ecology of cyanobacteria. Dordrecht, Kluwer Academic Publishers, pp. 669.
- Wiedner, C., Rucker, J., Bruggemann, R. & Nixdorf, B. 2007.** Climate change affects timing and size of populations of an invasive cyanobacterium in temperate regions. *Oecologia*, 152: 473-484.
- Willerslev, E., Hansen, A. J. & Poinar, H. N. 2004.** Isolation of nucleic acids and cultures from

fossil ice and permafrost. *Trends in Ecology & Evolution*, 19: 141-147.

Willerslev, E., Cappellini, E., Boomsma, W., Nielsen, R., Hebsgaard, M. B., Brand, T. B., Hofreiter, M., Bunce, M., Poinar, H. N., Dahl-Jensen, D., Johnsen, S., Steffensen, J. P., Bennike, O., Schwenninger, L., Nathan, R., Armitage, S., Hoog, C., Alfimov, V., Christl, M., Beer, J., Muscheler, R., Barker, J., Sharp, M., Penkman, K., Haile, J., Taberlet, P., Gilbert, M. T. P., Casoli, A., Campani, E. & Collins, M. J. 2007. Ancient biomolecules from deep ice cores reveal a forested Southern Greenland. *Science*, 317: 111-114.

Wise, M. G., McArthur, J. V. & Shimkets, L. J. 1999. Methanotroph diversity in landfill soil: isolation of novel type I and type II methanotrophs whose presence was suggested by culture-independent 16S ribosomal DNA analysis. *Appl. Environ. Microbiol*, 65: 4887-4897.

Woese, C. R. 1987. Bacterial evolution. *Microbiol. Rev.*, 51: 221-271.

Woide, D., Zink, A. & Thalhammer, S. 2010. Technical Note: PCR Analysis of Minimum Target Amount of Ancient DNA. *American Journal of Physical Anthropology*, 142: 321 - 327.

Wolk, C. P. 1965. Heterocyst germination under defined conditions. *Nature*, 205: 201-202.

Woloszynka, J. 1912. Das Phytoplankton einiger Javanian Seen mit Berücksichtigung des Sawa-Planktons. *Bulletin of the International Academy of Science Cracoviae*, 6: 649-709.

Yang, Z. 1999. PAML: Phylogenetic analysis by maximum likelihood, Version 2.0. University College London, London.

Zalocar de Domitrovic, Y., Asselborn, V. & Casco, S. 1998. Variaciones espaciales y temporales del fitoplancton en un lago subtropical de Argentina. *Revista Brasileira de Biologia*, 58: 359-382.

Zhou, J., Bruns M. A. & Tiedje, J. M. 1996. DNA recovery from soils of diverse composition. *Appl. Environ. Microbiol*, 62: 316-322.

ANEXO

Material para la extracción de ADN

- Solución buffer de extracción

Se prepararon 100ml conteniendo:

100mM Tris-HCl (pH 8.0)

100mM EDTA (pH 8.0)

100mM Na-Fosfao (pH 8.0)

1.5 M NaCl

1% CTAB (bromuro de hexadeciltrimetilamonio)

La solución se autoclavó por 15min a 1atm y se guardó a temperatura ambiente.

Materiales para los métodos de *fingerprinting*

- Solución stock de acrilamida 40%

Se prepararon 100ml conteniendo:

38,93g de acrilamida

1,07g de bisacrilamida

La acrilamida se disolvió en 30ml de agua miliQ, lentamente y empleando agitación se agregó la bisacrilamida, se completó el volumen con agua miliQ. Por último se filtró la solución por una membrana Millipore de 0,45 µm de tamaño de poro.

- Buffer TAE 50X

Se prepararon 250ml conteniendo:

60,5g de Tris Base

14,28ml de ácido acético glacial

20ml de solución EDTA 0,5M a pH 8

El Tris base se disolvió en agitación en 150ml de agua miliQ, luego se agregó el ácido acético

glacial y luego el EDTA. Se completó el volumen con agua miliQ y se lleva a un pH final de 9.

-Solución acrilamida 6%

Se prepararon 100ml conteniendo:

15ml de acrilamida 40%

2ml de TAE 50X

Se completó un volumen de 100ml con agua miliQ y la solución se filtró en membrana Millipore 0.45µm.

- APS 10%

0,1g de persulfato de amonio se diluyó en 1ml de agua miliQ.

- Solución 0% desnaturalizante (6% acrilamida)

Se preparó 100ml utilizando:

15 ml de acrilamida 40%

2ml de buffer TAE 50X

Se completó el volumen con agua miliQ y se filtró en membrana Millipore 0.45µm de tamaño de poro.

- Solución 70% desnaturalizante (6% acrilamida)

Se preparó 100ml utilizando:

15 ml de acrilamida 40%

2ml de buffer TAE 50X

28ml de formamida

29,4g de urea

Se completó el volumen con agua miliQ y se filtró en membrana Millipore 0.45µm de tamaño de poro.

- Solución 40% desnaturalizante (6% acrilamida)

Se prepararon 9ml de la solución mezclando 5,1ml de solución 0% desnaturalizante y 3,9 de solución 70% desnaturalizante.

- Colorante

Se prepararon 10ml conteniendo:

0,05g de azul de bromofenol

0.05g xilencianol

Se diluyó en 10ml de Buffer TAE 1X

- SYBR green

Se prepararon 20ml utilizando:

2µl de SYBR green 10000X

20ml de buffer TAE 1X

Material para Clonación

- Medio de cultivo líquido "*Luria Bertani*" (LB).

Para un 100ml de LB:

1g - Triptona

0,5g - Extracto de levadura

0,5g - NaCl

Se disolvió en 100ml de agua destilada. Se autoclavó por 15 min a 1 atm.

- Medio de cultivo sólido LB-Agar.

Para un 100ml de LB:

1g - Triptona

0,5g - Extracto de levadura

0,5g – NaCl

1,5g - Agar

- Solución stock de X-gal (5-bromo 4-cloro 3-indolyl β-D galactósido) 50mg/ml. 100mg de X-gal se disuelven en 2ml de dimetilformamida. Debe ser protegido de la luz y almacenado a -20°C.

- Solución stock de apmicilina 100mg/ml. Se prepara en agua miliQ y se guarda a -20°C.

Preparación de placas

Se agregaron 150µl de la solución stock de ampicilina al medio LB-Agar en estado líquido a una temperatura aproximadamente 50°C. Se colocaron 20mL del medio con antibiótico por placa de Petri en condiciones de esterilidad. Una vez solidificado el agar se plaquearon 20ul de solución stock de X-gal. Las placas se almacenaron a 4°C.

Figura 1

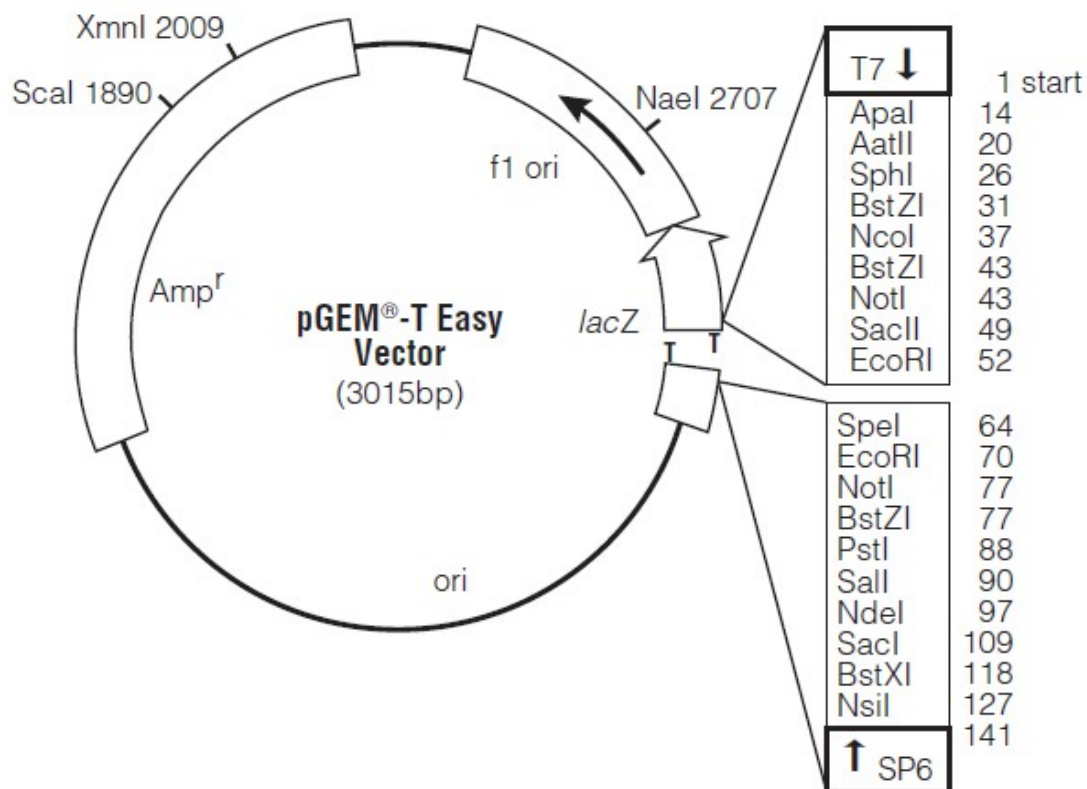


Figura 1: Mapa del plásmido pGEM-T-Easy Vector (Promega). En el mismo se indican diferentes punto de referencia de la secuencia, como ser el sitio de iniciación de la transcripción de la ARN polimerasa del fago T7 (posición 1 en la secuencia del plásmido), la región de clonado múltiple (posición 10 a 128) en la que se indican las posiciones de los sitios de reconocimiento para distintas enzimas de restricción, el promotor de la ARN polimerasa de SP6 (de -17 a +3, posición 139 a 158), el sitio de iniciación de la transcripción de la ARN polimerasa de SP6 (posición 141), el codón de iniciación de lac Z (posición 180), el operador lac (posición 200 a 216), región codificante de la β-lactamasa (posición 1337 a 2197), región del fago F1 (posición 2380 a 2835) secuencias del operón lac (posición 2836 a 2996 y 166 a 395), el promotor de la ARN polimerasa de T7 (de -17 a +3, posición 2999 a 3), el origen de replicación (ori) y el gen que confiere resistencia a la ampicilina (Amp^r).