UDELAR Facultad de Ciencias Licenciatura en Bioquímica

Trabajo Especial II: Análisis del gen *165 ADNr* de cianobacterias en una comunidad microbiana presente en suelos de la Isla Rey Jorge, Antártida Marítima.



Bach. María Cecilia Callejas Tutores: Dra. Silvia Batista y Dr. Paul Gill Trabajo Realizado en el Dpto. de Bioquímica del IIBCE Lividad A sociada a Facultad de Ciencias ntevideo, enero de 2008

ÍNDICE

ÍNDICE					
ÍNDI	CE DE TABLAS Y FIGURAS	3			
RES	UMEN	4			
1 IN	TRODUCCIÓN	5			
1.1	Descripción geográfica y clima de la Isla Rey Jorge/25 de mayo	5			
1.2	Flora de la región Antártica	8			
1.3	Matas o tapetes microbianos	9			
1.4	Antecedentes de estudios de diversidad microbiana en la Antártida e Isla l	Rey			
	Jorge con particular atención en las cianobacterias	. 14			
1.5	Estudios de biodiversidad microbiana con técnicas independientes de cultivo	. 17			
2- O	BJETIVOS	.22			
Obje	etivo general	.22			
Obje	etivos específicos	.22			
3- M	ATERIALES Y MÉTODOS	.23			
3.1 (Colecta de muestras	.23			
3.2 E	Extracción de ADN genómico	.23			
3.2 I	PCR	.24			
3.2.1	1PCR de 16S de cianobacterias	.24			
3.2.2	2 Reacción de PCR de región nifH de cianobacterias	.25			
3.3 (Clonado de productos de PCR	.25			
3.4 L	Ligación	.26			
3.5	Transformación	.26			
3.6 (Construcción de bibliotecas de amplicones	.27			
3.7	ARDRA	. 27			
3.7.1	1 Digestiones	.27			
3.8 /	3.8 Aislamiento del ADN plasmídico y secuenciación				
3.9 /	Análisis filogenético	.28			

4- RESULTADOS	29
4.1 Colección de muestras	
4.2 Extracción de ADN genómico de las muestras	31
4.3 PCR	32
4.3.1 PCR de regiones de 16S ARNr y nifH de cianobacterias	32
4.4 Clonado y Construcción de bibliotecas del gen16 ARNr de las muestras 6	б <i>у 18</i> 34
4.5 ARDRA de la biblioteca correspondiente a la muestra 6	35
4.6 Análisis filogenético	40
5- DISCUSIÓN	47
6- CONCLUSIONES	57
BIBLIOGRAFÍA	58
ANEXO: Protocolos, medios de cultivo y soluciones	67
A.1 Obtención de células químicamente competentes	
de E. coli suspendidas en CaCl2	67
A.2 Lisado de colonias bacerianas para PCR	68
A.3 Geles de poliacrilamida 6% (w/v) para ADN	68
A.4 Tinción con nitrato de plata	69
A.5 Extracción de ADN plasmídico por lisis alcalina	69
A.5.1 Solución I	70
A.5.2 Solución II	70
A.5.3 Solución III	71
A.6 Medio líquido LB	71
A.7 Medio LB-agar para placas	71
A.8 Solución stock de Ampicilina 100 mg/ml	71
A.9 Solución stock de X-Gal 20mg/ml	71
A.10 Buffer TAE 10x	72
A.11 Buffer TBE 5x	72

ÍNDICE DE TABLAS Y FIGURAS

Tablas

Tabla 1. Terminos empleados por ecologistas, biologos evolucionistas y bacteriologos
para describir los niveles de organización biológica superiores al nivel de
organismos individuales11
Tabla 2. Descripción de las 22 muestras colectadas en enero de 2005
Tabla 3. Lista detallada de las muestras ambientales a partir las cuales se amplificaron
fragmentos de los genes 16S ARNr y nifH de cianobacterias
Tabla 4. Restricción in silico de los genes 16S ADNr de distintas cianobacterias
incluyendo distintos géneros35
Tabla 5. Secuencias obtenidas de los fragmentos insertos en los clones 19, 20, 24, 30,
46, 47 y 48, pertenecientes a la biblioteca correspondiente al gen 16S ARNr
de la muestra 6 40
Tabla 6. Resultados obtenidos al contrastar las secuencias insertas en los clones 19,
20, 24, 30, 46, 47 y 48 en el banco de secuencias para el gen 1 <i>6S ARNr</i> de
organismos procariotas
Figuras
Figuras Figura 1. Mapa de la isla Rey Jorge/ 25 de Mayo
Figuras Figura 1. Mapa de la isla Rey Jorge/ 25 de Mayo
 Figuras Figura 1. Mapa de la isla Rey Jorge/ 25 de Mayo
 Figuras Figura 1. Mapa de la isla Rey Jorge/ 25 de Mayo
 Figuras Figura 1. Mapa de la isla Rey Jorge/ 25 de Mayo
 Figuras Figura 1. Mapa de la isla Rey Jorge/ 25 de Mayo
 Figuras Figura 1. Mapa de la isla Rey Jorge/ 25 de Mayo
 Figuras Figura 1. Mapa de la isla Rey Jorge/ 25 de Mayo
 Figuras Figura 1. Mapa de la isla Rey Jorge/ 25 de Mayo

Resúmen

RESUMEN

Algunas regiones de la Antártida Marítima aún permanecen prístinas, constituyendo sistemas biológicos terrestres naturales relativamente simples. En comparación con otros ambientes, el número e influencia de los factores externos (incluyendo los antrópicos) que actúan sobre estos ecosistemas es reducido. Estos sitios representan un ambiente ideal para estudiar algunos aspectos de las comunidades microbianas que allí se desarrollan como diversidad, fisiología y ciclado de nutrientes, etc.

La Base Científica Antártica Artigas (62°12'S, 58° 10'W) está ubicada en la Isla Rey Jorge (Antártida Marítima). Durante el verano se produce el deshielo de áreas donde crecen de forma aislada matas microbianas, briofitas y líquenes. Las matas microbianas (dominadas por cianobacterias) se desarrollan anualmente durante el período estival. Las cianobacterias presentes en estas matas se han caracterizado previamente mediante criterios morfológicos.

Las muestras analizadas en este trabajo fueron matas microbianas colectadas en distintos sitios de la Península Fildes, ubicada en la Isla Rey Jorge. Se emplearon técnicas independientes de cultivo para determinar la presencia de cianobacterias y cianobacterias diazótrofas, a partir del ADN ambiental de cada muestra. Una de las muestras colectada en el Pasaje Drake (latitud 61°50'S) fue escogida para construir una biblioteca de amplicones de una región de gen *16S ADNr* de cianobacterias. De acuerdo al estudio morfológico realizado por el Prof. Komậrek, la muestra se encontraba dominada por el género *Phormidium*.

El análisis de los filotipos ribosomales 16S ADNr en la biblioteca permitió establecer 7 patrones diferentes. La mayoría los ribotipos exhibieron una similitud significativa con miembros del género *Tychonema*, orden *Oscillatoriales* y el resto con cianobacterias no cultivables antárticas. Estos resultados no coincidieron con la identificación basada en la morfología de las células, al menos a nivel de género. Esto reflejaría la incongruencia que aún existe entre la identificación a nivel genético y morfológico, dentro algunos géneros en este grupo de microorganismos.

Introducción

1 INTRODUCCIÓN

1.1 Descripción geográfica y clima de la Isla Rey Jorge/25 de mayo

La Isla Rey Jorge (61º 54'- 62º 16'S y 57º 35'- 59º 02'W) es la mayor de las Islas Shetland del Sur. Este archipiélago se encuentra ubicado al norte de la Península Antártica, dentro de la región biogeográfica denominada como Antártida Marítima.

Las islas Shetland del Sur poseen la mayor riqueza biológica y paisajística de su entorno. Tienen una fácil accesibilidad, que han marcado en el pasado y dirigen en la actualidad la presencia humana en el archipiélago (Serrano Cañadas, 2001).

El clima de esta región, con características de Tundra, se caracteriza por el pasaje de sistemas ciclónicos sucesivos que transportan aire relativamente cálido y húmedo, trayendo además vientos y precipitaciones fuertes (Bintanja, 1995; Vinocur y Pizarro, 2000). Debido a esto, en el verano se producen frecuentemente ciclos de nevadas/deshielos (Braun, 2001, no publicado).

La Isla posee un clima marítimo típico, es decir, con poca variación de temperaturas durante todo el año y humedad relativa alta. En verano la temperatura oscila entre 2 y 4º C y en invierno el promedio es de -4ºC (Godagnone, 1997), y se caracteriza por la presencia de una cubierta de nubes casi permanente (Rakusa-Suszczewski *et al.*, 1993, Wen *et al.*, 1994).

También denominada Isla 25 de Mayo por la República Argentina, la Isla Rey Jorge ocupa un área de 1250 Km², de los cuales el 90% se encuentra cubierto por una gran capa de hielo permanente que puede llegar hasta 700 m de altitud (Vogt y Braun, 2004). El 10% de la superficie restante no posee cobertura permanente de hielo, (Fig. 1), formando estrechos pasajes costeros que separan los glaciares del mar (Vogt y Braun, 2004). Las áreas libres de hielo se encuentran principalmente en la costa sur de la Isla, siendo la Península Fildes el área sin cobertura de hielo más extensa y la zona más occidental de la isla. Estas áreas se encuentran cubiertas por nieve durante casi todo el año, excepto dos o tres meses durante el verano (Vogt y Braun, 2004). La mayoría de las Bases Científicas de los distintos países presentes en la Isla, incluyendo la Base Científica Antártica Artigas, perteneciente a Uruguay, se ubican en la Península Fildes (Fig. 1).



Fig. 1. Mapa de la isla Rey Jorge/ 25 de Mayo, el cual muestra la ubicación de las distintas Bases Científicas; Bases permanentes, O Bases de verano. La ubicación de la Base Científica Antártica Artigas perteneciente a Uruguay (URY) se destaca en un recuadro color rojo . Las áreas con cobertura de hielo permanente de hielo se ven en color blanco, mientras que las áreas libres de hielo se muestran en color marrón. *Adaptado de*: http://www.wikipedia.org

El régimen hidrológico de las áreas libres de hielo en el archipiélago (Isla Pingüino, Cabo Anca de León, Bahía Almirantazgo, Península Potter y Península Barton) es del tipo pro-glacial, es decir que se encuentra regido por una combinación de agua fundida proveniente del deshielo de los glaciares y de la cubierta de nieve de la misma área. En cambio, la Península Fildes se ha clasificado como área no pro-glacial y se ha propuesto que la fuente de agua dulce de los ecosistemas allí presentes provendría casi exclusivamente de la fusión de la cubierta de nieve en ese lugar (Vogt y Braun, 2004). Por otra parte, se ha propuesto que la descarga de agua generada por el deshielo que se produce en el verano, representa la principal incorporación (*input*) de agua dulce a los ecosistemas terrestres y costeros cercanos a los glaciares. Además, el agua de deshielo es la principal fuerza motriz responsable del transporte de sedimentos y de la formación del paisaje (Barsch y Staeblein, 1984).

En resumen, la dinámica de la nieve y el hielo en la Isla sería el factor principal que controlaría los ecosistemas terrestres y marinos adyacentes a los glaciares (Vogt y Braun, 2004). Durante cada verano, gran parte de los suelos de las denominadas áreas libres de hielo quedan expuestos. Estos suelos se encuentran dominados por rocas efusivas, mientras que sedimentos de origen glaciar y conglomerados volcánicos, se encuentran con menor frecuencia (Foucarde, 1960). Son comunes los sistemas acuáticos lénticos como estanques costeros y una variedad de lagos que varían en complejidad (Vinocur y Pizarro, 2000).

Los lagos se definen como masas de agua lénticas que nunca se congelan en su totalidad (p. ej., Lago Uruguay) y los estanques o charcos (*ponds*) como lagos someros que se congelan hasta el fondo. Algunos de estos se encuentran aislados mientras que otros se conectan temporal o permanentemente a través de pequeños arroyos o riachuelos (*creeks*). El fondo o bentos de las distintas masas de agua presenta composiciones disímiles, dentro de las cuales se pueden distinguir principalmente los compuestos por grava, piedra o material sedimentario fino (Vinocur y Pizarro, 2000).

El paisaje *emparchado*, típico de la región (p. ej.: áreas colonizadas por musgos en las zonas rocosas, áreas cubiertas de nieve, etc), da origen a una variedad de distintos ecosistemas y lagos. En éstos, generalmente se desarrollan matas microbianas bentónicas o epilíticas dominadas por cianobacterias, líquenes y musgos (Vinocur y Pizarro, 2000).

Además, la geología compleja de esta región resulta en una composición química variable de los lagos y esto desarrolla a su vez un rango importante de

vegetación terrestre. Esta situación conduce a una gran variedad de cuerpos de agua, lo que genera la alta diversidad de nichos (Ellis-Evans, 1996).

Por otra parte, la hipótesis de la evolución de lagos Antárticos se basa en la presunción de que la retracción de los glaciares conduce a la formación de una serie de lagos distintos (Priddle y Heywood, 1980), cada uno asociado a con una cantidad característica de sedimento. Debido a la retracción del glaciar Collins, en los últimos años han surgido nuevos lagos en la Península de Fildes, el área más extensa libre de hielo de la Isla Rey Jorge (Vogt y Braun, 2004). La consiguiente entrada de agua dulce y sedimentos a los sistemas costeros han tenido un impacto considerable sobre el ciclo de vida marina y terrestre. La retracción del glaciar se acompaña de un aumento del abastecimiento de sedimento a los suelos, además, estas altas tasas de sedimentación también influencian la composición de las comunidades costeras en el fondo del mar (Rakusa-Suszczewski *et al.* 1993).

1.2 Flora de la región Antártica

En los glaciares la vida está bastante restringida, por lo que la distribución de la biota es mayor en las áreas sin cobertura de hielo permanente (Vogt y Braun, 2004). En estos ecosistemas, generalmente costeros, crecen musgos, plantas briofitas (no vasculares), líquenes y matas (o tapetes) microbianas dominadas por cianobacterias (Pickard y Seppelt, 1984; Blümel y Eitel, 1989).

Los líquenes se forman por la simbiosis entre un alga o una cianobacteria y un hongo y son el grupo de organismos terrestres visibles más diverso numéricamente y los más conspicuos en los paisajes de las regiones libres de hielo en la Antártida (Longton 1988, Kappen, 2000, Øvstedal y Smith 2001). Estos se encuentran representados por aproximadamente por 360 taxones distribuidos en toda la región antártica (Smith y Øvstedal comunicación personal, 1999). En particular, en la Isla Rey Jorge se han identificado algunos de los géneros y especies presentes, como *Cladonia* (Osyczka y Olech, 2005) y

Usnea (Seymour *et al.,* 2007). Estos estudios sugieren además la distribución en ambos polos y el endemismo de algunos de estos géneros.

También se han descrito aproximadamente 200 taxones de algas terrestres (Broady, 1996) y 70 taxones de hongos microscópicos (Vishniac, 1996), 104 taxones de musgos y 25 taxones de briofitas hepáticas (Ochyra *et al.*, 1998), todos distribuidos en distintas regiones de la Antártida. Las plantas vasculares se restringen a la región Marítima, siendo su presencia muy esporádica y limitada a dos especies (*Deschampsia antártica y Colobanthus crassifolius*) (Pickard y Seppelt, 1984; Blümel y Eitel, 1989).

En otro orden, el número estimado de bacterias en toda la región Antártica aún permanece incierto, aunque el predominio y el éxito de las cianobacterias en las regiones polares se encuentra extensamente descrito, siendo particularmente abundantes en lagos y estanques donde forman matas microbianas bentónicas (Vincent, 2000).

La región Antártica -contrariamente a la Ártica- prácticamente no posee animales terrestres (Stromberg, 1991), sólo algunas especies de insectos son completamente terrestres. El resto de la fauna presenta una dependencia directa con el mar y ocurre en su mayoría en el litoral (Antartida Marina) (Echeverría y Paiva, 2006), el cual alberga distintas especies de peces, krill, pingüinos, focas, lobos marinos, elefantes marinos, ballenas y varios tipos de aves marinas (Friedman, 1993).

1.3 Matas o tapetes microbianos

Las matas microbianas son comunidades densas de microorganismos estratificados verticalmente que constan principalmente de cianobacterias. Estas matas consisten típicamente de una matriz de mucílago en la cual se embeben tricomas de cianobacterias, algas, microorganismos heterótrofos y quimioautótrofos junto con granos de arena y otros materiales inorgánicos (de los Ríos *et al.*, 2004).

Las matas o tapetes microbianos probablemente sean los ecosistemas estructurados más antiguos en nuestro planeta. Estas estructuras organosedimentarias, laminadas verticalmente, se desarrollan sobre superficies sólidas y se caracterizan por la presencia de gradientes acentuados de oxígeno y sulfuro y por ser dominadas por tan solo unos pocos grupos funcionales de microorganismos (van Gemerden, 1993).

La morfología, estructura y color de las matas están determinadas por las especies dominantes, las características del sedimento y otros factores ambientales (Stal, 2000). La estratificación de las mismas puede ser frecuentemente reconocida en algún grado por la organización de zonas de distinto color que varían verticalmente debido a la pigmentación de los distintos microorganismos fototrófos (Vincent *et al.*, 1993a).

La matriz de estos tapetes (o matas) se compone principalmente de sustancias mucilaginosas secretadas por especies de cianobacterias filamentosas y cocoides. Estas sustancias mucilaginosas contribuyen a la unión de las partículas a la matriz (Vinocur y Pizarro, 2000). El desarrollo en el tiempo de estas comunidades microbianas es el resultado de la actividad y crecimiento de los microorganismos, de la captura y unión de sedimento a la materia orgánica y de la sedimentación (Margulis *et al.*, 1980). De acuerdo a Walter (1976), algunos parámetros ambientales para el desarrollo de estos ecosistemas son el tamaño de grano del sustrato, la tracción capilar del agua, la penetración de la luz, las tasas de sedimentación y erosión y la presión ejercida por predadores (van Gemerden, 1993).

El proceso de fotosíntesis realizado por las cianobacterias y algas ubicadas en la superficie de la mata, es la fuerza motriz en la mayoría de este tipo de ecosistemas. Los organismos heterótrofos aerobios también son funcionalmente importantes, ya que su actividad conduce a la disminución de la concentración de oxígeno, mientras que los organismos fermentadores proveen de sustratos para el crecimiento de las bacterias reductoras del azufre. También pueden encontrarse presentes otros grupos funcionales

numéricamente menos importantes como bacterias nitrificantes y denitrificantes y bacterias metanogénicas. (van Gemerden, 1993).

El papel que juegan los microorganismos en un ecosistema depende de su capacidad para completar el sistema trófico, el cual se alcanza a través de la diversidad fisiológica (Guerrero *et al.*, 2002). Desde esta perspectiva, las comunidades microbianas se podrían dividir en dos niveles de organización, en el primero se encontrarían aquellas poblaciones de bacterias similares metabólicamente formando *gremios (guilds)*, por ejemplo: bacterias reductoras de sulfato y sulfuro. En un nivel superior de organización, se encontrarían grupos de gremios distintos, tales como bacterias fermentadoras, reductoras de sulfato y metanogénicas que juntos realizarían procesos fisiológicos interdependientes (Guerrero *et al*, 2002).

En la Tabla 1 se describen algunos términos empleados para describir los distintos niveles de organización de comunidades microbianas.

Tabla 1. Términos empleados por ecológos, biólogos evolutivos y bacteriólogos para describir los niveles de organización biológica superiores al nivel de organismos individuales. *Adaptado de Ward et al., 1998.*

Término	Definición	Fuente	
Población	"Grupo de individuos de una especie en un área"	Begon <i>et al.,</i> 1990	
	"Grupo de individuos conespecíficos que ocupan un área geográfica más o menos definida y que exhiben continuidad reproductiva generación tras generación "	Futuyuma, 1986	
Ecotipo	"Subconjunto de individuos dentro de una especie con una ecología característica"	Begon <i>et al.,</i> 1990	
	"Fenotipo determinado genéticamente de una especie que se encuentra como una variante local, asociada con ciertas condiciones ecológicas"	Futuyuma,1986	
Especie	"Cepas con aproximadamente el 70% o más de asociación en su ADN-ADN"		
	"Un linajeevolucionando separadamente de otros y con su rol y tendencias evolutivas unitarias propiasLos roles son definibles por su equivalencia con los nichos"	Wayne <i>et al</i> ., 1987	

		Simpson, 1961
Gremio	"Grupo de especies que explotan la misma clase de recurso ambiental en una forma similar"	Begon <i>et al</i> , 1990
Comunidad	"Ensamble de poblaciones de especies que se encuentran juntas en el espacio y el tiempo"	Begon <i>et al</i> .,1990

Las ventajas que este tipo de crecimiento (en forma de tapete) le confiere a las bacterias sésiles (que crecen adheridas a su sustrato, del que no se separan y sobre el que no se desplazan) son: (1) mayor disponibilidad de nutrientes para el crecimiento, (2) mayor unión de moléculas de agua, lo que reduce la posibilidad de desecación, (3) protección relativa de la radiación UV, (4) el establecimiento de un consorcio complejo que permite el reciclado de sustancias y (5) intercambio genético facilitado por la proximidad entre la progenie con el resto de la bacterias (Guerrero *et al*, 2002).

En relación a lo mencionado en el párrafo anterior, podría decirse que las reacciones bioquímicas en estas comunidades o consorcios son realizadas por una *cascada de microorganismos*. Según ha descrito van Gemerden (1993), en una mata bentónica marina se pueden distinguir los siguientes estadios de desarrollo:

1- Organismos capaces de colonizar el sustrato, generalmente pobre en nutrientes. Dichos organismos son invariablemente cianobacterias fijadoras de nitrógeno, que también realizan fotosíntesis oxigénica. Su capacidad de movimiento (*gliding*) les permite migrar hacia la superficie luego de ser cubiertas por la arena/sustrato. Luego, el crecimiento y supervivencia de otros organismos depende de los productos de excreción y lisis de las cianobacterias.

En matas jóvenes, el enriquecimiento de compuestos nitrogenados es de particular importancia, mientras que en matas maduras la excreción de fuentes de carbono es más relevante. Las cianobacterias son la fuerza motriz (*driving force*) en la mayoría de las matas microbianas, ya que suministran sustancias para el crecimiento de otros organismos así como un soporte físico. Las especies pioneras como *Oscillatoria* son remplazadas luego por organismos formadores de tricomas como *Microcoleus chthononplastes*, siendo esta última dominante en matas microbianas marinas.

2- Los compuestos orgánicos solubles son respirados por una variedad de organismos heterótrofos.

3- El sedimento es enriquecido con moléculas orgánicas debido a la excreción, lisis y la fermentación (realizada por los heterótrofos). Una proporción importante de productos orgánicos de bajo peso molecular se originaría a partir del metabolismo del período sin luz de las cianobacterias.

4- Subsecuentemente, estos compuestos serían degradados total o parcialmente por bacterias reductoras de sulfato anaeróbicas, resultando en la producción de sulfuros.

5- Las bacterias incoloras y púrpuras del azufre se ubican frecuentemente entre la capa más superficial ocupada por las cianobacterias y la capa más interna, ocupada por las bacterias reductoras del azufre. Estos dos grupos de organismos son los responsables de consumir el H₂S producido por las bacterias reductoras del azufre, permitiendo que menos del 1% llegue a la atmósfera.

Las matas de cianobacterias se desarrollan en un amplio rango de ambientes (Stal, 2000), algunos de los cuales pueden considerarse extremos como algunos lagos y estanques hipersalinos (des Marais, 2003), manantiales termales (Ward y Cohen, 2005; Ward *et al.*, 1996), desiertos calientes (García-Pichel *et al.*, 2001) y ambientes fríos, en regiones polares (Jungblut *et al.*, 2005, Mueller *et al.*, 2005, Taton *et al*, 2006a, b).

1.4 Antecedentes de estudios de diversidad microbiana en la Antártida e Isla Rey Jorge con particular atención en las cianobacterias

La dominancia y el éxito de las cianobacterias en las regiones polares son bien conocidos. Este grupo de organismos es particularmente dominante en lagos y estanques donde forman matas microbianas bentónicas (Vincent, 2000). Aún así, la diversidad de algunas especies y la distribución geográfica de muchas comunidades de cianobacterias polares aún no han sido examinadas completamente (Taton *et al.*, 2006a).

La presencia ubicua de las matas de cianobacterias, así como su composición taxonómica y actividad fisiológica en arroyos, estanques, lagos y aguas de desglaciación están bien documentados en distintos sitios de la Antártida Continental, (Howard-Williams y Vincent, 1989; Howard-Williams *et al.*, 1989; Broady y Kibblewhite, 1991; Vincent *et al.*, 1993a, b; Ellis- Evans, 1996; Fernández-Valiente *et al.*, 2001; de los Ríos *et al.*, 2004; Sabbe *et al.*, 2004).

Los taxones pertenecientes a distintos géneros de nostocales y oscillatoriales sin heterocistos como *Phormidium* sp., *Oscillatoria* sp., *Lyngbya* sp., *Nostoc* sp., *Nodularia* sp. y *Anabaena* sp., serían los géneros más abundantes en estanques formados por la desglaciación estival en Mc Murdo Ice Shelf (de los Ríos *et al.*, 2004).

Ciertamente, la mayoría de los estudios de diversidad microbiana se han realizado en la región este del continente, en donde se ha comenzado a construir un inventario con información molecular y morfológica de cianobacterias provenientes de distintos biotopos como hielo y agua de lagos, *cryoconite holes* (pequeños huecos cilíndricos encontrados en la superficie de los glaciares, producidos por el deshielo y que son colonizados por comunidades de cianobacterias), biotopos criptoendolíticos, piedras de cuarzo y matas microbianas (Taton *el al.,* 2006a).

Introducción

En estos estudios se describen representantes de morfotipos *Nostoc*, *Hydrocoryne*, *Leptolyngbya*, *Phormidium*, *Nodularia* y *Schizothrix* e indican la existencia de genotipos encontrados únicamente en la Antártida (Priscu *et al.*, 1998; Bowman *et al.*, 2000; Smith *et al.*, 2000; Vincent *et al.*, 2000; Nadeau *et al.*, 2001; Christner *et al.*, 2003; de la Torre *et al.*, 2003; Taton *et al.*, 2003; Casamatta *et al.*, 2005; Jungblut *et al.*, 2005). En estos estudios también se describen la influencia de la salinidad en la composición de las cianobacterias presentes en la comunidad (Jungblut *et al.*, 2005) y la psicrotolerancia más que la psicrofilia de la mayoría de las cianobacterias antárticas (Nadeau *et al.*, 2001; Taton *et al.*, 2003).

En la Antártida Marítima, se han realizado algunos estudios taxonómicos de matas microbianas en la Península Antártica (Vincour y Pizarro, 1995) y en la Isla Rey Jorge (Vincour y Pizarro, 2000). Dichos estudios mostraron una composición más rica en especies que en la Antártida Continental, reflejando además el amplio rango de condiciones físicas y químicas de los lagos y estanques estudiados. Por otro lado, en la Península de Byers, (Isla de Livingstone, Archipiélago Shetland del Sur) se caracterizó la estructura y fisiología de tres comunidades microbianas (matas), provenientes de tres habitats distintos (arroyo, estanque y suelo) (Fernández-Valiente *et al.*, 2007).

En base a la observación microscópica se estableció que las cianobacterias filamentosas pertenecientes al orden Oscillatoriales y más precisamente, a los géneros *Leptolyngbya, Phormidium, Nostoc* fueron dominantes en las muestras de provenientes de suelo y de los estanques o charcos (*ponds*). Por el contrario, las diatomeas fueron dominantes en la mata proveniente del arroyo, mientras que las cianobacterias fueron subdominantes (Fernández-Valiente *et al.*, 2007).

Estos estudios establecieron además que en la Península de Byers, las matas sostienen poblaciones de invertebrados asociados a éstas, incluyendo varias especies de *Nematoda, Tardígrada, Rotífera* y *protozoa* (Fernández-Valiente *et al.*, 2007). Estas observaciones son consistentes con la idea que las

matas microbianas serían responsables, en gran medida, de la producción primaria en los ambiente polares (Vincent, 2000).

Si bien aún no se han publicado estudios similares sobre la región antártica, algunos trabajos realizados en el Ártico han sugerido que además de nutrir los micro-invertebrados, las matas microbianas bentónicas constituyen una fuente de nutrientes autóctonos en los lagos (Bonilla *et al*, 2005).

En la Isla Rey Jorge se han realizado algunos estudios de diversidad microbiana, aunque más reducidos que los desarrollados en la región continental. En su mayoría, son estudios taxonómicos clásicos basados en características morfológicas y ecológicas de las cianobacterias presentes en las comunidades microbianas, incluyendo matas microbianas bentónicas (Komârek, 1999 a,b, Komârek, 2007).

realizado Recientemente, se han estudios de diversidad de microoganismos heterótrofos en áreas cercanas a la Base China Gran Muralla, empleando abordajes dependientes e independientes de cultivo. A través de métodos dependientes de cultivo lograron aislar γ -proteobacterias, actinobacterias, flavobacterias y firmicutes, mientras que con la técnica de se identificaron α , β , γ y δ -proteobacterias, flavobacterias, PCR-DGGE actinobacterias y bacterias aún no clasificadas.

Los autores indicaron que el método PCR-DGGE reveló una diversidad más alta (26 especies bacterianas) que aquella obtenida con los métodos de cultivo y aislamiento (15 especies) (Xiao *et al.*, 2006).

Por otra parte se han realizado estudios de diversidad y ecología de cianobacterias en la isla empleando métodos de clasificación clásicos (Komậrek, 1999a). En dichos estudios se establecieron biotopos característicos (corrientes de agua, suelos inundados producidos por el deshielo de agua dulce proveniente de glaciares y nieve (*seepages*), piscinas estancas, piscinas costeras, paredes de piedra continuamente húmedas, suelos cubiertos por nieve y glaciares), donde se desarrollan comunidades de cianobacterias como

organismos dominantes. La composición de especies y la estructura de las comunidades varían según los distintos biotopos y el período de la estación estival (Komậrek, 1999a).

Las especies de cianobacterias observadas en los distintos biotopos pertenecen principalmente a los géneros *Aphanocapsa, Chroococcus, Cyanothece, Gleocapsa, Leptolyngbya, Microcoleus, Nodularia, Nostoc, Oscillatoria y Phormidium* (Komárek, 1999b).

1.5 Estudios de biodiversidad microbiana con técnicas independientes de cultivo

Nuestra percepción de las bacterias como formas de vida unicelulares está profundamente enraizada en el paradigma del cultivo axénico o "puro". De este modo, el cultivo de bacterias aisladas en medios líquidos y sólidos ha sido la forma tradicional de estudiar facetas sorprendentes de la fisiología microbiana incluyendo patogénesis, simbiosis, interacciones con organismos eucariotas, etc. Sin embargo, en la naturaleza las bacterias casi nunca crecen como cultivos axénicos planctónicos (Guerrero *et al*, 2002).

Los investigadores que trabajan en temas de Ecología Microbiana postulan que las comunidades bacterianas complejas conducen los ciclos biogeoquímicos que mantienen la biosfera. Hasta hace relativamente poco tiempo, la carencia de métodos para estudiar esas comunidades *in situ* dificultaba la realización de análisis detallados de las mismas (Guerrero *et al.,* 2002).

Los estudios tradicionales descriptivos de comunidades microbianas en el laboratorio se han basado en el análisis morfológico, fenotípico y más recientemente genotípico de sus miembros, partiendo de aislamientos del ambiente o en el recuento de organismos viables. Sin embargo, la *subpoblación cultivable* obtenida con esta metodología no es representativa de la comunidad microbiana originaria, ya que subestima de manera importante el número de taxones presentes en la misma. Asimismo, la información genética

que se obtiene es significativamente inferior a la contenida en los genomas colectivos (metagenomas) de la microbiota total (Stach, 2001).

Como consecuencia, en este tipo de estudios no se encuentran representados grupos de organismos importantes, como aquellos no cultivables en las condiciones de laboratorio, aquellos que presentan una fuerte dependencia de otros organismos en el cultivo para vivir (por lo que no podrían ser cultivados de forma pura), así como aquellos que poseen requerimientos no tradicionales para su crecimiento.

Una alternativa empleada por algunos Ecólogos para la descripción de los distintos miembros presentes en una comunidad microbiana se basa en la observación directa al microscopio de los distintos *morfotipos* observados en muestras tomadas directamente del ambiente, sin el aislamiento previo de los organismos. Este tipo de abordaje permite describir morfológicamente a algunos miembros no cultivables con las técnicas tradicionales, pero presenta la desventaja de no permitir el estudio de aspectos tales como la abundancia de los distintos miembros en la comunidad, ni tampoco una clasificación filogenética polifásica.

Además, es sabido que la morfología y las características fenotípicas de los organismos pueden ser influenciadas por sus estadios de desarrollo y las condiciones ambientales. Es decir, las características morfológicas no reflejan necesariamente las divergencias fisiológicas y genéticas reales, las cuales podrían ser reveladas empleando datos moleculares (Nadeau *et al.,* 2001).

Particularmente, algunos autores han señalado que dentro del grupo de cianobacterias la identidad establecida mediante técnicas genotípicas y la inferida a través de la identificación de *morfotipos* pueden coincidir o no, dependiendo del caso específico analizado. De todos modos, la correlación entre morfotipos y filotipos ha mejorado gradualmente a medida que se han ido considerando estructuras celulares más complejas (Taton *et al.*, 2003).

Introducción

El estudio de la estructura de las comunidades microbianas laminadas se ha abordado empleando diferentes técnicas, algunas de estas de alta resolución, incluyendo microscopía de luz y microscopía electrónica de transmisión o de barrido. Además, la microscopía confocal láser de barrido ha ofrecido ventajas significativas en estudios de Ecología Microbiana (Solé *et al.,* 1998). Recientemente se han descrito nuevas técnicas que permiten el estudio *in situ* de las características morfológicas, estructurales y geofisicoquímicas de comunidades bentónicas. Estos métodos combinan microscopía electrónica de barrido (empleando un detector *back-scattered electron, BSE*) con un sistema microanalítico auxiliar de espectroscopia de dispersión de energía de rayos X (*X-ray energy-dispersive spectroscopy*, EDS) (Wierzchos y Ascaso, 1994).

Asimismo, el análisis de lípidos (FAME, PLFA), especialmente el de ácidos grasos, permite cuantificar los organismos viables dentro de la comunidad, la composición de los microorganismos en esa comunidad y el estado fisiológico-nutricional de la misma (Navarrete *et al.,* 2000).

En las últimas décadas, el desarrollo de nuevas técnicas moleculares ha facilitado la detección e identificación de muchos grupos filogenéticos no observados previamente. Más recientemente, con el desarrollo de la Bioinformática, se ha hecho posible manejar un número mayor de secuencias de ácidos nucleicos, permitiendo realizar comparaciones entre genes, proteínas y secuencias nucleotídicas de grupos distintos para revelar las relaciones existentes entre ellos (Guerrero *et al*, 2002).

Las técnicas de Biología Molecular para detectar e identificar microorganismos a través de marcadores moleculares (como el gen *16S ARNr*) o de genes funcionales (por ej.: *nifH, nir, amoA*), son actualmente las más utilizadas para explorar la diversidad así como para analizar la estructura de las comunidades microbianas (Guerrero *et al*, 2002). La principal ventaja de emplear este tipo de abordaje en estudios de diversidad es que permiten realizar una clasificación basada en la filogenia de los microorganismos, (logrando así construir una *clasificación natural* de los mismos) sin la necesidad de cultivos puros, además de detectar organismos aún no cultivables.

Introducción

En general, el análisis de secuencia de los genes que codifican para las subunidades menores del ARN ribosomal (SSU), como el gen *16S ADNr*, es considerado el abordaje más fácil, rápido y ajustado para clasificar filogenéticamente a los organismos procariotas en todos los niveles taxonómicos incluyendo el de especie (Nübel, 1997).

Las secuencias de 16S ARNr han sido utilizadas ampliamente en microbiología ambiental y son invalorables para estudiar la amplia diversidad microbiana y sus capacidades funcionales (de Long & Pace, 2001), asi como para establecer nuevos agrupamientos de organismos no cultivados (Hugenholtz *et al.* 1998; Garrity *et al.* 2002).

Sin embargo, el análisis comparativo del gen 16S ARNr entre organismos que se encuentran cercanamente relacionados tiene una capacidad de resolución flexible y discutible. El valor umbral de similitud de secuencia nucleotídica que los diferencie como pertenecientes a diferentes especies varía dependiendo de los organismos estudiados (Coenye *et al.,* 2005).

En la identificación a nivel de especie, también se ha propuesto el análisis parcial o total de secuencias de otros genes muy conservados a través de la evolución y que además han mostrado congruencia con la filogenia del *16S ADNr* como *rpoC1*, que codifica para la subunidad β de la ARN polimerasa (Ma *et al.,* 2004). En las cianobacterias también se ha empleado la región *cpcB*-IGS-*cpcA* (que codifica para dos subunidades de las ficobiliproteínas), perteneciente al operón de la ficocianina (Nübel *et al.,* 1997, Premanandh *et al.,* 2005).

Sin embargo, las bases de datos de secuencias de genes como *rpoC1* no son lo suficientemente extensas, en comparación con la del gen *16S ARNr*. El gen *16S ARNr* ha sido el más empleado como marcador molecular filogenético, sus secuencias son relativamente fáciles de alinear y actualmente

se cuenta con una base de datos importante que incluye entre otras, aproximadamente 11000 secuencias de cianobacterias.

Esta gran cantidad de información permite realizar comparaciones y análisis entre secuencias distintas. Asimismo, representa una alternativa para investigar la discrepancia entre cepas de colecciones y aquellos aislamientos recuperados de comunidades naturales (Nübel, 1997).

En general, los estudios independientes del cultivo, orientados a describir la composición y/o diversidad microbiana de comunidades, consisten en la extracción del material genético (ADN o ARN) del ambiente, amplificación mediante PCR del gen o de una región del gen de interés (p. ej.: *16S ADNr*) y la posterior separación de los amplicones obtenidos utilizando técnicas de clonado, DGGE y T-RFLP entre otras. Finalmente, se pueden identificar los integrantes de la comunidad mediante el análisis de secuencia de ADN, perfiles de T-RFLP, etc. y su comparación con las bases de datos.

Actualmente, este tipo de metodología es empleada para explorar la biodiversidad presente en distintos hábitats, en varias áreas de investigación como en la ecología microbiana, biotecnología, industria alimenticia y medicina. Los estudios son muy diversos e incluyen ambientes extremos, suelos, intestino de termitas, quesos y tejidos bucales, entre otros.

Sin embargo, cuando se emplean métodos independientes de cultivo para estudiar la biodiversidad de un sistema, es importante tener siempre presente que este tipo de metodología también posee sesgos intrínsecos que introducen desviaciones y apartan o no reflejan la complejidad de la comunidad analizada.

Por este motivo se ha propuesto que en general, este tipo de abordaje es cualitativo o en algunos casos semicuantitativo y debe entenderse como una forma diferente de muestrear la biodiversidad microbiana, en comparación con los abordajes dependientes de cultivo o la microscopía (Ward *et al*, 1998).

La información actual acerca de la diversidad de filotipos de cianobacterias contenidos en matas microbianas antárticas, provenientes de la isla Rey Jorge, es ecasa. Este trabajo pretende aportar información filogenética para comprender mejor la composición de cianobacterias y complementar la descripición morfológica detallada de los géneros de cianobacterias que dominan dichas matas.

2- OBJETIVOS

Objetivo general

Explorar la diversidad de cianobacterias y la presencia de cianobacterias diazótrofas, en matas microbianas de suelos provenientes de la Península Fildes, Isla Rey Jorge, empleando métodos independientes de cultivo.

Objetivos específicos

- Amplificar regiones específicas de los genes 16S ADNr y nifH de cianobacterias en las comunidades microbianas analizadas y obtener bibliotecas de ADN conteniendo las secuencias amplificadas.
- Analizar la diversidad de secuencias contenidas en las bibliotecas de ADN empleando ARDRA. Definir un número de unidades taxonómicas operacionales (OTUs) presentes en cada biblioteca.
- 3. Secuenciar, comparar y analizar las OTUs halladas a los efectos de identificar la composición de la comunidad

3- MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 Colecta de muestras

Durante el mes de enero del 2005 se colectaron 22 muestras de suelo en diferentes sitios de la Isla Rey Jorge / 25 de Mayo, la cual forma parte del Archipiélago de Islas Shetland del Sur. Los sitios de colección fueron en la península Fildes: Pasaje Drake, Punta Nebles, valle al suroeste del Aeródromo Tte. Rodolfo Marsh y Punta Halfthree. El muestreo se realizó evitando las zonas en donde fueran evidentes signos de actividad de origen antropogénico (zona cercana a la Base, lago Uruguay) u ornitogénico.

Las muestras de suelo (aproximadamente 10 g) fueron colectadas en tubos Falcon[®] estériles y mantenidas en hielo durante su transporte hacia el Laboratorio del Departamento de Bioquímica (IIBCE) en Montevideo, en donde fueron mantenidas a -20°C hasta su procesamiento.

3.2 Extracción de ADN genómico

El ADN genómico de cada muestra fue purificado en base al protocolo que combina la lisis mecánica y química de las células, descrito previamente (Griffiths *et al.* 2000) con algunas variaciones:

La primer etapa se efectuó en cámara de flujo laminar a los efectos de disminuir posibles contaminaciones de la muestra original y de la preparación. Se colocó en un tubo Corex[®] de 15 ml frío: aproximadamente 1,0 g de muestra junto con igual volumen de cuentas de zircornio (0,1 mm zircornia/silica beads, BioSpec Products Inc.), 1 ml de buffer TE "alto" (TRIS 100 mM, EDTA 100 mM, pH 8,0), 0,5 ml de buffer de extracción (CTAB 5% w/v, NaCl 0,35 M en buffer fosfato 200 mM, pH 8,0) y 0,5 ml de una mezcla de fenol: cloroformo: alcohol isoamílico (25:24:1).

Las células se lisaron durante 5 min en vortex y luego los tubos se centrifugaron a 8x10³ r.p.m. por 10 min a temperatura ambiente (T.A.). La fase acuosa (superior) se transfirió de forma estéril a otro tubo Corex[®].

Se extrajo el fenol remanente en la fase acuosa mediante una segunda extracción con igual volumen de cloroformo y posterior centrifugación a 8x10³ r.p.m. La fase acuosa (superior) se transfirió a un tubo Corex[®] de 15 ml nuevo y se realizó una última extracción con igual volumen de éter etílico, invirtiendo el tubo varias veces. Una vez separadas las dos fases, se transfirió nuevamente la fase acuosa, ubicada esta vez en la zona inferior del tubo, a un tubo Sigma[®] estéril.

Los ácidos nucleicos totales se precipitaron agregando igual volumen de polietilenglicol (PEG 8000 30% en solución acuosa de NaCl 1,6 M) e incubando a T.A. durante 2 hs. Luego se centrifugó a 16x10³ g durante 30 min a 5°C y se descartó el sobrenadante. El *pellet* se lavó con etanol 70% v/v frío dos veces y se dejó evaporar el solvente en campana de flujo laminar.

Los ácidos nucleicos se resuspendieron en 150 μ l de agua miliQ[®] y la suspensión se incubó durante toda la noche a 4°C a los efectos de favorecer la hidratación de los mismos. Al día siguiente se agregó 3 μ l de RNasa 10 mg/ml, libre de DNAsa y se incubó a 37°C durante 15 min. Finalmente, la integridad del ADN se evaluó cualitativamente mediante electroforesis en geles de agarosa 1% w/v en buffer TAE 1x, teñidos con una solución de Bromuro de etidio 5 μ g/ml.

3.2 PCR

3.2.1 PCR de 16S ADNr de cianobacterias

Se amplificó una región de 422-pb del gen *16S ADNr* de cianobacterias, conteniendo las regiones varibles V3 y V4 de dicho gen. En la reacción se utilizó como templado cada una de las preparaciones de ADN ambiental. Para

ello se empleó el siguiente par de oligonuclétidos universales degenerados; 359f (5'GGGGAATYTTCCGCAATGGG3') y 781ra (5'GACTACTGGGGTATCTAATCCCATT3') o (5'GAC TAC AGG GGT ATC TAA TCC CTT T) 781rb (Nübel *et al.*, 1997). (Integrated DNA Technologies, IDT[®] Inc.). La mezcla reacción se realizó en 25 µl totales conteniendo: 2,0 µl ADN, 2,5 µl buffer 10X Hot Start, 0,8 mM de cada dNTP, 4,0 µM de oligonucleótido 359f, 4,0 µM de oligonucleótido 781ra o781rb y 1U de Hot Start *Taq* DNA polimerasa (Fermentas).

La amplificación fue llevada a cabo en un termociclador Perkin-Elmer 2400 de acuerdo al siguiente programa: un ciclo inicial de desnaturalización de 5 min a 94°C; luego 5 ciclos de 30 s a 94°C, 30 s a 56°C y 30 s a 72°C; 25 ciclos de 30 s a 94°C, 30 s a 55°C y 30 s a 72°C y un paso de elongación final de 4 min a 72°C. Los productos de PCR fueron analizados cualitativamente mediante electroforesis en geles de agarosa 1% w/v en buffer TAE 1x y teñidos en una solución de Bromuro de etidio 5 µg/ml.

Se recortó la banda del gel conteniendo los productos de amplificación y los mismos se purificaron con el kit Sephaglass™ Band Prep (Amersham Biosciences) según las indicaciones del fabricante.

3.2.2 Reacción de PCR de región nifH de cianobacterias

Análogamente se amplificó una región del gen nifH de cianobacterias en cada una de las muestras. El tamaño del fragmento esperado fue de aproximadamente 360-pb. Para ello se empleó el siguiente par de oligonuclétidos universales; CIAFORNIF (5'-CGTAGGTTGCGACCCTAAGGCTGA-3⁽) (5'-CIAREVNIF V GCATACATCGCCATCATTTCACC-3⁽⁾ (Olson et al. 1998) (Integrated DNA Technologies, IDT® Inc.). La mezcla reacción se realizó en 25 ul totales conteniendo exactamente las mismas cantidades de reactivos y ADN que en la amplificación del fragmento del gen 16S ADNr, sustituyendo los oligonucleótidos originales por el par correspondiente al gen *nifH* (20 μ M). La amplificación se realizó en un termociclador Perkin-Elmer 2400 de acuerdo al siguiente programa: primero un ciclo de desnaturalización de 5 min a 94°C; luego 5 ciclos de 30 s a 94°C, 30 s a 52,5°C y 30 s a 72°C; 25 ciclos de 30 s a 94°C, 30 s a 51,5°C y 30 s a 72°C y un paso de elongación final de 4 min a 72°C. Los productos de PCR fueron analizados de la misma forma que en el caso del gen *16S ADNr*.

3.3 Clonado de productos de PCR

Los productos de PCR previamente purificados, correspondientes a la región del gen *16S ADNr* de dos muestras, m6 y m18, fueron clonados empleando el kit InsT/Aclone[™] PCR Product Cloning Kit #K1213 (Fermentas) de acuerdo a las instrucciones del fabricante.

3.4 Ligación

Para la reacción de ligación se agregó a un tubo de microfuga Eppendorf[®] de 1,5 ml: 1 μ l de vector pTZ57R/T(0,165 μ g, 0,18 pmol), 3 μ l de producto de PCR previamente purificado, 3 μ l de buffer de reacción 10x (Tris-HCl 400 mM, MgCl₂ 100 mM, DTT 100 mM, ATP 5 mM, pH7,8 a 25°C), 3 μ l de solución PEG 4000 (50% w/v), 1 μ l de T4 ADN ligasa (5U), 0,75 μ l seroalbúmina bovina (SAP)BSA 20 mg/ml y agua miliQ[®] en c.s.p. 30 μ l. La mezcla de reacción se incubó durante toda la noche a 10°C.

3.5 Transformación

El vector pTZ57R/T conteniendo el producto de PCR correspondiente al gen *16S ADNr* de cianobacterias se transformaron células de *Escherichia coli* químicamente competentes (Top10 *E. coli,* Invitrogen).

Se agregó 10 μ l de la reacción de ligación a un tubo Eppendorf[®] de 1,5 ml con 150 μ l de células *E. coli* químicamente competentes (Top10 *E. coli*,

Invitrogen). Se incubó durante 40 min en hielo, por 1 min a 42°C e inmediatamente después se agregó 1 ml de medio LB en frío (5,0 g bacto triptona, 3,0 g de extracto de levadura, 5,0 g de NaCl y agua destilada c.s.p. 1 L). El cultivo se incubó durante 40 min a 37°C con agitación constante. Finalmente se extendió con rastrillo 100 µl del cultivo en placas de Petri con medio sólido LB-Agar (5,0 g bacto triptona, 3,0 g de extracto de levadura, 5,0 g de NaCl, 18 g agar y c.s.p. 1I) con ampicilina 50 µg/ml y X-Gal 20 µg/ml. Las placas sembradas se incubaron durante toda la noche a 37°C. Los clones transformantes conteniendo el inserto fueron seleccionados en base al análisis de α -complementación (colonias azules o blancas). Aproximadamente 80 transformantes blancas fueron seleccionadas para construir la biblioteca de amplicones.

3.6 Construcción de bibliotecas de amplicones

Las colonias blancas de los posibles clones transformados fueron transferidos con palillos estériles a nuevas placas de Petri conteniendo medio LB sólido con ampicilina 50 µg/ml. Las colonias fueron sembradas en el medio sólido de forma tal de poder ser repicadas nuevamente con un *replica plate* de 48 sitios. Las placas fueron incubadas a 37°C durante toda la noche. Con un *replica plate* se transfirió la biblioteca a placas de microtitulación de 96 pocillos conteniendo 100 µl de medio LB líquido con ampicilina 50 µg/ml. Las placas cubiertas con autoadhesivo estéril se incubaron durante toda la noche a 37°C. Se agregaron 50 µl de glicerol 50% a cada pocillo e inmediatamente se depositaron a -80°C como fuente de respaldo por períodos prolongados.

3.7 ARDRA

3.7.1 Digestiones

Los fragmentos clonados del gen 16S ADNr de la biblioteca correspondiente a la muestra m6 fueron reamplificados mediante PCR a partir de lisados de las colonias individuales y luego analizados por la técnica de

ARDRA (*Amplified Ribosomal DNA Restriction Analysis*). Cada fragmento reamplificado a partir de un clon se incubó en tres ensayos independientes, cada uno con una enzima de restricción distinta de acuerdo a las instrucciones del fabricante; 6 μ l de producto de PCR fueron digeridos con 0,1 μ l de endonucleasa *Alu* I, *Hinf* I *or Msp* I (Fermentas), 1,5 μ l de buffer 10x de la enzima correspondiente y agua miliQ[®] en c.s.p. para 15 μ l como volumen total de reacción.

Los productos de cada digestión fueron analizados en geles nativos de poliacrilamida 6% y teñidos con nitrato de plata. Luego, todos los clones analizados fueron agrupados en distintos ribotipos de acuerdo al patrón de bandas observado para cada enzima. Cada grupo o ribotipo fue asignado como una unidad taxonómica operacional (OTU) en esta comunidad. Este análisis sirvió como criterio para la selección de clones que posteriormente fueron secuenciados y analizados filogenéticamente.

3.8 Aislamiento del ADN plasmídico y secuenciación

El ADN plasmídico fue extraído por el método de lisis alcalina (adaptado de Sambroock) seguido de una precipitación con PEG (polietilengilcol 8000-30% NaCl 1,6 M) durante 1 h a -80°C. Luego se centrifugó por 30 min a 16x10³ rpm y 4°C. Los ácidos nucleicos precipitados (*pellet*) se resuspendieron en 40 µl de agua miliQ[®]. La reacción de secuenciación de los fragmentos nucleotídicos insertos en los clones seleccionados fue realizada empleando el oligonucleótido pUC/M13 reverso (Promega Corp., Madison, WI), en un secuenciador modelo ABIPrism 377 (Applied Biosystems, Foster City, CA), por el Centro Técnico de Análisis Genéticos (CTAG) de la Facultad de Ciencias, UDELAR.

3.9 Análisis filogenético

Las secuencias obtenidas de los clones seleccionados se analizaron por BLASTn (www.ncbi.nlm.nih.gov). Se realizaron alineamientos múltiples

empleando el programa CLUSTALW (Thompson *et al.*, 1994) y los árboles filogenéticos fueron inferidos mediante el análisis de Máxima Parsimonia (MP; factor de búsqueda heurístico de 2) /(MP; heuristic search factor of 2) y Neighbor-Joining (NJ; matriz de distancia-p) /(NJ; p-distance matrix), empleando el programa MEGA 3.1(Kumar *et al.*, 2004). La confianza en la topologías se halló empleando *bootstrapping*

4- RESULTADOS

4.1- Colección de muestras

Se obtuvieron muestras de matas (o tapetes), musgos y líquenes, provenientes de matrices distintas como, suelos, estanques someros o charcos y riachuelos formados por el deshielo estival. A cada muestra se le asignó un número y un nombre referente al género dominante en comunidad microbiana. En la Tabla 2 se detalla la cantidad de muestras colectadas así como su descripción.

N⁰ de	Descripción № de		Descripción		
muestra					
1	Mata Nostoc	17	Mata Tolypothrix		
2	Musgo pasaje Drake	18	Mata Nostoc		
3	Algas verdes	19	Nieve verde		
5	Musgo	20	Musgo		
6	Mata Phormidium	J20	Mata Phormidium		
7	Líquenes	22	Mata Leptolyngbya		
10	Mata Phormidium	24	Musgo		
11	Mata <i>Leptolyngbya</i>	29	Líquenes negros		
12	Musgo	30	Musgo		
15	Musgo	40	Suelo		
16	Mata <i>Leptolyngbya</i>	48	Crioseton (nieve roja)		

Tabla 2. Descripción de las 22 muestras colectadas en enero de 2005. Los nombres hacen referencia ala matriz de la comunidad microbiana o al género dominante en la misma.



Fig. 2. Mata o tapete microbiano dominado por cianobacterias pertenecientes al género *Leptolyngbya* (lámina color marrón).

En aquellas muestras provenientes de matas se empleó el criterio de nombrarlas según el género dominante en las mismas. Esto fue posible debido a que en el momento de la recolección cada muestra fue observada al microscopio e identificada de acuerdo a criterios morfológicos por el Prof. Jiri Komárek (comunicación personal).

4.2- Extracción de ADN genómico de las muestras

Se purificó el ADN genómico ambiental de 18 muestras, conservadas a -20ºC. En la Figura 3 se muestran los resultados obtenidos al emplear esta técnica con las distintas muestras colectadas para este trabajo.





Con la técnica empleada se purificó el ADN genómico en todas las muestras provenientes de matas microbianas. En los carriles correspondientes a las muestras 6, 11, 17, 18, 19, J20, 22, 29 y 48 se observan bandas con una intensidad igual o superior a la de banda de mayor tamaño (12Kb) del marcador molecular (Fermentas), correspondientes al ADN genómico de toda la comunidad microbiana. Por debajo de cada banda también puede observase

un *smear* que adjudicamos a la presencia de una cierta proporción de ADN degradado.

Los resultados obtenidos con el resto de las muestras provenientes de otras matrices son diversos: en algunos casos pudo purificarse el ADN, obteniéndose preparaciones de concentraciones considerablemente menores (Fig 3, muestras 2, 24 y 30) y en la mayoría de las muestras provenientes de musgos y líquenes (Fig. 3, muestras 5, 7, 10, 12, 15 y 20) no se logró obtener una preparación purificada de ácidos nucleicos con una concentración suficiente como para ser visualizada con esta técnica.

La ruptura parcial de los ácidos nucleicos puede visualizarse en todos los casos y probablemente se produzca por las condiciones que se emplean en la técnica de purificación escogida, particularmente durante la etapa de lisis celular mecánica.

Finalmente, los extractos de ADN fueron conservados a –20°C y empleados como molde para amplificar regiones específicas de los genes 16S ADNr y nifH de cianobacterias.

4.3- PCR

4.3.1 PCR de regiones de 16S ADNr y nifH de cianobacterias

Empleando la técnica de PCR *stepdown* y oligonucleótidos universales para los genes *16S ADNr* y *nifH* de cianobacterias, se obtuvieron productos de PCR del tamaño esperado al emplear como templado 14 preparaciones de ADN obtenidas de muestras distintas. En 8 de éstas también se obtuvieron productos de PCR de tamaño esperado, al emplear oligonucleótidos específicos para amplificar una región interna del gen *nifH*, que codifica para una de las proteínas estructurales del complejo enzimático nitrogenasa.

Los fragmentos corresponden a 379 pb y 359 pb, respectivamente. En la Tabla 3 se detallan las muestras a partir de las cuales fue posible obtener un

producto de PCR de tamaño esperado y las temperaturas empleadas para el protocolo de *PCR stepdown*.

En las mezclas de reacción de PCR, se emplearon como molde preparaciones de ADN obtenidas con técnicas distintas. Como se muestra en la Tabla 3, algunos productos de PCR fueron obtenidos a partir del ADN purificado con un kit comercial (SoilMaster[™] Epicentre), siguiendo las instrucciones del fabricante.

Tabla 3. Lista detallada de las muestras ambientales a partir las cuales se amplificaron fragmentos de los genes 16S ADNr y nifH de cianobacterias.

Nº	Descripción	Extracción	PCR stepdown			
muestra	Morfológica de género	de ADN 16S ARNr nifH		16S ARNr		
	dominante	Fecha	Fecha	Tm (ºC)	Fecha	Tm (ºC)
6	Phormidium	8/4/05	27/4/05	56/55	5/5/05	53/52
10	Phormidium	12/4/05	23/5/05	56/55	14/6/05	52.5/51.5
16	Leptolyngbya	17/3/05	27/4/05	56/55		
17	Tolypothrix	8/4/05	27/4/05	56/55		
18	Nostoc	17/3/05	27/4/05	56/55	5/5/05	53/52
J20	Phormidium	7/4/05	19/5/05	56/55	23/6/05	52.5/51.5
J20b	Phormidium		19/5/05	56/55		
25	Nostoc	*	12/5/05	56/55	14/6/05	52.5/51.5
34	Phormidium	*	11/5/05	55.5/54.5	2/6/05	51/50
35	Phormidium	*	11/5/05	55.5/54.5	2/6/05	51/50
44	Phormiduim	*	31/5/05	56/55	23/6/05	52.5/51.5
49	Lyngbya	*	24/5/05	56/55		
50	Lyngbya	*	12/5/05	56/55		
55	Phormidium	*	31/5/05	55.5/54.5		
58	Phormidium	*	11/5/05	56/55	13/5/05	51/50

Nota: La técnica empleada para purificar el ADN de las muestras es la descrita en la sección Materiales y Métodos (Griffiths *et al.,* 2000), exceptuando aquellas que se encuentran señaladas con asteriscos:

* Extracción de ADN empleando el Kit SoilMaster[™] (Epicentre), durante la estadía en la Base Antártica Artigas La integridad del ADN obtenido con este kit fue superior y la cantidad de muestra empleada fue 10 veces inferior a la técnica adaptada de Griffith *et al.* (2000). No obstante, las concentraciones de los extractos obtenidas con ambas técnicas fueron comparables por lo que el resto de los productos de PCR fueron obtenidos empleando como molde el ADN purificado con la técnica descrita en Materiales y Métodos.

4.4- Clonado y Construcción de bibliotecas del gen 16 ADNr de las muestras 6 y 18

Se eligieron dos muestras para construir bibliotecas de amplicones y analizar la diversidad de secuencias de ADN ribosomal de cianobacterias (*16S ADNr*) en las mismas. Las dos muestras escogidas provienen de matas dominadas por cianobacterias; una dominada por el género *Phormidium* (muestra 6) y la otra por *Nostoc* (muestra 18).

Se construyeron dos bibliotecas de 82 y 96 clones, correspondientes a las muestras 6 y 18, respectivamente. Ambas bibliotecas se conservaron a - 80°C en placas de ELISA, conteniendo en cada pocillo una suspensión celular en medio LB de cada clon con glicerol al 15% (v/v).

A partir de la biblioteca correspondiente a la muestra 6 se reamplificaron los fragmentos clonados en 63 clones, estableciéndose que los mismos tenían un inserto del tamaño esperado (422 pb). Con estos productos de amplificación se realizó un análisis mediante ARDRA (*Amplified Ribosomal DNA-Restriction Analysis*).

La diferencia entre el número de clones que contiene la biblioteca y la cantidad de productos de PCR obtenidos, se debe a que con las condiciones elegidas no fue posible amplificar el fragmento inserto en cada uno de los clones. Esto puede ser debido a que no todos los clones contenían el fragmento esperado, aunque cabe indicar que no se insistió en la optimización de las condiciones de la reacciones de PCR para eventualmente amplificarlos.

4.5- ARDRA de la biblioteca correspondiente a la muestra 6

Se realizó el análisis mediante ARDRA de la biblioteca correspondiente a la muestra 6 con el objetivo de agruparlos y elegir clones representantes de los distintos patrones de restricción. Estos clones se utilizaron para identificar los grupos taxonómicos específicos a los que pertenecían o con los que mantenían alguna relación filogenética.

Previamente se realizó un estudio *in silico* de los diferentes perfiles de restricción del gen *16S ADNr* de distintas especies de cianobacterias con 9 enzimas de restricción de corte frecuente (reconocimiento de cuatro nucleótidos). Para esto se emplearon las regiones nucleotídicas ubicadas entre las posiciones 359 y 781, respecto al primer nucleótido de la presuntiva secuencia codificante. Los genes analizados con el programa Web cutter 2.0 (<u>http://rna.lundberg.gu.se/cutter2/</u>) fueron seleccionados del banco de datos del GeneBank (<u>http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/guery.fcgi?db=Taxonomy</u>).

Tabla 4. Restricción *in silico* de los genes *16S ADNr* de distintas cianobacterias incluyendo distintos géneros. Se emplearon las regiones nucleotídicas ubicadas entre las posiciones 359 y 781, respecto al primer nucleótido de la secuencia codificante. Se muestran los tamaños de los fragmentos de ADN esperados al digerir con las distintas enzimas escogidas. (*) = No existe sitio de restricción el la secuencia.

Especie Cianobacteria		Enzimas de restricción				
	Alu I	Bfa I	Fatl	Hae III	Hinf I	
Nostoc indist	269, 388	270/272, 358/360, 389/391	*	362	*	
N. desertorum	389	*	*	363	*	
N. communa	237, 270, 389	*	*	363	230/233	
N.edaphicu	237, 389	*	*	363	230/233	
N. calcicola	237, 389	*	*	363	230/233	
N. lichenoi	237, 389	*	*	363	230/233	
N. entophytum	237, 389	359, 271, 390	*	363	114	
N. linckia	389, 237	390, 359, 271	*	363	114	
N. muscorum	237, 389	359, 271, 246	*	363	230, 114	
N. ellipsos	237, 389	*	*	363	*	
N. sp	270, 398	271/273, 359/361, 390/392	*	*	*	
T. distorta	389	271/273, 359/361, 390/392 279/281	265/269	363	230/233	
T. sp	278, 397	367/369, 398/400	*	371	*	
	Phormidium. subfuscu	270, 389	271/273, 390/392	*	*	114/117
------------	-------------------------------------	-------------------	-----------------------------	-------------------	---------------------	-------------------
	P. sp. Ant-orange	281, 400	282/284, 401/403	*	*	125/128
	P. cf terebriformis	269, 388	270/272, 389/391 207/209	*	363	113/116
P. sp AJ54		387	269/271, 388/390	*	251	112/115
	P. autumnale	388	389/391	376/380	362	113/116
	P. ambiguum	*	4/8, 292/296	*	*	112/115
	P. mucicola	26, 235, 268, 388	267/269, 386/388	373/377	*	
	P. molle	388	270/272, 389/391	*	*	92/95, 113/116
	P. tenue	388	270/272, 389/391	*	*	95/95, 113/116
	Leptolyngbya. schmidlei	217, 369	370/372	*	39, 343	94/97
	L. boryanum	26, 388	270/272, 389/391	*	*	92/95, 113/116
	L. foveolar	388	270/272, 389/391	*	*	92/95, 113/116
	L. sp	236, 269, 388	270, 389	*	*	92, 113
	L. crispata	269, 388	270, 389	*	*	92, 113
	Cianobacterias					
ļ		HinP1 I	Mbol	Mse I	Msp I	
	Nostoc indist	*	324/328	224/226	175/177	
	N. desertorum	351/353	324/328	225	175, 328	
	N. communa	351	324	225	175	
	N.edaphicu	351	324	225	175, 339	
	N. calcicola	351	324	225	175, 339	
	N. lichenoi	351	324, 405	225	175	
	N. entophytum	351	324	*	175, 339	
	N. linckia	351	324	*	175, 339	
	N. muscorum	*	324	225	175, 339	
	N. ellipsos	351/353	*	*	175/177, 339/341	
	N. sp	*	324/328	239/241	339/341	
				*		
	T. distorta	351	324	225	175, 339	
	T. sp	359/361	332/336	233/235	183/185, 347/349	
	Phormidium subfuscu	351	324	*	175 232	
	P. sp. Ant-orange	362	335	*	186 243	
	P. cf terebriformis	350	94	224 238	174 231 338	
	P. sp AJ54	349	*	*	173 252 298	
	P. autumnale	20, 229, 350	94	224, 238	174	
	P. ambiguum	349	93	223 237	173 337	
	P. mucicola	349	93	223, 237	173, 337	
	P. molle	*	*	238	174	
	P. tenue	*	*	238	174	
	Leptolyngbya. schmidlei	331	*	219	155, 280	
	L. boryanum	*	*	9, 239	174	
	L. foveolar	*	*	238	174	
	L. foveolar L. sp	* 20	*	238 407	174 174	
	L. foveolar L. sp L. crispata	* 20 20	* *	238 407 238	174 174 174	

Continuación tabla 4.

El estudio *in silico*, que también incluyó el gen *nifH*, fue realizado originalmente por la M.Sc. Ana Inés Catalán en el marco del proyecto: "*Perfil de ADN de poblaciones microbianas diazótrofas en suelos y lagos de la Península Antártica e Isla Rey Jorge*" (CSIC I+D), dentro del cual se encuentra incluido este trabajo. A partir de los resultados obtenidos *in silico*, se eligieron tres enzimas distintas a saber, *Alu* I, *Hinf* I y *Msp* I que generaron como productos entre 2 y 4 fragmentos de tamaños no menores a 10 pb cada uno.

Luego de este estudio preliminar, se digirieron los 63 productos de PCR obtenidos con las tres enzimas escogidas, en ensayos independientes. Los patrones de restricción fueron inspeccionados visualmente, lográndose identificar 6 grupos diferentes o ribotipos (Fig. 4). Se eligió un clon representante de cada patrón para su secuenciación, estos clones corresponden a los números 20, 24, 30, 46, 47 y 48 según su ubicación en la biblioteca. También se incluyó un clon al azar (clon 19) como referencia de clon elegido fuera del sistema de agrupamiento adoptado.

El criterio empleado para establecer un ribotipo fue que todos los clones del mismo exhibieran el mismo perfil de restricción, tomando en cuenta las tres enzimas. La mayor variabilidad de perfiles se observó cuando se emplearon las enzimas *Hinf* I y *Alu* I.

Los perfiles de digestión obtenidos con la enzima *Msp* I no presentaron diferencias importantes. Se distinguieron dos perfiles, uno incluyendo un fragmento de un tamaño aproximado a los 400 pb (que correspondería al fragmento sin digerir) y el otro por dos fragmentos de tamaños similares e inferiores a los 200 pb. El clon 46 fue el único que presentó un perfil distinto, en el cual se observaron 3 bandas, 2 de ellas que indicaban la presencia de fragmentos entre 100 y 200 pb y la restante, menor a 100 pb.

En la Figura 4 se muestran los perfiles de restricción obtenidos con las enzimas *Alu* I, *Hinf* I y *Mso* I de los 6 clones escogidos, representantes de los distintos ribotipos observados. El **primer ribotipo** se encuentra representado por el **clon 20**, agrupado con todos aquellos en los que no se visualizó

digestión aparente con la enzima *Alu* I y se identificaron 4 fragmentos de tamaño entre 100 y 300 pb con la enzima *Hinf I*.

El ribotipo representado por el **clon 24** se caracterizó por la presencia 3 fragmentos de entre 100 y 200 pb y uno menor de 100 pb cuando se digirió con la enzima *Alu* I y 4 fragmentos de tamaños entre 100 y 300 pb cuando se digirió con la enzima *Hinf* I.



Fig. 4. Fotografías de perfiles electroforéticos en geles de acrilamida 6% teñidos con nitrato de plata en 105 cuales se muestran los perfiles de restricción de los fragmentos insertos en los 6 clones escogidos, representantes de los distintos ribotipos. En los geles A, B y C se observan los fragmentos resultantes de la digestión con la enzima *Alu* I. En los geles D, E y F se muestran los perfiles de restricción de los mismos clones obtenidos con la enzima *Hinf* I y en la figura G, H e I aquellos resultantes de la digestión con la enzima *Msp* I.

El ribotipo representado por el **clon 30** presentó una única banda correspondiente a un fragmento de tamaño similar al del producto sin digerir cuando se emplearon las enzimas *Alu* I y *Hinf* I y las dos bandas características cercanas e inferiores a 200pb cuando se digirió con *Msp* I.

El **clon 46** representa a aquellos en los cuales se observó un patrón de digestión de 2 bandas correspondientes a fragmentos entre 100 y 200 pb y otra inferior a 100pb, empleando la enzima *Alu* I y una única banda sin digerir, cuando se empleó la enzima *Hinf I*.

El **clon 47** representa la mayoría de los clones analizados y se caracterizó por la presencia de dos bandas que sugieren la presencia de dos fragmentos de entre 100 y 300 pb cuando se digirió con la enzima *Alu* I y con la enzima *Hinf* I.

Finalmente, el **clon 48** se caracterizó por tener el mismo perfil que el clon 47 cuando se emplearon las enzimas *Alu* I y *Msp* I, pero difirieron cuando se empleó la enzima *Hinf* I. El fragmento inserto en el clon 48 no fue digerido en presencia de dicha enzima.

Por otra parte, en todos los perfiles electroforéticos se observó la presencia de un conjunto de bandas difusas, teñidas suavemente, que migraron aproximadamente igual que los fragmentos del marcador molecular de tamaños de 300, 500 y 850 pb. Dichas bandas fueron atribuidas a las proteínas presentes en la mezcla de reacción de la digestión. Esta hipótesis fue apoyada cuando se realizó un control negativo de la reacción sin ADN y se observó la presencia de las mismas bandas luego de la tinción (resultados no mostrados).

4.6- Análisis filogenético

Se obtuvieron las secuencias nucleotídicas de una del las hebras (empleando el olignucleótido forward) los fragmentos insertos en los 7 clones elegidos. Cada secuencia exhibió un tamaño similar al esperado (422 pb), exceptuando el clon 24, el cual tuvo una longitud de 399 pb (Tabla 5).

Tabla 5. Secuencias obtenidas de los fragmentos insertos en los clones 19, 20, 24, 30, 46, 47 y 48, pertenecientes a la biblioteca correspondiente al gen *16S ADNr* de la muestra 6. Las secuencias destacadas en itálica corresponden a las secuencias de unión con los cebadores.

			Nº
Nº	Secuencia del fragmento inserto 16S ARNr	Lon	Acceso
Clon		g .	Gene
		(pb)	Bank
19	5`GGGGAATTTTCCGCAATGGGCGAAAGCCTGACGGAGCAAGACCG	423	DQ533823
	CGTGGGGGAAGAAGGCTCTTGGGTTGTAAACTCCTTTTCTCTGGGA		
	AGAACGCAATGACGGTACCAGAGGAATCAGCATCGGCTAACTCCG		
	TGCCAGCAGCCGCGGTAAGACGGAGGATGCAAGCGTTATCCGGAA		
	TGATTGGGCGTAAAGCGTCCGCAGGTGGCAGTTCAAGTCTGCTGTC		
	TGCGTAGATATTGGGAGGAACACCGGTGGCGTAAGCGCCTTGCTGG		
	ACTGTAACTGACGCTGAGGAACGAAAGCCAGGGGAG CGATGGGAT		
	TAGATACCCCAGTAGT 3		
20	5) CCCC & A TCTTCCCCC A A TCCCCCC A A A CCCTC A CCC A CC A A C A C	125	DO533824
20	GTGGGGGAAGAAGGCTCTTGGGTTGTAAACCCTCACUCACCAACACCCC	425	DQ000024
	TGGGCGTAAAGCGTCCGCAGGTGGCAGTTCAAGCCGTGTCAAAG		
	TATGGTAGGGGCAAAGGGAATTCCTGGTGTAGCGGTGAAAATGCGTA		
	GAAATCAGGAAGAACATCGGTGGCGAAGGCGCTTTGCTGGACCATA		
	ACTGACACTCAGGGACGAAAGCTAGGGGAGCGAATGGGATTAGATA		
	CCCCAGTAGTC 3'		
24	5`GGGGAATCTTCCGCAATGGGCGAAAGCCTGACGGAGCAAGACCGC	399	DQ533825
	GTGGGGGAAGAAGGCTCTTGGGTTGTAAACTCCTTTTCTCTGGGAAG		
	AACAAAATGACGGTACCAGAGGAATCAGCATCGGCTAACTCGTGCC		
	AGCAGCCGCGGTAAGACGGAGGATGCAAGCGTTATCCGGAATGATG		
	GGCGTAAAGCGTCCGCAGGTGGCAGTTCAAGTCTGCTGTCAAAGAC		
	CGGGGCTCAACCTCGGAAAGGCAGTGGAAACTGAACAGCTAGAGTA		
	TGGTAGGGGCAAAGGGAATTCCTGGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGA		
	GATCAGGAAGAACATCGGTGGCGAAGGCGCTTTGCTGGACCATAAC		
	TGACACTCAGGGACGAAAGCTAGGGGAGCG3`		
		405	DOF
30	5 GGGGAAICIICCGCAAIGGGCGAAAGCCIGACGGAGNAAGACCG	425	DQ533826
	ΤΑΤΟΟΤΑΟΤΙΟΑΑΟΤΙΟΟΑΑΑΟΤΟΑΑΑΟΤΟΑΑΑΟΤΟΑΑΟΤΟΑΑΟΤΟΑΟΑΟΤΑΟΑΟ ΤΑΤΟΟΤΑΟΟΤΑ		
	METOMENETEROUOREURARUETAUUUUAUUUAIUUAATOUUATTAUATA		

46	5°GGGAATCTTCCGCAATGGGCGAAAGCCTGACGGAGCAATACCG CGTGAGGGAGGAAGGCTCTTGGGTTGTAAACCTCTTTTCTTAGGGA AGAAGCTCTGACGGTACCTAAGGAATAAGCATCGGCTAACTCCGTG CCAGCAGCCGCGGTAATACGGAGGAGGATGCAAGCGTTATCCGGAATCA TTGGGCGTAAAGCGTCCGTAGGTGGCAGTTCAAGTCTGCTGTTAAA GGCTGGGGCTTAACCCCAGACAGGCAGTGGAAACTGAACAGCTAGA GTGTGGTAGGGGTAGAGGGAATTCCCGGTGTANCGGTGAAATGCGT ANATATCGGGAAGAACACCGGTGGCGAAAGCGCTCTGCTGNACCAC AACTGACACTNAGGGACGAAAGCTAGGGGAGCGAATGGGATTAGAT ACCCCAGTAGTC 3`	423	DQ533827
47	5°GGGGAATTTTCCGCAATGGGCGAAAGCCTGACGGAGCAAGACCG CGTGGGGGAAGAAGGCTCTTGGGTTGTAAACTCCTTTTCTCTGGGA AGAACAAAATGACGGTACCAGAGGAATCAGCATCGGCTAACTCCG TGCCAGCAGCCGCGGTAAGACGGAGGAGGATGCAAGCGTTATCCGGAA TGATTGGGCGTAAAGCGTCCGCAGGTGGCAGTTCAAGTCTGCTGTC AAAGACCGGGGCTCAACCTCGGAAAGGCAGTGGAAACTGAACAGC TAGAGTATGGTAGGGGCAAAGGGAATTCCTGGTGTAGCGGTGAAAT GCGTAGAGATCAGGAAGAACATCGGTGGCGAAGGCGCTTTGCTGGA CCATAACTGACACTCAGGGACGAAAGCTAGGGGAGCGAATGGGATT AGATACCCCAGTAGTC 3′	425	DQ533828
48	5'GGGGAATTCTCGCAATGGGCGAAAGCCTGACGGAGCAATACCGC GTGAGGGAAGAAGGCTCTTGGGTTGTAAACCNCTTTTCTCAGGGAA TAAAAAATGAAGGTACCTGAGGAATAAGCATCGGCTAACTCCGTG CCAGCAGCCGCGGTAATACGGAGGAGGATGCAAGCGTTATCCGGAATGA TTGGGCGTAAAGCGTCCGCAGGTGGTACAACAAGTCTAGTGTCAAA GACCGGGGCTCAACCTCNGAAAGGCAGTGGAAACTGAACAGCTANA GTATGGTAGGGGCAAAGGGAATTCTGNTGTAGCCGGTGAAATGCGT AGAGATCAGGAAGAACATCNGTGGCGAANGCGCTTTGCTGGACCAT AACTGACACTCAGGGACCNNAAGCTAGGGGGACCGAATGGGATTAG ATACCCCAGTAGTC 3'	426	DQ533829

CCCCACTACTC 3

Cada secuencia fue inspeccionada visualmente corrigiéndose los nucleotidos N del electroferograma empleando el softwarwe Chromas. Estas secuencias luego fueron comparadas con las secuencias nucleotídicas no redundantes de organismos procariotas del Genbank. El programa utilizado para efectuar el análisis fue BLASTn (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/).

Los resultados obtenidos presentaron una alta similitud con secuencias de genes 16S ADNr de cianobacterias como Tychonema bornetii, Tychonema bourrellyi, Phormidium sp., Oscillatoria sp. y Microcoleus rushforthii y cianobacterias antárticas no cultivables (Tabla 6). Notablemente, todas las cianobacterias del banco de datos, cuyas secuencias que exhibían similitud con las obtenidas en este trabajo, pertenecen al orden Oscillatoriales

Tabla 6. Resultados obtenidos al contrastar las secuencias nucleotídicas de los fragmentos insertos en los clones 19, 20, 24, 30, 46, 47 y 48 con el banco de secuencias de organismos procariotas (www.ncbi,gov). Se muestran además las cinco primeras secuencias (con mayor *score*) de especies relacionadas con su correspondiente porcentaje de identidad.

Clon	Hit (blast)	Especie	N⁰ acceso	Identidad	Fuente
19	1	Phormidium autumnale CCAP 1462/10	AM398804	93	Marquardt, J. and Palinska, K. (2007) Genotypic and phenotypic diversity of cyanobacteria assigned to the genus <i>Phormidium</i> (Oscillatoriales) from different habitats and geographical sites <i>Arch. Microbiol.</i> 187 (5), 397-413.
	2	Uncultured bacterium clone ANTLV1_A05	DQ521468	93	Mosier, A. C., Murray, A. E. and Fritsen, C. H. (2007) Microbiota within the perennial ice cover of Lake Vida, Antarctica <i>FEMS Microbiol. Ecol.</i> 59 (2), 274-288
	3	Uncultured cyanobacterium clone RD065	DQ181701	93	Taton, A., Grubisic, S., Balthasart, P., Hodgson, D. A., Laybourn-Parry, J. and Wilmotte,A. (2006) Biogeographical distribution and ecological ranges of benthic cyanobacteria in East Antarctic lakes <i>FEMS Microbiol. Ecol.</i> 57 (2), 272- 289.
	4	Phormidium autumnale Arct- Ph5	DQ493873	93	Comte, K., Sabacka, M., Carre-Mlouka, A., Elster, J.and Komarek, J (2007) Relationships between the Arctic and the Antarctic cyanobacteria; three <i>Phormidium</i> -like strains evaluated by a polyphasic approach <i>FEMS Microbiol.</i> <i>Ecol.</i> 59 (2), 366-376.
	5	Oscillatoria sp. E17	AF263338	93	Nadeau, TL., Milbrandt, E. C. and Castenholz, R. W. (2001) Evolutionary relationships of cultivated Antarctic oscillatorians (Cyanobacteria) <i>J. Phycol.</i> 37 (4), 650-654.
20	1	Tychonema. bornetii NIVA-CYA 60	Y12686	99	Rudi, K., Skulberg O. M., Jakobsen, K.S.(1998) Evolution of cyanobacteria by exchange of genetic material among phyletically related strains; <i>J. Bacteriol.</i> 180 (13), 3453-3461 (1998).
	2	Tychonema. bourrellyi NIVA-CYA 70	Y12685	99	Rudi, K.; Skulberg O. M., Jakobsen, K.S. (1998) Evolution of cyanobacteria by exchange of genetic material among phyletically related strains; <i>J. Bacteriol.</i> 180 (13) 3453-3461
	3	T. bourrellyi NIVA-CYA 58	Y12684	99	Rudi, K.; Skulberg O. M., Jakobsen, K.S. (1998) Evolution of cyanobacteria by exchange of genetic material among phyletically related strains; <i>J. Bacteriol.</i> 180 (13) 3453-3461
	4	<i>T. bourrellyi</i> NIVA-CYA 33/1	Y12682	99	Rudi, K.; Skulberg O. M., Jakobsen, K. S. (1998) Evolution of cyanobacteria by exchange of genetic material among phyletically related strains; <i>J. Bacteriol.</i> 180 (13), 3453-3461.
	5	T. bourrellyi NIVA-CYA	Z82791	99	Rudi, K.; Skulberg, O. M. Larsen, F. and Jakobsen, K. S. (1997) Strain

		261/1			characterization and classification of oxyphotobacteria in clone cultures on the basis of 16S rRNA sequences from the variable regions V6, V7, and V8 ; <i>Appl.</i>
24	1	<i>T. bornetii</i> NIVA-CYA 60	Y12686	99	<i>Environ. Microbiol.</i> 63 (7), 2593-2599. Rudi, K.; Skulberg O. M., Jakobsen, K. S. (1998) Evolution of cyanobacteria by exchange of genetic material among phyletically related strains; <i>J. Bacteriol.</i> 180 (13), 3453-3461.
	2	<i>T. bourrellyi</i> NIVA-CYA 70	Y12685	99	Rudi, K.; Skulberg O. M., Jakobsen, K. S. (1998) Evolution of cyanobacteria by exchange of genetic material among phyletically related strains ; <i>J. Bacteriol.</i> 180 (13), 3453-3461.
	3	T. bourrellyi NIVA-CYA 58	Y12684	99	Rudi, K.; Skulberg O. M., Jakobsen, K. S. (1998) Evolution of cyanobacteria by exchange of genetic material among phyletically related strains; <i>J. Bacteriol.</i> 180 (13), 3453-3461.
	4	T. bourrellyi NIVA-CYA 33/1	Y12686	99	Rudi, K; Skulberg O. M., Jakobsen, K. S. (1998) Evolution of cyanobacteria by exchange of genetic material among phyletically related strains ; <i>J. Bacteriol.</i> 180 (13), 3453-3461.
	5	T. bourrellyi NIVA-CYA 261/1	Z82791	99	Rudi, K.; Skulberg, O. M. Larsen, F. and Jakobsen, K. S. (1997) Strain characterization and classification of oxyphotobacteria in clone cultures on the basis of 16S rRNA sequences from the variable regions V6, V7, and V8; <i>Appl.</i> <i>Environ.</i> Microbiol. 63 (7), 2593-2599.
30	1	T. bornetii NIVA-CYA 60	Y12686	99	Rudi, K.; Skulberg O. M., Jakobsen, K. S. (1998) Evolution of cyanobacteria by exchange of genetic material among phyletically related strains; <i>J. Bacteriol.</i> 180 (13), 3453-3461.
	2	T. bourrellyi NIVA-CYA 70	Y12685	99	Rudi, K.; Skulberg O. M., Jakobsen, K. S. (1998) Evolution of cyanobacteria by exchange of genetic material among phyletically related strains; <i>J. Bacteriol.</i> 180 (13), 3453-3461.
	3	T. bourrellyi NIVA-CYA 58	Y12684	99	Rudi,K.; Skulberg O. M., Jakobsen, K. S. (1998) Evolution of cyanobacteria by exchange of genetic material among phyletically related strains; <i>J. Bacteriol.</i> 180 (13), 3453-3461.
	4	T. bourrellyi NIVA-CYA 33/1	Y12689	99	Rudi, K.; Skulberg O. M., Jakobsen, K. S. (1998) Evolution of cyanobacteria by exchange of genetic material among phyletically related strains; J. Bacteriol. 180 (13), 3453-3461.
	5	T. bourrellyi NIVA-CYA 261/1	Z82791	99	Rudi, K.; Skulberg, O. M. Larsen, F. and Jakobsen, K. S. (1997) Strain characterization and classification of oxyphotobacteria in clone cultures on the basis of 16S rRNA sequences from the variableregions V6, V7, and V8; <i>Appl.</i> <i>Environ. Microbiol.</i> 63 (7), 2593-2599.
46	1	Uncultured Antarctic cyanobacterium clone Fr147	AY151731	100	Taton,A.; Grubisic, S., Brambilla, E., de Wit, R. & Wilmotte, A. (2003) Cyanobacterial Diversity in Natural and Artificial Microbial Mats of Lake Fryxell (McMurdo Dry Valleys, Antarctica): a Morphological and Molecular Approach; <i>Appl. Environ. Microbiol.</i> 69 (9), 5157- 5169.

	2	cyanobacterium clone Fr005	AY151724	95	Taton,A.; Grubisic, S., Brambilla, E., de Wit, R. & Wilmotte, A. (2003) Cyanobacterial Diversity in Natural and Artificial Microbial Mats of Lake Fryxell (McMurdo Dry Valleys, Antarctica): a Morphological and Molecular Approach; <i>Appl. Environ. Microbiol.</i> 69 (9), 5157-
	3	Uncultured soil crust cyanobacterium clone lichen4	AF428510	96	Redfield, E.; (2002) Comparative diversity and composition of cyanobacteria in three predominant soil crusts of the Colorado Plateau; <i>FEMS Microbiol.</i> Ecol. 40 (1), 55-63
	4	Microcoleus steenstrupii	AJ871987	93	Gundlapally, S. R.; Direct Submission; Submitted (03-JAN-2005) Gundlapally S.R., School of Life Sciences, Arizona State University, Main Campus, Tempe, Arizona 85287, USA
	5	Uncultured cyanobacterium isolate DGGE gel band 11	AY942898	93	Kim,SG.; Profiling cyanobacterial abundance and diversity based on cpcBA sequences during bloom in Daechung Reservoir, Korea; Unpublished
47	1	<i>T.bornetii</i> NIVA-CYA 60	Y12686	100	Rudi,K.; Skulberg O. M., Jakobsen, K. S. (1998) Evolution of cyanobacteria by exchange of genetic material among phyletically related strains; <i>J. Bacteriol.</i> 180 (13), 3453-3461.
	2	T.bourrellyi NIVA-CYA 70	Y12685	100	Rudi,K.; Skulberg O. M., Jakobsen, K. S. (1998) Evolution of cyanobacteria by exchange of genetic material among phyletically related strains; <i>J. Bacteriol.</i> 180 (13), 3453-3461.
	3	T.bourrellyi NIVA-CYA 58	Y12684	100	Rudi,K.; Skulberg O. M., Jakobsen, K. S. (1998) Evolution of cyanobacteria by exchange of genetic material among phyletically related strains; <i>J. Bacteriol.</i> 180 (13), 3453-3461.
	4	T.bourrellyi NIVA-CYA 33/1	Y12686	100	Rudi,K.; Skulberg O. M., Jakobsen, K. S. (1998) Evolution of cyanobacteria by exchange of genetic material among phyletically related strains; <i>J. Bacteriol.</i> 180 (13), 3453-3461.
	5	T.bourrellyi NIVA-CYA 261/1	Z82791	100	Rudi, K.; Skulberg, O. M. Larsen, F. and Jakobsen, K. S. (1997) Strain characterization and classification of oxyphotobacteria in clone cultures on the basis of 16S rRNA sequences from the variable regions V6, V7, and V8; Appl. Environ. Microbiol. 63 (7), 2593-2599.
48	1	Uncultured Antarctic cyanobacterium clone BGC-Fr018	AY151739	95	Taton,A.; Grubisic, S., Brambilla, E., de Wit, R. & Wilmotte, A. (2003) Cyanobacterial Diversity in Natural and Artificial Microbial Mats of Lake Fryxell (McMurdo Dry Valleys, Antarctica): a Morphological and Molecular Approach; I. <i>Appl. Environ. Microbiol.</i> 69 (9), 5157- 5169.
	2	Oscillatoria sp. E17	AF263338	92	Nadeau,TL.; Milbrandt, E. C. & Castenholz, R. W. (2001) Evolutionary relationships of cultivated Antarctic oscillatorians (Cyanobacteria); <i>J. Phycol.</i> 37 (4), 650-654.
	3	Oscillatoria sp. Ant-G16	AF623333	92	Nadeau, TL.; Milbrandt, E. C. & Castenholz, R. W. (2001) Evolutionary relationships of cultivated Antarctic oscillatorians (Cyanobacteria); <i>J. Phycol.</i> 37 (4), 650-654.

4	Uncultured Antarctic cyanobacterium clone FreP02	AY541578	92	Jungblut, A. D.; Hawes, I., Mountfort, D., Hitzfeld, B., Dietrich, D.R., Burns, B. P. & Neilan, B. A. (2005) Diversity within cyanobacterial mat communities in variable salinity meltwater ponds of McMurdo Ice Shelf, Antarctica; <i>Environ.</i> <i>Microbiol</i> , 7 (4), 519-529.
5	Uncultured Antarctic cyanobacterium clone FreP19	AY541575	93	Jungblut, A. D.; Hawes, I., Mountfort, D., Hitzfeld, B., Dietrich, D.R., Burns, B. P. & Neilan, B. A. (2005) Diversity within cyanobacterial mat communities in variable salinity meltwater ponds of McMurdo Ice Shelf, Antarctica; <i>Environ.</i> <i>Microbiol.</i> 7 (4), 519-529.

El análisis filogenético se realizó empleando como referencia distintas secuencias de genes *16S ADNr* de organismos pertenecientes a tres órdenes de cianobacterias, a saber, Oscillatoriales, Nostocales y Chrococcales y una secuencia de un organismo alejado filogenéticamente como raíz externa (*16S ADNr* de *E. coli*). Todas las secuencias fueron obtenidas del GenBank (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/ Taxonomy/ taxonomyhome.html/).

Los dos algoritmos empleados para construir los árboles, Neighbour Joining y Maximum Parsimonia (NJ y MP), mostraron topologías similares pero se muestra únicamente el árbol obtenido empleando el algoritmo de MP (Fig. 5).

Los resultados obtenidos indicaron que los ribotipos 20, 24, 30 y 47 exhibieron una alta similitud entre ellos y se agruparon junto con miembros del género *Tychonema*, aislamientos provenientes del Lago Mjøsa y del Río Glåma, en Noruega (Rudi *et al.* 1997, Rudi *et al.*, 1998). Los ribotipos 19 y 48 formaron grupos independientes pero mantuvieron una alta similitud con organismos del orden Oscillatoriales.

La secuencia del ribotipo 19 exhibió un 93% de identidad.con las secuencias obtenidas de cianobacterias no cultivadas, en particular con un organismo de la especie *Phormidium autumnale* CCAP 1462/10 (Marquardt *et al.,* 2007) y otro también de la especie *Phormidium autumnale* Arct-Ph5 (Comte *et al.,* 2007), proveniente del ártico.





El ribotipo 46 presentó un 100 % de identidad a nivel de toda la secuencia nucleotídica con la correspondiente a una potencial cianobacteria no cultivada proveniente del Lago Fryxell, McMurdo Dry Valley, en la región Este del continente antártico (Taton *et al.*, 2003). Este ribotipo pareció también estar relacionado, lejanamente, con organismos del género *Microcoleus*, también perteneciente al orden Oscillatoriales (Gundlapally, 2005, *direct submision*).

Por último, la secuencia obtenida con el ribotipo 48 mostró un porcentaje de identidad de 95 y 92% con el resto de laspotenciales cianobacterias antárticas no cultivadas, provenientes de matas de cianobacterias en estanques en Mc Murdo Ice Shelf (Nadeau *et al.*, 2001, Taton *et al.*, 2003, Jungblut *et al.*, 2005).

5- DISCUSIÓN

Los estudios clásicos de biodiversidad microbiana están basados en el empleo de cultivos axénicos de organismos aislados del ambiente. Actualmente conocemos mejor las limitaciones de este tipo de abordaje y en consecuencia es claro que mediante esta estrategia se subestima la diversidad microbiana, especialmente, si tenemos en cuenta de que el 99% de los microorganismos aún no ha sido cultivado a nivel de laboratorio (Sharma *et al.,* 2005).

En las últimas dos décadas, con la incorporación de métodos independientes de cultivo a los estudios de diversidad, hemos ampliado de forma significativa la capacidad de detectar microorganismos en los distintos ambientes. Esto ha contribuido enormemente a mejorar nuestro entendimiento sobre su distribución, abundancia y función en los mismos.

A su vez, el conocimiento de las vías metabólicas de los *nuevos* organismos ha permitido, en algunos casos, el diseño de nuevos métodos de cultivo (Sharma *et al.*, 2005). Así, estos dos tipos de abordaje han conformado un sistema de estudio, el cual se retroalimenta positivamente. Actualmente, el abordaje independiente de cultivo se ha convertido, junto con los métodos de cultivo tradicionales, en requisitos imprescindibles para explorar la diversidad de microorganismos en un ambiente dado.

La biodiversidad del continente antártico como tema de estudio ha atraído la atención de varios países en los últimos años. Esto se ha debido al mayor acceso y permanencia del ser humano en el continente, al interés que despierta la búsqueda de *nuevos* microorganismos en ambientes *extremos* y sobre todo por sus potenciales aplicaciones biotecnológicas. Además, este tipo de ambientes es sensible a los cambios climáticos globales y eventualmente constituye un sistema de estudio prístino.

En lo que respecta a la diversidad de microorganismos presentes en la Antártida, la gran mayoría de la información generada se ha basado en

estudios realizados en la región Este del continente. En esta región se ha realizado una descripción profunda y detallada de las comunidades microbianas empleando abordajes polifásicos (Taton *et al.*, 2003, Jungblut *et al.*, 2005, Taton *et al.*, 2006a, b), que abarcan métodos independientes y dependientes del cultivo. De esta forma, se han descrito diversas comunidades microbianas, generalmente dominadas por cianobacterias. Además, los integrantes de las mismas han sido identificados genética y morfológicamente.

En la Isla Rey Jorge, ubicada en la región Oeste del continente, se han realizado estudios detallados de la flora nativa. Contrariamente a esto, los trabajos sobre biodiversidad de microorganismos en comunidades microbianas han sido escasos. Aquellos que emplean un abordaje polifásico son aún más reducidos (Comte *et al.*, 2007) y se han centrado principalmente en microorganismos heterótrofos (Xiao *et al.*, 2006).

Los tapetes microbianos terrestres que se desarrollan durante el verano son componentes importantes del paisaje y la biomasa de la isla. Estas matas o tapetes, dominados por cianobacterias, han sido descritos según criterios morfológicos (Komárek, 1999, Komárek y Komárek, 2001), identificándose individuos pertenecientes a los géneros *Aphanocapsa, Chroococcus, Cyanothece, Gleocapsa, Leptolyngbya, Microcoleus, Nodularia, Nostoc, Oscillatoria* y *Phormidium.* Sin embargo, son escasos los estudios de diversidad genética de los microorganismos que componen estas comunidades (Comte *et al.,* 2007). Por este motivo, con este trabajo se pretende establecer un nuevo antecedente en el incipiente estudio de la diversidad y composición de las cianobacterias presentes en los suelos de la Isla Rey Jorge.

Como se ha mencionado anteriormente, los métodos independientes de cultivo también poseen sesgos intrínsecos que introducen desviaciones que no reflejan la complejidad de la comunidad analizada. Este tipo de abordaje es en general cualitativo o en algunos casos semi-cuantitativo. Los resultados obtenidos dependen, entre otros factores, del método escogido para obtener el ADN de la comunidad nativa. En este trabajo se empleó una técnica originalmente diseñada para extraer ácidos nucleicos de suelo, pero que

permitió también extraer sin problemas los ácidos nucleicos de todas las muestras provenientes de matas microbianas colectadas en este trabajo. En cambio, esto no fue posible en muestras provenientes de otras matrices, como musgos y líquenes. La diferencia quizás se deba a que en las matas o tapetes, la densidad de este grupo de microorganismos es muy superior a aquellas presentes en los musgos y líquenes.

También se han descrito sesgos asociados a la reacción de PCR, por ejemplo, la elección del par de oligonucleótidos, la formación de artefactos como quimeras y heteroduplex o aún de la metodología escogida para el análisis (Martin, 2001; Qiu, 2001). Los sesgos inherentes a esta técnica de amplificación de ADN son la principal causa de que toda la estrategia experimental se convierta en cualitativa.

En las reacciones de PCR realizadas en este trabajo se empleó un par de oligonucleótidos diseñados específicamente para amplificar una región interna del gen *16S ADNr* de cianobacterias, descritos por Nübel *et al.*(1997). Estos oligonucleótidos se conocen con el nombre 359F (*forward*) y 781Ra o 781Rb (*reverse*). El producto de PCR obtenido es de 379 pb, comprende las regiones variables V3 y V4 del gen, respectivamente y contiene información significativa para realizar una clasificación filogenética (Nübel *et al.*,1997).

Algunos autores recomiendan el uso de los oligonucleótidos reversos CYA781Ra y CYA781Rb por separado para obtener una visión más completa de la composición de la comunidad, ya que el oligonucleótido (a) está diseñado para amplificar el fragmento nucleotídico de cianobacterias filamentosas y el (b) para unicelulares y su uso por separado permitiría revelar dos tipos distintos de poblaciones (Boutte *et al.*, 2006).

En este trabajo se amplificó la región del gen 16S ADNr cuando se empleó el oligonucleótido reverso CYA781Ra. Cuando se empleó el oligonucleótido CYA781Rb no se visualizó producto de PCR en el perfil electroforético (resultados no mostrados). Debido a esto no se insistió en la optimización de la reacción con el oligonucleótido reverso (b) y se construyó la biblioteca con los amplicones obtenidos con el oligunucleótido (a).

Este resultado podría deberse a que la reacción de PCR no fue optimizada para el oligonucleótido (b). De todos modos, las reacciones de PCR se realizaron con las temperaturas recomendadas, siendo la misma para ambos pares (a y b). Además, debido a la similitud de temperaturas de annealing, se realizaron ensayos preliminares empleando ambos oligonucleótidos (a y b) por separado y distintas concentraciones de ADN Como resultado de estos ensayos se observaron molde. bandas correspondientes a los productos de PCR de tamaño esperado, sólo en las reacciones en las cuales se empleó el oligonucleótido 781Ra.

Otra interpretación posible sería que la mayoría de las muestras analizadas se encontrarían dominadas por cianobacterias filamentosas. Esto sería concordante con la descripción morfológica realizada por el Prof. Komârek (2005, comunicación personal) en matas de la isla. En su estudio, la mayoría de los géneros dominantes en las distintas matas fueron de morfología filamentosa. De todos modos, esta hipótesis debería ser verificada optimizando la reacción de PCR con el par de oligonucleótidos 359F/781Rb o aún empleando otro tipo de técnica, por ejemplo, microscopía de alta resolución.

Todos los productos de PCR fueron obtenidos empleando como molde el ADN ambiental purificado de acuerdo con la técnica descrita en la sección de Materiales y Métodos. Es interesante comentar que dichas preparaciones no fueron reaisladas del gel de agarosa como último paso en la purificación. Esto sugiere que las preparaciones de ADN ambiental obtenidas con esta técnica no contenían sustancias que inhibieran la reacción de PCR. Sin embargo, debe indicarse que al incluir el ADN parcialmente fracturado en la reacción de PCR, se aumenta la probabilidad de formación de artefactos, como quimeras (Qiu *et al.,* 2001).

En su conjunto, los resultados obtenidos en la etapa de amplificación de las regiones de los genes *16S ADNr* y *nifH* de cianobacterias, sugieren la

presencia de cianobacterias y en particular, de cianobacterias diazótrofas, en la mayoría de las matas microbianas analizadas. A su vez, estos resultados concuerdan con estudios realizados en otras regiones de la Antártida Marítima, donde se propone que las cianobacterias son los organismos dominantes en las matas microbianas de los ecosistemas de suelos y lagunas someras formadas por el deshielo del verano (Fernández-Valiente *et al.*, 2007).

Sería interesante relacionar la presencia o predominancia de cianobacterias fijadoras de nitrógeno con los ambientes limitados en nitrógeno de la isla. Para esto sería necesario contar con una cantidad mayor de información referente a cada una de las muestras como parámetros fisicoquímicos y una descripción detallada del biotopo del cual fue colectada.

La hipótesis de la presencia de cianobacterias y cianobacterias diazótrofas en las distintas muestras estudiadas se basa en observaciones realizadas con un microscopio de luz y en la presencia o ausencia de un producto amplificado, de tamaño esperado correspondiente a una región nucleotídica del genoma de cianobacterias. Asumimos que la visualización del producto de PCR del tamaño esperado sugiere la presencia dicho gen.

Las distintas secuencias contenidas en los productos de PCR no fueron confirmadas en cada una de las 14 muestras analizadas, ya que esto implicaría mayores costos y el manejo de un gran volumen de información para nuestra infraestructura. Cada producto de PCR proveniente de cada muestra contendría en teoría una variedad de secuencias, originarias de los genomas de distintos individuos que integran o eventualmente integraron la comunidad.

Por este motivo se ecogío la muestra 6, dominada por el género *Phormidium* para analizar por ARDRA. La mayoría de los clones de la biblioteca correspondiente a esta muestra presentaron perfiles de restricción idénticos y correspondientes a una de las seis OTU (representada por el clon 47), mientras que las cinco restantes se encontraron representadas por pocos clones (perfil del clon 20) y en algunos casos representadas por un único clon (perfiles de los clones 24, 30, 46 y 48).

A partir de estos resultados podría concluirse que la OTU representada por el clon 47 es la más abundante o la más representada dentro de la biblioteca de clones. Es importante dejar en claro que los diferentes patrones de restricción en los clones analizados no implican necesariamente especies diferentes y por eso empleamos el concepto de OTU. Por ejemplo, en este trabajo cuatro de los 6 OTUs (representadas por los clones 20, 24, 30 y 47) tuvieron una alta similitud con *T. bornetii* y *T. bourrellyi*.

Notablemente, al comparar la secuencia nucleotídica de los fragmentos clonados representativos de cada OTU con los bancos de datos, se obtuvo una cierta similitud con organismos cuyo origen geográfico se remonta al Lago Mjosa y el Río Glama, en el sur de Noruega, latitud 60°N (Rudi, 1998). La Península Fildes se encuentra a una latitud similar en el hemisferio Sur. La relativamente alta similitud a nivel de secuencia del gen *16S ADNr* de organismos ubicados en regiones tan apartadas, es actualmente tema de estudio de algunos investigadores que proponen el concepto de ecotipo (Cohan, 2001, Konstantinidis *et al.*, 2006), mientras que la posibilidad de la introducción de especies alóctonas a la Antártida por parte del ser humano también es una hipótesis demostrada en otros casos (Frenot *et al.*, 2005).

Las tres secuencias restantes (c19, c46 y c48), ubicadas dentro de la tabla 6 exhibieron cierta similitud a nivel de secuencia nucleotídica con las correspondientes a otras cianobacterias no cultivadas de origen antártico, provenientes de McMurdo Ice Shelf, (Taton *et al.,* 2003, Jungblut *et al.,* 2005). Las mencionadas secuencias presentaron un 93-95% de identidad a nivel de toda la secuencia. Aparentemente, las secuencias de estos clones estarían relacionadas de forma distante con el resto de las secuencias depositadas en el banco de datos.

Asimismo, estas tres secuencias poseerían una identidad genética distinta a las descritas en la región Este del continente. Sin embargo, sería necesario contar con una mayor cantidad de secuencias de cianobacterias provenientes de la región Marítima, para discutir mejor este punto.

La secuencia del fragmento inserto en el clon 19 exhibió un 93% de identidad con las secuencias correspondientes a dos cepas de la especie *P. autumnale* (Tabla 6), una de ellas originaria del Ártico. Esta observación otra vez plantea la interrogante acerca de la distribución (cosmopolita, endémica) de las especies de microorganismos en el planeta. Esta secuencia fue la única que mostró identidad (aunque con un bajo porcentaje) con otras dos secuencias del género *Phormidium*, evidenciando un cierto grado de congruencia entre la clasificación genética y la morfológica original de la muestra.

Los métodos clásicos de taxonomía de cianobacterias se basaron en criterios morfológicos. Recientemente, el género Tychonema ha sido incorporado dentro del orden Oscillatoriales empleando criterios taxonómicos polifásicos (Suda et al, 2002). Los estudios moleculares indican que el análisis del gen 16S ADNr y el criterio taxonómico clásico tienen un cierto grado de congruencia (Komârek, 2005). En la clasificación taxonómica actual de las cianobacterias (Komârek, 2005), el género Tychonema se ubica muy cercano género Phormidium. Además, comparten muchas características al morfológicas que los han agrupado dentro de la familia Phormidiaceae y la sub familia Phormidioideae, junto con los géneros Arthrospira, Microcoleus, Porphyrosiphon, Pseudophormidium, Planktothrix, Symploca y Trichodesmium. Tomando en cuenta las diferencias sutiles que podrían existir en la morfología de estos géneros, las discrepancias entre la clasificación genética y la morfológica resulta entonces posible.

En su conjunto, los resultados obtenidos son consistentes con otros estudios que emplean la misma estrategia (Jungblut *et al.*, 2005). Los ribotipos (OTUs) encontrados en este trabajo, llevado a cabo en la Antártida Marítima, coinciden con aquellos identificados en McMurdo Ice Shelf (Jungblut *et al.*, 2005) y en el Lago Fryxell (Taton *et al.*, 2003), a excepción de los clones (OTUs) que exhibieron una alta similitud con las secuencias de organismos del género *Tychonema*, originarios de Noruega.

En otro orden, las proporciones de OTUs halladas en la biblioteca no pueden extrapolarse a la comunidad original con la cual se construyó la biblioteca, por lo que no se discute la riqueza de la misma en cuanto a este aspecto. Como ha sido mencionado anteriormente, la estrategia de PCR ofrece la ventaja de amplificar el ADN para poder analizarlo, pero esto también implica que las abundancias relativas de las distintas secuencias de ADN entre muestra de partida y el producto al final de la reacción no se mantengan.

Es sabido que empleando la técnica de ARDRA es posible llegar a discriminar diferencias muy sutiles entre las distintas secuencias analizadas. En algunos casos puede llegar a discriminar diferencias a nivel de especie o cepa, generándose resultados con mucha información. Sin embargo, cuando se realizan estudios en comunidades como en este trabajo, la técnica de ARDRA no es aplicable para diferenciar a nivel de especie ya que el análisis de los distintos perfiles se torna demasiado complejo en vista de la variedad de los mismos. Además, la complejidad aumenta con la cantidad de enzimas de restricción empleadas. En este trabajo se empleó la técnica de ARDRA únicamente con el fin de poder agrupar los clones de la biblioteca y poder secuenciar un representante de cada grupo (OTU).

La cantidad de enzimas de restricción empleadas en este trabajo quizás fue excesiva para el objetivo con que empleamos la técnica y quizás el empleo de dos o eventualmente una enzima podría haber brindado igualmente información adecuada para lograr el objetivo planteado.

Los resultados obtenidos en este trabajo se basan principalmente en la amplificación y análisis de secuencias de ADN presentes en el ambiente, por lo que debe tenerse presente que las secuencias obtenidas a partir de las distintas matas podrían ser provenientes de organismos activos en la comunidad, así como de restos de ADN de organismos que integraron la comunidad en algún momento, pero que no se encontrarían activos o ni siquiera vivos. De todos modos, la estabilidad y persistencia de moléculas de ADN en el ambiente es un tema en discusión.

Un análisis de la comunidad empleando algún marcador quimiotaxonómico de cianobacerias como son los pigmentos, los PLFAs (*Phospholipid Fatty Acid*) o los FAMEs (*Fatty Acid Methyl Ester*), hubiese complementado este estudio. De esta forma se hubiese podido relacionar, al menos en cierto grado, a las cianobacerias metabólicamente activas con los géneros hallados a partir de las secuencias *16S ADNr*.

Asimismo, se debe tener presente que los organismos pueden tener varias copias del gen 16S ADNr y las mismas exhibir cierta heterogeneidad, influyendo de manera significativa en los resultados, por ejemplo, en el número de ribotipos obtenidos (Crosby, 2003). Además, actualmente se reconoce que la identificación de un microorganismo, basada únicamente en el gen 16S ADNr, no es suficiente en algunos casos. Recientemente se ha propuesto como estudio complementario el análisis de secuencias múltiples (Multi Locus Sequence Analysis, MLSA) en estudios de Ecología Microbiana Molecular (Case et al., 2007). En este tipo de metodología, además del gen 16S ADNr, se secuencia y analiza un número variable de genes housekeeping (en general se propone siete) para determinar de forma más confiable la identidad del organismo en estudio. Esto requiere, sin embargo, el desarrollo de técnicas accesibles para amplificar varios genes a partir de una única célula de un microorganismo no cultivado. Este tipo de abordaje permite discriminar de manera más certera la identidad de cada organismo (Connon and Giovannoni, 2002; Gevers, 2005). No obstante, para realizar un estudio MLSA de organismos no cultivados se requiere de técnicas denominadas high throughput methods, empleando tecnología sofisticada y una infraestructura aún no diponibles a nuestro laboratorio y en general se aplica en aislamientos cultivados.

Finalmente, hoy se concuerda en que el análisis taxonómico de cianobacterias debe realizarse empleando diversos criterios y métodos dentro de los cuales se incluyen los fenotípicos, ecológicos, bioquímicos y moleculares (Komárek, 2005). Lamentablemente en muy pocos trabajos se han investigado los morfotipos y genotipos de las cianobacterias en paralelo (Taton et al., 2006a). Sin embargo, aún empleando un abordaje polifásico, la

clasificación de las cianobacterias y su revisión se tornan complicadas, y esto se debe a la asignación clásica e histórica de *especies* a organismos descritos únicamente según su morfología, sin ninguna información genética o a la creciente presencia de secuencias de cianobacterias en bancos de datos, sin descripción morfológica, como en este trabajo. Debido a esto, la taxonomía de las cianobacterias se encuentra en constante revisión.

6 conclusiones

6 CONCLUSIONES

Se optimizó una metodología de estudio de diversidad de secuencias
 16S ADNr de cianobacterias provenientes de matas microbianas terrestes de la
 Isla Rey Jorge, Antártida Marítima. Esto incluye la puesta a punto en técnicas
 de extracción y purficación de ADN ambiental, PCR, clonado y ARDRA.

 Los ribotipos hallados en esta región de la Antártida Marítima coincidieron con aquellos identificados en McMurdo Ice Shelf y en el lago Fryxell, Antártida Continental.

• La 48 de los clones de la biblioteca correspondiente a la muestra 6, exhibieron una alta similitud con organismos del género *Tychonema*, indicando que este podría ser el género predominante en la comunidad.

• El género más representado dentro de la biblioteca de amplicones 16S *ADNr* de cianobacterias en la muestra 6 (*Tychonema*), no coincidió con el género dominante según la identificación basada en criterios morfológicos (*Phormidium*).

• La diversidad hallada en la biblioteca analizada fue relativamente baja, esto indicaría una baja diversidad en la comunidad. No obstante, estos resultados deberían interpretarse con cautela ya que la composición de las librerías generadas a partir de productos de PCR no son necesariamente cuantitativas (Suzuki & Giovanonni, 1996)

BIBLIOGRAFÍA

- Ausubel, F.M., Brent, R., Kingston, R.E., Moore, D.D., Seidman, J.G., Smith, J.A. & Struhl, K. (1992) *En:* Current Protocols in Molecular Biology. New York. John Wiley & Sons.
- Barsch, D. and Staeblein, G. (1984) Frostdynamik und Permafrost in den eisfreien Gebieten der Antarktischen Halbinsel. *Polarforschung* **54**: 111–119.
- Begon, M., Harper, J. L. and Townsend, C. R. (1990) *En*: Ecology: individuals, populations and communities. Blackwell Scientific Publications, Cambridge, Mass.
- Bintanjra, R. (1995) The local surface energy balance of Ecology Glacier, King George Island. *Antarc Sci* **7**: (3) 315-325.
- Blümel, W.D. y Eitel, B. (1989) Geoecological aspects of maritime climatic and continental periglacial regions in Antarctica (S-Shetland, Antarctic peninsula and Victoria Land). *Geookodynamics* **10**: 201-214.
- Bonilla, S., Villeneuve, V. & Vincent, W.F. (2005) Benthic and planktonic algal communities in a high arctic lake: pigment structure and contrasting responses to nutrient enrichment. *J Phycol* **41**: (6)1120–1130.
- Boutte, C., Grubisic, S., Balthasart, P., y Wilmotte. A. (2006) Testing of primers for the study of cyanobacterial molecular diversity by DGGE. J Microbiol Meth 65: 542–550.
- Bowman, J. P., Rea S. M., Mc Cammon S. A. & Mc Meekin T.A. (2000) Diversity and community structure within anoxic sediment from marine salinity meromictic lakes and a coastal meromictic marine basin, Vestfold Hills, eastern Antarctica. *Environ Microbiol 2*: 227–237.
- Broady, P,. A. (1996) Diversity, distribution and dispersal of Antarctic terrestrial algae. *Biodivers Conserv* **5**:1307-1335.
- Broady, P.A. & Kibblewhite, A.L. (1991) Morphological characterization of Oscillatoriales (Cyanobacteria) from Ross Island and southern Victoria Land, Antarctica. *Antarct Sci* **3**:35–45.
- Casamatta, D. A., Johansen, J. R., Vis, M. L. & Broadwater, S.T. (2005) Molecular and morphological characterization of ten polar and near-polar strains within the oscillatoriales (cyanobacteria). *J Phycol* **41**: 421–438.
- Case, R. J., Boucher, Y., Dahllof, I., Holmstrom, C., Doolittle, W. F.and Kjelleberg, S. (2007) Use of 16S rRNA and rpoB Genes as Molecular Markers for Microbial Ecology Studies *Appl Environ Microbiol* 73: 278-288.

- Christner, B. C., Kvitko, I. I. & Reeve, J. N. (2003) Molecular identification of bacteria and eukarya inhabiting an Antarctic cryoconite hole. *Extremophiles* **7**: 177–183.
- Coenye, T., Gevers, D., Van de Peer, Y., Vandamme, P. and Swings, J. (2005) Towards a prokaryotic genomic taxonomy. FEMS Microbiol Rev **29**: 147–167.
- Cohan, F. M. (2001) Bacterial species and speciation. Syst Biol 50: 513–524.
- Comte, K., Sabacka, M., Carre-Mlouka, A., Elster, J.and Komarek, J (2007) Relationships between the Arctic and the Antarctic cyanobacteria; three Phormidium-like strains evaluated by a polyphasic approach. *FEMS Microbiol. Ecol* **59** :(2) 366-376.
- Connon, A. and Giovannoni, S. J. (2002) High-Throughput Methods for Culturing Microorganisms in Very-Low-Nutrient Media Yield Diverse New Marine Isolate *Appl. Environ. Microbiol.* **68**: 3878-3885
- de Long, E. F. and Pace, N. R. (2001) Environmental Diversity of Bacteria & Archaea. Syst Biol 50:1-9.
- de la Torre, J. R., Goebel, B. M., Friedmann, E. I. and Pace, N. R. (2003) Microbial diversity of cryptoendolithic communities from the Mc Murdo Dry Valleys, Antarctica. *Appl Environ Microbiol* **69**: 3858–3867.
- de los Ríos, A., Ascaso, C., Wierzchos, J., Fernández-Valiente, E. & Quesada,
 A. (2004) Microstructural characterization of cyanobacterial mats from the McMurdo Ice Shelf, Antarctica. *Appl Environ Microbiol* 70: 569–580.
- des Marais, D. (2003) Biogeochemistry of Hypersaline Microbial Mats Illustrates the Dynamics of Modern Microbial Ecosystems and the Early Evolution of the Biosphere. *Biol Bull* **204**: 160–167.
- Echeverria, C.A. & Cesar Paiva, P. (2006) ¿Idiosincrasias del bentos antártico? Oecol Bras **10**: (2) 165-176.
- Ellis-Evans, J. C., (1996) Microbial diversity and function in Antarctic freshwater ecosystems. *Biodiv Conserv* **5**: 1395–1431.
- Fernádez-Valiente, E., Camacho, A., Rochera, C., Rico, E., Vincent, W.F.
 & Quesada, A. (2007) Community structure and physiological characterization of icrobialmats inByers Peninsula, LivingstonIsland (SouthShetland Islands, Antarctica). *FEMS Microbiol Ecol* 59: 377–385.
- Fernández-Valiente, E., Quesada, A., Howard-Williams, C. & Hawes, I. (2001) N2-fixation in cyanobacterial mats from ponds on the McMurdo Ice Shelf, Antarctica. *Microb Ecol* 42: 338–349.

- Fourcade, N. (1960) Estudio geológico-petrográfico de Caleta Potter, Isla 25 de Mayo, Islas Shetland del Sur. *Publ Inst Antárt Argent* **8**: 1–120.
- Frenot, Y., Chown, S.L., Whinam, J., Selkirk, P.M., Convey, P., Skotnicki, M. and Bergstrom, D. M. (2005) Biological invasions in the Antarctic: extent, impacts and implications. *Biol Rev* 80: 45–72.
- Friedman, E. I. (1993) *En*: Antarctic microbiology. Wiley- Liss, Inc., New York. 1-615pp.
- Futuyma, D. J. (1986) Evolutionary biology. 2da ed. Sinauer Associates, Sunderland, Mass.
- García-Pichel, F., López, A. and Nübel, U. (2001) Phylogenetic and Morphological Diversity of Cyanobacteria in Soil Desert Crusts from the Colorado Plateau. *Appl Environ Microbiol* **67**: (4) 1902–1910.
- Garrity, G. M., A. Winters, A. W. Kuo, and D. B. Searles (2002) Taxonomic outline of the prokaryotes. Bergey's manual of systematic bacteriology, second edition. Available at http://www.springer-ny.com/bergeysoutline.
- Gevers, D., Cohan, F. M., Lawrence, J. G., Spratt, B. G., Coenye, T.,. Fei, I E. T., Stackebrandt, E., Van de Peer, Y., Vandamme, P.,. Thompson, F. L. and Swings, J. (2005) Re-evaluating prokaryotic species *Nat Rev Microbiol* 3, 733-739.
- Godagnone, R. E. (1997) Peninsula Potter (Isla 25 de Mayo) Antártida Argentina. Mapa detallado de suelos, escala 1: 10000. *Contrib. Inst. Antárt. Argent.* **448**: 1–45.
- Griffiths, R. I., Whiteley, A. S., O'Donnell, A. G. & Bailey, M. (2000) Rapid method for coextraction of DNA and RNA from natural environments for analysis of ribosomal DNA and rRNA-based microbial community composition. *Appl Environ Microbiol* **330**: (66) 5488-549.
- Guerrero, R., Piqueras, M. and Berlanga, M. (2002) Microbial mats and the search for minimal ecosystems. *Int Microbiol* **5**: 177–188.
- Gundlapally, S. R.; Direct Submission; Submitted (03-JAN-2005) Gundlapally S.R., School of Life Sciences, Arizona State University, Main Campus, Tempe, Arizona 85287, USA.
- Howard-Williams, C., Pridmore, R. D., Downes, M. T. & Vincent, W. F. (1989) Microbial biomass, photosynthesis and chlorophyll a related pigments in the ponds of the McMurdo Ice Shelf, Antarctica. *Antarct Sci* 1: 125–131.
- Howard-Williams, C. & Vincent, W. F. (1989) Microbial communities in southern Victoria Land streams (Antarctica) Photosynthesis. *Hydrobiol* **172:** 27–38.

- Hugenholtz, P., Goebel, B. M. and Pace, N. R. (1998) Impact of Culture-Independent Studies on the Emerging Phylogenetic View of Bacterial Diversity. *J Bacteriol* **180**: 4765-4774.
- Jungblut, A. D., Hawes, I., Mountfort, D., Hitzfeld, B., Dietrich, D.R., Burns, B. P. & Neilan, B. A. (2005) Diversity within cyanobacterial mat communities in variable salinity meltwater ponds of Mc Murdo Ice Shelf, Antarctica. *Environ Microbiol* **7**: 519–529.
- Kappen L. (2000) Some aspects of the great success of lichens in Antarctica. Antarct Sci **72** (3): 314-324.
- Komárek, J. (2007) Phenotype diversity of the cyanobacterial genus Leptolyngbya in the maritime Antarctic. Pol Polar Res 28 (3): 211–231.
- Komárek, J. & Komárek, O, (2003) Diversity of cyanobacteria in seepages of King George Island, maritime Antarctica. *En:* Huiskes A.H.L. *et al.* eds. Antarctic Biology in a Global Context. – Backhuys Publishers, Leiden, 338 pp.
- Komárek, O. and Komárek, J. (2001) Two year phytobenthos investigation of Petrified Forest Creek at Maritime Antarctic, King George Island – preliminary study. *Folia Fac. Sci. Nat. Univ. Masarykianae Brunensis Geographia* 25: 103-110.
- Komárek, J. (1999a) Diversity of cyanoprokaryotes (cyanobacteria) of King George Island, maritime Antarctica – a survey. Arch Hydrobiol 94: 181– 193.
- Komárek, O. and Komárek, J. (1999b) Diversity of freshwater and terrestrial habitats and their oxyphototroph microflora in the Arctowski Station region, South Shetland Islands. *Pol Polar Res* **20** (3): 259-282.
- Kumar S, Tamura K & Nei M. (2004) MEGA3: Integrated Software for Molecular Evolutionary Genetics Analysis and Sequence Alignment Briefings. *Bioinformatic* 342 (5): 150-163.
- Longton, R. E. (1988). *En:* The biology of polar bryophytes and lichens. Cambridge: Cambridge University Press, 391 pp.
- Ma, Y., Jiao, N. Z. and Zeng, Y. H. (2004) Natural community structure of cyanobacteria in the South China Sea as revealed by *rpoC1* gene sequence analysis. *Lett Appl Microbiol* **39** (4): 353–358.
- Margulis, L., Barghoorn, E. S., Ashendorf, D., Banerjee, S., Chase, D., Francis, S., Giovannoni, S. & Stolz, J. (1980) The microbial community in the layered sediments at Laguna Figueroa, Baja California, Mexio: does it have Precambrian analogues? *Precambrian Res I* 1: 93-123.

- Martin-Laurent, F., Phillipot, L., Hallet, R., Chaussod, R., Germon, J. C., Soulas, G. and Catroux, G. (2001) DNA Extraction from Soils: Old Bias for New Microbial Diversity Analysis Methods. *Appl Environ Microbiol* 67: (5) 2354–2359.
- Marquardt, J. and Palinska, K. (2007) Genotypic and phenotypic diversity of cyanobacteria assigned to the genus *Phormidium* (Oscillatoriales) from different habitats and geographical sites. *Arch Microbiol* **187**: (5) 397-413.
- Mosier, A. C., Murray, A. E. and Fritsen, C. H. (2007) Microbiota within the perennial ice cover of Lake Vida, Antarctica. *FEMS Microbiol Ecol* **59**: (2) 274-288.
- Mueller, D. R., Vincent, W. F., Bonilla, S. and Laurion, I. (2005) Extremotrophs, extremophiles and broadband pigmentation strategies in a high arctic ice shelf ecosystem. *FEMS Microbiol Ecol* **53**: 73–87.
- Nadeau, T. L., Milbrandt, E. C. & Castenholz, R. W. (2001) Evolutionary relationships of cultivated Antarctic Oscillatoriaceans (cyanobacteria). *J Phycol* **37**: 650–654.
- Navarrete, A., Peacock, A., Macnaughton, S. J., Urmeneta, J., Mas-Castellà, J., White, D. C. and Guerrero, R. (2000) Physiological status and community composition of microbial mats of the Ebro Delta, Spain, by signature lipid biomarkers. *Microb Ecol* **39**: 92–99.
- Nübel, U., Garcia-Pichel, F. & Muyzer, G. (1997) PCR primer to amplify 16S rRNA genes from cyanobacteria. *Appl Environ Microbiol* **63**: 3327–3332.
- Ochyra, R., Bendarek-Ochyra, H. & A, Smith, R. I. L. (1998) 170 years of research of the Antarctic moss flora. *Polish Polar Studies 25th International Polar Symposium.* Warszawa: Institute of Geophysics of the Polish Academy of Sciences 159-177.
- Olson, J., Steppe, T., Litaker, R., Paerl, H., (1998). N2 –fixing microbial consortia associated with the ice cover of Lake Bonney, Antártica. Microb. Ecol. 36:231-238
- Osyczka, P., and Olech, M. (2005) The lichen genus *Cladonia* of King George Island, South Shetland Islands, Antarctica. *Polish polar Res* **26**: (2) 107–123.
- Øvstedal, D. O. & Smith, R. I. L. (2001). *En*: Lichens of Antarctica and South Georgia. A guide to their identification and ecology. Cambridge: Cambridge University Press, 411 pp.
- Pickard, J. and Seppelt, R.D. (1984): Phytogeography of Antarctica. J Biogeography **12**:83-122.

- Premanandh, J., Priya, B., Teneva, I., Dzhambazov, B., Prabaharan, D. and Uma, L. (2005) Molecular Characterization of Marine Cyanobacteria from the Indian Subcontinent Deduced from Sequence Analysis of the Phycocyanin Operon (cpcB-IGS-cpcA) and 16S-23S ITS Region. J Microbiol 44: (6) 607-616.
- Priddle, J. & Heywood, R. B. (1980) Evolution of Antarctic lake ecosystems. *Biol. J linn Soc* **14**: 51–66.
- Priscu, J., C., Fritsen, C., H., Adams, E. E., Giovannoni, S. J., Paerl, H. W., Mc Kay, C. P., Doran, P. T., Gordon, D. A., Lanoil, B. D. & Pinckney, J. L. (1998) Perennial Antarctic lake ice: an oasis for life in a polar desert. *Sci* 280: 2095–2098.
- Qiu, X., Wu, L., Huang, H., Mc Donel, P. E., Palumbo, A. V, Tiedje, J. M. and Zhou, J. (2001) Evaluation of PCR-Generated Chimeras, Mutations, and Heteroduplexes with 16S rRNA Gene-Based Cloning. *Appl Environ Microbiol* 67: (2) 880–887.
- Rakusa-Suszczewski S (Ed.) (1993) The maritime Antarctic coastal Ecosystem of Admiralty Bay. Warsaw: Polish Academy of Sciences, p. 216.
- Redfield, E. (2002) Comparative diversity and composition of cyanobacteria in three predominant soil crusts of the Colorado Plateau. *FEMS Microbiol Ecol* **40**: (1) 55-63.
- Rudi, K., Skulberg, O. M., Larsen, F. and Jakobsen, K. S. (1998) Evolution of Cyanobacteria by Exchange of Genetic Material among Phyletically Related Strains. *J Bacteriol* **180**: **(3)** 3453–3461.
- Rudi, K., Skulberg, O. M., Larsen, F. and Jakobsen, K. S. (1997) Strain Characterization and Classification of Oxyphotobacteria in Clone Cultures on the Basis of 16S rRNA Sequences from the Variable Regions V6, V7, and V8. *Appl Environ Microbiol* 63: (7) 2593–2599.
- Sabbe K, Hodgson, D. A., Verleyen, E., Taton, A., Wilmotte. A., Vanhoutte. K. & Vyverman. W. (2004) Effects of physical disturbance, salinity and light regime on microbial mat structure and composition in continental Antarctic lakes (Larsemann Hills and B_lingen Islands). *Freshwater Biol* 49: 296–319.
- Sambroock, J., Fritsch, E. F. and Maniatis, T. (1989) *En:* Molecular Cloning. A Laboratory Manual. Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Serrano-Cañadas (2001) Espacios protegidos y política territorial en las islas Shetland del Sur (Antártida). *Bol A G E 31*: 5-21.
- Sharma, R., Ranjan, R., Kapardar, R. K. and Grover, A. (2005) 'Unculturable' bacterial diversity: An untapped resource. *Curr Sci* **81**: (1) 10 72-77.

- Seymour, F. A., Crittenden, P. D., Wirtz, N., ØVSTEDAL, D. O., Dyer, P. D. and Lumbsch, H. T. (2007) Phylogenetic and morphological analysis of Antarctic lichenforming Usnea species in the group Neuropogon. Antarct Sci 19 (1): 71–82.
- Simpson, G. G. (1961) Principles of animal taxonomy. Columbia UniversityPress, New York, N.Y.
- Smith, M. C., Bowman, J. P., Scott, F. J and Line, M. A. (2000) Sublithic bacteria associated with Antarctic quartz stones. *Antarct Sci* **12**:177–184.
- Stach, J. E. M., Bathe, S., Clapp, J. P., and R. G. Burns (2001) PCR-SSCP comparison of 16S rDNA sequence diversity in soil DNA obtained using different isolation and purification methods. *FEMS Microbiol Ecol* 36: 139-151.
- Stal, L. J. (2000) Cyanobacterial mats and stromatolites *En*: The Ecology of Cyanobacteria: Their Diversity in Time and Space (Whitton, B. A. & Potts M, eds), pp. 61–120. Kluwer Academic Press, Dordrecht, the Netherlands.
- Stromberg, J. O. (1991) Marine ecology of polar seas: Acomparison Arctic/Antarctic. Pp. 247-261. En: T. Mauchline & T. Nemoto, (eds.), Marine Biology: Its Accomplishment And Future Prospect. Elsevier, Amsterdam.
- Solé, A., Gaju, N., Guerrero and Esteve, R. I. (1998) Confocal laser scanning microscopy of Ebro Delta microbial mats. *Eur Microsc Anal* 13–15.
- Suzuki, M. T. and Giovannoni, S. J. (1996) Bias caused by template annealing in the amplification of mixtures of 16S rRNA genes by PCR. *Appl Environ Microbiol* **62**: 625-630.
- Taton, A., Grubisic, S., Balthasart, P., Hodgson, D. A., Laybourn-Parry, A. and Wilmotte, A. (2006a) Biogeographical distribution and ecological ranges of benthic cyanobacteria in East Antarctic lakes. *FEMS Microbiol Ecol* 57 : 272–289.
- Taton, A., Grubisic, S., Ertz, D, Hodgson, D. A., Piccardi, R., Biondi, N., Tredici, M. R., Mainini, M., Losi, D., Marinelli, F., Wilmotte, A. (2006b) Polyphasic study of Antactic Cyanobacterial Strians. J Phycol 42: 1257–1270.
- Taton, A., Grubisic, S., Brambilla, E., Wit, R. & Wilmotte, A. (2003) Cyanobacterial diversity in natural and artificial microbial mats of Lake Fryxell (Dry Valleys, Antarctica): a morphological and molecular approach. *Appl Environ Microbiol* 69: 5157–5169.

van Gemerden, H. (1993) Microbial mats: A joint venture. Mar Geol 113: 3-25.

- Vincent, W. F. (2000) Cyanobacterial dominance in the polar regions. *En:* The Ecology of Cyanobacteria, Vol. 12 (Whitton BA & Potts M, eds), pp. 321–340. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, the Netherlands.
- Vincent, W. F., Bowman, J. P., Rankin, L. M. and Mc Meekin, T. A. (2000) Phylogenetic diversity of picocyanobacteria in Arctic and Antarctic ecosystems. 8th International Symposium on Microbial Ecology – Microbial Biosystems: New Frontiers (Bell C, Brylinsky M & Johnson-Green M, eds) Atlantic Canada Society for Microbial Ecology, Halifax, pp. 317–322.
- Vincent WF, Downes MT, Castenholz RW& Howard-Williams C (1993a) Community structure and pigment organization of cyanobacteriadominated microbial mats in Antarctica. *Eur J Phycol* **28**: 213–221.
- Vincent, W, F., Castenholz, R. W., Downes, M. T. and Howard-Williams C (1993b) Antarctic cyanobacteria: light, nutrients, and photosynthesis in the microbial mat environment. *J Phycol* **29**: 745–755.
- Vinocur, A. and Pizarro, H. (2000) Microbial mats of twenty-six lakes from Potter Peninsula, King George Island, Antarctica. *Hydrobiol* **437**: 171–185.
- Vinocur, A. and Pizarro, H. (1995) Periphyton flora of some lotic and lentic environments of Hope Bay (Antarctic Peninsula). *Polar Biol* **15**: 401–414.
- Vishnac, H. S. (1996) Biodiversity of yeasts and filamentous microfurigi in terrestrial Antarctic ecosystems. *Biodiv Cons* **5**: 1365-1378.
- Vogt, S. and Braun, M. (2004) Influence of glaciers and snow cover on terrestrial and marine ecosystems as revealed by remotely-sensed data. *Pesqui Antár Bras* **4**: 105-118.
- Walter, M. R. (1976) Stromatolites. (Developments in Sedimentology, 20.) Elsevier, Amsterdam, 790 pp.
- Ward, D. M. and Cohan, F. M. (2005) Microbial diversity in hot spring cyanobacterial mats: pattern and prediction. *Geothermal biology and* geochemistry in Yellowstone National Park (eds. Inskeep, W.P. & McDermott, T.), Bozeman, MT: Thermal Biology Institute, pp. 185–202.
- Ward, D. M., Ferris, M, J., Nold, S. C. and Bateson, M. M. (1996) A Natural View of Microbial Biodiversity within Hot Spring Cyanobacterial Mat Communities. *Microbiol Mol Biol Rev* **62**: (4) 1353–1370.
- Wayne, L. G., Brenner, D. J., Colwell, R. R., Grimont, P. A. D., Kandler, O., Krichevsky, M. I., Moore, L. H., Moore, W. E. C., Murray, R. G. E., Stackebrandt, E., Starr, M. P. and Tru⁻per, H. G. (1987) Report of the ad hoc committee on reconciliation of approaches to bacterial systematics. *Int J Syst Bacteriol* **37**: 463–464.

- Wen, J., Kang, J., Xie, Z., Han, J. and Lluberas, A. (1994) Climate, mass balance and glacial changes on small dome of Collins Ice Cap, King George Island, Antarctica. *Antarct Res (Chinese)* 5: 52–61.
- Wierzchos, J. and Ascaso, C. (1994) Application of back-scattered electron imaging to the study of the lichen-rock interface. *J Microsc* **175**: 54–59.
- Xiao, X., Li, M., You, Z. and Wang, F. (2007) Bacterial communities inside and in the vicinity of the Chinese Great Wall Station, King George Island, Antarctica. *Antarctic Sci* **19** (1): 11–16.
- Zdanowsky, M. K. and Weglenski, P. (2001) Ecophysiology of soil bacteria in the vicinity of Henryk Arctowski Station, King George Island, Antarctica *Soil biol Biochem* **33**: (6) 819-829.

ANEXO: Protocolos, medios de cultivo y soluciones

A.1 Obtención de células químicamente competentes de E. coli suspendidas en solución de CaCl₂.

Se extendió con ansa portainóculos la cepa de *E. coli* TOP10 (Invitrogen) sobre una placa de LB-agar estéril (sin antibiótico) y se incubó a 37°C durante 24 horas. Las colonias aisladas fueron empleadas para inocular 2 ml de LB. El medio de cultivo líquido se incubó a 37°C con agitación durante toda la noche.

Se transfirió 1 ml del cultivo a un matraz de crecimiento con 100 ml de LB estéril y se incubó a 37°C con agitación durante aprox. 2 a 3 horas. Se determinó la Densidad Óptica (D.O.) a 600 nm durante la incubación hasta que el cultivo alcanzó una D.O. de aprox. 0,4-0.5.

El cultivo fue centrifugado en frío (4°C) a 4000-5000rpm durante 5 min y se descartó el sobrenadante. La pastilla de células (*pellet*) se resuspendió con suavidad en 30 ml de una solución de CaCl₂ 0,1 M estéril a 4°C.

Se centrifugó en frío (4°C) la suspensión celular a 4000 r.p.m. durante 10 min y se descartó el sobrenadante. Las células se resuspendieron con suavidad en 2 ml de una solución de CaCl₂ 0,1 M estéril a 4°C y se incubaron 1 hora en hielo. Finalmente, la suspensión de células competentes se transfirió en volúmenes de 50 µl en tubos estériles de 1,5 ml y se agregó glicerol estéril a una concentración final del 20% (v/v). Estas suspensiones fueron guardadas a -80°C hasta su posterior uso.

Solución de CaCl₂ 0.1 M (para 100 ml) -CaCl₂.2H₂O 1.47 gr. -H2O (d) c.s.p. 100 ml

La solución se preparó con agitación y se esterilizó en autoclave o por filtración (filtros 0.2 µm desechables Nalgene[®]).

A.2 Lisado de colonias bacterianas para PCR

En cámara de flujo laminar: se picaron individualmente las colonias frescas de las placas de cultivo con palillos de madera estériles. Cada colonia fue suspedida en 100µl de agua miliQ[®] en tubos de 1,5 ml para microcentrífuga. Los tubos fueron incubados a 95°C por 10 min. para lisar las células. Inmediatamete fueron incubados a -20 °C en el freezer por 20 min. Finalemente se centrifugaron a 10000 r.p.m. por 5 min. y se empleó el sobrenadante como templado para las reacciones de PCR.

A.3 Geles de poliacrilamida 6% (w/v) para ADN

Solución stock acrilamida:bisacrilamida (4ºC, en agua destilada)

-Acrilamida 30% w/v -Bisacrilamida 0,8% w/v

Para 100ml de solución de acrilamida 6% en TBE 1x (4°C) -20 ml solución stock de acrilamida:bisacrilamida -10 ml de buffer TBE 5x -70 ml de agua destilada

Para preparar un gel mediano (aproximadamente 10 ml) -15 ml de solución de acrilamida 6%

-180 µl APS 10% w/v persulfato de amonio (PSA)

-18 µl TEMED

Nota: En algunos casos se preparó un *tapón* de acrilamida previo para evitar pérdidas de la solución mientras polimeriza el gel: Para ello se mezcló en un matraz pequeño: 880 μ l de agua miliQ[®], 200 μ l de solución *stock* de acrilamida: bisacrilamida y 120 μ l de TBE 5x. Se agregó rápidamente 9,0 μ l de APS 10% w/v y 25 μ l de TEMED.

A.4 Tinción con nitrato de plata

Etapa de fijación y tinción: Se colocó el gel en solución fijadora (15 ml de alcohol 95%, 0,75 ml de ácido acético glacial y 150 ml de agua destilada) por 10 min. Se transfirió luego a la solución de nitrato de plata (0,3 g de nitrato de plata en 150 ml de agua destilada) por 10 min. Se enjuagó por lo menos 1 vez (15 s) en agua destilada.

<u>Etapa de revelado:</u> Se agregó 150 ml de *solución reveladora* (4,5 g de NaOH, 0,75 ml de formaldehído 37% y 150 ml de agua destilada). Se esperó aproximadamente 5 min hasta visualizar las bandas. Se descartó la solución y se detuvo la reacción con solución fijadora. Se secó el gel de electroforesis entre papel celofán y vidrio.

A.5 Extracción de ADN plasmídico por lisis alcalina (Protocolo adaptado de Sambrook, Maniatis Vol. 1.25)

Se transfirió una colonia a 10 ml de LB ampicilina 50 ug/ml. Se incubó con agitación constante durante toda la noche a 37ºC.

Se centrifugó todo el volumen del cultivo a 12x10³ g por 2 min en tres tubos Eppendorf[®] de 1,5 ml y descartó el sobrenadante.

Se agregó 100 µl de *solución l* al pellet de células. Se homogeneizó con vortex e incubó por 5 min a T.A.

Se agregó 100 µl de *solución II* e incubó hasta que la solución se tornó transparente. La *solución II* debe prepararse en el momento.

Se agregó 100 μ l de *solución III* y mezcló invirtiendo el tubo. Se agregó 20 μ l de cloroformo y centrifugó a 12x10³ g por 10 min a 4°C.

Se transfirió la fase acuosa a otros tubos de microfuga y se agregó 0,6 volúmenes de isopropanol (aprox. 180 µl). Se mezcló la solución invirtiendo el

tubo varias veces. Se incubó durante 15 min a -20 °C y centrifugó a 12x10³ g por 15 min a 4°C, descartándose el sobrenadante.

Se lavó el *pellet* de células con 200 μ l de etanol 75% v/v y centrifugó por 1 min. Se descartó el sobrenadante. Se secó el *pellet* y resusupendió en 30 μ l de agua miliQ[®] con RNAsa 1 μ g/ul.

Se agregó dos volúmenes de una solución de polietilenglicol 8000 30%, NaCl 1,6 M e incubó durante 1h a -80°C. Se centrifugó a 16x10³ g durante 30 min a 4°C y descartó el sobrenadante.

Se resuspendió el *pellet* en 40 μ l de agua miliQ.

A.5.1 Solución I

50 mM glucosa 25 mM TRIS.CI (pH 8,0) 10 mM EDTA (pH 8,0)

Se esterilizó en autoclave y guardó a 4ºC.

A.5.2 Solución II

0,2 N NaOH
1% v/v SDS
Se preparó em el momento de usarse.
Para 10 ml:
0,2 ml NaOH 10 N
1,0 ml SDS 10% v/v
8,8 ml H₂O destilada

A.5.3 Solución III

60 ml Acetato de potasio 5 M

11,5 ml Ácido acético glacial

28,5 ml H₂O destilada

A.6 Medio líquido LB (para 1I):

5,0 g Bacto triptona
3,0 g Extracto de levadura
5 g NaCl
H2O destilada hasta 1L de volumen final.

La mezcla se agitó hasta su disolución. Se ajustó a pH 7,0 con NaOH 2 N (aprox. 0.2 ml). Se esterilizó en autoclave.

A.7 Medio LB-agar para placas (para 500ml):

Se preparó medio LB líquido como el descrito anteriormente. Se agregó 8,5 g. de agar bacteriológico y esterilizó en autoclave. El antibiótico se agregó al medio tibio estéril todavía líquido. El antibiótico se esterilizó por filtración. Las placas preparadas fueron conservadas no más de 15 días en heladera hasta su empleo.

A.8 Solución stock de Ampicilina 100 mg/ml (para 5,0 ml)

Se disolvió 250 mg de ampicilina en 5 ml de H₂O destilada. La solución se esterilizó por filtración (filtros 0,2 µm Sartorius® de nitrato de celulosa). La solución stock se mantuvo congelada a -20°C.

A.9 Solución stock de X-Gal 20 mg/ml (para 5,0 ml)

Se disolvió 100 mg de X-Gal en 5 ml de dimetilformamida en frasco de vidrio estéril.

A.10 Buffer TAE 10x
48,4 g	Tris base	
11,4 ml	Acido acético glacial	
20 ml	EDTA 0,5 M pH 8,0	
	Agua destilada c.s.p.	1 L

A.11 Buffer TBE 5x

- 54,0 g Tris base
- 27,5 g Ácido Bórico
- 40 ml EDTA 0,5 M pH 8,3

Agua destilada c.s.p. 1 L