

*UDELAR-Facultad de Ciencias
PEDECIBA Biología
Sub área Microbiología
Tesis de Maestría*

TESIS PARA LA OBTENCIÓN DEL GRADO DE:
MAGISTER EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

TÍTULO: Caracterización ecofisiológica de matas microbianas
dominadas por Cianobacterias en suelos de la isla Rey Jorge,
Antártida Marítima



AUTORA: María Cecilia Callejas

ORIENTADORA: Dra. Silvia Batista

TRIBUNAL: Dra. Claudia Etchebere (Presidenta), Dra. Cecilia Alonso
(Vocal), Dr. Héctor Romero (Vocal)

AÑO: 2011

LUGAR: Instituto de Investigaciones Biológicas Clemente Estable (IIBCE).
Montevideo, Uruguay

Agradecimientos

Quiero agradecer a todos aquellos y aquellas colegas, amigos y familiares que me acompañaron durante este viaje y sin los cuales este trabajo no hubiese sido posible:

A Silvia Batista por permitirme la oportunidad de trabajar en este tema que me ha encantado y por apoyarme siempre.

A Vero Antelo y Ceci Martínez por congelarse solidariamente colectando muestras.

Al personal de Instituto Antártico Uruguayo por la buena predisposición y el apoyo constante para realizar este proyecto.

A Ana Inés Catalán por enseñarme mil trucos y por su constante buena onda.

A Emanuel de Souza por recibirme en su laboratorio y enseñarme a hablar portugués.

A Vane, La Rubia y el Fede por hacerme reír tanto.

A María por los mates y a Ali por los cafés con sus charlas.

A todas las compis del gallinero que siempre dan una mano (voy por mesadas): Ariane, Adriana, Ine, Vicky, Lis, Pati, Gastón, Karen, Vero, Nati, las tres Danis, Pablo, Cintia, Martín y Paulita. Y a los compis de la vuelta que siempre me tiran terrible onda, Rufo, el Batti, Ceci T., María Z., Francisco y Ele.

A mi viejo, "la Hermana" y Mire, ¡Qué grande mi familia!

A todos los que injustamente me estoy olvidando en estas líneas.

A todos, muchas gracias!

RESUMEN

La Península de Fildes es la mayor área sin cobertura permanente de hielo de la isla Rey Jorge, Antártida marítima. Fue declarada Área Especialmente Protegida (ASPA 125) por el Comité del Tratado Antártico debido a su interés geológico y paleobiológico. En este trabajo caracterizamos la diversidad de microorganismos que componen los tapetes microbianos presentes en la península. Estos tapetes se desarrollan anualmente a lo largo del verano, siendo microecosistemas terrestres característicos de la zona. Empleamos dos abordajes: uno independiente de cultivo, en el cual analizamos bibliotecas de clones de gen 16S ARNr de bacterias, cianobacterias y arqueas y otro, en el cual aislamos microorganismos heterótrofos, seleccionando aquellos capaces de acumular biopolímeros. El análisis de diversidad de secuencias del gen 16S ARNr indicó que las Cianobacterias filamentosas y las α y β Proteobacterias fueron los grupos más abundantes en los sitios estudiados. No obstante también identificamos miembros de los Bacteroidetes, Acidobacterias, Actinobacterias, Clostridios, Verrucomicrobios, Planctomyces y *Bacillariophyta* (diatomeas) en menor abundancia. Dentro de las cianobacterias, los géneros *Anabaena*, *Nostoc* y *Cyanospira*, pertenecientes al Orden Nostocales y los géneros *Leptolyngbya* y *Microcoleus* pertenecientes al Orden Oscillatoriales fueron los más abundantes. Si bien observamos una variación a nivel de la estructura de las comunidades que componían cada sitio, los índices de diversidad calculados no mostraron diferencias claras entre las cuatro comunidades analizadas. Por otro lado, obtuvimos una colección de bacterias heterótrofas a partir de las mismas muestras mencionadas previamente. Seleccionamos cuatro aislamientos bacterianos capaces de sintetizar PHB, tres de estos aislamientos fueron identificados como *Pseudomonas* y el cuarto como un miembro del género *Bacillus*. Este trabajo ha contribuido a incrementar el escaso conocimiento acerca de la diversidad microbiana presente en la Península de Fildes. Esta información, junto con otros trabajos de similares características, puede ser empleada como línea de base en la planificación de políticas de manejo de la zona.

TABLA DE CONTENIDOS

Agradecimientos	i
RESUMEN.....	ii
TABLA DE CONTENIDOS.....	1
<i>Figuras</i>	3
<i>Tablas</i>	5
1 INTRODUCCION.....	6
1.1 <i>Ambientes extremos: Antártida</i>	7
1.2 <i>Isla Rey Jorge</i>	11
1.3 <i>Matas o tapetes microbianos</i>	13
1.4 <i>Sistemática de las cianobacterias</i>	17
1.4.1 <i>Clasificación según criterios bacteriológicos</i>	17
1.4.2 <i>Clasificación según criterios botánicos</i>	18
1.5 <i>Secuenciación y análisis de amplicones del gen 16S ARNr</i>	20
1.5.1 <i>Ecología Microbiana Molecular: gen ARNr de 16S</i>	20
1.5.2 <i>Estimadores de diversidad</i>	23
1.6 <i>Acumulación de Polihidroxicarbohidratos (PHAs) como mecanismo de resistencia al estrés ambiental</i>	26
1.7 <i>Antecedentes</i>	30
2 HIPÓTESIS Y OBJETIVOS	36
2.1 <i>HIPÓTESIS</i>	36
2.2 <i>OBJETIVOS</i>	37
2.2.1 <i>General</i>	37
2.2.2 <i>Específicos</i>	37
3 MATERIALES Y MÉTODOS.....	38
3.1 <i>Colecta de muestras</i>	38
3.2 <i>Extracción de ADN y construcción de bibliotecas de amplicones del gen ARNr de 16S</i>	40
3.3 <i>Secuenciación</i>	43
3.4 <i>Análisis bioinformático</i>	43
3.4.1 <i>Análisis de calidad de las secuencias</i>	44
3.4.2 <i>Clasificación de las secuencias</i>	44
3.4.3 <i>Análisis basados en Unidades Taxonómicas Operacionales (OTUs)</i>	45
3.4.4 <i>Análisis de distribución geográfica de las OTUs representativas</i>	45
3.5 <i>Búsqueda de heterótrofos productores de PHB</i>	46
3.5.1 <i>Aislamiento de heterótrofos</i>	46
3.5.2 <i>Elección del medio de cultivo y curvas de crecimiento</i>	47
3.5.3 <i>Detección de PHB por ensayos de fluorescencia con Rojo Nilo</i>	48
3.5.4 <i>Detección de PHB por cromatografía de gases</i>	48
3.5.5 <i>Detección de ácidos grasos por cromatografía de capa fina (TLC)</i>	49
3.6 <i>Identificación y caracterización de los aislamientos seleccionados</i>	50
3.6.1 <i>Secuenciación del gen 16S ARNr de los aislamientos productores de PHB</i>	50
3.6.2 <i>Secuenciación del gen <i>phaC</i> de los aislamientos productores de PHB</i>	50
3.6.3 <i>Fingerprinting de los aislamientos mediante REP- PCR</i>	52
3.7 <i>Búsqueda de los cultivables en las bibliotecas empleando el gen ARNr de 16S</i>	53
3.8 <i>Ensayos de acumulación de PHB en cultivos en lote</i>	53
4 RESULTADOS	55
4.1 <i>Colección de muestras</i>	55
4.2 <i>Construcción de bibliotecas de amplicones del gen 16S ARNr</i>	56
4.3 <i>Purificación de los insertos</i>	58
4.4 <i>Reacciones de Secuenciación</i>	61
4.5 <i>Análisis de diversidad empleando software mothur</i>	62

4.5.1 Estimación del número de OTUs y su distribución.....	63
4.5.2 Análisis de agrupamiento	64
4.5.3 Curvas de rarefacción e índices de diversidad	65
4.6 Análisis de la composición taxonómica de las bibliotecas	68
4.6.1 Clasificación de las secuencias empleando el Ribosome Database Project (RDP).....	68
4.6.2 Clasificación de las secuencias empleando GREEN GENES (GG).....	72
4.7 Distribución geográfica de las secuencias.....	77
4.7.1 Eubacterias	77
4.7.2 Cianobacterias	78
4.8 Caracterización primaria de aislamientos antárticos y búsqueda de organismos capaces de acumular polihidroxiacetato (PHA) y/o triacilglicéridos.	79
4.8.1 Colección de bacterias heterótrofas y determinación del perfil de crecimiento	79
4.8.2 Búsqueda de organismos acumuladores de PHB y/o triacilglicéridos: Ensayo de visualización de fluorescencia de colonias en presencia de Rojo Nilo.....	81
4.8.3 Búsqueda de organismos acumuladores de triacilglicéridos: ensayo de Cromatografía en Capa Fina (TLC).....	82
4.8.4 Búsqueda de organismos acumuladores de PHB: Identificación del polímero acumulado por Cromatografía Gaseosa (GC-FID).....	83
4.9 Identificación y caracterización molecular de los aislamientos seleccionados... 83	
4.9.1 Identificación filogenética de los organismos seleccionados.....	84
4.9.2 Amplificación y análisis de secuencia de los genes que codifican para las enzimas polihidroxiacetato sintasas (phaC y phaC1).....	85
4.9.3 Fingerprinting de los aislamientos seleccionados: rep-PCR	87
4.10 Ensayos en lote de los aislamientos identificados, para determinar la acumulación de polímeros	88
4.11 ¿La diversidad molecular contiene los aislamientos seleccionados?.....	89
5 DISCUSIÓN.....	90
5.1 Diversidad microbiana.....	90
5.1.1 Colección de muestras y secuenciación de bibliotecas	90
5.1.2 Análisis de diversidad basados en OTUs	92
5.1.3 Análisis de diversidad taxonómica.....	93
5.1.4 Distribución geográfica de OTUs representativas.....	99
5.2 Búsqueda de organismos acumuladores de PHB y/o triglicéridos.....	101
5.2.1 Determinación de las condiciones de cultivo celular.....	101
5.2.2 Búsqueda y selección de organismos productores de polímeros	103
5.2.3 Caracterización molecular parcial de los aislamientos seleccionados	104
5.2.4 Evaluación de la capacidad de acumular PHAs de los aislamientos seleccionados	106
6 CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS.....	110
6.1 Conclusiones	110
6.2 Perspectivas	113
BIBLIOGRAFIA.....	115
ANEXO I	133
Anexo II	154

Figuras

Figura 1.1. Extensión de hielo marino (promedio 1979-2007) en la Antártida.....	8
Figura 1.2. Regiones biogeográficas terrestres.....	10
Figura 1.3 Mapa de la Isla rey Jorge donde se muestran la topografía, las áreas libres de hielo y las cubiertas por glaciares.....	11
Figura 1.4. Imágenes de cortes transversales de dos matas microbianasestratificadas.....	15
Figura 1.5. Estructura general de los PHAs. R_1 y R_2 son radicales alquilo (C_1 . C_{13}).....	27
Figura 1.6. Esquema de las cuatro clases de poliéster sintasas.....	28
Figura 1.7. Esquema de las cuatro clases de poliéster sintasas.....	29
Figura 3. 1 Imagen satelital de los sitios de muestreo.....	38
Figura 4. 1 Fotografía de dos de los sitios de colecta.....	55
Figura 4. 2 ADN genómico ambiental. Fotografía del perfil electroforético en gel de agarosa 1% teñido con bromuro de etidio.....	57
Figura 4. 3 Perfiles electroforéticos de plásmidos purificados a partir de las bibliotecas de cianobacterias.....	58
Figura 4. 4 Perfiles electroforéticos de plásmidos purificados a partir de las bibliotecas de eubacterias.....	59
Figura 4. 5 Perfiles electroforéticos de plásmidos purificados a partir de las bibliotecas de arqueas.....	60
Figura 4. 4 Histograma que muestra la distribución de OTUs calculadas con una distancia máxima de 3% en los distintos sitios	64
Figura 4. 5 Dendograma construido con <i>MOTHUR</i> , representando la similitud entre las distintas bibliotecas de Cianobacterias.....	64
Figura 4. 6 Dendograma construido con <i>mothur</i> , representando la similitud entre las distintas bibliotecas de eubacterias	65
Figura 4. 9 Curvas de rarefacción obtenidas con el programa <i>mothur</i>	66
Figura 4. 10 Gráficos que muestran los índices de diversidad calculados con el programa <i>mothur</i> para cada biblioteca.....	68
Figura 4. 11 Gráfico de barras que muestra la abundancia relativa de los distintos taxones, de acuerdo con la clasificación realizada con RDP, de las bibliotecas de eubacterias.....	69
Figura 4. 12 Gráfico de barras que muestra la abundancia relativa de los distintos taxones en la clasificación realizada con RDP de las bibliotecas de cianobacterias.....	70
Figura 4. 13 Gráfico de barras que muestra la abundancia relativa de los distintos taxones en la clasificación realizada con GG-NCBI de las bibliotecas de eubacterias.....	72
Figura 4. 14 Gráfico de barras que muestra la abundancia relativa de los distintos taxones en la clasificación realizada con GG-NCBI de las bibliotecas de cianobacterias.....	74

Figura 4.15 Mapa de la distribución geográfica de las secuencias con una identidad mayor o igual 99% con las OTUs representativas de las bibliotecas de eubacterias	77
Figura 4.16 Mapa de la distribución geográfica de las secuencias con una identidad mayor o igual 99% con las OTUs representativas de las bibliotecas de Cianobacterias	78
Figura 4.17 Curvas de crecimiento de los aislamientos cultivados a 25°C, obtenidos a partir de cada muestra.....	80
Figura 4. 18 Resultado del ensayo empleando Rojo Nilo para la detección de la acumulación de PHB y/o triacilglicéridos.....	81
Figura 4. 19 Ensayos de cromatografía de capa fina de cada aislamiento positivo con Rojo Nilo.....	82
Figura 4. 20 Fotografía de los aislamientos seleccionados en este trabajo.....	83
Figura 4. 21 ADN genómico de los aislamientos seleccionados.....	84
Figura 4. 22 Productos de PCR de la PhaC sintasa de clase II.....	85
Figura 4. 23 Perfiles obtenidos en el rep-PCR para los cuatro aislamientos seleccionados.....	87
Figura 4. 24 Histograma que muestra el número de secuencias por OTU.....	89

Tablas

Tabla 1.1. Nombres de los taxones publicados por la IJSEM/ IJSB o validados en las Listas de Validación de la publicación hasta noviembre del 2003.	18
Tabla 1.2 Clasificación de las Cianobacterias de acuerdo a los sistemas bacteriológico (Manual Bergey's de Sistemática Bacteriológica) y botánico (Komárek and Anagnostidis; Hoffmann, Komárek and Kaštovský).....	19
Tabla 1.3 Descripción de los grupos taxonómicos de bacterias descritos en trabajos realizados en la Isla Rey Jorge.....	34
Tabla 3. 1 Descripción de los oligonucleótidos empleados para amplificar secuencias el gen 16S ARNr de eubacterias, cianobacterias y arqueas.....	41
Tabla 3. 2 Descripción de los pares de oligonucleótidos empleados y la temperatura de <i>annealing</i> empleada para amplificar y secuenciar el gen 16S ARNr de eubacterias, cianobacterias y arqueas.....	41
Tabla 3. 3 Oligonucleótidos empleados para amplificar regiones de los genes que codifican para las polihidroxicanoato sintetas clase I y II.....	51
Tabla 4.1. Descripción de las características fisicoquímicas de las muestras y su localización geográfica.....	56
Tabla 4. 1 Detalle de las bibliotecas de amplicones de 16S ARNr construidas en este trabajo.....	57
Tabla 4. 2 Resumen de los valores de los índices de diversidad calculados con el programa <i>mothur</i> para cada biblioteca.....	62
Tabla 4. 3 Resumen de los valores de abundancia de los distintos grupos taxonómicos presentes en las cuatro bibliotecas de eubacterias analizadas con el <i>Classifier</i> de RDP.....	63
Tabla 4. 4 Resumen de los valores de abundancia de los distintos grupos taxonómicos presentes en las cuatro bibliotecas de cianobacterias analizadas con <i>Classifier</i> de RDP.....	67
Tabla 4. 6 Abundancia relativa de los distintos grupos taxonómicos presentes en las cuatro bibliotecas de Cianobacterias analizadas con <i>Classify</i> de RDP y <i>Classifier</i> de G-G.....	75
Tabla 4. 7 Abundancia relativa de los distintos grupos taxonómicos presentes en las cuatro bibliotecas de eubacterias analizadas con <i>Classify</i> de RDP y <i>Classifier</i> de G-G.....	76
Tabla 4. 8 Identificación de los 4 aislamientos seleccionados mediante la comparación del gen 16S ARNr con el banco de secuencias del RDP (http://rdp.cme.msu.edu/).....	85
Tabla 4. 9 Productos de PCR obtenidos con los distintos juegos de cebadores utilizados en esta etapa.....	87
Tabla 4.10 Resultados de los ensayos en lote expresados en biomasa (g/l), concentración (g/l de PHB) y contenido en PHB (% en relación al peso seco) de los 4 aislamientos seleccionados en este trabajo.....	88

1 INTRODUCCION

Los microorganismos cumplen roles claves en la biosfera; son colonizadores primarios en hábitats nuevos, participan como productores primarios (biomasa y energía) en las tramas tróficas y reciclan macro y micro nutrientes esenciales. Modifican el ambiente y modelan las características físicas y químicas del mismo (Vincent, 2000).

La dominancia y el éxito de los microorganismos en las regiones polares son bien conocidos, en particular en lagos y estanques donde forman tapetes o matas microbianas bentónicas dominadas por Cianobacterias (Vincent, 2000). Aún así, la diversidad de algunas especies y la distribución geográfica de muchas comunidades de microorganismos polares aún no han sido examinadas completamente (Taton *et al.*, 2006a).

Los ambientes fríos perennes se clasifican como “extremos” y se caracterizan por temperaturas por debajo de los 5°C. Entre ellos se pueden mencionar las regiones polares, glaciares y las regiones elevadas como los Alpes. En estos ambientes, las bajas temperaturas se acompañan por ciclos de congelamiento y fusión de nieve, fluctuaciones extremas en la irradiancia (incluyendo radiación UV) y variaciones extremas en la disponibilidad de nutrientes y salinidad (Torsvik & Øvreås, 2008).

Como resultado de estas restricciones, los ambientes polares y alpinos presentan ecosistemas relativamente sencillos, con una notable reducción en la complejidad de las tramas tróficas, en comparación con latitudes más templadas (Wall & Virginia, 1999). En estos ecosistemas la vegetación es escasa, dispersa y sin árboles. Según algunos autores tampoco habría anélidos, moluscos e insectos alados (Davis, 1981).

Otra característica de los ambientes extremos es la escasa redundancia funcional de la microbiota del suelo. Es decir, solo unas pocas poblaciones de individuos (eventualmente pertenecientes a distintos taxones) se encontrarían presentes para llevar a cabo una determinada función (p.ej. fijación de N₂).

La redundancia funcional es característica de ambientes no extremos, en los cuales existen condiciones ambientales relativamente estables y en los que una perturbación moderada causa un bajo impacto en los procesos globales de la comunidad -como la mineralización o respiración- aunque sí puede modificar profundamente la estructura de la misma (Torsvik & Øvreås, 2008).

Las comunidades de ambientes extremos (consorcios microbianos), es más característica la presencia de algunas especies numéricamente dominantes, siendo por ende, más sensibles en su respuesta a cambios en el ambiente (Torsvik & Øvreås, 2008).

En este trabajo analizamos la diversidad microbiana presente en cuatro consorcios microbianos de la Isla Rey Jorge, Antártida marítima. Analizamos la diversidad del gen 16S ARNr de eubacterias, Cianobacterias y arqueas en cada una de las muestras analizadas y realizamos la búsqueda de organismos cultivables con la capacidad de acumular polihidroxicanoatos como mecanismo de resistencia al estrés ambiental.

La introducción de este trabajo fue organizada en cinco grandes secciones, con el objetivo de contextualizar la temática abordada e incluir antecedentes de estudios similares a tener en cuenta a la hora de interpretar los resultados.

1.1 Ambientes extremos: Antártida

No hay consenso general en como definir un ambiente “extremo”. Desde un punto de vista antropocéntrico, las condiciones fisicoquímicas que mantienen la vida de los mamíferos son vistas como “normales” y cualquier otra que se desvíe de estas es considerada “extrema”. Sin embargo, lo que es “normal” y “extremo” para los microorganismos es un tema actualmente en debate, ya que los mismos se encuentran presentes virtualmente en todos los tipos de suelo y hábitats (Torsvik & Øvreås, 2008).

Una definición más objetiva de los ambientes “extremos” se basa en el hecho de que existen condiciones físicas y químicas específicas que pueden limitar los procesos celulares. Los procesos celulares dependen en gran medida de las biomoléculas y las reacciones bioquímicas. De acuerdo con esta visión, las condiciones “extremas” son consideradas aquellas cercanas a los límites del funcionamiento celular, lo cual implica el limitar las actividades de enzimas o dañar biomoléculas. Dentro de los factores fisicoquímicos podemos mencionar, entre otros, la disponibilidad de agua y nutrientes, la temperatura, el pH, la salinidad y la radiación (Rothschild & Mancinelli 2001; Marion *et al.*, 2003).

Los ambientes “extremos” son muy variables y abarcan desiertos, suelos congelados (*permafrost*) en los polos, pantanos, suelos geotermales en áreas volcánicas, hasta minas ácidas con altas concentraciones de ácido sulfúrico o ambientes con alcalinidades extremas o concentraciones de sales elevadas. De todas las formas de vida que conocemos, los microorganismos son el grupo de organismos con la más alta capacidad para adaptarse a este tipo de ambientes “extremos” y “estresantes” (Torsvik & Øvreås, 2008).

En la Antártida, las comunidades microbianas dominadas por cianobacterias son el componente dominante en términos de biomasa, controlando además la mayor parte de los flujos de carbono, nutrientes y energía (Wynn-Williams, 1996; Mueller *et al.*, 2005).

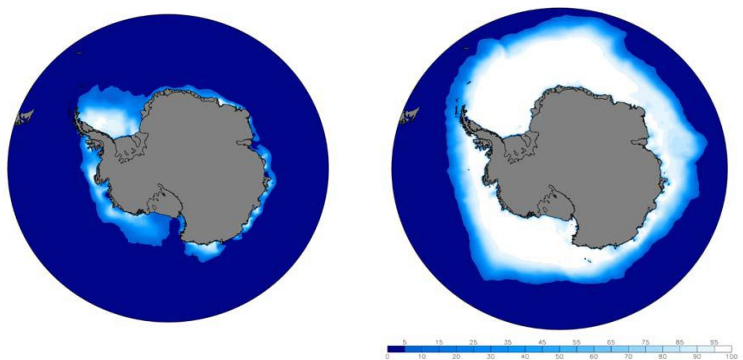


Figura 1.1. Extensión de hielo marino (promedio 1979-2007) en la Antártida. A) Febrero; B) Septiembre. Adaptado de: NSIDC (http://nsidc.org/cgi-bin/bist/bist.pl?config=seaice_index).

El continente antártico ofrece además, una oportunidad única para estudiar algunos aspectos de la evolución microbiana. Esta vasta región del planeta ha estado aislada del resto del mundo desde su separación del continente Gondwana y la formación del frente polar, hace más de diez millones de años (Vincent, 2000).

Actualmente, sólo el 2% de los 14 millones de km² de territorio permanece sin cobertura de hielo. La capa de hielo de aproximadamente 30 × 10⁶ km³, varía su extensión durante el año y almacena el 70% del agua dulce del planeta (Figura 1.1).

La Antártida puede dividirse en tres zonas topológicas; Antártida Oriental (región Este) con un área de aproximadamente 10.35 × 10⁶ km², Antártida Occidental (región W) de 1.97 × 10⁶ km² y la Península Antártica de 0.52 × 10⁶ km² (Ainley *et al.*, 2009).

Asimismo, el territorio se puede dividir en tres grandes regiones bioclimáticas principales: la Antártida continental, que comprende la mayor parte del continente; la región subantártica, limitada al conjunto de islas del Atlántico e Índico (Georgia del Sur, Kergelen y Macquarie); y la Antártida marítima, que abarca la porción septentrional de la Península Antártica y los archipiélagos de las Shetland del Sur, Orcadas del Sur y Sandwich del Sur (Figura 1.2). A mayores latitudes, las diferencias básicas entre las tres regiones (continental, marítima y subantártica) más destacables son: disminución del número de especies vegetales, disminución de temperaturas medias anuales, de precipitaciones y de los regímenes de vientos (Serrano-Cañadas, 2001).

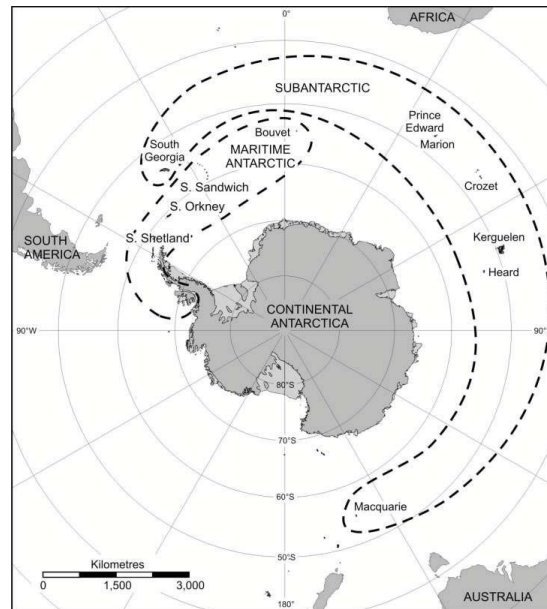


Figura 1.2. Regiones biogeográficas terrestres. *Adaptado de: Arbetter et al 2009.*

La Antártida marítima es marcadamente estacional, con una influencia marítima fuerte durante el verano, cuando se reduce la cantidad de hielo marino (Figura 1.1). La diversidad faunística y florística es muy restringida en comparación con latitudes menores, siendo mayor la distribución de la biota en las áreas sin cobertura de hielo permanente (Vogt & Braun, 2004).

En estos ecosistemas, generalmente costeros, crecen musgos, plantas briofitas (no vasculares), líquenes y matas (o tapetes) microbianas dominadas por cianobacterias (Pickard & Seppelt, 1984; Blümel & Eitel, 1989). Este tipo de paisaje generalmente se atribuye al régimen de temperaturas anuales, el aislamiento geográfico y el período disponible de colonización relativamente corto (Convey & Smith, 2005).

1.2 Isla Rey Jorge

La Península Antártica, ubicada al noroeste del continente, es una de las regiones del planeta que experimentan un rápido cambio climático. En esta región, las temperaturas medias anuales han aumentado en 1,5°C en el período de 1950-2000, en comparación con un aumento global de la temperatura de ca. 0,6K. El tercer Informe del IPCC de 2001 (Folland *et al.*, 2001) confirmó que estas tres áreas (continental, marítima y subantártica) se han calentado rápidamente durante el período 1976-2000.

Las islas Shetland del Sur se encuentran ubicadas al norte de la Península Antártica y 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).

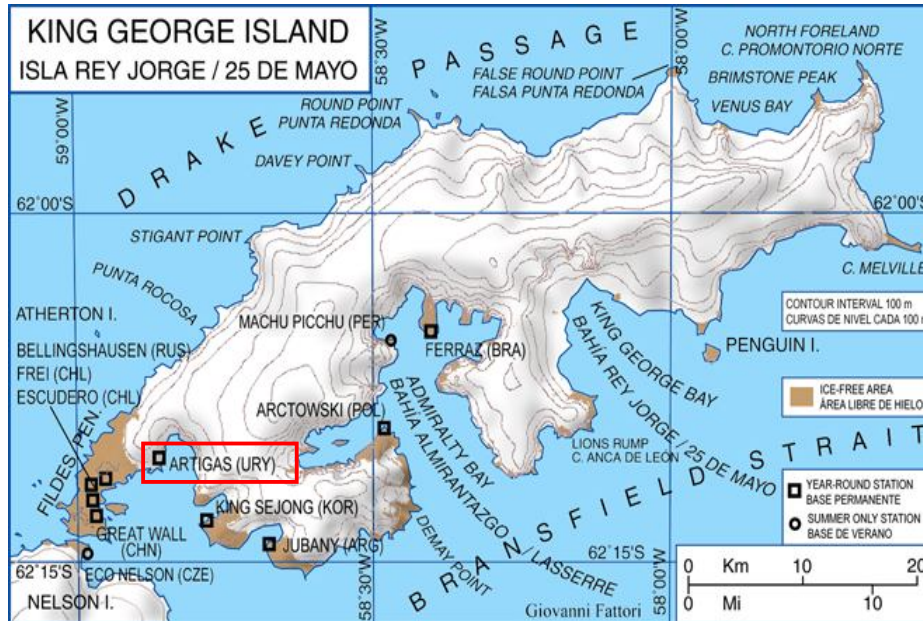


Figura 1.3 Mapa de la Isla rey Jorge donde se muestran la topografía, las áreas libres de hielo (■) y las cubiertas por glaciares (□). También puede observarse la localización de las distintas bases científicas de distintos países. La Base Científica Antártica Artigas perteneciente a Uruguay, se encuentra destacada en rojo (■). Adaptado de: www.wikipedia.org

La Isla Rey Jorge ($61^{\circ} 54'$ - $62^{\circ} 16'S$ y $57^{\circ} 35'$ - $59^{\circ} 02'W$) 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.

También denominada Isla 25 de Mayo por la República Argentina, la Isla Rey Jorge ocupa un área de 1250 km^2 . El 90% de su superficie se encuentra cubierto por una gran capa de hielo permanente que puede llegar hasta 700 m de altitud (Vogt & Braun, 2004). El 10% de la superficie restante no posee cobertura permanente de hielo, (Figura 1.3), formando estrechos pasajes costeros que separan los glaciares del mar (Vogt & 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. Esta península se encuentra cubierta por nieve durante casi todo el año, excepto dos o tres meses durante el verano (Vogt & 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.

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 de estanques, cañadas y lagos. En éstos, generalmente se desarrollan matas microbianas bentónicas o epilíticas dominadas por cianobacterias, líquenes y musgos (Vinocur & Pizarro, 2000).

La retracción de los glaciares y 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 influyen la composición de las comunidades costeras en el fondo del mar (Rakusa-Suszczewski *et al.*, 1993).

1.3 Matas o tapetes microbianos

El término de mata microbiana se emplea para describir de forma general a una gran variedad de comunidades microbianas que van desde aquellos biofilms compuestos mayoritariamente por cianobacterias que se forman en algunas corrientes de agua, hasta los complejos ecosistemas multiestratificados observados en los *bañados salinos* y estuarios (Vissher & Stoltz, 2005).

Estos tapetes son comunidades densas de microorganismos, a veces estratificados verticalmente y otras sin una organización evidente a la vista, 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).

Desde una perspectiva ecológica, las matas microbianas son ecosistemas en sí mismos. A pesar de que su extensión geográfica es extremadamente pequeña (en el orden de metros de extensión), contienen los grupos tróficos esenciales (productores primarios, consumidores y descomponedores). Los integrantes de la comunidad poseen propiedades metabólicas específicas, y conviven interactuando entre sí y con el ambiente (Vissher & Stoltz, 2005).

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).

Estos *microambientes* generan una plétora de microhábitats que resultan en una estructura de la comunidad muy heterogénea en términos espaciales y temporales. Por este motivo, las matas son ecosistemas muy

dinámicos que contienen una gran diversidad de especies y un amplio rango de procesos metabólicos que se llevan a cabo en espacios físicamente muy próximos. Estos procesos generalmente resultan en reacciones acopladas (por ej. reducción y oxidación de un elemento como C, S, N, etc., o alternativamente la oxidación o reducción en varios pasos de un compuesto), que sostienen ciclos biogeoquímicos robustos (Vissher & Stoltz, 2005).

La morfología, estructura y coloración 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 reconocida al visualizar el tapete de forma transversal, por la presencia de franjas o zonas horizontales de distinto color debido a la pigmentación de los distintos microorganismos fotótrofos (Vincent *et al.*, 1993).

La matriz de estos tapetes o matas (Figura 1.4) 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. 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 que contribuyen en 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 los predadores (van Gemerden, 1993).

El proceso de fotosíntesis realizado por las Cianobacterias, eubacterias fotosintéticas y algas ubicadas en la superficie de la mata constituye 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 suministran 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).

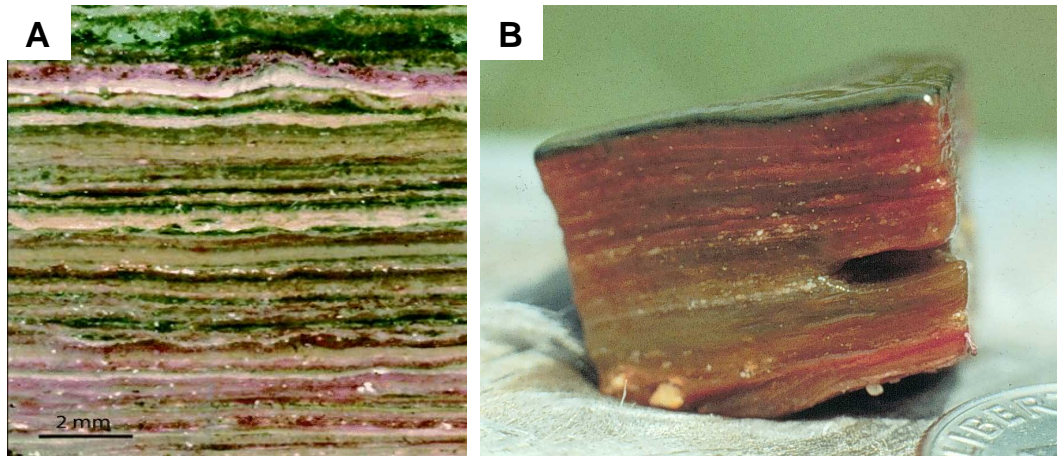


Figura 1.4 Imágenes de cortes transversales de dos matas microbianas estratificadas A) Mata hipersalina estratificada de Guerrero Negro, Baja California. Los complejos gradientes químicos sostienen una espectacular diversidad de vida microbiana en estas matas de 6-10 cm de grosor. *Adaptado de: Cover photograph American Society for Microbiology (2007) 73:(9): Foto de John R. Spear and Norman R. Pace.* B) Mata microbiana del *Octopus Springs del* Parque Nacional de Yellowstone. La capa verde superior se compone de la cianobacteria *Synechococcus* y en las capas inferiores *Chloroflexus*. *Adaptado de: Biello 2007. Foto: de David Ward.*

La visión clásica de las matas microbianas estratificadas verticalmente ha sido revisada. Se ha propuesto que los distintos microorganismos se encuentran en una estrecha asociación con la capa de cianobacterias. Por ejemplo, se han descrito poblaciones de bacterias sulfatoreductoras y metanogénicas en la superficie de algunas matas marinas (Vissher & Stoltz, 2005).

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 de los organismos de la comunidad (Guerrero *et al.*, 2002).

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 incluyendo las regiones polares (Jungblut *et al.*, 2005, Mueller *et al.*, 2005, Taton *et al.*, 2006a,b).

En la Antártida, las matas se desarrollan de forma bentónica en lagos y estanques y en un tipo particular de hábitat, denominado en conjunto como “pantanos polares” o *wetlands*. Los “pantanos polares” comprenden a todos los tipos de hábitat en los cuales el agua se encuentra en estado líquido (períodos de semanas hasta unos pocos meses) durante el verano. Los componentes principales de los pantanos polares son Cianobacterias, particularmente del género *Oscillatoriales* (Tang *et al.*, 1997) junto con un amplio espectro de algas eucariotas (Elster, 2002). Los tipos de pantanos más abundantes son los suelos minerales y ornitogénicos, *seepages* y pantanos someros lóticos y lénticos (Sabaca, 2006).

Una vez establecidas, las matas son ecosistemas tan eficientes en el ciclado de elementos que requieren prácticamente sólo luz para subsistir. Pueden ser vistas como sistemas semicerrados, resultando más o menos fácil crear balances de masas y modelos de ciclados de nutrientes.

1.4 Sistemática de las cianobacterias

Las cianobacterias originalmente fueron clasificadas como *algas verde azules* (Cyanophyta). Luego del descubrimiento de su naturaleza procariota en la década del setenta, el nombre de *cianobacteria* fue más aceptado (Adams y Duggan, 1999).

Desde el año 1979 este grupo de organismos se encuentra sujeto a dos sistemas de clasificación: el del Código Botánico del *International Code of Botanical Nomenclature* (Cyanophyta, algas verde azules) y el Código Bacteriológico del *International Committee on Systematic Bacteriology* (Oren, 2004).

La sistemática de las cianobacterias es aún tema de discusión entre Botánicos (Cyanophyta) y Bacteriólogos (Cianobacterias), principalmente por la confusión y el desorden que podría generarse al asignar nuevos nombres a taxones ya existentes y reconocibles morfológicamente (Oren, 2004).

1.4.1 Clasificación según criterios bacteriológicos

La clasificación bacteriológica se basa en la información genética y filogenética de las cianobacterias que han podido ser aisladas en cultivos puros (cepas axénicas). Actualmente, el phylum Cyanobacteria incluye a los fotótrofos oxigénicos, a los prochlorales que contienen ambos tipos de clorofila (prochlorophyta) y a las cianobacterias (Wacklin, 2006).

Las cianobacterias fueron agrupadas en cuatro sub-secciones, las cuales a su vez fueron divididas en subgrupos y géneros. Aún en la actualidad, las sub-secciones y los géneros se definen principalmente en base a criterios morfológicos. Esto se debe a la carencia de suficientes aislamientos caracterizados genética y fenotípicamente (Wacklin, 2006).

Asimismo, en el año 2002, Cavalier-Smith propuso que la “División *Cyanobacteria*” -una de las ocho *Divisiones* propuestas para los procariotas-

estaría compuesta por dos subdivisiones, tres clases y seis ordenes (Tabla 1.1) (Oren, 2004).

División	Subdivisión	Clase	Orden
Cianobacteria	Gloeobacteria	Oxiphotobacteria ⁽⁺⁾	Chroococcales
		Chroobacteria	Gloeobacterales
	Phycobacteria	Gloeobacteria	Nostocales
		Hormogoneae	Oscillatoriales
			Pleurocapsales
			Prochlorales ^(*)
		Stigonematales	

Tabla 1.1. Nombres de los taxones publicados por la IJSEM/ IJSB o validados en las Listas de Validación de la publicación hasta noviembre del 2003. Todos han sido propuestos por Cavalier-Smith en 2002, excepto los que están marcados, (+) Murray 1984, 1988, (*)Florenzano *et al.*, 1986. *Adaptado de: Oren, 2004*

1.4.2 Clasificación según criterios botánicos

De acuerdo con la clasificación morfológica tradicional, este grupo de organismos procariontes fue dividido en cinco subsecciones. Las subsecciones I (Chroococcales) y II (Pleurocapsales) contienen cianobacterias cocoides unicelulares. Las células de la sub-sección I se dividen por fisión binaria, mientras que las de la subsección II también son capaces de dividirse por fisión múltiple, produciendo células reproductivas pequeñas y fácilmente dispersables llamadas *baecitos* (Tomitani *et al.*, 2006).

Las cianobacterias de las subsecciones III al V forman filamentos que varían en su complejidad morfológica. La subsección III (Oscillatoriales) incluye a los filamentos compuestos exclusivamente por células vegetativas, mientras que en las subsecciones IV (Nostocales) y V (Stigonematales), algunas células vegetativas pueden diferenciarse en heterocistos o acinetos, células morfológica y ultraestructuralmente distintas. Además, las cianobacterias de la subsección V puede presentar patrones de ramificación complejos (Tomitani *et al.*, 2006).

La revisión de la clasificación según el código botánico realizada por Komárek en 1985 agrupó a las cianobacterias (cianoprocarotas) en cuatro órdenes - Nostocales, Stigonematales, Chroococcales y Oscillatoriales- que fueron divididos en familias, subfamilias, géneros y especies (Tabla 1.2) (Wacklin, 2006). Este sistema de clasificación se basa principalmente en la identificación de las especies directamente en las muestras naturales colectadas sin previo aislamiento, lo cual ha sido usualmente empleado como herramienta para el estudio de la diversidad de cianobacterias por los Ecólogos (Wacklin, 2006).

Clasificación según el Manual Bergey's de Sistemática Bacteriológica (Boone & Castenholz 2001)	Clasificación según Komárek y Anagnostidis (Anagnostidis y Komárek 1985; Komárek y Anagnostidis 1988, 1999, 2005)	Clasificación según Hoffman, Komárek y Kaštovský (2005)
<p>Subsección I: Unicelulares o colonias, división por fisión binaria en 1 o 3 planos o por gemación</p> <p>Subsección II: Unicelulares o colonias, división por fisión múltiple o en combinación con fisión binaria</p>	<p>Chroococcales: Unicelular o colonias</p>	<p>Gloeobacterales: Cocoides, sin tilacoides</p> <p>Synechococcales²: Organizaciones de tilacoides paralelas a la superficie celular, unicelulares o colonias</p> <p>Chroococcales: Organización radial de los tilacoides, unicelulares o colonias</p>
<p>Subsección III: Filamentos sin heterocistos</p>	<p>Oscillatoriales: Filamentos sin heterocistos</p>	<p>Oscillatoriales¹: Organización radial de los tilacoides, filamentos grandes</p> <p>Pseudoanabaenales²: Organizaciones de tilacoides paralelas a la superficie celular, filamentos delgados</p>
<p>Subsección IV: Filamentos con heterocistos, no ramificados</p>	<p>Nostocales: Filamentos con heterocistos, acinetos, ramificaciones falsas</p>	<p>Nostocales: Cianobacterias filamentosas con heterocistos</p>
<p>Subsección V: Filamentos con heterocistos, ramificados</p>	<p>Stigonematales: Filamentos con heterocistos, acinetos, ramificaciones verdaderas</p>	

Tabla 1.2 Clasificación de las Cianobacterias de acuerdo a los sistemas bacteriológico (Manual Bergey's de Sistemática Bacteriológica) y botánico (Komárek and Anagnostidis; Hoffmann, Komárek and Kaštovský). *Adaptado de: Wacklin, 2006*

Sin embargo, en las últimas dos décadas se ha intentado adoptar un criterio único para la clasificación de estos organismos, respetando la nomenclatura de los Códigos Botánico y Bacteriológico (Komârek, 1990).

1.5 Secuenciación y análisis de amplicones del gen 16S ARNr

1.5.1 Ecología Microbiana Molecular: gen ARNr de 16S

La Ecología Microbiana Molecular comenzó en la década de los 90 con la amplificación y secuenciación del gen *ARNr* de 16S directamente del ambiente. Esta metodología revolucionó la Ecología Microbiana y cambió nuestra forma de estudiar a los procariotas en el ambiente.

La idea de utilizar los genes ribosomales como reloj molecular para descifrar las relaciones filogenéticas entre microorganismos fue propuesta por Carl Woese (Woese, 1987; Woese & Fox, 1977). Estos genes codifican para las distintas subunidades de los ribosomas, por lo que se encuentran presentes en todo los procariotas, su secuencia posee regiones conservadas y otras variables a través de la evolución y se transfieren de forma vertical (Madigan & Martinko, 2006). Estas características fueron la base para definir los tres Dominios de la vida.

En los procariotas el gen *ARNr de 16S* codifica para la subunidad menor de los ribosomas (30S) y se ha convertido en la *regla de oro* para la filogenia bacteriana y la ecología microbiana (Case *et al.*, 2007). Este gen tiene aproximadamente 1500 pb y puede dividirse en cuatro dominios estructurales (I-IV) y nueve regiones hipervariables (V1-V9) (Madigan & Martinko, 2006).

En estudios de diversidad microbiana ambiental, básicamente se amplifica dicho gen a partir del ADN ambiental, mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y luego los amplicones son separados mediante distintas técnicas (clonado y DGGE, entre otros) y finalmente secuenciados. Para realizar la PCR se utilizan cebadores específicos para un determinado

grupo taxonómico o cebadores universales para procariontes en general. Finalmente, el análisis de secuencia se realiza empleando regiones específicas del gen que contengan regiones hipervariables.

Actualmente existe un consenso acerca de cuales regiones hipervariables son las más adecuadas para analizar la diversidad microbiana presente en determinado ambiente. Se ha propuesto que las regiones V1, V2, V3 y V4 serían las más adecuadas para realizar la clasificación taxonómica de las secuencias, mientras que la región V6 sería más apropiada para realizar análisis de diversidad (OTUs) debido a su alta variabilidad (Claesson *et al.*, 2009).

Durante todas las etapas que comprende este tipo de abordaje se introducen sesgos que pueden “distorsionar” la diversidad presente en el ambiente, conocer esto es importante a la hora de interpretar los resultados. En lo que respecta a la técnica de PCR particularmente podemos mencionar: la formación de secuencias quiméricas, los heterodúplex y la amplificación preferencial de cierto grupo taxonómico (cuando se emplean cebadores universales) (Baker, 2003).

Junto con este tipo de abordaje también se han desarrollado nuevas técnicas de secuenciación de ADN (por ejemplo pirosecuenciación) así como la capacidad de almacenar secuencias en repositorios de datos. La cantidad de secuencias depositadas en dichos bancos de datos ha crecido de forma exponencial desde los primeros trabajos publicados en 1985 (Pace *et al.*, 1985) al presente. Este avance no sólo se refleja en la cantidad de secuencias depositadas, sino también en la ampliación de nuevos marcadores filogenéticos a algunos genes funcionales (Schloss *et al.*, 2009).

Actualmente, existen varios bancos de datos de secuencias del gen ARNr de 16S. Estos “depósitos” de secuencias están asociados con programas informáticos para el análisis *online* de las mismas. El número de secuencias almacenadas a la fecha se encuentra en el orden de los cientos de miles de secuencias (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>). Cada repositorio se basa en distintos esquemas o sistemas taxonómicos. Dentro de estos sistemas podemos

destacar el Manual *Bergey's* (Brenner *et al.*, 2005), utilizado en el NCBI y la clasificación realizada por Hugenholtz (Hugenholtz, 2002) y Pace (Pace, 1997).

Los repositorios de secuencias más prominentes son el *Ribosomal Database Project II* (RDP II) (<http://rdp.cme.msu.edu/>) (Cole *et al.*, 2007), el *Greengenes* (<http://greengenes.lbl.gov>) (deSantis *et al.*, 2007) y *ARB-SILVA* (Pruesse *et al.*, 2007).

El RDP II se basa en el sistema taxonómico del Manual *Bergey's*, el cual contiene un número relativamente bajo de phylums (Divisiones). El *Greengenes* incluye distintos esquemas o criterios de agrupamientos taxonómicos, permitiendo comparar los resultados de las secuencias analizadas con los distintos esquemas. El repositorio de *ARB-SILVA* también ofrece la posibilidad de clasificar las secuencias examinadas con distintos esquemas taxonómicos, aunque es menos flexible que el *Greengenes* y posee en su mayoría secuencias de organismos marinos (Petrosino *et al.*, 2009).

Estas bases de datos *online* poseen además una serie de herramientas informáticas para la clasificación y el alineamiento de múltiples secuencias, facilitando la identificación de los microorganismos presentes en una muestra. Por ejemplo, poseen programas de alineamiento múltiple de secuencias y editores de secuencias. *Greengenes* brinda la posibilidad de trabajar en una *mesada virtual*, que permite la identificación de microorganismos en base al análisis de secuencias 16S, empleando distintos métodos y herramientas de alineamiento. Este repositorio emplea la herramienta de alineamiento NAST (deSantis *et al.*, 2002) y genera un archivo de salida con los resultados, compatible con otras herramientas informáticas de libre acceso como el ARB.

Algunos de estos bancos de secuencias, como el RDP II, poseen además clasificadores de secuencias que emplean originalmente un *set* de secuencias curadas o corregidas. Los clasificadores *SeqMatch* y *Classifier* se basan en cálculos de estadística bayesiana y han demostrado una exactitud superior a la del programa *Basic Local Alignment Search Tool (BLAST)* para encontrar las secuencias de ARNr más similares (Cole *et al.*, 2005).

En diciembre de 2009 se publicó un trabajo que presentó a la comunidad científica de microbiólogos ambientales la plataforma informática *mothur* (Schloss *et al.*, 2009). Esta plataforma integra los programas implementados en otras herramientas informáticas desarrolladas previamente. Dentro de estas, podemos mencionar el *pipeline* de RDP (Cole *et al.*, 2009), los programas de alineamiento de secuencias *NAST* (deSantis *et al.*, 2006), *RDP* (Cole *et al.*, 2009), el programa *DNADIST* que permite construir matrices de distancia (Felsenstein *et al.*, 1989), los programas para comparar comunidades *Libshuff* (Singleton *et al.*, 2001) y *Unifrac* (Lozupone *et al.*, 2005) y la versión anterior de esta plataforma, el programa *DOTUR* (Schloss & Handelsman, 2005), que permite el asignar OTUs a las secuencias y calcular estimadores de diversidad. Además se le incorporaron 25 *estimadores* para estimar la diversidad alfa y beta, herramientas de visualización como los diagramas de Venn, mapas de temperatura (*heat maps*) y dendogramas, entre otros (Schloss *et al.*, 2009).

En su conjunto, estas herramientas nos han dado acceso a la diversidad microbiana en su “estado natural” y a su vez nos han mostrado cuán poco conocemos acerca de la vasta diversidad de microorganismos que colonizan y transforman nuestro planeta Tierra. De hecho, aún continúan vigentes muchas preguntas fundamentales. Por ejemplo, ¿Cuántas especies microbianas hay en la Tierra? ¿Cuántas vías metabólicas hay en el mundo microbiano? ¿Cuál es la relación entre la diversidad microbiana y la actividad microbiana en el ambiente? Las respuestas a estas preguntas requieren un abordaje interdisciplinario, en el cual las herramientas bioinformáticas juegan un papel fundamental.

1.5.2 *Estimadores de diversidad*

El análisis de una comunidad en general involucra la estimación de su diversidad, esto se calcula estadísticamente a partir de las abundancias relativas de las especies que componen la misma.

Es por esto que la estimación de la diversidad en las comunidades bacterianas es actualmente uno de los retos y objetivos más ampliamente perseguidos en la Ecología Microbiana. Sin embargo, estimar la diversidad entraña dos problemas: que el tamaño de muestra que sea representativo de la comunidad y elegir el estimador de diversidad más adecuado (Escalante, A.E. 2007).

La relación entre el número de OTUs (OTU= especie, filotipo, etc) y el esfuerzo de muestro (por ejemplo, cantidad de secuencias) nos da información acerca de la diversidad que ha sido muestrada. Esto puede visualizarse contruyendo una curva de colección o una curva de rarefacción. Las curvas de rarefacción permiten comparar la diversidad observada entre sitios, tratamientos o hábitats que no han sido muestreados equitativamente. En ambos casos las curvas revelan la calidad del muestreo, la idea es que a partir de cierto valor del esfuerzo de muestreo, la curva se acercará a una asíntota y la diversidad del sistema se habrá alcanzado (Escalante, A.E. 2007).

En la mayoría de las comunidades microbianas muestradas no se alcanza la asíntota, esto es debido a la alta diversidad presente en las comunidades microbianas y a la falta de técnicas que permitan un mayor esfuerzo de muestreo. Aunque, con las técnicas de secuenciación masiva como a pirosecuenciación, se han logrado avances importantes en el mismo.

Si bien sería interesante conocer la diversidad real en la comunidad, la mayoría de las preguntas pueden contestarse, aún con las limitaciones descritas anteriormente. Por ejemplo es posible comparar distintas comunidades o estudiar cambios provocados por alteraciones bióticas o abióticas. Otra forma de evaluar la calidad del muestro en estudios de Microbiología Molecular es la Cobertura que se define como, $C = [1 - (n/N) \times 100]$, donde n es el número de OTUs y N es el número de secuencias.

Por otra parte, se encuentran los estimadores de riqueza, que pueden ser de extrapolación de curvas de acumulación, paramétricos o no paramétricos. En el caso de los microorganismos es difícil emplear estimadores paramétricos debido a que estos suponen una distribución de los datos (por

ejemplo, Poisson o lognormal) y a pesar de que muchas comunidades de macroorganismos parecen tener una distribución lognormal de abundancia de especies, aún existe controversia sobre el modelo que se ajusta mejor (Escalante, A.E. 2007).

Los estimadores no paramétricos emplean la riqueza (número de especies, OTUs, filotpos, etc.) y la abundancia relativa de esta (equitatividad o *evenness*), ponderando según el estimador las especies abundantes en relación con las especies raras. Dentro de esta categoría de estimadores se encuentran los de Simpson y Chao1.

Chao1 estima la riqueza total de especies como:

$$S_{\text{Chao1}} = S_{\text{obs}} + (n_1^2/2n_2)$$

En donde S_{Chao1} es la riqueza total de especies, S_{obs} es el número de especies observadas, n_1 es el número de especies observadas una vez y n_2 es el número de especies observadas dos veces. Chao (1984) hace notar que este índice es particularmente útil para series de datos que tengan poca abundancia en sus clases, como es el caso de los microbios (Hughes *et al.*, 2001).

Otra forma de comparar la diversidad entre distintas comunidades microbianas comúnmente empleada es a través de la estimación del índice de Shannon-Weaver (1949) que toma en cuenta dos aspectos de la diversidad, la riqueza de las especies y la uniformidad de la distribución del número de individuos de cada especie. Este índice (H) se define según la siguiente ecuación:

$$\hat{H} = -\sum p_i \ln p_i$$

Donde:

\hat{H} = diversidad estimada

$p_i = n_i/N$ proporción de individuos en la *i-ésima especie*

Aunque, este estimador se encuentra cada vez más en desuso.

1.6 Acumulación de Polihidroxialcanoatos (PHAs) como mecanismo de resistencia al estrés ambiental

Los microorganismos han desarrollado una variedad de mecanismos de resistencia para sobrevivir en condiciones “estresantes”. Esto se refleja en la amplia gama de metabolismos descritos hasta la fecha. Por ejemplo, muchos microorganismos tienen la capacidad de permanecer en estadios de latencia por largos períodos, lo que les permite sobrevivir a la desecación (Madigan & Martinko, 2002; Berlanga & Guerrero, 2007).

La acumulación de polímeros intracelulares de reserva es una estrategia que les permite aumentar la sobrevivencia en un ambiente cambiante. Los PHAs pueden ser definidos como reservorios endógenos de carbono y energía, los cuales pueden ser usados en los períodos de estrés y limitación de nutrientes (Kadouri *et al.*, 2003, Berlanga *et al.*, 2006, Wang *et al.*, 2009). Se ha demostrado que en las bacterias *Legionella pneumophila* y *Wautersia eutropha* H16 (*Cupriavidus necator*, *Ralstonia eutropha*, *Alcaligenes eutrophus*), el contenido intracelular de PHB se correlaciona con el tiempo de sobrevivencia en condiciones de limitación de nutrientes. La búsqueda de organismos con esta capacidad en matas microbianas ya ha sido explorada, probablemente debido a que las matas son una excelente fuente de microorganismos adaptados a condiciones fluctuantes y en algunas ocasiones enfrentando una limitación de nutrientes por períodos prolongados (Berlanga *et al.*, 2006)

Los PHAs son miembros de una familia de poliésteres que incluyen un amplio rango de D-hidroxialcanoatos como monómeros, de los cuales el poli-3-hidroxibutirato (PHB) es el más conocido (Figura 1.5). El PHB fue el primer PHA descrito en 1926 por Lemoigne en *Bacillus megaterium*. Se han publicado varios trabajos demostrando la producción de PHAs en una amplia variedad de procariotas. Sólo los procariotas son capaces de acumular PHAs de alto peso molecular en forma de gránulos citoplasmáticos (Shang & Chang, 2003).

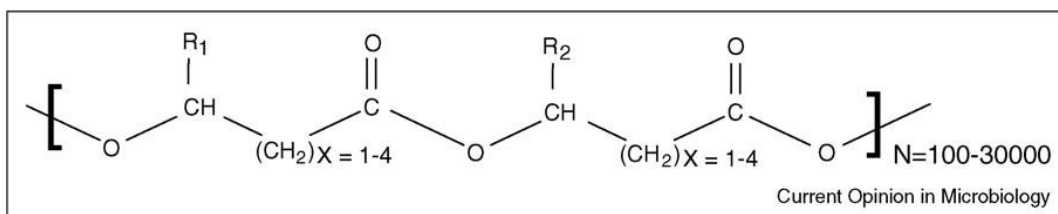


Figura 1.5. Estructura general de los PHAs. R_1 y R_2 son radicales alquilo (C_1 - C_{13}).
Adaptado de: Keshavarz & Roy, 2010

Los gránulos se encuentran recubiertos de una monocapa de fosfolípidos y proteínas que participan en la síntesis y degradación del PHA y en la formación del gránulo (Pötter & Steinbüchel, 2005). Se han descrito una gran variedad de bacterias Gram⁺ y Gram⁻ (aproximadamente unas 300 especies incluyendo los géneros *Pseudomonas* sp., *Bacillus* sp. y *Methylobacterium* sp) con la capacidad sintetizar PHAs (Keshavarz & Roy, 2010).

El PHA se acumula cuando la fuente carbonada se encuentra en exceso y otro nutriente esencial para el crecimiento (por ej. N, S, PO_4^{3-} , Fe^{2+} , Mg^{2+} , K^+ u O_2) es limitante. La polimerización de intermediarios solubles en moléculas insolubles de PHA no modifica la presión osmótica de la célula. Las bacterias productoras de PHAs poseen la ventaja de poseer un material de reserva a un costo de mantenimiento relativamente bajo y con un retorno en energía asegurado (Madison & Huisman 1999).

La vía de síntesis clásica de PHB abarca la condensación de dos moléculas de acetil-CoA para formar acetoacetil-CoA participando la enzima tiolasa (gen *phaA*). Este compuesto subsecuentemente se reduce a 3-hidroxiacetyl-CoA mediante una reductasa (gen *phaB*) y la polimerización a PHB la cataliza la enzima sintasa (gen *phaC*) (Madison & Huisman, 1999).

Las PHA sintasas (PhaC) son las enzimas claves en la producción de los gránulos de polímero. Estas enzimas se clasifican en cuatro clases de acuerdo a su secuencia, especificidad de sustrato y composición de subunidades (Rhem, 2003).

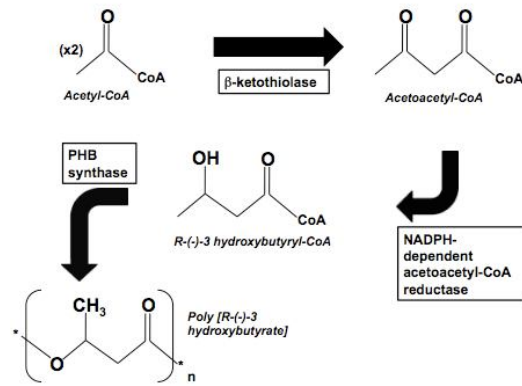


Figura 1.6. Vía de síntesis de PHB en *R. eutropha*. Adaptado de: Reemer, 2009

Las PHA sintasas de clase I y II son enzimas formadas por un solo tipo de subunidad (PhaC). En ensayos *in vitro* dirigidos a estudiar la especificidad por el sustrato, se logró establecer que las PHA sintasas de clase I (por ejemplo, *Ralstonia eutropha* también conocida como *Wautersia eutropha* o *Cupriavidus necator*), reconocen preferentemente *(R)*-3-hidroxiácidos con cadenas entre 3 y 5 carbonos, mientras que las sintasas de clase II (por ejemplo, *Pseudomonas aeruginosa*), incorporan *(R)*-3-hidroxiácidos con cadenas entre 6 a 14 carbonos.

Las PHA sintasas de clase III (*Allochromatium vinosum*) y IV (*Bacillus megaterium*), se componen de dos subunidades: i) la subunidad PhaC que exhibe un 21-28% de similitud con las PhaC de clase I y II y ii) la subunidad PhaE en el caso de las sintasas de clase III o la PhaR, en el caso de las sintasas de clase IV (Rhem *et al.*, 2003).

Clase	Subunidades	Especie	Substrato
I	PhaC ~60-73 kDa	<i>Cupriavidus necator</i>	3HA _{SCL} -CoA (~C3-C5) 4HA _{SCL} -CoA, 5HA _{SCL} -CoA, 3MA _{SCL} -CoA
II	PhaC ~60-65 kDa	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	3HA _{MCL} -CoA (~C5)
III	PhaC PhaE ~40 kDa ~40 kDa	<i>Allochromatium vinosum</i>	3HA _{SCL} -CoA (3HA _{MCL} -CoA [-C6-C8], 4HA-CoA, 5HA-CoA)
IV	PhaC PhaR ~40 kDa ~22 kDa	<i>Bacillus megaterium</i>	3HA _{SCL} -CoA

Figura 1.7. Esquema de las cuatro clases de poliéster sintasas. *Adaptado de:* Rhem, 2003.

Este tipo de biopolímeros ha atraído la atención de los investigadores tecnológicos debido a sus propiedades biodegradables, termoplásticas y de biocompatibilidad. Estos materiales pueden ser usados comercialmente, especialmente en el área de la biomedicina (Chen & Wu, 2005). Los PHAs son biodegradables, muy versátiles y en algunos aspectos tienen propiedades físicas similares a las de los plásticos convencionales. Si bien en los últimos años se han desarrollado otro tipo de polímeros como los plásticos derivados del almidón o sintetizados químicamente como los ácidos poliglicólico y poliláctico, éstos no poseen la versatilidad de estructuras y las propiedades de los PHAs (Steinbüchel & Lutke-Eversloh, 2003).

1.7 Antecedentes

Con respecto a la diversidad de Cianobacterias, los taxones de distintos géneros de nostocales y oscillatoriales sin heterocistos (*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 (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; de los Ríos *et al.*, 2004, Casamatta *et al.*, 2005; Jungblut *et al.*, 2005). En estos estudios también se describe 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 psicofilia de la mayoría de las cianobacterias antárticas (Nadeau *et al.*, 2001; Taton *et al.*, 2003).

Por otra parte, la microbiología de suelos ha identificado una gran diversidad de especies de microorganismos en estudios dependientes e independientes de cultivo. Estos estudios han indicado que la mayoría de las bacterias antárticas pertenecen a un número restringido de taxones cosmopolitas, generalmente aeróbicos (Friedman, 1993). Se ha descrito un gran número de bacterias relacionadas con bacterias corineformes tales como *Arthrobacter*, *Brevibacterium*, *Cellulomonas* y *Corynebacterium*. También se han descrito aislamientos de bacterias Gram⁻ (gracilicutes) como *Pseudomonas* y *Flavobacterias*. Dentro de los firmicutes descritos se pueden mencionar organismos de los géneros: *Bacillus*, *Micrococcus*, *Nocardia* y *Streptomyces*. También se han descrito géneros menos comunes como *Beijerinckia*, constituido por bacterias que ocasionalmente se encuentra en suelos tropicales, *Xanthomonas*, un género de organismos patógenos asociados con plantas superiores y *Planococcus*, un género de organismos marinos (Vyermann *et al.*, 2010).

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 *et al.*, 2006a).

En la Antártida marítima se han realizado algunos estudios taxonómicos de matas microbianas en la Península Antártica (Vincour & Pizarro, 1995) y en la Isla Rey Jorge (Vincour & Pizarro, 2000). Dichos estudios mostraron una composición más rica en especies que en la Antártida continental.

Por otro lado, en la Isla Livingston (Península de Byers), se caracterizó la estructura y fisiología de tres comunidades microbianas (matas) provenientes de tres hábitats distintos (arroyo, estanque y suelo) (Fernández-Valiente *et al.*, 2007). Asimismo, podemos mencionar el estudio de diversidad microbiana realizado en sedimentos de la Isla Ardley, mediante técnicas independientes de cultivo (Li *et al.*, 2006).

En el trabajo de Li y cols. (2006) analizan la diversidad de bacterias en sedimentos de un lago en la isla Ardley empleando DGGE y secuenciación. Los autores encontraron que la mayoría de las bacterias pertenecieron a la subdivisión α , β y γ Proteobacteria, Cytophaga-Flavobacteria-Bacteroides, Gemmatimonadetes, Firmicutes, Actinobacteria y algunas secuencias no clasificadas.

En el trabajo realizado en la Isla de Livingston mencionado anteriormente, se estableció mediante la observación microscópica que las cianobacterias filamentosas pertenecientes al orden Oscillatoriales y más precisamente a los géneros *Leptolyngbya*, *Phormidium* y *Nostoc*, fueron dominantes en las muestras 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).

Además, en este trabajo establecieron que en la Península de Byers, las matas sostienen poblaciones de invertebrados asociados a éstas, incluyendo varias especies de *Nematoda*, *Tardigrada*, *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).

Más recientemente, se han realizado estudios de diversidad microbiana empleando secuenciación masiva en la Península Antártica. Entre ellos se destacan los trabajos de Yergueau y col. (2007a, b) y Teixeira y col. (2010), que analizaron la diversidad microbiana asociada a las rizosfera de las dos especies de plantas vasculares presentes en la Península Antártica.

En el trabajo de Yergueau y cols (2007) estudian la abundancia de las bacterias en distintos sueltos de la Península antártica empleando PCR en tiempo real y DGGE. Los autores encuentran una correlación inversa entre la latitud y el número de taxones, asimismo sugieren un efecto positivo de la presencia de vegetación, sobre la comunidad microbiana.

En el trabajo publicado por Teixeira y cols. (2010), se estudió la microbiología de rizósfera de dos especies de plantas en la bahía Almirantazgo, en la isla Rey Jorge. Los autores encontraron que el 92% de las secuencias pertenecieron a nueve phyla, generalmente presentes en suelos sin importar la latitud (Proteobacteria, Actinobacteria, Acidobacteria, Chloroflexi, Verrucomicrobia, Bacteroidetes, Planctomycetes, Gemmatimonadetes and Firmicutes). Aunque, los Firmicutes fueron los más abundantes en todos los sitios analizados. En la Tabla 1.2 se describen los distintos grupos taxonómicos (*phyla*) descritos en los trabajos más relevantes citados en esta sección.

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 las características morfológicas y ecológicas de las cianobacterias presentes en

las comunidades microbianas, incluyendo las matas microbianas bentónicas (Komárek, 1999 a,b, Komárek, 2007).

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 (Komárek, 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. & Komárek, 1999).

Recientemente, se han realizado estudios de diversidad de microorganismos heterótrofos en suelos cercanos 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 PCR-DGGE se identificaron α , β , γ y δ -Proteobacterias, flavobacterias, 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).

Más recientemente se estudió la diversidad del gen 16S ARNr de bacterias empleando PCR-DGGE en sedimentos de lagos y cañadas de la Península Fildes (Pin *et al.*, 2010) y por pirosecuenciación en la rizósfera de *Deschampsia antarctica* en la bahía de Almirantazgo (Texeira *et al.*, 2010). También se estudió la diversidad del gen 16S ARNr de Cianobacterias mediante ARDRA de matas microbianas de la península de Fildes (Callejas *et al.*, 2010). En el trabajo de Pin (Pin *et al.*, 2010) se menciona la dominancia de géneros como *Bacteroidetes*, *Proteobacteria*, *Acidobacteria*,

Gemmatimonadetes, *Nitrospira*, *Firmicutes*, *Actinobacteria*, *Chloroflexi*, *Cyanobacteria*, *Spirochaetes*, *Deinococcus-Thermus*, descritos anteriormente.

Grupo taxonómico	Li <i>et al.</i> , 2006	Xiao <i>et al.</i> , 2006	Yergueu <i>et al.</i> , 2007	Texeira <i>et al.</i> , 2010	Pin <i>et al.</i> , 2010
Acidobacteria	-	-	+	+	+
Actinobacteria	+	+	+	+	+
Bacteriodes	+	-	+	+	+
Cianobacteria	-	-	+	-	+
Cloroflexi	-	-	-	+	+
Deinococcus	-	-	-	-	+
Espiroquetas	-	-	-	-	+
Firmicutes	+	-	+	+	+
Gemmatimonadetes	+	-	+	+	+
Nitrospira	-	-	-	-	+
Planctomices	-	-	+	+	-
Proteobacteria	+	+	+	+	+
sin clasificar	-	-	+	+	+
Verrucomicrobia	-	-	+	+	-
Nº sitios	1	9	8	10	9
Muestras	1 sedimento de lago	9 sitios, suelos contaminados, agua dulce	4 sitios suelo con vegetación y s/vegetación	3 sitios por triplicado suelo con vegetación	9 sitios sedimentos, suelo, agua dulce.
N secuencias	34	99	2111	27000	299
Database	DDBJ	NCBI	RDP	RDP	RDP
Indice de Shannon (H)	1,2-2,2	**	**	5	2,8-3,0
Correlaciones		**	correlacion latitud	**	correlacion pH
Metodología	DGGE/clonado	DGGE/clonado	clonado	pirosecuenciación	clonado

Tabla 1.3 Descripción de los grupos taxonómicos de bacterias descritos en trabajos realizados en la Isla Rey Jorge. También se detallan otros aspectos de cada trabajo como la cantidad de secuencias, el tipo de metodología empleada y valores del índice de Shannon.

En base a la bibliografía consultada este trabajo sería el primero en estudiar molecularmente la diversidad de Bacterias (con especial atención en

las Cianobacterias) y arqueas presentes en este tipo de microecosistemas (tapetes) de la Isla Rey Jorge.

En lo que respecta a antecedentes de trabajos orientados a aislar microorganismos productores de PHB del ambiente, encontramos trabajos realizados en matas presentes en el Delta de Ebro en España (Berlanga *et al.*, 2006) y en muestras de origen marino, provenientes del sur de India (Arun *et al.*, 2008).

Por otra parte, la búsqueda de compuestos producidos por microorganismos aislados a partir de matas microbianas antárticas, es un tema de estudio reciente (Rojas *et al.*, 2009). En un ambiente como la Antártida, la producción de antibióticos y toxinas, así como la capacidad de acumular reservas de energía (en forma de PHAs) podría conferir ventajas competitivas para la sobrevivencia. Asimismo, la acumulación de pigmentos proporcionaría protección contra la radiación UV.

En cambio, no encontramos antecedentes de trabajos que tengan como objetivo la búsqueda de organismos productores de PHB en matas microbianas antárticas. Aunque, sí se ha aislado una *Pseudomonas* capaz de acumular PHB proveniente de muestras de suelo de la Península Antártica (Ayub *et al.*, 2004; López *et al.*, 2009).

Nuestro grupo de trabajo se dedica al estudio de la producción de PHB por microorganismos desde hace varios años. Esta línea de investigación se dirigió principalmente a analizar la capacidad de acumular PHB en un organismo endófito de caña de azúcar denominado *Herbaspirillum seopedicae*, cepa Z69 (Catalán *et al.*, 2007). Durante este tiempo, el grupo ha acumulado conocimiento acerca del tema y desde el año 2008 decidimos ampliar la búsqueda de este tipo de organismos en ambientes naturales extremos como la Antártida.

2 HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

2.1 HIPÓTESIS

- i) Es posible estudiar la composición de los tapetes microbianos que se desarrollan anualmente en la Isla Rey Jorge empleando un protocolo de independiente del cultivo, que incluye el análisis de secuencias del gen 16S ARNr, obtenidas a partir de bibliotecas de amplicones.

- ii) ii) Las condiciones ambientales “adversas” de la Isla Rey Jorge promueven la expresión de vías metabólicas que permiten la “sobre-vivencia” de los organismos a condiciones ambientales de limitación de nutrientes, estrés oxidativo, luz UV, etc. En virtud de ello, presumimos que la acumulación de polihidroxialanoatos (PHAs), como mecanismo de reserva de fuente de carbono y poder reductor, es expresada por varios microorganismos antárticos.

2.2 OBJETIVOS

2.2.1 General

Analizar a nivel molecular la diversidad e identidad de microorganismos procariotas terrestres y seleccionar organismos cultivables capaces de acumular biopolímeros, en tapetes en tres sitios de la Isla Rey Jorge, Antártida marítima.

2.2.2 Específicos

- i) Conocer la identidad de los microorganismos incluyendo bacterias especialmente las Cianobacterias y arqueas que integran las comunidades microbianas terrestres presentes en cuatro sitios de Península de Fildes, Isla Rey Jorge.
- ii) Determinar la capacidad de acumular PHAs en cepas de organismos heterótrofos, aislados a partir de de los cuatro sitios analizados en el objetivo i).

3 MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 Colecta de muestras

Durante el año 2008 se colectaron cuatro muestras de tres sitios cercanos a la Caleta Gradzinski sobre del Mar de Drake, en la Península de Fildes (Figura 3.1). Las muestras 15 y 16 fueron colectadas durante el mes de abril y las muestras 7 y 8 fueron colectadas en el mes de diciembre. Esta zona se caracteriza por la influencia costera oceánica y por la formación estival de cañadas y otras corrientes de agua dulce, provenientes del deshielo del glaciar Collins. Estas corrientes de agua descargan su caudal hacia la costa. En esta zona también es característica la presencia de aves tales como petreles, pingüinos y escúas, así como distintas especies de lobos y elefantes marinos.

El muestreo se realizó evitando las zonas en donde fueran evidentes signos de actividad de origen antropogénico (zona cercana a la Base, lago Uruguay). Las distintas muestras (aproximadamente 10g) fueron colectadas en tubos Falcon® estériles y mantenidas en hielo durante su transporte hacia el laboratorio de la Unidad de Microbiología Molecular (IIBCE) en Montevideo, en donde fueron mantenidas a -20°C hasta su procesamiento.

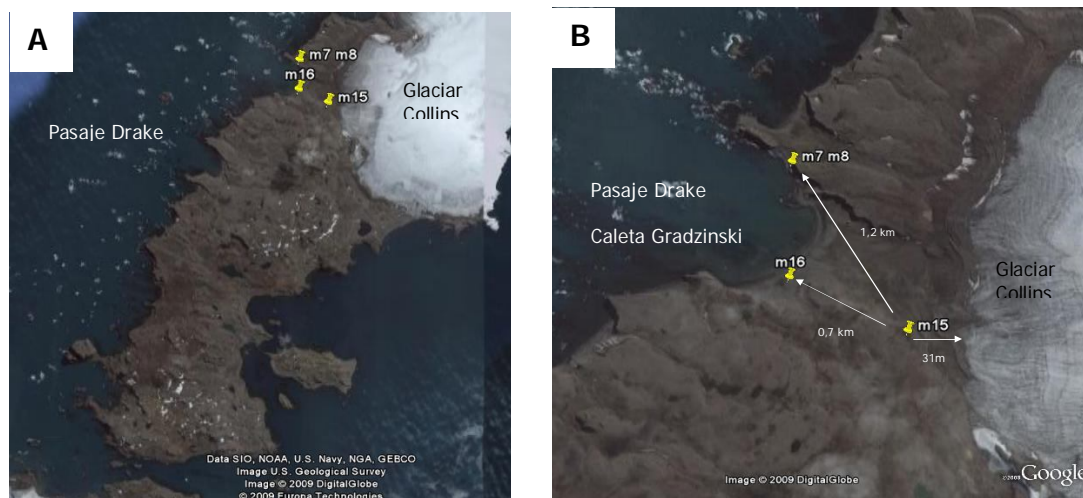


Figura 3.1 Imagen satelital de los sitios de muestreo. A) Península de Fildes con la ubicación de las muestras colectadas para este trabajo (m7, m8, m15 y m16) y de la Base Artigas B) Imagen ampliada de la región donde se colectaron las muestras: m16, m7 y m8 cercanas a la Caleta Gadzinski; m15 cercana al Glaciar Collins. Fuente: Google Earth <http://earth.google.es/>

Las cuatro muestras analizadas corresponden a cuatro matas microbianas de terrenos inundados por corrientes de agua de deshielo. Para coleccionar las matas se utilizó una espátula previamente esterilizada con la cual se “despegó” la mata del suelo, al cual se encontraba adherido. Todas las matas se encontraban cubiertas por corrientes de agua poco profundas, estaban bien desarrolladas (aproximadamente 0,5 cm de espesor), se extendían en superficies de algunos metros cuadrados y presentaban un color rojizo en su superficie.

Asimismo, se constató la presencia dominante de cianobacterias filamentosas en cada una, a través de la observación en microscopio óptico (1000x). Sin embargo, la identificación taxonómica de las especies dominantes en cada muestra no fue realizada mediante esta metodología. En la muestra 8 también se visualizaron diatomeas.

En el momento de la colecta de cada muestra se registró la posición geográfica de la misma, empleando el sistema de posicionamiento global (GPS). También se determinó *in situ* el pH, la temperatura y conductancia del agua. Posteriormente, se analizó el contenido de C y N totales. Para ello, parte de las muestras fueron secadas por 48 hrs a 60°C, luego fueron molidas en un mortero de porcelana y finalmente fumigadas con vapores de HCl (com. pers. MS Germán Pérez). La determinación de los isótopos estables de ^{13}C y ^{15}N fue realizada por espectrometría de Masa en Flujo Continuo en el Centro de Aplicaciones de Tecnología Nuclear en Agricultura Sostenible (CATNAS), ubicado en la Facultad de Agronomía de la UDELAR, Uruguay.

3.2 Extracción de ADN y construcción de bibliotecas de amplicones del gen ARNr de 16S

Se extrajo el ADN genómico ambiental de cada muestra según un protocolo previamente descrito por Griffiths (2000). La purificación se basa en la lisis mecánica-química de las células con esferas de zirconio y un detergente iónico (CTAB), seguido de una extracción con una mezcla fenol:cloroformo:alcohol isoamílico (24:25:1) y una precipitación del ADN con una solución acuosa de polietilenglicol en frío (ver protocolo en Anexo I, A1.1). Los ácidos nucleicos se resuspendieron en agua miliQ® y las soluciones resultantes se conservaron a 4°C.

A partir de cada extracto de ADN purificado se amplificó el gen 16S ARNr de arqueas y eubacterias y una región específica del mismo gen de Cianobacterias. Para esto se emplearon oligonucleótidos específicos para cada taxón (Tabla 3.1).

Las reacciones de PCR se realizaron en 20µl totales (2,0µl de Buffer de reacción 10x, 0,8µl de MgCl₂ 50 mM, 0,4µl de dNTPs 10 mM, 0,5µl de solución de oligonucleótido forward 20 µM, 0,5µl oligonucleótido reverso 20 µM, 0,1µl de Taq polimerasa 5 U/µl, 14,7µl de agua y 1µl de ADN molde). Todas las reacciones de PCR fueron realizadas en un termociclador Perkin-Elmer 2400. Para amplificar el gen de eubacterias se usó el siguiente programa: un ciclo inicial de desnaturalización de 5 min a 94°C; luego 25 ciclos de 1 min a 94°C, 1 min a 58°C y 1:30 min a 72°C y, finalmente, una etapa de extensión final de 10 min a 72°C. En el caso de arqueas y Cianobacterias, se empleó el mismo programa variando la temperatura de *annealing*, que fue de 56°C y 55°C, respectivamente (Tabla 3.2). 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.

Nombre	Grupo	Secuencia	Referencia
4fa	Arqueas	5´TCCGGTTGATCCTGCCRG3´	(Lane, 1991)
27f	Eubacterias/ Cianobacterias	5´AGAGTTTGATCCTGGCTCAG3´	(Lane, 1991)
781ra	Cianobacterias	5´GACTACTGGGGTATCTAATCCCATT3´	(Nübel <i>et al.</i> , 1997)
1492r	Eubacterias/ Arqueas	5´GGTTACCTTGTTACGACTT3´	(Lane, 1991)
1525r	Bacterias	5´AAGGAGGTGATCCAGCGGCA3´	(Lane, 1991)
M13 univ	***	5´GACGTTGTAAAACGACGGCCAGT3´	(Messing, 1983)

Tabla 3. 1 Descripción de los oligonucleótidos empleados para amplificar secuencias el gen 16S ARNr de eubacterias, Cianobacterias y arqueas.

Para construir cada biblioteca se mezclaron los volúmenes de al menos tres reacciones de amplificación independientes. La mezcla fue sometida a una electroforesis en gel de agarosa 1%. El producto de amplificación de tamaño esperado se purificó a partir de fragmentos de gel con el *DNA Extraction Kit #K0513* (*Fermentas Life Science estado, país*) según las indicaciones del fabricante (ver Anexo I, A1.2).

Taxón	Oligonucleótidos	Tannealing (°C)
Eubacterias	27f-1492/1525	58
Cianobacterias	27f-781ra	55
Arqueas	4fa-1492	56

Tabla 3. 2 Descripción de los pares de oligonucleótidos empleados y la temperatura de *annealing* empleada para amplificar y secuenciar el gen 16S ARNr de eubacterias, Cianobacterias y arqueas.

Luego, el ADN obtenido fue incorporado en una reacción de clonado con el vector pCR[®] 2.1-TOPO, según las instrucciones incluidas en el kit TOPO TA Cloning (Invitrogen CA, USA). La mezcla de reacción se usó para transformar células de *Escherichia coli* químicamente competentes (TOP10 *E. coli*, Invitrogen) (ver Anexo I, A1.3). La suspensión de células transformadas se

transfirió a placas conteniendo medio LB sólido (10g Bacto-triptona, 5g Extracto de levadura, 10g NaCl, H₂O c.s.p 1L, agar 15g) con ampicilina 50 µg/ml y X-gal 20 µg/ml.

La cepa de *E. coli* TOP10 contiene en el cromosoma parte del gen *lacZ*, mutación denominada *lacZ*ΔM15. La inserción de un fragmento de ADN en el sitio de clonado del vector, que contiene el gen *lacZ*α, no permite que, por α-complementación, se exprese actividad β-galactosidasa al ser transferido a la bacteria hospedero. De este modo, se seleccionaron las colonias blancas Amp^r, las cuales fueron transferidas con palillos estériles a nuevas placas de petri conteniendo medio LB sólido con ampicilina 50 µg/ml.

Las células fueron repicadas en el medio sólido de forma tal de poder ser transferidas nuevamente con un sistema mecánico de transferencia de colonias (replicador multiansa) de 48 sitios (*replica plate*). Las placas fueron incubadas a 37°C durante toda la noche. Con un replicador multiansa se transfirió cada una de las bibliotecas a placas de microtitulación estériles de 96 pocillos, conteniendo 100µl de medio LB líquido con ampicilina 50 µg/ml. Las placas, cubiertas con autoadhesivo estéril, se incubaron durante toda la noche a 37°C. Al día siguiente se agregó 50µl de glicerol 50% a cada pocillo e inmediatamente se guardaron a -80°C como respaldo por períodos prolongados.

Se construyeron un total de 12 bibliotecas de aproximadamente 150 clones cada una. Para cada una de las 4 muestras se construyó una biblioteca del gen 16S ARNr de eubacterias, Cianobacterias y arqueas.

Luego, purificamos el ADN plasmídico de cada clon mediante la técnica de *miniprep* alcalina en placas de 96 pocillos (ver Anexo I. 1.4). Una vez obtenidos los plásmidos purificados, se secuenciaron los insertos.

3.3 Secuenciación

Las bibliotecas enviadas desde Montevideo se transfirieron a placas con medio LB sólido y ampicilina 50 µg/ml hasta el Departamento de Bioquímica y Biología Molecular de la Universidad federal de Paraná, Curitiba, Brasil. Luego se preparó una copia de reserva en caldo TB (Anexo I, A1.10) con ampicilina 50 µg/ml y glicerol a una concentración final de 25%. Estas suspensiones se guardaron a -20°C y se purificaron los plásmidos a partir de todos los clones de cada una de las bibliotecas (18 placas de microtitulación ELISA) (Figuras 4.3., 4.5 y 4.5).

La secuenciación se realizó en el Departamento de Bioquímica y Biología Molecular de la Universidad federal de Paraná, Curitiba, Brasil. Se secuenciaron placas de 96 pocillos, utilizando el método de Sanger (Sanger *et al.*, 1997) (ver Anexo I. 1.5 y 1.6). Se emplearon dideoxinucleótidos fluorescentes, separación en electroforesis capilar y detección láser de los fluoróforos en un equipo de secuenciación automático MegaBASE 1000 (Amersham Life Science/Molecular Dynamics). Los clones se secuenciaron parcialmente desde el extremo 5' del gen 16S ARNr, empleando los cebadores 27f para Cianobacterias y eubacterias y el M13 universal para las bibliotecas de arqueas.

3.4 Análisis bioinformático

El análisis bioinformático de las secuencias obtenidas se realizó parcialmente en el servidor genopar@dartagnan.genopar.org, perteneciente al laboratorio de Bioquímica de la Universidad Federal de Paraná y se culminó en la Unidad de Microbiología Molecular del IIBCE. Para los análisis utilizamos secuencias de con una longitud de aproximadamente 400pb que comprenden las regiones hipervariables V1 y V2.

3.4.1 Análisis de calidad de las secuencias

Los electroferogramas obtenidos fueron analizados con el software PHRED (Ewing *et al.*, 1998), eliminándose aquellos erróneos, así como los de baja calidad. Los extremos de cada electroferograma con baja calidad de señal (*no base calling*) y las secuencias correspondientes al vector (pCR2.1, Invitrogen) también fueron removidas. De este modo, se obtuvieron archivos *multifasta* de cada biblioteca.

3.4.2 Clasificación de las secuencias

Cada archivo *multifasta* fue analizado con las herramientas informáticas disponibles para el sitio web de genes de 16S ARNr de *Green Genes* (<http://greengenes.lbl.gov/cgi-bin/nph-index.cgi>) (Desantis *et al.* 2006).

Primero se alinearon las secuencias empleando el programa NAST (*Near Alignment Space Terminador*). Este programa compara las secuencias incógnitas con la base de datos del *Green Genes*, buscando alinear k-meros de la secuencia incógnita con la base de datos. Para la alinear las secuencias dentro de cada biblioteca utilizamos los siguientes parámetros: una cantidad de 50 secuencias alineadas en cada ciclo (NAST *Batch of sequences*: 50), una longitud de secuencia mínima de 300pb (*Seq Length*: 300) y un porcentaje de identidad mínimo de 75% entre secuencias (*Min % identity*: 75). Luego se eliminaron las potenciales secuencias químéricas dentro de cada biblioteca, empleando el programa *Bellerophon3*, disponible en *Green Genes* (Desantis *et al.* 2006).

Con el objetivo de identificar a nivel taxonómico las secuencias obtenidas en cada biblioteca, se empleó la herramienta *Classify*, disponible en la herramienta *Green Genes*. Esta aplicación permite clasificar las secuencias dentro de cada biblioteca, empleando distintas bases de datos (RDP, NCBI, Hugghenhotz).

3.4.3 Análisis basados en Unidades Taxonómicas Operacionales (OTUs)

Cada biblioteca se analizó con el programa *mothur* (Schloss *et al.* 2004). Básicamente, se alinearon las secuencias de cada archivo *multifasta* con la herramienta *Align* de *Green Genes* (Desantis *et al.* 2006). Luego, se editó cada archivo alineado con el software Bioedit v7.0.0 (Hall, 1999) y se construyeron las matrices de distancia correspondientes, empleando el método *DNA dist* de *Phylip* (Felsenstein, 1989, 1993).

A partir de estas matrices de distancia se ejecutaron los comandos necesarios (ver Anexo I, A1.7) para construir las curvas de rarefacción y calcular el número de OTUs en cada biblioteca y los estimadores de diversidad de Shannon, Chao y Simpson y obtener secuencias de OTUs representativas. Para calcular el porcentaje de Cobertura en cada biblioteca se empleó la siguiente ecuación $C = [1-(n/N) \times 100]$, donde n es el número de OTUs y N es el número de secuencias.

3.4.4 Análisis de distribución geográfica de las OTUs representativas

Para este análisis se utilizó un archivo multifasta conteniendo todas las secuencias de eubacterias por un lado (286 secuencias de aproximadamente 400pb) y otro con todas las secuencias de cianobacterias (235 secuencias de aproximadamente 400pb) por otro. Empleando dichos archivos y la herramienta *get outrep* de *mothur* se construyó otro archivo conteniendo las secuencias de las OTUs representativas dentro de cada archivo multifasta. Para establecer el número de OTUs se escogió un 1% de distancia p entre las secuencias como línea de corte.

Una vez que obtenidos los dos archivos conteniendo las secuencias de las OTUs representativas, fueron identificadas taxonómicamente una por una, empleando el programa BLAST disponible en el NCBI (http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?PROGRAM=blastn&BLAST_PROGRAM_S=мегаBlast&PAGE_TYPE=BlastSearch&SHOW_DEFAULTS=on&LINK_LOC

[=blasthome](#)). Luego, se seleccionaron aquellas secuencias que exhibieron una identidad igual o mayor al 99% con otra secuencia del gen ARNr de 16S depositada en el NCBI. Esto se realizó para las secuencias de eubacterias y de cianobacterias.

Finalmente, empleando el programa Google Earth v5.1 (Google Inc. 2009) se construyeron dos mapas en los cuales se localizaron los orígenes geográficos de aquellas OTUs representativas que exhibieron una identidad igual o mayor al 99% con otra secuencia del gen ARNr de 16S depositada en el NCBI. Esto se realizó para las secuencias de eubacterias y de cianobacterias.

3.5 Búsqueda de heterótrofos productores de PHB

Las mismas muestras ambientales que se utilizaron para analizar la diversidad molecular microbiana (mediante métodos independientes del cultivo), fueron utilizadas para obtener una colección de bacterias heterótrofas, capaces de crecer a 25°C. Una vez obtenida la colección de aislamientos, se determinaron los perfiles de crecimiento de cada uno mediante medidas de DO₆₂₀.

3.5.1 Aislamiento de heterótrofos

Se agregó aproximadamente 1g de cada muestra colectada (m7, m8, m15 y m16) a 1ml aproximadamente de *buffer* fosfato salino (PBS) (*buffer* fosfato de potasio 10 mM, NaCl 190 mM, pH 7,4). Las suspensiones fueron agitadas con *vortex* y luego se aplicaron alícuotas de 200µl sobre placas de petri con medio rico LB-agar. Estas alícuotas se distribuyeron sobre el medio con un “rastrillo” de vidrio estéril.

Las placas se incubaron a 25°C por 48 hrs hasta la visualización de crecimiento sobre las mismas. Las colonias con distinta morfología se transfirieron a nuevas placas con medio LB mediante “estriado” con ansa. De

esta forma, los aislamientos fueron transferidos a placas frescas por lo menos cinco veces antes de ser seleccionados como cultivos axénicos, para su posterior estudio. Los 46 aislamientos fueron conservados en glicerol 25% a -80°C y en placas con medio LB a 4°C.

3.5.2 Elección del medio de cultivo y curvas de crecimiento

Con el objetivo de determinar el medio de cultivo para analizar la acumulación de PHB, se evaluó cualitativamente el crecimiento de los distintos aislamientos en 3 medios distintos. Los aislamientos se repicaron con el sistema de transferencia mecánica de 48 sitios en medio mínimo definido LGI agar ((NH₄)₂SO₄ 2,64g; glucosa 1%; KH₂PO₄ anhidro 11,9g; K₂HPO₄ anhidro 2,13g; MgSO₄ 0,1g; CaCl₂ 15mg; FeCl₃.6H₂O 10mg; Na₂MoO₄.2H₂O 2mg; H₂O destilada. c.s.p. 1L; agar 15g, pH 6,8) (Cavalcante & Dobereiner, 1988) y dos medios no definidos R2A (extracto de levadura 0,5g; proteosa peptona 0,5g; casaminoácidos 0,5g, glucosa 0,5g, almidón soluble 0,5g; piruvato de sodio 0,3g; K₂HPO₄ 0,3, MgSO₄ 0,05g; H₂O desionizada c.s.p. 1L, agar 15g) y LGIE (base salina de LGI agar, triptona 1,0g; extracto de levadura, 0,2g, H₂O c.s.p. 1L) (ver Anexo I, A1.10).

Los perfiles de crecimiento de cada aislamiento se determinaron a partir de cultivos incubados a 25°C en un agitador orbital a 130 r.p.m.. Los cultivos se efectuaron en tubos con 5ml de medio R2A líquido y se midió la DO₆₂₀ en un colorímetro Erma Model AE-22 (Erma Optical Works Ltd., Japón) cada 8 hrs, por al menos 48 hrs.

Los perfiles de crecimiento de cada aislamiento se determinaron a partir de tres cultivos réplica, en tubos con medio R2A líquido, inoculados con una suspensión de células denominada preinóculo. Los preinóculos se prepararon sembrando tubos con 5ml de medio R2A, con células recogidas en un ansa estéril a partir de una colonia aislada crecida en medio R2A. Estos preinóculos se incubaron por 24 horas de forma similar a lo descrito previamente. A estos preinóculos se les midió la DO₆₂₀ y luego se calculó el volumen de cultivo a

agregamos a cada uno de los tres tubos de cultivo réplica, de modo que la DO_{620} inicial fuese de aproximadamente 0,05.

3.5.3 Detección de PHB por ensayos de fluorescencia con Rojo Nilo

Con el objetivo de detectar aquellos aislamientos capaces de acumular PHB, se realizó un ensayo de tinción con Rojo Nilo (solución al 1% w/v en acetona) de los aislamientos seleccionados, provenientes de las cuatro muestras estudiadas en este trabajo (Spiekermann *et al.*, 1999). El ensayo se realizó en medio R2A, pero incluyendo distintas concentraciones de glucosa (3,5 g/l; 6,5 g/l y 9,5 g/l). Cada placa, conteniendo las 46 colonias, fue incubada por 24 hrs a 25°C. Luego, cada placa fue cubierta con la solución de Rojo Nilo 1% y una vez evaporada la acetona, se observaron las placas en un transiluminador bajo luz UV, acoplado a un equipo de registro de geles Kodak (modelo EDAS 290)(Kodak, NY, USA). Las colonias que presentaron fluorescencia fueron consideradas como señal positiva de posible acumulación del polímero. Como control positivo se utilizó *Herbaspirillum seropedicae* Z69 y como control negativo *Escherichia coli* Epi 300.

3.5.4 Detección de PHB por cromatografía de gases

Analizamos mediante GC-FID los extractos preparados a partir de los 45 aislamientos según fue descrito anteriormente por Brandl y col. (1988). Para ello, los liofilizados de células de cada aislamiento fueron sometidos a un proceso de derivatización que incluyó un tratamiento con H_2SO_4 y metanol. Mediante este protocolo, los PHAs son hidrolizados y los hidroxiácidos generados son posteriormente esterificados en presencia del metanol. Se inyectó 1µl del producto de esta reacción en un cromatógrafo de gases Hewlett-Packard modelo 6890, equipado con una columna HP-5 y un detector FID. Se empleó N_2 como gas de corrida a un flujo de 2 ml.min⁻¹.

El perfil de temperaturas durante la corrida fue; 2 min iniciales a 80°C y posteriores incrementos de 8°C hasta alcanzar los 140°C. Esta temperatura se

mantuvo por 20 min. Para la identificación de los hidroximetil ésteres se utilizó como estándar externo el ácido 3-hidroxibutírico (Sigma, chemical Co., st Louis, MO). Empleamos PHB como estándar interno.

El PHA más comúnmente acumulado por los microorganismos es el PHB. Es por ello que en primer término se incluyó metil-hidroxibutirato como estándar externo.

3.5.5 Detección de ácidos grasos por cromatografía de capa fina (TLC)

Los aislamientos cuyas preparaciones presentaron picos con tiempos de retención mayores a los que corresponderían a hidroxiésteres de cadena mediana, fueron analizados por TLC. Este análisis se realizó con el objetivo de detectar si dichos picos se correspondían con la presencia de ácidos grasos acumulados (Ver Anexo I, A1.9). Es decir, este ensayo nos permitió descartar la posibilidad de que los aislamientos seleccionados en base a la tinción con rojo Nilo y a la cromatografía gaseosa acumularan triglicéridos en vez de PHB.

Para esto, los aislamientos seleccionados fueron cultivados en medio líquido R2A, con 10g/l de glucosa como fuente de carbono, luego se realizó el protocolo de extracción de ácidos grasos descrito más adelante.

Se extrajeron los lípidos celulares a partir de 1,5ml de cultivo, previamente centrifugado, con 2,0ml de una mezcla de metanol: cloroformo (1:2 vol/vol) durante 30 minutos, alternando con agitación en *vortex* y reposo a bajas temperaturas.

Luego se realizó la separación cromatográfica en una placa de sílica gel 60F254 (Merck, Alemania) aplicando el siguiente sistema de solventes: hexano/ cloruro de metileno/ ácido acético (80:20:1). Se sembró 10 μ l de cada sobrenadante en la placa de TLC. Las fracciones de lípidos se visualizaron luego de una exposición a vapores de yodo. La identificación de cada fracción

se realizó por comparación de los respectivos R_f con sustancias de referencia. En este análisis se empleó aceite de oliva comestible como referencia.

3.6 Identificación y caracterización de los aislamientos seleccionados

3.6.1 Secuenciación del gen 16S ARNr de los aislamientos productores de PHB

Se amplificó el gen 16S ARNr de los aislamientos que presentaron fluorescencia en presencia de Rojo Nilo y que, además, sus perfiles cromatográficos presentaran picos con tiempo de retención que coincidieran con el del estándar usado (PHB). Para esto se realizó una reacción de PCR en 80 μ l totales conteniendo 8,0 μ l de buffer de PCR 10x, 8,0 μ l de colorante indicador/de corrida, 2,0 μ l de oligonucleótido 27f 10 mM y 2,0 μ l de oligonucleótido 1525r 10 mM, 1,6 μ l de dNTPs 10 mM, Taq-polimerasa (SBS[®]) 5 U/ μ l 0,3 μ l y 2,0 μ l de ADN. Todas las reacciones de PCR fueron realizadas en un termociclador Perkin-Elmer 2400 de acuerdo al siguiente programa: un ciclo inicial de desnaturalización de 5 min a 94°C; luego 25 ciclos de 1 min a 94°C, 1 min a 58°C y 1: 30 min a 72°C y un paso de extensión final de 10 min a 72°C.

Luego de la electroforesis de las reacciones obtenidas, los productos de PCR de tamaño esperado fueron purificados con el *DNA Extraction Kit #K0513 (Fermentas Life Science, Canadá)*, según las indicaciones del fabricante (ver Anexo I, 1.6). La secuenciación se realizó empleando los servicios de MacroGen, Corea (http://www.macrogen.com/eng/macrogen/macrogen_main.jsp).

3.6.2 Secuenciación del gen *phaC* de los aislamientos productores de PHB

Se amplificaron regiones específicas de los genes *phaC* que codifican para las polihidroxialcanoato sintasas (PhaC) de clase I y II. Para amplificar la región del gen *phaC* clase I, se empleó un par de oligonucleótidos degenerados diseñados previamente por Kadouri y col. (2003). Para amplificar parte de los

genes que codifican para las PhaC sintasas de clase II, se emplearon dos pares de oligonucleótidos diseñados para discriminar entre dos genes *phaC*, localizados en el operón *pha* de *Pseudomonas aureginosa* (Romo *et al.*, 2007). En la Tabla 3.3 se detalla la secuencia de los oligonucleótidos empleados.

La reacción de PCR se realizó a partir del ADN genómico previamente purificado de cada aislamiento. El ADN se obtuvo empleando el kit comercial EZ Nucleosomal DNA Prep Kit (ZYMO RESEARCH, CA, USA). El volumen total de cada reacción fue de 20µl totales conteniendo 2,0µl de buffer de PCR 10x, 2,0µl de oligonucleótido directo 2,0 mM y 2,0µl de oligonucleótido reverso 2,0 mM, 1,0µl de dNTPs 10 mM, 1,0µl de DMSO, 16,8µl de agua miliQ estéril, 0,1µl de Taq- polimerasa (SBS®) 5 U/µl y 2,0µl de ADN.

Nombre Oligonucleótido	Secuencia 5' → 3'	Referencia
phaC for	ATCAACAAGTTCTAYATC	Kadouri <i>et al.</i> , 2003
phaC rev	GTTCCAGTASAGSAGGTCGAA	Kadouri <i>et al.</i> , 2003
phaC-E1 for	GGAGCGTCGTAGATGAGTAACAAGAA	Romo <i>et al.</i> , 2007
phaC-E1 rev	AGGTTGGCGCCGATGCCGTTGAA	Romo <i>et al.</i> , 2007
phaC-E2 for	TGCTGGCCTGGCGCATTCCCAA	Romo <i>et al.</i> , 2007
phaC-E-2 rev	AAGTGGTAGTAGAGGTTGCC	Romo <i>et al.</i> , 2007

Tabla 3. 3 Oligonucleótidos empleados para amplificar regiones de los genes que codifican para las polihidroxialcanoato sintasas clase I y II.

Todas la reacciones de PCR fueron realizadas en un termociclador Perkin-Elmer 2400 de acuerdo a los siguientes programas: para *phaC* clase I con oligonucleótidos degenerados, un ciclo inicial de desnaturalización de 5 min a 94°C; luego 30 ciclos de 30 seg a 94°C, 30 seg a 55°C y 30 seg a 72°C y un paso de extensión final de 7 min a 72°C.; para *phaC1* clase II, un ciclo inicial de desnaturalización de 5 min a 94°C; luego 14 ciclos de 30 seg a 94°C, 30 seg a 65°C (reduciendo 1°C cada dos ciclos) y 1 min a 72°C, seguidos de 20 ciclos de 30 seg a 94°C, 30 seg a 59°C y 1 min a 72°C y un paso de extensión final de 5 min a 72°C. Para *phaC2* clase II, el programa consistió de: 5 min a 94°C; luego 12 ciclos de 30 seg a 94°C, 30 seg a 65°C (reduciendo 1,5°C cada dos

ciclos) y 1 min a 72°C, seguidos de 22 ciclos de 30 seg a 94°C, 30 seg a 57,5°C y 1 min a 72°C y un paso de extensión final de 5 min a 72°C.

3.6.3 *Fingerprinting de los aislamientos mediante REP- PCR*

El REP-PCR es una técnica que permite diferenciar cepas a nivel de especie o subespecie, aún cuando presenten una alta identidad en el gen ARNr de 16 en base a un perfil electroforético de fragmentos amplificados por PCR. Para ello, se emplean como cebadores oligonucleótidos diseñados para amplificar elementos Palindrómicos Extragénicos Repetidos, intercalados en el genoma. En este caso usamos los primers ERIC, diseñados por Hulton y col. (1991), con las siguientes secuencias: ERIC1 (5´ ATG TAA GCT CCT GGG CAT TTC AC3´), ERIC2 (5´AAG TAA GTG ACT GGG GTG AGC G3´).

Cada reacción de PCR se realizó por duplicado. El volumen total de cada reacción fue de en 25µl totales conteniendo 2,5µl de buffer de PCR 10x, 2,0µl de MgCl₂ 25 mM, 2,0µl de oligonucleótido directo REP 25 µM y 2,0µl de oligonucleótido reverso REP 25 µM, 2,5µl de dNTPs 10 mM, 8,7µl de agua miliQ estéril, 0,3ul de Taq-polimerasa (SBS[®]) 5 U/µl y 5,0µl de ADN. El ADN genómico se obtuvo a través de la lisis celular por calor (ver Anexo I, A1.12).

Todas la reacciones de PCR fueron realizadas en un termociclador Perkin-Elmer 2400 de acuerdo al siguiente programa: un ciclo inicial de desnaturalización de 5 min a 94°C; luego 30 ciclos de 1 min a 94°C, 1 min a 52°C y 6 min a 65°C y un paso de extensión final de 16 min a 65°C

Los perfiles electroforéticos obtenidos a partir cada aislamiento se obtuvieron por electroforesis horizontal en un gel de agarosa 1,5% en buffer TBE a 140V.

3.7 Búsqueda de los cultivables en las bibliotecas empleando el gen ARNr de 16S

Incluimos las secuencias del gen ARNr de 16S de los cuatro aislamientos que seleccionamos en el archivo multifasta que contiene todas las secuencias obtenidas en las bibliotecas de eubacteria y calculamos las OTUs empleando 99%, 97% y 95% de similitud como cutoff (*mothur*). Luego observamos si las secuencias de las cepas aisladas se agrupaban en alguna OTU con algunas de las secuencias obtenidas en las bibliotecas.

Empleamos un total de 290 secuencias, cuando fijamos el cutoff en 99%, las secuencias se agruparon en 120 OTUs, empleando un 97% obtuvimos 89 OTUs y cuando empleamos un 95%, obtuvimos 76 OTUs.

3.8 Ensayos de acumulación de PHB en cultivos en lote

Se realizaron cultivos en lote de cada uno de los cuatro aislamientos seleccionados y se determinó la biomasa y el contenido de PHB a tiempo final. Se inocularon matraces de 1L conteniendo 250ml de medio R2A líquido con 10 g/l de glucosa. El inóculo consistió en un cultivo de cada cepa en medio R2A líquido previamente crecido a 25°C. Ajustamos el volumen de inóculo para que cada uno de los cuatro matraces tuviera un D.O. inicial de 0,05. Los matraces se incubaron a 25°C en un agitador orbital a 130 r.p.m. por 48 hrs. Una vez finalizada la incubación, se colectaron alícuotas de cada cultivo para analizar la biomasa generada (peso seco) y la concentración de polímero (peso seco), por triplicado.

La purificación de la biomasa celular se realizó por centrifugación de 4ml de cultivo a 10.000 r.p.m. durante 10 min, seguida de dos lavados con igual volumen de agua destilada y centrifugaciones a 10.000 r.p.m. por 10 min cada vez. El botón de células se secó a 60°C por 48 hrs (en tubos secos y limpios previamente pesados) y luego se determinó el peso final de las células lavadas.

La extracción de polímeros se realizó a partir de 20ml de cultivo. Empleamos la técnica de extracción de PHB mediante el método de hipoclorito (ver Anexo I, A1.11). Brevemente, se lisaron las células en hipoclorito 5% a 37°C por un par de horas y luego se realizó una extracción en cloroformo y una precipitación en metanol. Finalmente, el contenido en polímero se evaluó mediante gravimetría y se relacionó con el volúmen de cultivo (peso polímero (g) / litro de cultivo) o la biomasa del mismo ($\% = 100 \times \text{peso polímero (g)} / \text{gramo de biomasa}$).

4 RESULTADOS

4.1 Colección de muestras

En la Tabla 4.1 detallamos algunas características fisicoquímicas de las muestras, así como su localización geográfica y una breve descripción de cada sitio. El pH, la temperatura y la conductancia fueron registradas directamente en el curso de agua durante el muestreo. El pH presentó un rango de valores entre 5,6 y 8,2. La temperatura de los distintos sitios también fue variable, tanto entre la fecha de muestro (abril o diciembre) como entre sitios distintos muestreados en el mismo día (sitios 7 y 8). Los valores de conductancia sólo pudieron registrarse en dos sitios. En la siguiente figura (Figura 4.1) se muestran dos de los sitios de colecta analizados en este trabajo.

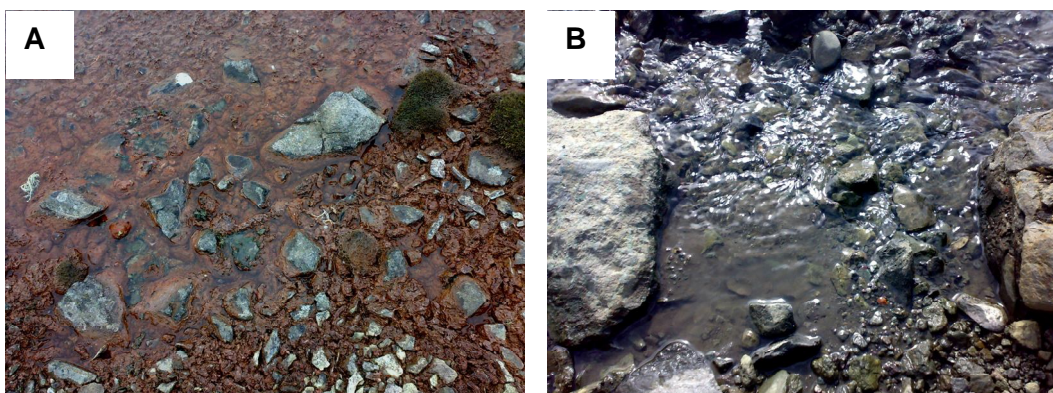


Figura 4.1 Fotografía de dos de los sitios de colecta. En las imágenes pueden observarse el aspecto de los tapetes microbianos estudiados en este trabajo. A) sitio 7 y B) sitio 8, ambos tapetes microbianos presentaron un color rojizo en su superficie y fueron colectados a lo largo de una corriente de agua dulce.

Los valores de contenido de nitrógeno y carbono totales en cada muestra (N_{tot} y C_{tot}) y sus isótopos estables (^{15}N y ^{13}C) fueron variables, dependiendo del sitio analizado (Tabla 4.1). La abundancia de los isótopos estables fue siempre negativa para el carbono ($\Delta C^{13} / C^{12}$) y positiva para el nitrógeno ($\Delta N^{15} / N^{14}$), excepto en la muestra m15, en la cual obtuvimos un valor negativo.

Muestra	Descripción	Localización	T °C	pH	S	N_{tot}	$\Delta^{15}\text{N}$ /^{14}N	C_{tot}	$\Delta^{13}\text{C}$ /^{12}C
m7	Mata roja, cañada deshielo	S 62°9'11'' W 58°56'21''	0,4	6,8	n.d.	0,6889	2,292	5,2025	-15,297
m8	Mata roja, cruzando la cañada hacia el oeste	S 62°9'11'' W 58°56'	1,0	6,5	n.d.	0,5667	3,511	5,7913	-17,459
m15	Mata roja, vecina a musgos	S 62°9'39'' W 58°55'40''	0,1	5,6	77,0	0,5119	1,924	3,1187	-13,249
m16	Mata roja, corriente de agua deshielo. Fecas animales cercanas	S 62°9'30'' W 58°56'21''	0,2	8,2	74,5	0,1050	3,719	0,7930	-18,175

Tabla 4.1. Descripción de las características fisicoquímicas de las muestras y su localización geográfica.

4.2 Construcción de bibliotecas de amplicones del gen 16S ARNr

Purificamos el ADN genómico ambiental de las 4 muestras, conservadas a -20°C. En la Figura 4.2 mostramos los perfiles electroforéticos de los ADN obtenidos al emplear el protocolo de purificación descrito en materiales y métodos. En cada carril del gel de la Figura puede observarse el ADN genómico parcialmente degradado (*smear*).

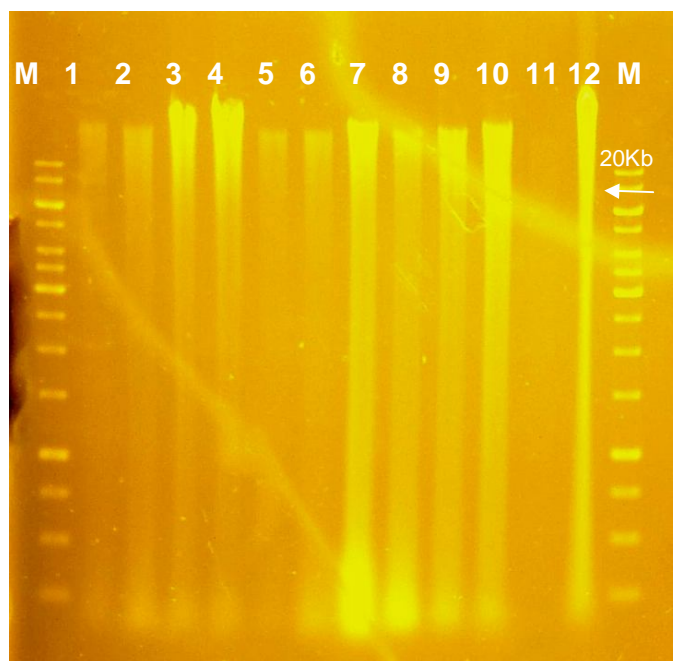


Figura 4.2 ADN genómico ambiental. Fotografía del perfil electroforético en gel de agarosa 1% teñido con bromuro de etidio, en el cual observamos las preparaciones de ADN ambiental de las cuatro muestras analizadas en este trabajo. Carriles: M= Marcador molecular; 1-3 sitio 7, 4-6 sitio 8; 7-9 sitio 15; 10-12 sitio 16.

Tabla 4. 2 Detalle de las bibliotecas de amplicones de 16S ARNr construidas en este trabajo.

<i>Muestra</i>	<i>Nº de clones</i>	<i>Oligonuclótidos</i>		
		<i>Cyanobacterias</i>	<i>Eubacterias</i>	<i>Arqueas</i>
m7	144	27f-781ra	27f-1525r	4af-1492r
m8	144	27f-781ra	27f-1525r	4af-1492r
m15	144	27f-781ra	27f-1492r	4af-1492r
m16	144	27f-781ra	27f-1492r	4af-1492r

4.3 Purificación de los insertos

En las siguientes figuras se muestran los resultados obtenidos al purificar los vectores con inserto de las distintas bibliotecas. Cada protocolo de purificación o *miniprep*, correspondiente a cada placa, se repitió hasta lograr una concentración de ADN homogénea. De esta forma se obtuvieron 1728 *minipreps*. Se preparó un total de 30 *miniprep* (de placa de 96 pocillos, 2880 clones) y secuenciaron 18 placas (1728 clones) (Figuras. 3, 4 y 5). De estas, 144 clones corresponden a cada biblioteca.

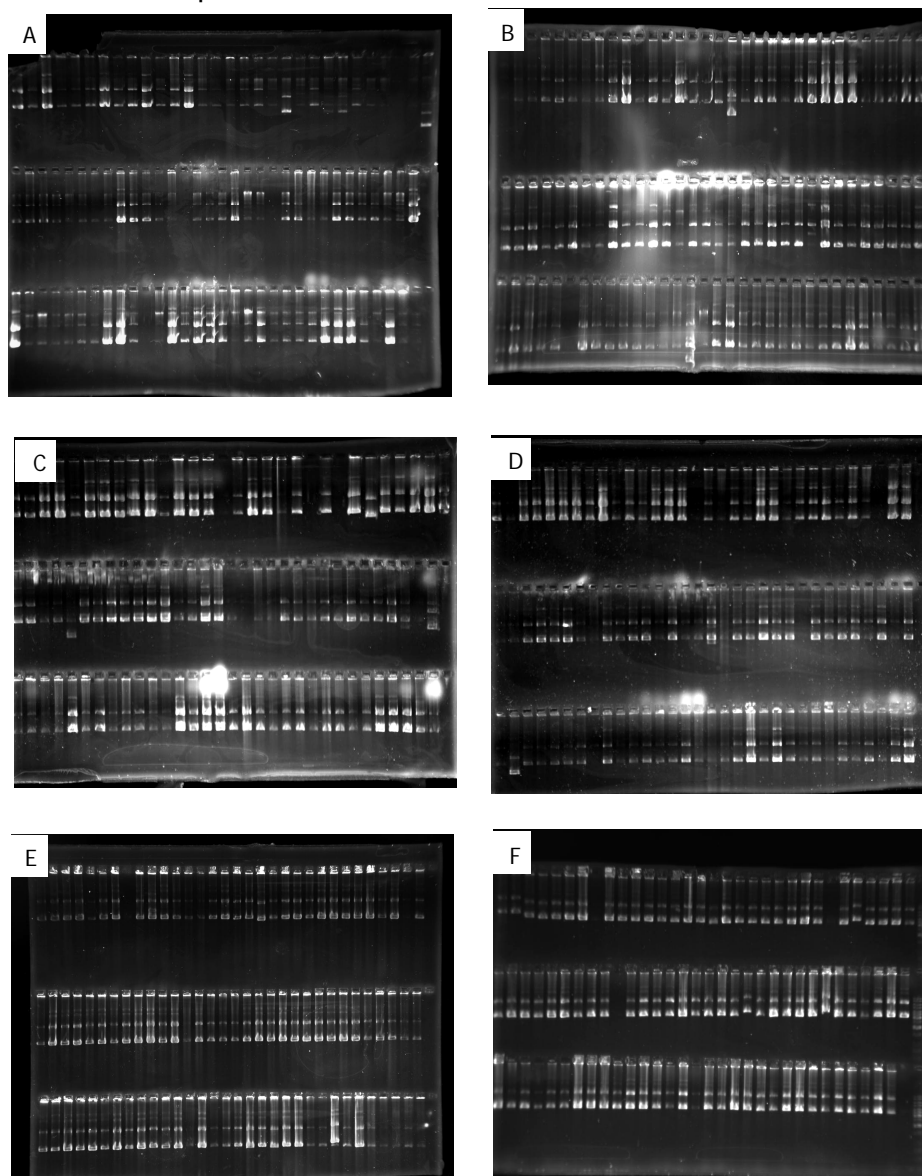


Figura 4.3 Perfiles electroforéticos de plásmidos purificados a partir de las bibliotecas de Cianobacterias. Fotografías digitales de geles de agarosa 0,7% teñidos con bromuro de etidio donde se observan los plásmidos purificados en cada *miniprep*. Cada plásmido contiene inserta una región del gen 16S ARNr de Cianobacterias (CIA). Cada gel corresponde a una placa: A) muestra m7 CIA; B) muestra m8 CIA; C) muestra m15 CIA; D) muestra m16 CIA; E) muestras m7 y m8 CIA; F) muestras m15 y m16 CIA.

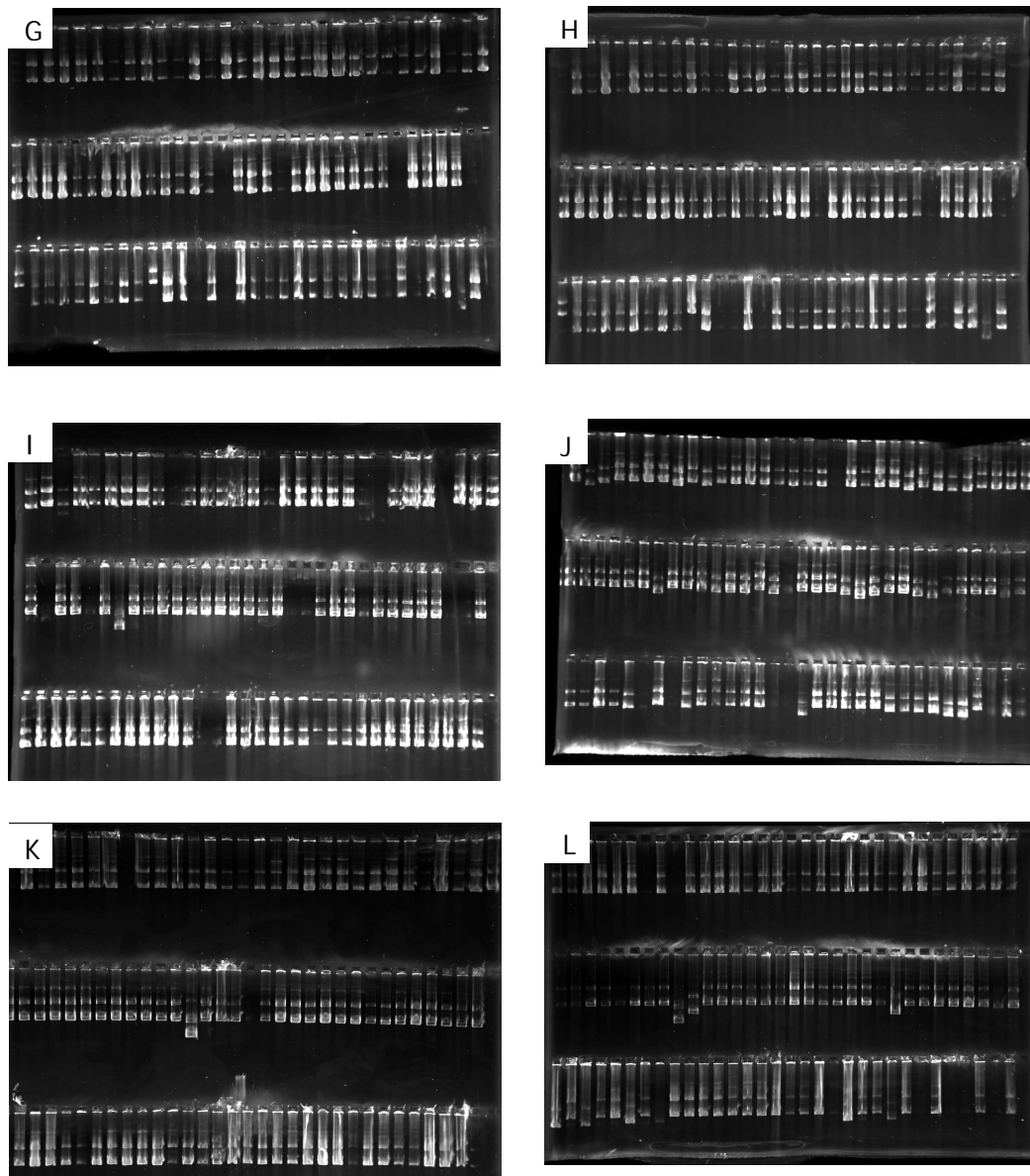


Figura 4.4 Minipreps de las bibliotecas de eubacterias. Fotografías digitales de electroforesis en geles de agarosa 0,7% teñidos con bromuro de etidio dónde se observan los plásmidos purificados en cada miniprep. Cada plásmido contiene inserto un fragmento que representa una región del gen 16S ARNr de eubacterias (EUB). Cada gel corresponde a una placa: G) muestra m7 EUB; H) muestra m8 EUB; I) muestra m15 EUB; J) muestra m16 EUB; K) muestras m7 v m8 EUB; L) muestras m15 v m16 EUB.

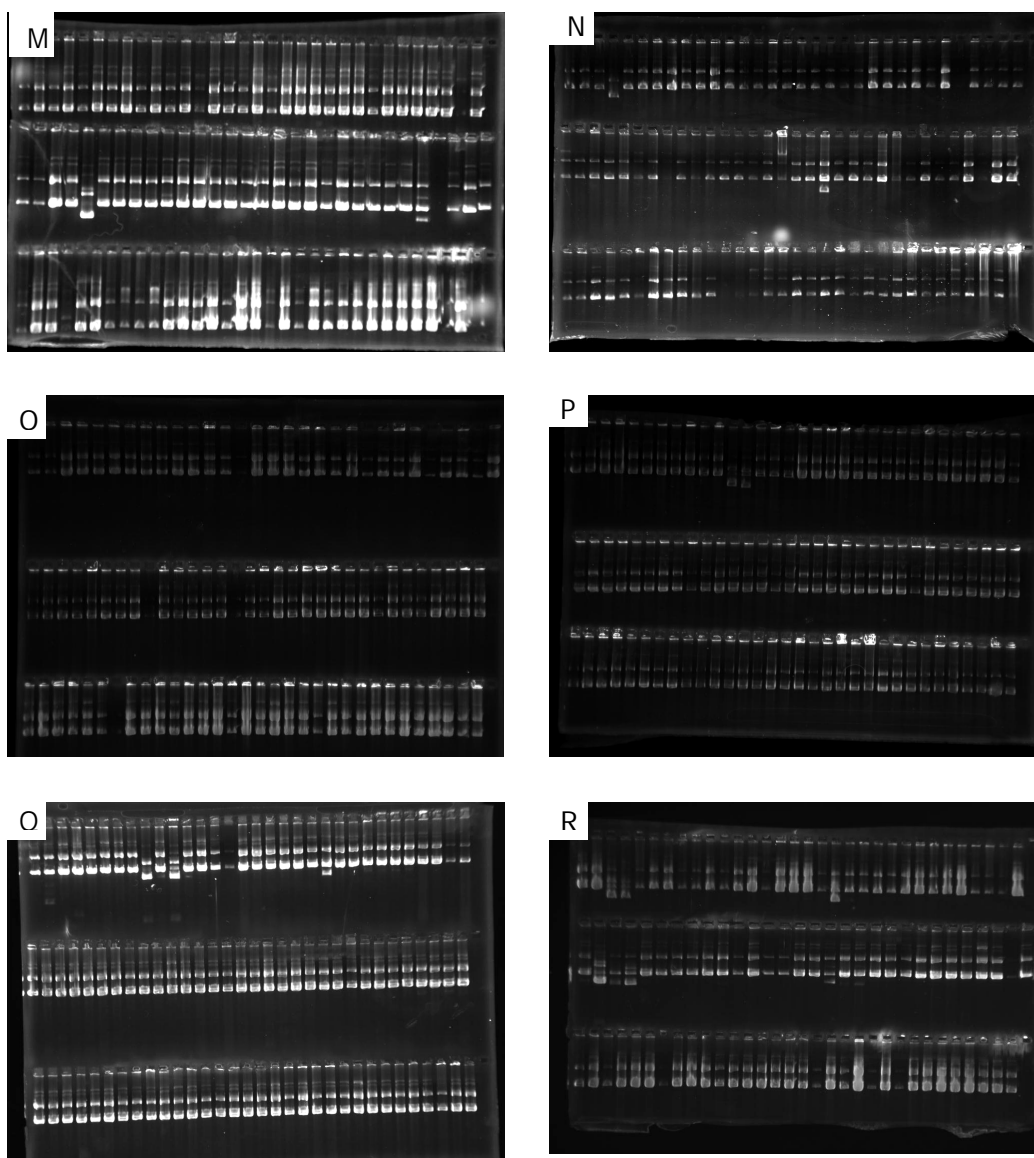


Figura 4. 5 Minipreps de las bibliotecas de arqueas. Fotografías digitales de perfiles electroforéticos en geles de agarosa 0,7% teñidos con bromuro de etidio dónde se observan los plásmidos purificados en cada miniprep. Cada plásmido contiene inserta una región del gen 16S ARNr de Arqueas (ARQ). Cada gel corresponde a una placa: M) muestras m7 ARQ; N) muestras m8 ARQ; O) muestras m15 ARQ; P) muestras m16 ARQ; Q) muestras m7 y m8 ARQ; R) muestras m15 y m16 ARQ.

4.4 Reacciones de Secuenciación

Se secuenciaron un total de 1368 clones a partir del extremo 5' del gen 16 ARNr de cianobacterias y eubacterias, empleando el oligonucleótido 27f. A partir de estas reacciones se obtuvieron aproximadamente 800 secuencias de alta calidad. La diferencia entre el número de clones analizados y el número de secuencias se debe a que no logramos obtener resultados en todas las reacciones de secuenciación.

Esto se debe principalmente a problemas en la manipulación previa, a la técnica de secuenciación en sí misma y al equipo empleado. Por ejemplo, la eficiencia de la reacción depende de la concentración de plásmido presente en cada pocillo de la placa de secuenciación. El rendimiento promedio del equipo de secuenciación automático es de aproximadamente un 70%. En nuestro caso obtuvimos un rendimiento ligeramente inferior al esperado (58,4%).

Las 800 secuencias obtenidas fueron de aproximadamente 700pb y cubrieron las regiones V1 y V2 del gen 16S ARNr. Esta cantidad de secuencias representa un rendimiento del 60% de la cantidad de reacciones de secuenciación realizadas.

Los clones de las bibliotecas de arqueas no se secuenciaron a partir del cebador 4af. Durante mi pasantía en el laboratorio de Curitiba no pude disponer de este cebador y es así que decidimos usar el cebador M13 universal, contenido en el vector pCR2.1 A partir de estas reacciones obtuvimos aproximadamente 40 secuencias por biblioteca.

No obtuvimos secuencias de arqueas. Las secuencias dentro de las bibliotecas de arqueas presentaron similitud con cianobacterias o bacterias, pero no con secuencias de arqueas. Por este motivo, las bibliotecas de arqueas no fueron tomadas en cuenta para el análisis bioinformático subsecuente. En la Tabla 4.3 se describen detalladamente las secuencias

obtenidas de cada biblioteca, los oligonucleótidos y las temperaturas de *annealing* utilizadas.

Muestra	N° de clones secuenciados	Eubacterias			Cianobacterias			Arqueas		
		Cebador	Tann (°C)	N° de secuencias obtenidas	Cebador	Tann (°C)	N° de secuencias obtenidas	Cebador	Tann (°C)	N° de secuencias obtenidas
m7	144	27f	60	96	27f	60	77	M13 univ	55	37
m8	144	27f	60	81	27f	60	43	M13 univ	55	38
m15	144	27f	60	79	27f	60	79	M13 univ	55	40
m16	144	27f	60	98	27f	60	98	M13 univ	55	39

Tabla 4. 3 Descripción detallada de la cantidad de secuencias obtenidas a partir de cada biblioteca, se muestran además las temperaturas de *annealing* (T_{an}) empleadas en las distintas reacciones de secuenciación y el cebador empleado.

Las secuencias fueron anotadas en el NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucleotide/>) bajo los siguientes números de acceso: cianobacterias sitio 7 HQ827185 - HQ827253, cianobacterias sitio 8 HQ827254 - HQ827294, cianobacterias sitio 15 HQ827295 - HQ827372, cianobacterias sitio 16 HQ827373 - HQ827459. Eubacterias sitio 7 HQ827531 - HQ827619, 8 HQ827460 - HQ827530, eubacterias sitio 15 HQ827620 - HQ827688, eubacterias sitio 16 HQ827689 - HQ827768. Estas secuencias serán públicas a partir del 31 de diciembre de 2011.

4.5 Análisis de diversidad empleando software *mothur*

Los análisis de diversidad se efectuaron empleando el software *mothur* v1.15.0 (Schloss, *et al.* 2009). Este programa es de libre acceso en internet y contiene una batería de herramientas informáticas desarrolladas específicamente para el análisis de problemas de Ecología Microbiana. Con este programa informático calculamos el número de Unidades Taxonómicas Operacionales (OTUs) (*operational taxonomic unit*), construimos curvas de

rarefacción y estimamos los índices de diversidad (Chao 1 y Shannon) en cada biblioteca.

4.5.1 Estimación del número de OTUs y su distribución

Estimamos el número de OTUs para cada biblioteca considerando distintos valores de distancia entre las secuencias (1%, 3%, 5%). Para esto trabajamos con el número de secuencias detallado en la Tabla 4.4. En la Figura 4.6 y la Tabla 4.4, mostramos el número de OTUs obtenidos, empleando como criterio de agrupamiento una identidad mínima del 97% entre secuencias. En el Anexo II 2.1 se detalla la cantidad de OTUs obtenida empleando las distancias mencionadas anteriormente.

Muestra	Cyanobacterias			Eubacterias		
	# OTUs	# secuencias	%C ⁹⁷	# OTUs	# secuencias	%C ⁹⁷
7	37	54	31	63	82	23
8	32	39	18	51	68	25
15	33	61	52	41	61	32
16	49	85	42	43	79	46

Tabla 4. 4 Número de secuencias empleadas en cada biblioteca (# secuencias) número de OTUs (#OTUs) y porcentaje de cobertura (% C⁹⁷) calculado para cada una de ellas, empleando una identidad del 97%.

Con el número de secuencias pertenecientes a cada OTU también construimos un histograma de distribución. Como observamos en la Figura 4.7, las bibliotecas presentaron algunas OTUs con un número relativamente mayor de secuencias, mientras que el resto, contenían una o muy pocas secuencias. Para la comunidad microbiana en estudio, estos resultados podrían describir la presencia de unas pocas especies dominantes y un grupo de varias especies poco abundantes.

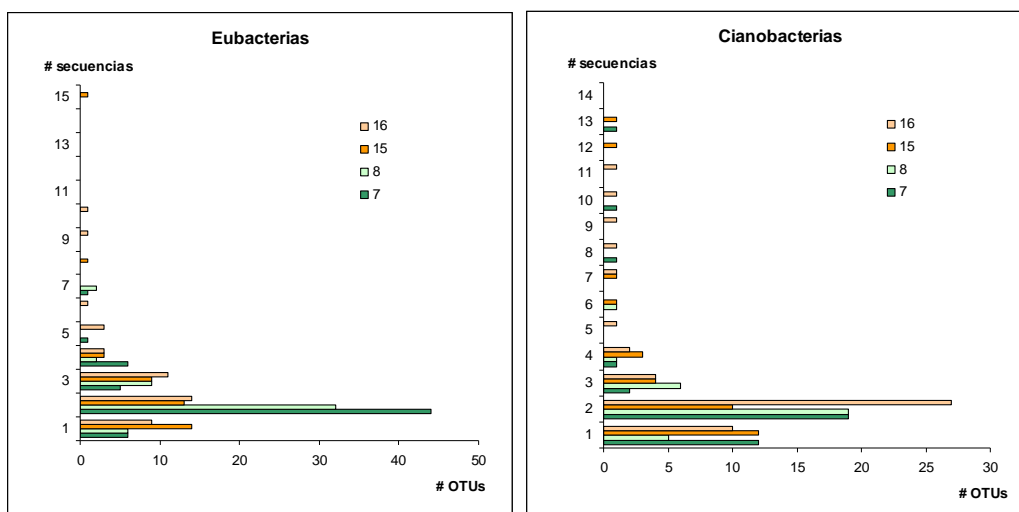


Figura 4.6 Histograma que muestra la distribución de OTUs calculadas con una distancia máxima de 3% en los distintos sitios A) Cianobacterias y B) eubacterias.

4.5.2 Análisis de agrupamiento

Este tipo de análisis también fue realizado con *mothur* y compara la similitud entre las bibliotecas, empleando un estimador de la diversidad de la estructura de las mismas, llamado *Yue & Clayton tetayc*. De este modo, comparamos las bibliotecas de eubacterias y cianobacterias de los cuatro sitios. Las bibliotecas de cianobacterias se agruparon de forma distinta a las de eubacterias. Como observamos en la Figura 4.7, las bibliotecas de cianobacterias formaron tres grupos, los sitios 7 y 15 se agruparon juntos, mientras que los sitios m8 y m16 se ubicaron solos.

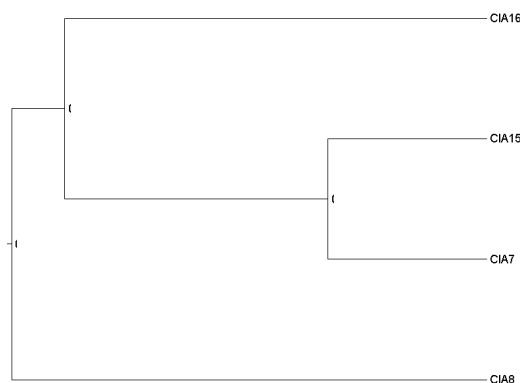


Figura 4.7 Dendrograma construido con *MOTHUR*, representando la similitud entre las distintas bibliotecas de Cianobacterias analizadas.

Por otra parte, el agrupamiento de las eubacterias (Figura 4.8) mostró una mayor similitud entre las bibliotecas m15 y m16, en comparación con las bibliotecas m7 y m8.

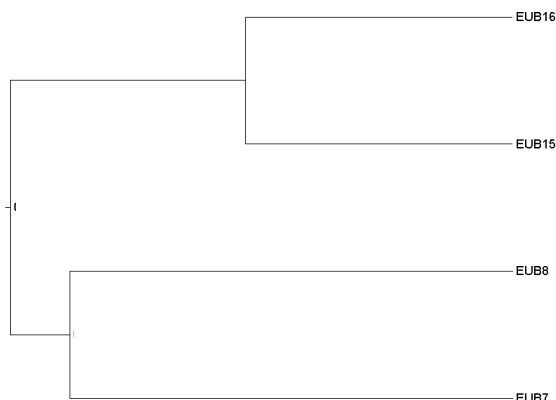


Figura 4. 8 Dendrograma construido con *MOTHUR*, representando la similitud entre las distintas bibliotecas de eubacterias analizadas.

En ambos dendogramas podemos agrupar los distintos sitios, en el caso de las Cianobacterias serían tres grupos: m8 por un lado y m7, m15 juntos y por el otro m16. En el caso de las eubacterias los sitios se podrían agrupar en dos m15 y m16 juntos por un lado y m7 y m8 en otro grupo separado.

4.5.3 Curvas de rarefacción e índices de diversidad

Las curvas de rarefacción se construyeron considerando que dos secuencias pertenecen a la misma OTU si presentan una distancia p menor al 3% o al 5% (Figura 4.9). Empleando este criterio, las curvas no llegaron al *plateau* en ninguna de las bibliotecas analizadas. Este resultado indica que el número de secuencias analizadas en cada biblioteca no fue suficiente para describir la diversidad presente en cada sitio.

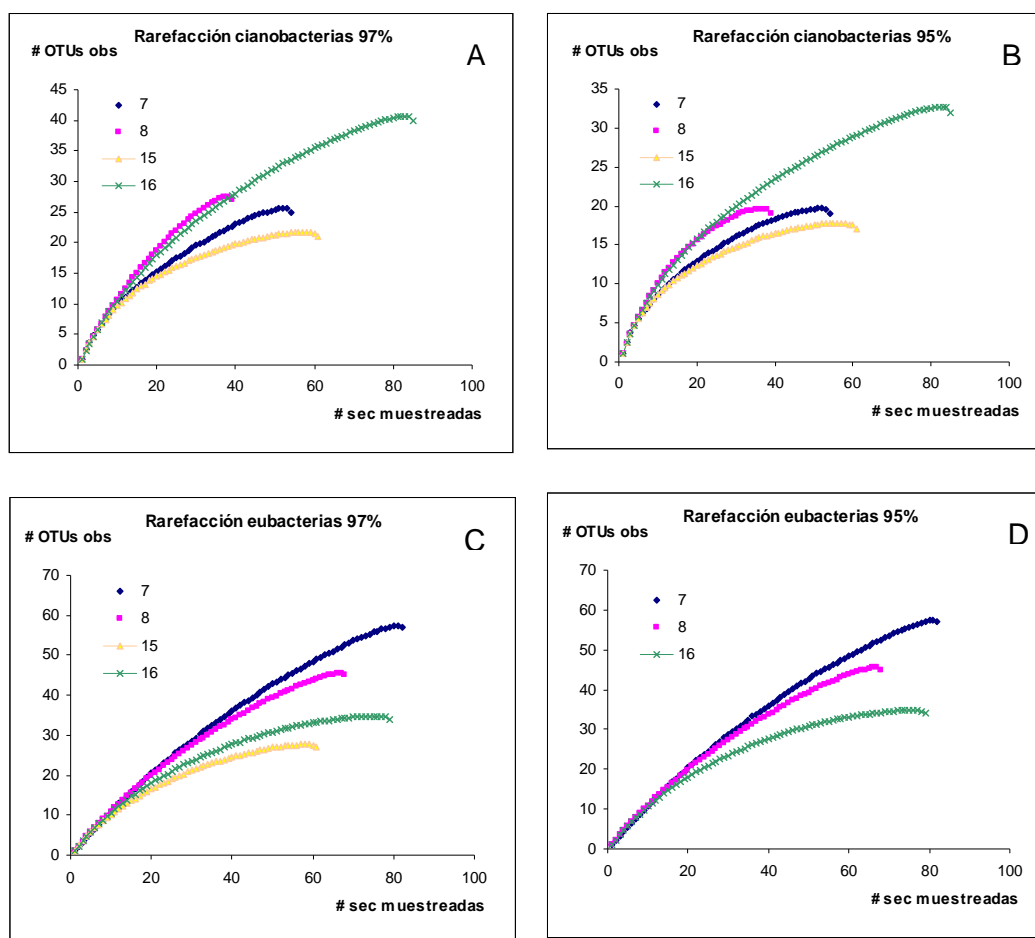


Figura 4. 9 Curvas de rarefacción obtenidas con el programa *MOTHUR*, diseñado para el análisis de la diversidad de secuencias del gen ARNr. Se graficó el número de secuencias obtenidas en función del número OTUs calculado por dicho programa. A y B: curvas de rarefacción de las bibliotecas de cianobacterias m7-m8-m15 y m16 respectivamente empleando un 97% y un 95% de similitud respectivamente. C-D curvas de rarefacción de las bibliotecas de eubacterias m7-m8-m15 y m16 empleando una similitud del 97% y 95% respectivamente.

Por otro lado, comparamos las curvas de los distintos sitios entre sí. En el caso de las bibliotecas de Cianobacterias, al emplear una distancia del 3% para definir las OTUs, m8 contendría una comunidad ligeramente más diversa y le seguirían en orden decreciente m16, m7 y m15, respectivamente. Esta comparación se realizó empleando el máximo número de secuencias comparables (correspondiente a 39 secuencias). Este perfil cambia parcialmente

cuando empleamos un corte de 5% de distancia, en cuyo caso m16 presentaría el mayor número de OTUs, siguiéndoles m8, m7 y m15.

En el caso de las curvas correspondientes a las bibliotecas de eubacterias, comparando 60 secuencias y con un corte del 3% de distancia, m7 tendría una comunidad más diversa y luego le seguirían en orden decreciente m8, m16 y m15. También calculamos el porcentaje de cobertura C^{97} para cada una de las bibliotecas (Tabla 4.4), hallamos que en promedio el porcentaje de cobertura fue de 36% en la eubacterias y 32% en las cianobacterias.

Con el programa *mothur* también calculamos los índices de diversidad de Shannon (H) y Chao 1 para cada biblioteca. Obtuvimos un $H \approx 3$ en todas las bibliotecas, mientras que los valores de Chao1 fueron muy dispersos encontrándose en un rango entre 40-400. En la Figura 4.10 y en la Tabla 4.5 se muestran los valores de los índices calculados, con sus respectivos intervalos de confianza inferiores y superiores (lci y hci). Tomando en cuenta dichos intervalos, no existirían diferencias entre los valores de diversidad de las distintas bibliotecas analizadas, o al menos, con la cantidad de secuencias empleadas. La única excepción fue la biblioteca de eubacterias de la muestra m7, que presentó un valor de diversidad de Shannon ligeramente superior al resto.

Muestra	7		8		15		16	
	average	97% lci/hci	average	97% lci/hci	Average	97% lci/hci	average	97% lci/hci
Shannon								
<i>Cia</i>	2,7	2,4/3	3,1	2,9/3,4	2,6	2,4/2,9	3,2	3,0/3,5
<i>eub</i>	3,9	3,7/4,1	2,9	2,6/3,2	2,9	2,6/3,2	2,9	2,6/3,2
Chao 1	average	97% lci/hci	average	97% lci/hci	Average	97% lci/hci	average	97% lci/hci
<i>Cia</i>	82	42/216	51	35/102	45	29/110	109	64/238
<i>eub</i>	214	120/447	94	65/167	34	29/56	41	36/61

Tabla 4. 5 Resumen de los valores de los índices de diversidad calculados con el programa *MOTHUR* para cada biblioteca.

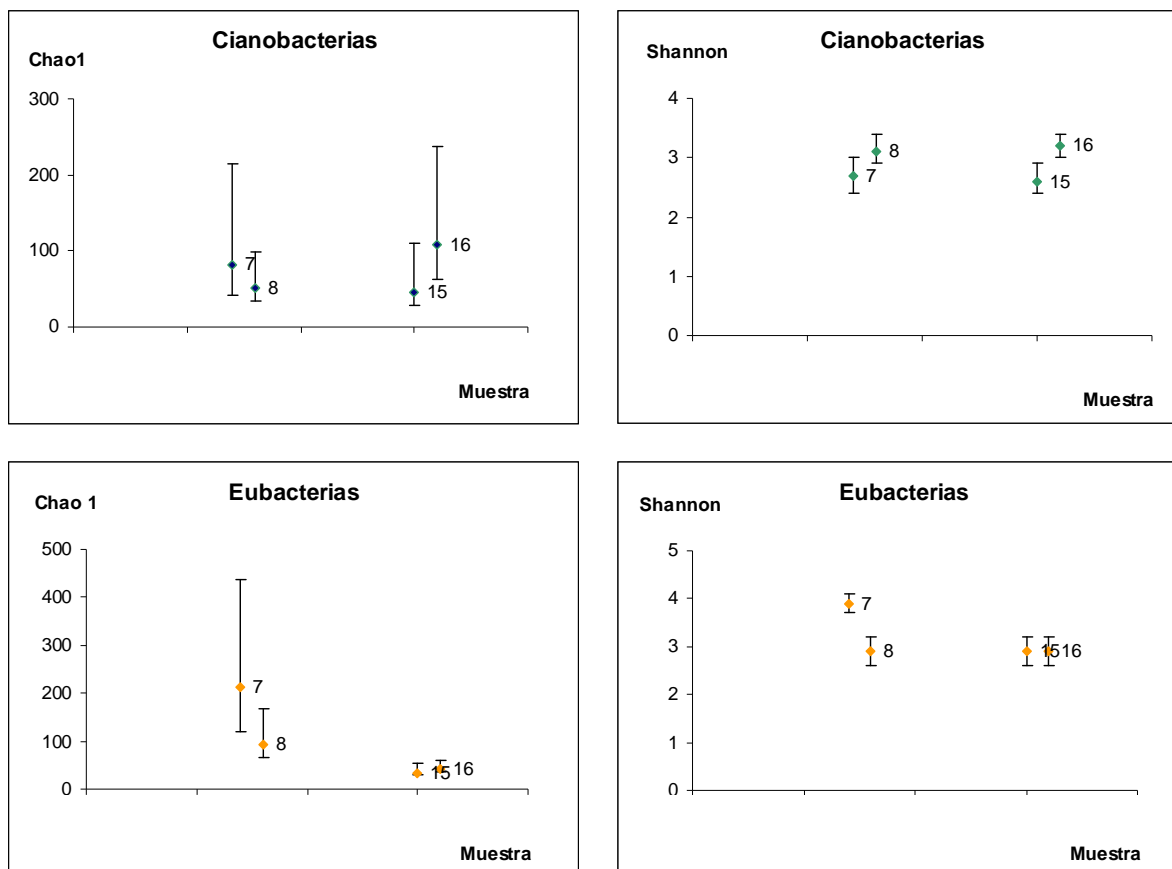


Figura 4.10 Gráficos que muestran los índices de diversidad calculados con el programa *MOTHUR* para cada biblioteca. A y B: Índices de Shannon para las bibliotecas de cianobacterias y eubacterias, respectivamente. C y D: Índices Chao1 para las bibliotecas de cianobacterias y eubacterias, respectivamente. Las barras representan los intervalos de confianza.

4.6 Análisis de la composición taxonómica de las bibliotecas

4.6.1 Clasificación de las secuencias empleando el Ribosome Database Project (RDP)

Utilizamos la herramienta *Classifier* del RDP para asignar taxones microbianos a las secuencias ARNr de 16S de nuestras bibliotecas. Con los resultados obtenidos, construimos gráficas de barras con los porcentajes relativos de los distintos taxones, para cada biblioteca.

sitios 7, 8 y 16, los Firmicutes, Bacteroidetes y las α y β Proteobacterias fueron los grupos más abundantes y con valores comparables. En los sitios 15 y 16, las Cianobacterias no clasificadas fueron otro de los grupos más abundantes. En el sitio 15, las Proteobacterias fueron poco abundantes y la mayoría de las secuencias presentaron similitud con las de miembros de Cianobacterias.

Las α -Proteobacterias mostraron similitud principalmente con miembros pertenecientes a los Rhodobacterales, Sphingomonadales y Rhizobiales. Las secuencias incluidas como β -Proteobacterias, mostraron similitud con integrantes de los Burkorderiales. Los valores de las abundancias relativas se pueden consultar en el Anexo II A2.6.

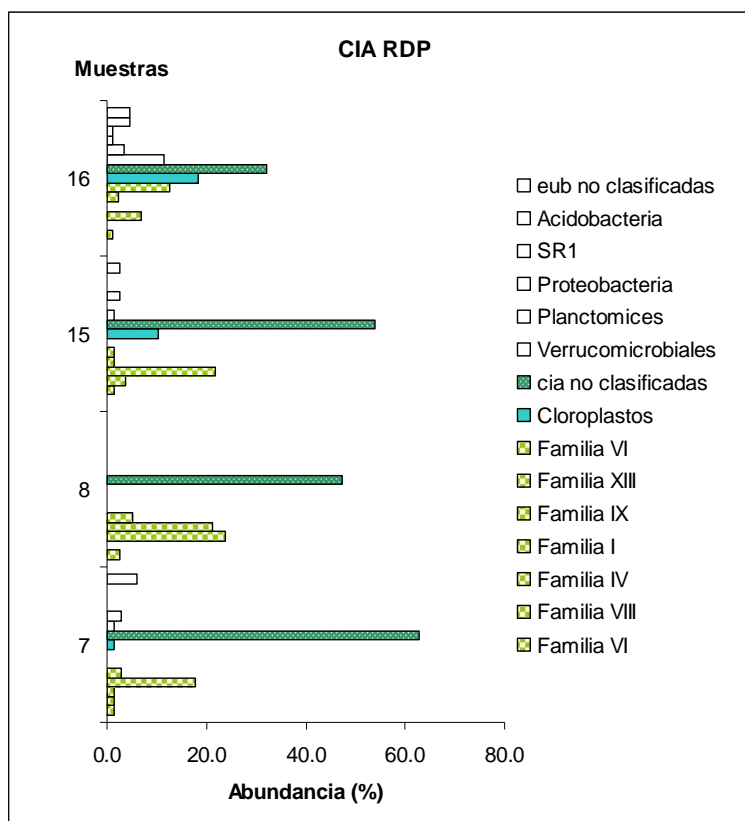


Figura 4. 12 Gráfico de barras que muestra la abundancia relativa de los distintos taxones en la clasificación realizada con RDP de las bibliotecas de cianobacterias. En el eje vertical se muestran los distintos sitios muestreados, en el eje horizontal se muestra la abundancia relativa. En todas las bibliotecas las cianobacterias no clasificadas (■) y cianobacterias pertenecientes a distintas Familias (■) fueron los taxones más abundantes. En los sitios 15 y 16 también observamos un porcentaje considerable de secuencias correspondientes a cloroplastos de diatomeas y briofitas (■).

Asimismo, algunas secuencias fueron asignadas a otros grupos taxonómicos como *Acidobacterias*, *Actinobacterias*, *Planctomycetes*, *Bacteroidetes*, *Verrucomicrobios* y *Gematimonadales*, aunque en menor abundancia. Dichos grupos se encontraron en m7 y m8. En la biblioteca de la muestra m15, los taxones de *Planctomycetes*, *Gematimonadetes*, *Acidobacterias* y *Firmicutes* se encontraron ausentes, al igual que los taxones de *Firmicutes* y *Acidobacterias* en la biblioteca m16.

Al clasificar las secuencias de las bibliotecas de Cianobacterias no se logró resolver claramente la identidad de los taxones. Como se observa en la Figura 4.13, la mayoría de las secuencias presentó similitud con secuencias de Cianobacterias no clasificadas y con integrantes de las Familias I, IV y VI. Aunque en menor abundancia, también se identificaron secuencias de *Verrucomicrobios*, *Planctomyces*, *Acidobacterias* y cloroplastos de diatomeas y briofitas.

En su conjunto (Figura 4.12), la gran mayoría de las secuencias presentaron similitud con secuencias de Cianobacterias no clasificadas en este repositorio o con secuencias de cloroplastos

4.6.2 Clasificación de las secuencias empleando GREEN GENES (GG)

Realizamos la clasificación de las todas bibliotecas empleando las herramientas disponibles en el sitio web de *Green Genes*. Este sitio web está diseñado para el análisis de secuencias correspondientes al gen 16S ARNr y posee protocolos (*pipelines*) para el análisis informático de las mismas. Empleamos la clasificación obtenida con el NCBI como repositorio de secuencias.

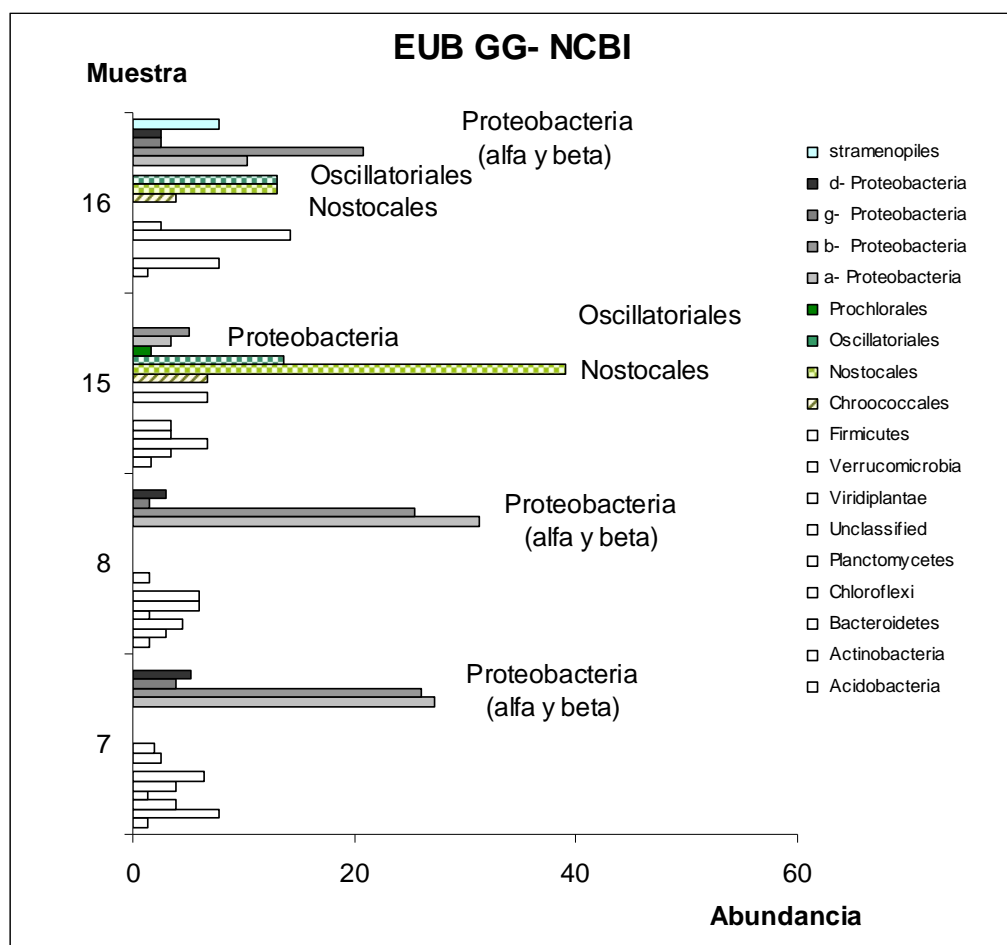


Figura 4. 13 Gráfico de barras que muestra la abundancia relativa de los distintos taxones en la clasificación realizada con GG-NCBI de las bibliotecas de eubacterias. En todas las bibliotecas las α y β Proteobacterias () y las cianobacterias pertenecientes a los órdenes de los Nostocales y Oscillatoriales () fueron los grupos más abundantes.

La clasificación de las bibliotecas de eubacterias generó un patrón similar a la obtenida con RDP. En las cuatro bibliotecas, las Proteobacterias

fueron los taxones dominantes, junto con miembros del phylum Firmicutes en los sitios 7 y 8 y Cianobacterias de los órdenes Nostocales y Oscillatoriales en los sitios 15 y 16. Las *Acidobacterias*, *Actinobacterias*, *Bacteroidetes* y los *Verrucomicrobios*, entre otros, presentaron una baja abundancia en las cuatro bibliotecas (Figura 4.13).

Por otro lado, en las bibliotecas de Cianobacterias se identificaron mayoritariamente secuencias pertenecientes a los órdenes Oscillatoriales y Nostocales. Dependiendo del sitio estudiado, el género dominante cambió pero en general, dentro de los Oscillatoriales, los géneros *Microcoleus* y *Phormidium* fueron los más abundantes, mientras que en los Nostocales, los géneros más abundantes fueron *Cyanospira*, *Anabaena* y *Nostoc* (Figura 4.14).

Aunque en menor abundancia, dentro de los Oscillatoriales también identificamos los géneros *Leptolyngbya*, *Oscillatoria* y *Limnotrix*. Asimismo, dentro de los Nostocales también identificamos secuencias pertenecientes a los géneros *Cyanospira* y *Nodularia*. La muestra m8 fue la más diversa en géneros de Oscillatoriales y Nostocales. Los valores de las abundancias relativas se pueden consultar en el Anexo II A2.6.

Con el par de oligonucleótidos empleado para amplificar el gen de se identificaron secuencias de *Verrucomicrobios*, *Clostridios*, *Planctomycetes*, así como de epsilon-bacterias y *Bacteroidetes* en muy bajas abundancia.

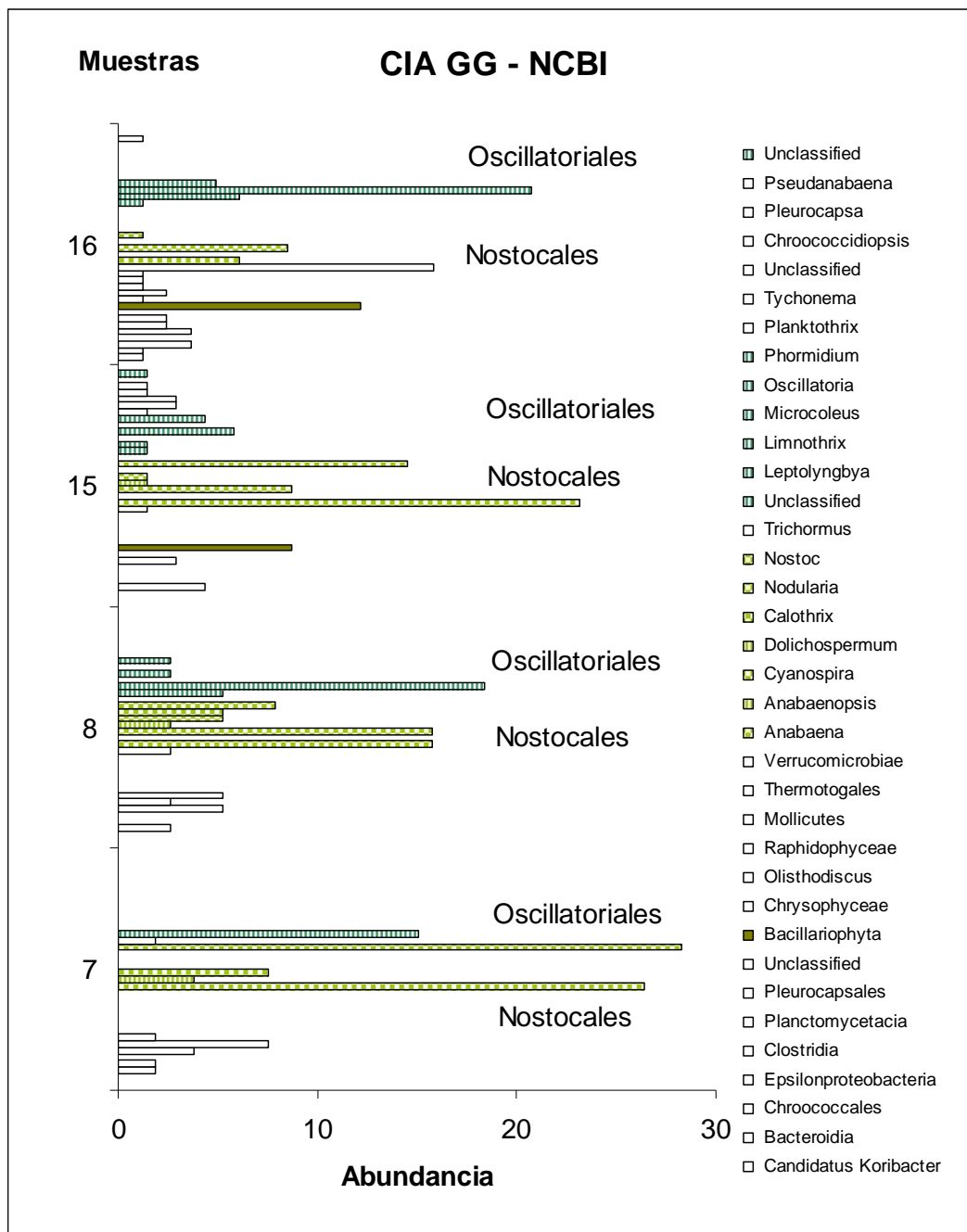


Figura 4. 14 Gráfico de barras que muestra la abundancia relativa de los distintos taxones en la clasificación realizada con GG-NCBI de las bibliotecas de Cianobacterias. En todas las bibliotecas los Oscillatoriales (▨) y Nostocales (▩) fueron los grupos más abundantes. En las muestras m15 y m16 también se identificaron secuencias de Bacillariophyta (diatomeas).

En las dos Tablas siguientes (Tabla 4.6 y 4.7) mostramos los resultados obtenidos con ambos clasificadores (RDP y Green Genes).

Tabla 4. 6 Abundancia relativa de los distintos grupos taxonómicos presentes en las cuatro bibliotecas de Cianobacterias analizadas con *Classify* de RDP y *Classifier* de G-G.

Sitio	RDP 7	GG	RDP 8	GG	RDP 15	GG	RDP 16	GG
Acidobacteria	1	1	1	2	2	2	0	0
Actinobacteria	3	8	1	3	0	3	1	1
Bacteroidetes	5	4	4	5	6	7	8	8
Cloroflexi	2	1	3	2	3	3	0	0
Chroococcales	**	0	**	0	**	7	**	4
Nostocales	**	0	**	0	**	39	**	13
Oscillatoriales	**	0	**	0	**	13	**	13
Prochlorales	**	0	**	0	**	2	**	0
Pleurocapsales	**	0	**	0	**	5	**	0
cia no clasificadas	0	**	0	**	39	**	18	**
stramenopiles	**	0	**	0	**	0	**	8
Viridiplantae	**	0	**	0	**	0	**	3
Verrucomicrobia	**	3	**	2	**	7	*	0
cloroplasto	0	**	0	**	0	**	10	**
Familia I	0	**	0	**	16	**	3	**
Familia III	0	**	0	**	0	**	0	**
Familia IV	0	**	0	**	0	**	3	**
Familia IX	0	**	0	**	5	**	3	**
Familia VI	0	**	0	**	3	**	1	**
Familia VIII	0	**	0	**	3	**	1	**
Familia XIII	0	**	0	**	2	**	4	**
Firmicutes	6	10	14	15	0	0	0	0
Gemmatimonadetes	2	**	3	**	3	**	0	**
Planctomicetes	3	4	3	6	2	3	0	0
alfa proteobacteria	30	27	36	31	3	3	14	10
beta proteobacteria	30	26	28	25	5	5	31	21
gama proteobacteria	5	4	0	2	0	0	0	3
delta proteobacteria	3	5	1	3	0	0	1	3
eub no clasificadas	7	6	3	6	3	0	1	14

Tabla 4. 7 Abundancia relativa de los distintos grupos taxonómicos presentes en las cuatro bibliotecas de eubacterias analizadas con *Classify* de RDP y *Classifier* de G-G.

<i>Sitio</i>	RDP 7	GG	RDP 8	GG	RDP 15	GG	RDP 16	GG
Familia VI	2	**	3	**	0	**	0	**
Familia VIII	2	**	0	**	1	**	1	**
Familia IV	2	**	24	**	4	**	0	**
Familia I	18	**	21	**	22	**	7	**
Familia IX	3	**	5	**	1	**	0	**
Familia XIII	0	**	0	**	1	**	2	**
Familia VI	0	**	0	**	0	**	13	**
Cloroplastos	2	**	0	**	10	**	18	**
Planctomices	3	**	0	**	0	**	3	**
Proteobacteria	0	**	0	**	3	**	1	**
SR1	0	**	0	**	0	**	1	**
Acidobacteria	0	**	0	**	0	**	5	**
eub no clasificadas	6	**	0	**	3	**	5	**
Candidatus Koribacter	**	0	**	0	**	0	**	1
Bacteroidia	**	0	**	0	**	0	**	1
Chroococcales	**	2	**	3	**	4	**	4
Epsilonproteobacteria	**	2	**	0	**	0	**	0
Clostridia	**	0	**	0	**	0	**	4
Planctomycetacia	**	4	**	5	**	0	**	2
Pleurocapsales	**	8	**	3	**	3	**	2
Unclassified	**	2	**	5	**	0	**	0
Bacillariophyta	**	0	**	0	**	9	**	12
Chrysophyceae	**	0	**	0	**	0	**	1
Olisthodiscus	**	0	**	0	**	0	**	2
Raphidophyceae	**	0	**	0	**	0	**	1
Mollicutes	**	0	**	0	**	0	**	1
Thermotogales	**	0	**	0	**	0	**	1
Verrucomicrobiales	2	0	0	3	1	1	12	16
Anabaena	**	26	**	16	**	23	**	6
Anabaenopsis	**	4	**	0	**	0	**	0
Cyanospira	**	8	**	16	**	9	**	9
Dolichospermum	**	0	**	2	**	1	**	0
Calothrix	**	0	**	5	**	1	**	1
Nodularia	**	0	**	5	**	0	**	0
Nostoc	**	28	**	8	**	14	**	0
Trichormus	**	2	**	0	**	0	**	0
Leptolyngbya	**	0	**	18	**	1	**	1
Limnothrix	**	0	**	0	**	0	**	6
Microcoleus	**	0	**	3	**	6	**	21
Oscillatoria	**	0	**	0	**	0	**	5
Phormidium	**	0	**	3	**	4	**	0
Planktothrix	**	0	**	0	**	1	**	0
Tychonema	**	0	**	0	**	3	**	0
Unclassified	**	0	**	0	**	3	**	0
Chroococciopsis	**	0	**	0	**	1	**	0
Pleurocapsa	**	0	**	0	**	1	**	0
Pseudanabaena	**	0	**	0	**	0	**	1
Bacillariophyceae	**	0	**	0	**	9	**	0
cia no clasificadas	63	15	47	5	54	3	32	0

4.7 Distribución geográfica de las secuencias

4.7.1 Eubacterias

Empleando un 1% de distancia p en *mothur* para obtener las OTUs representativas de todas las bibliotecas de eubacterias (267 secuencias), obtuvimos 124 OTUs, de las cuales solo 34 mostraron una identidad del 99% o 100% con secuencias depositadas en el NCBI.

Solo 3 de estas secuencias fueron aislamientos, una cianobacteria proveniente del ártico perteneciente al género *Phormidium* (*Phormidium autumnale* Arct-Ph5, Comte, et al., 2007) y dos aislamientos provenientes de un estanque en las montañas trans Antárticas (*Polaromonas* sp. R-36732 y *Brevundimonas* sp. R-37030, Peeters et al., 2010). El resto fueron secuencias de bacterias no cultivables. Como puede observarse en la figura 4.16, La distribución geográfica de las OTUs representativas no fue únicamente Antártica, sino que se extendió en distintos lugares del mapa, hasta el Ártico (Figura 4.15).

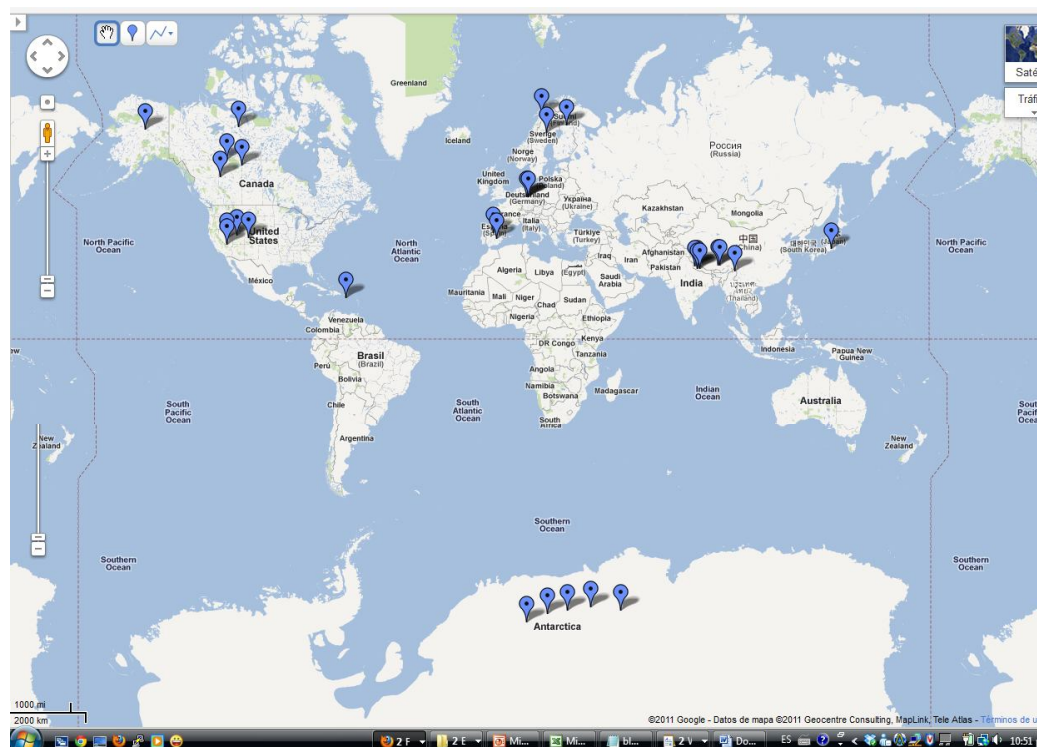


Figura 4.15 Mapa de la distribución geográfica de las secuencias con una identidad mayor o igual 99% con las OTUs representativas de las bibliotecas de eubacterias.

Aunque, notablemente las secuencias que no “mapearon” en la Antártica, igualmente fueron anotadas como provenientes de lugares altos (Himalayas en Nepal, Tibet en China, Pirineos en España) o lugares de altas latitudes (Alaska en USA, glaciares en Suecia y Noruega, ceniza volcánica en Islandia, hielo en el alto Ártico, etc.).

4.7.2 *Cyanobacterias*

Cuando empleamos las secuencias provenientes de las cuatro bibliotecas de cianobacterias, obtuvimos 120 OTUs representativas, de estas 28 tuvieron una similitud del 99% en NCBI con otras secuencias depositadas (Figura 4.16). De las 28 secuencias, solo cuatro fueron de cepas de cianobacterias aisladas del ambiente, dos *Leptolyngbya antarctica* ANT.BFI.1 (Taton *et al.*, 2006) y *Oscillatoria* sp. KNUA009 (Hong & Yoon, 2010) provienen de la Antártida continental, mientras que *Phormidium autumnale* Arct-Ph5 (Comte *et al.*, 2007) proviene del Ártico. Por otro lado, la cepa *Phormidium autumnale* SAG 35.90 (Seigesmund *et al.*, 2008) no tiene descripción de su origen geográfico.

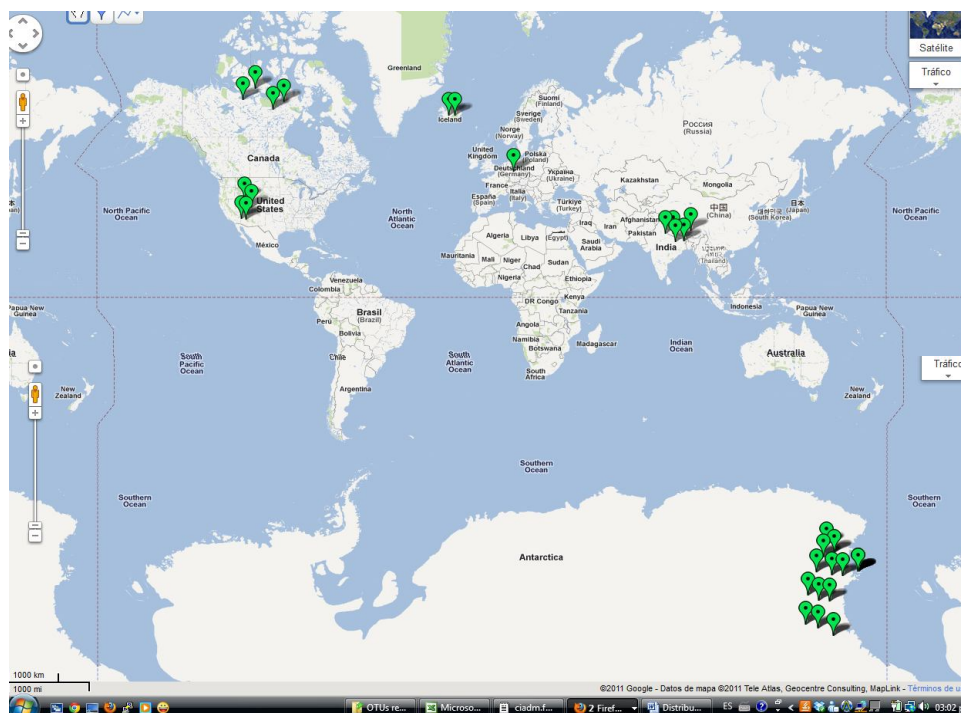


Figura 4.16 Mapa de la distribución geográfica de las secuencias con una identidad mayor o igual 99% con las OTUs representativas de las bibliotecas de Cianobacterias

El resto de las secuencias fueron obtenidas por métodos independientes de cultivo y se anotaron como “no cultivables”. Nuevamente, la distribución geográfica de las secuencias fue en lugares fríos y altos o de altas latitudes. En el caso de las cianobacterias observamos una mayor cantidad de secuencias anotadas como provenientes de la Antártida (12 secuencias de 28), en comparación con las secuencias de eubacterias (4 de 34).

La gran mayoría de las secuencias representativas, tanto de las bibliotecas de eubacterias como de cianobacterias exhibieron similitud con otras secuencias obtenidas de muestras ambientales (hielo de glaciación, nieve, agua de lagos y sedimentos, entre otros), a excepción de un grupo de secuencias provenientes de un proyecto de metagenómica de la piel humana, desarrollado en USA por el NIH Intramural Skin Microbiome Consortium; NISC Comparative Sequencing Program (Kong et al., 2010).

Ninguna de las secuencias representativas mostró identidad con secuencias provenientes de la isla Rey Jorge o de regiones cercanas como la Península Antártica o de la región sub Antártica. Aún cuando se han publicado algunos trabajos que estudian el gen 16S, en dichas regiones (Yergueau *et al.*, 2007, Schiaffino *et al.*, 2009, Texeira *et al.*, 2010).

4.8 Caracterización primaria de aislamientos antárticos y búsqueda de organismos capaces de acumular polihidroxibutirato (PHB) phas y/o triacilglicéridos.

4.8.1 Colección de bacterias heterótrofas y determinación del perfil de crecimiento

Unos 24 aislamientos alcanzaron el máximo de crecimiento (aprox. DO_{620} 0,7) antes de las 48 hrs, mientras que los restantes 21 aislamientos exhibieron un crecimiento apreciablemente más lento (DO_{620} 0,1 aprox. a las 200 hrs de incubación) (Figura 4.17). Este primer ensayo nos permitió descartar los aislamientos que exhibieron un crecimiento lento en estas

condiciones de cultivo. Con el fin de comparar el crecimiento en estas condiciones, empleamos la cepa de *Herbaspirillum seopedicae* Z69 como control positivo (esta cepa acumula PHB) y *Escherichia coli* epi 700 que no acumula PHB como control negativo. Estos organismos nos permitieron luego comparar el crecimiento de nuestras cepas aisladas.

De este modo, seguimos trabajando con aquellos organismos con potenciales aplicaciones biotecnológicas para acumular polímeros biodegradables en nuestras condiciones de trabajo. Los valores de D.O. de todas las curvas de crecimiento se encuentran en el Anexo de este informe como material suplementario (Ver Anexo II, A2.3).

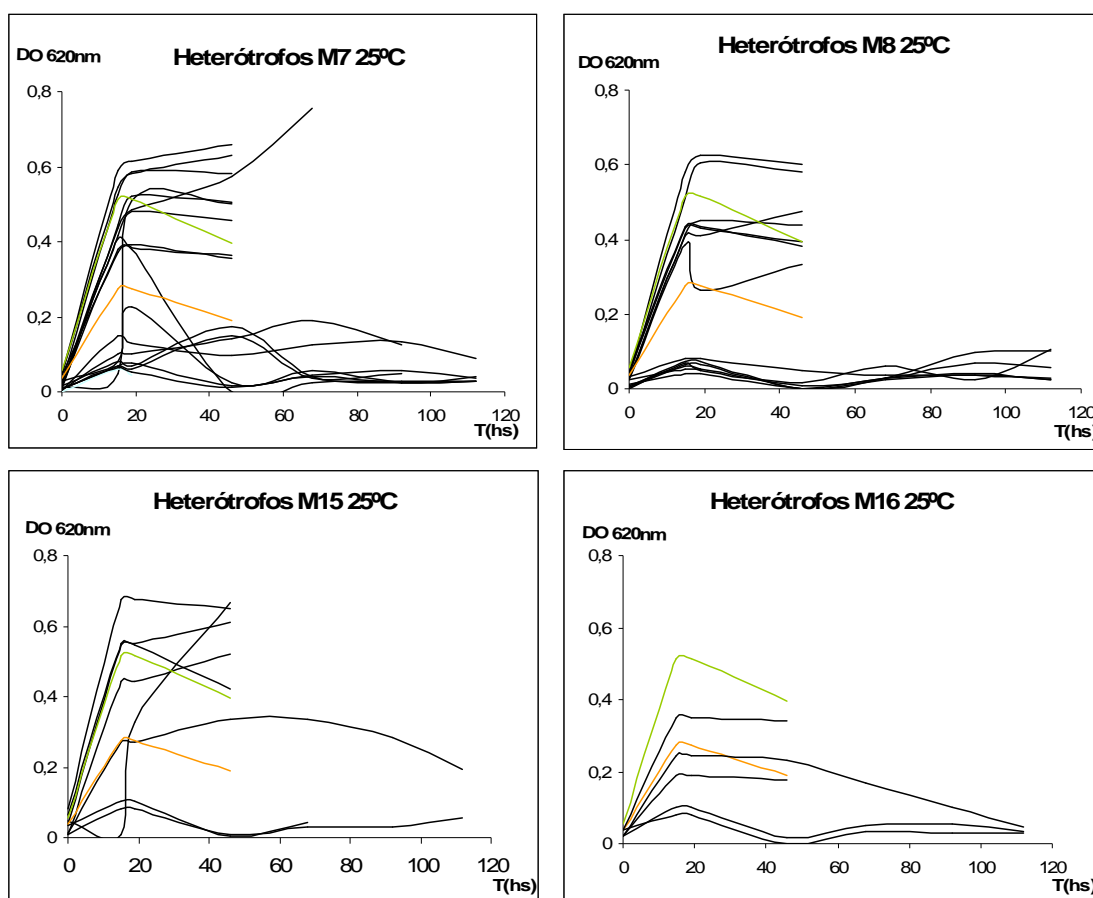


Figura 4.17 Curvas de crecimiento de los aislamientos cultivados a 25°C, obtenidos a partir de cada muestra. A) muestra m7; B) muestra m8; C) muestra m15; D) muestra m16.. Se incluyeron *Herbaspirillum seopedicae* como **control +** (verde) y *Escherichia coli* como **control -** (naranja) EPI300. Los cultivos se realizaron en medio líquido R2A con agitación a 130 r.p.m. El crecimiento celular se estimó por la medida de densidad óptica a 620nm.

4.8.2 Búsqueda de organismos acumuladores de PHB y/o triacilglicéridos: Ensayo de visualización de flourescencia de colonias en presencia de Rojo Nilo

Esta colección de 45 bacterias fue utilizada para seleccionar los organismos capaces de acumular PHAs y/o triacilglicéridos mediante un test sencillo. El medio R2A fue el único en el que obtuvimos un crecimiento relativamente rápido (visualización de colonias en 48 hrs) de todos los aislamientos. Algunos aislamientos no fueron capaces de crecer en los medios LGI y LGI0 y otros exhibieron un crecimiento pobre.

Por otro lado, si bien todos los aislamientos crecieron en las tres concentraciones de glucosa ensayadas (0,5, 6,0 y 10 g/l) (Figura 4.18), escogimos la concentración de 10g/l, debido a que las condiciones óptimas de acumulación de PHAs requieren un exceso de fuente de carbono y la limitación de otro nutriente esencial en el medio. En base a esto, todos los ensayos posteriores fueron realizados en estas condiciones. Con esta técnica identificamos 15 aislamientos como potenciales organismos acumuladores de polímeros de reserva

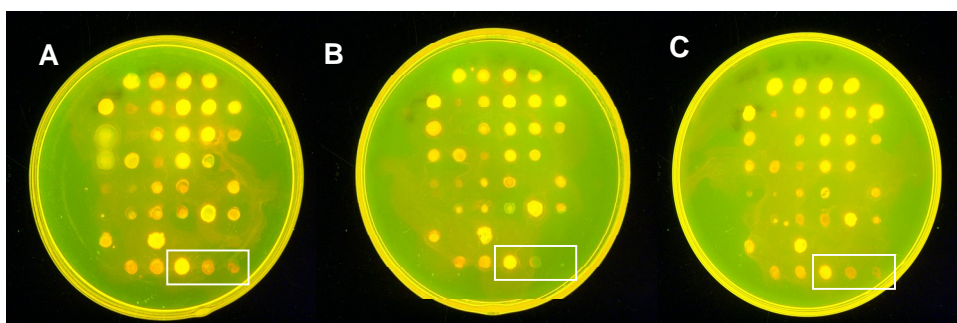


Figura 4. 18 Resultado del ensayo empleando Rojo Nilo para la detección de la acumulación de PHB y/o triacilglicéridos. Foto de los aislamientos cultivados en medio sólido. Las placas de Petri fueron expuestas a luz UV-B. Los 45 aislamientos se cultivaron en medio R2A con A) 0,5, B) 6,0 y C) 10 g/l de glucosa. Los aislamientos cuyas colonias fueron fluorescentes en las condiciones ensayadas, se consideraron como organismos candidatos para evaluar la acumulación de PHAs y/o triacilglicéridos. Recuadro inferior derecho en cada imagen, de izquierda a derecha: control (+) *H. seopedicae* Z69, control (-) *E. coli* epi 700 y blanco, respectivamente.

4.8.3 Búsqueda de organismos acumuladores de triacilglicéridos: ensayo de Cromatografía en Capa Fina (TLC)

Como el colorante rojo Nilo puede teñir tanto PHAs como lípidos, decidimos analizar 12 aislamientos con “alta D.O.₆₂₀”, con el objetivo de establecer si los mismos también acumulaban triacilglicéridos. La subcolección de 12 aislamientos que presentaron resultados positivos a partir del ensayo con Rojo Nilo y que exhibieron un perfil de crecimiento mayor en medio líquido R2A, fue usada para analizar la acumulación de triacilglicéridos. Los otros tres aislamientos que presentaron resultados positivos en el ensayo con Rojo Nilo exhibieron un crecimiento relativamente limitado en medio R2A líquido, por lo que fueron descartados para este ensayo.

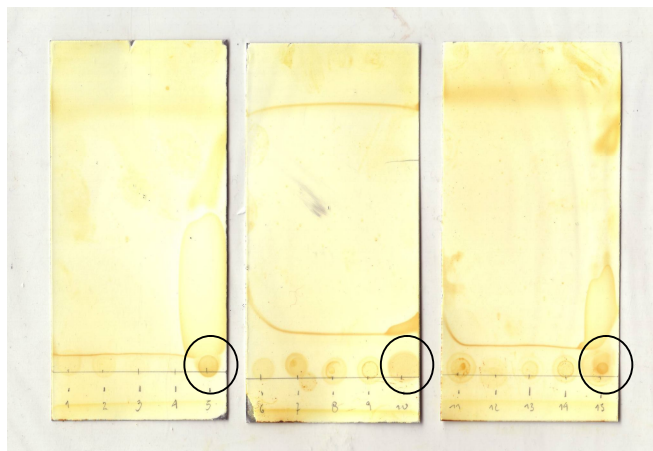


Figura 4. 19 Ensayos de cromatografía de capa fina de cada aislamiento positivo con Rojo Nilo. Se muestra el control positivo (○) en cada placa.

En la Figura 4.19 mostramos los resultados de los ensayos revelados con vapores de yodo. En ninguno de los carriles se identificó la presencia de ácidos grasos en forma de triglicéridos. Empleamos aceite de oliva comercial como control positivo.

4.8.4 Búsqueda de organismos acumuladores de PHB: Identificación del polímero acumulado por Cromatografía Gaseosa (GC-FID)

A partir de los resultados obtenidos con esta técnica, seleccionamos 4 aislamientos que exhibieron un perfil cromatográfico que presentaba un pico con un tiempo de retención correspondiente al 3-hidroxi-butirato de metilo. Estos 4 aislamientos (7-17-33-35) también exhibieron resultados positivos en los ensayos con Rojo Nilo y exhibieron un buen crecimiento celular en medio R2A líquido. En base a estos resultados, seleccionamos estos 4 aislamientos (7, 17, 33 y 35) como productores de PHB para desarrollar los ensayos posteriores.

4.9 Identificación y caracterización molecular de los aislamientos seleccionados

Los cuatro aislamientos seleccionados fueron: 7, proveniente de la muestra 7; el aislamiento 17, proveniente de la muestra 8 y los aislamientos 33 y 35, aislados de la muestra 15. Se realizó la tinción de Gram cada cepa y se determinó que las cepas 7, 17 y 33 fueron Gram -, mientras que la cepa 35 fue Gram +. Las colonias de los aislamientos 7, 17 y 33 exhibieron características morfológicas casi idénticas aunque fueron aislados de distintas muestras ambientales. En el medio R2A formaron colonias mucosas de color blanco, brillantes, de borde continuo y con relieve. Los tres aislamientos, presentaron una morfología celular de bacilos Gram⁻, al ser visualizados por tinción de Gram en microscopio óptico.

Las colonias del aislamiento 35 también fueron de color blanco grisáceo pero de textura más rugosa y opaca, de borde ondeado y poco relieve. Este aislamiento presentó una morfología de bacilo Gram⁺ al visualizarlo en el microscopio óptico. En la Figura 4.20 se muestra el aspecto de los cuatro aislamientos al ser cultivados en medio sólido R2A.

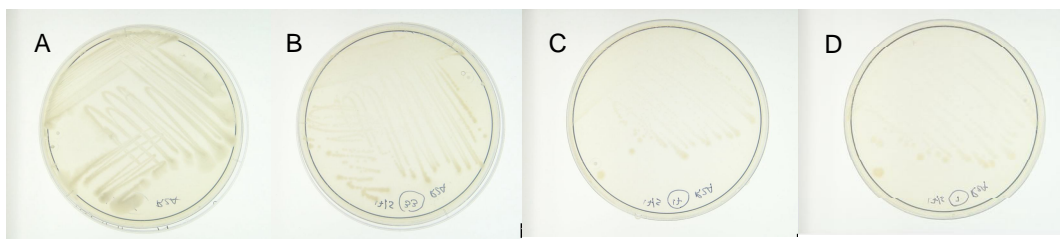


Figura 4.20 Fotografía de los aislamientos seleccionados en este trabajo. Colonias de los cuatro aislamientos en medio sólido R2A. A) aislamiento 35; B) aislamiento 33; C) aislamiento 17 y D) aislamiento 7.

4.9.1 Identificación filogenética de los organismos seleccionados

Obtuvimos extractos de ADN de concentración elevada y sin evidencia de degradación. Como puede observarse en la siguiente figura (Figura 4.21), los perfiles electroforéticos de cada una de las cuatro preparaciones exhibieron bandas de alto peso molecular, intensas y bien definidas, lo que indica la buena calidad de ADN purificado. Estos extractos fueron empleados como template para realizar todas las reacciones de PCR de este trabajo.

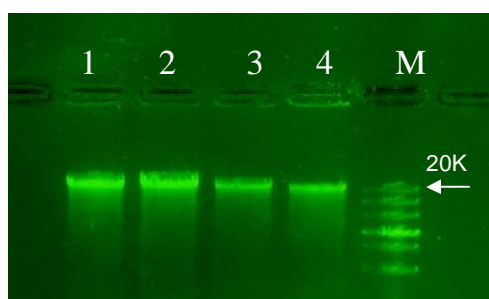


Figura 4. 21 ADN genómico de los aislamientos seleccionados. Fotografía de un perfil electroforético en gel de agarosa 1% teñido con bromuro de etidio, en el cual observamos el ADN genómico de los cuatro aislamientos analizados en este trabajo. Carriles: 1) aislamiento 7; 2) aislamiento 17; 3) aislamiento 33; 4) aislamiento 35; M) Marcador molecular.

Luego, identificamos los 4 aislamientos productores de PHAs mediante el análisis de secuencia del gen 16S ARNr. Dichos aislamientos resultaron tener una identidad del 99%, a lo largo de toda la secuencia, con miembros del género *Pseudomonas* (3 aislamientos) y *Bacillus* (1 aislamiento). Los resultados fueron concordantes cuando se compararon con distintos repositorios de secuencias como el Genbank de NCBI y el de Green Genes?.

Las secuencias de ARNr de 16S obtenidas de cada aislamiento pueden consultarse en el Anexo (Ver Anexo II, A2.1).

Aislamiento	Identidad en el RDP	Longitud de la secuencia (nt)
7	Bacteria; "Proteobacteria"; Gammaproteobacteria; Pseudomonadales; Pseudomonadaceae; Pseudomonas	938
17	Bacteria; "Proteobacteria"; Gammaproteobacteria; Pseudomonadales; Pseudomonadaceae; Pseudomonas	942
33	Bacteria; "Proteobacteria"; Gammaproteobacteria; Pseudomonadales; Pseudomonadaceae; Pseudomonas	939
35	Bacteria; "Firmicutes"; "Bacilli"; Bacillales; Bacillaceae	940

Tabla 4. 8 Identificación de los 4 aislamientos seleccionados mediante la comparación del gen 16S ARNr con el banco de secuencias del RDP (<http://rdp.cme.msu.edu/>) empleando Seqmatch.

4.9.2 Amplificación y análisis de secuencia de los genes que codifican para las enzimas polihidroxicanoato sintasas (*phaC* y *phaC1*)

Mediante PCR y usando como templado el ADN genómico purificado a partir de cada aislamiento, amplificamos parte de los genes que codifican para las enzimas PHA sintasa (*phaC*) clase I y clase II, descritas en la página 16 de la Introducción de este trabajo (Figura 4.22).

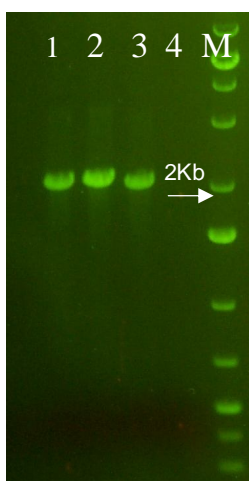


Figura 4. 22 Productos de PCR de la PhaC sintasa de clase II. Fotografía de un perfil electroforético en gel de agarosa 1%, teñido con bromuro de etidio, en el cual observamos los productos de PCR obtenidos con los oligonucleótidos E1 partir de los cuatro aislamientos Carriles: 1) aislamiento 7; 2) aislamiento 17; 3) aislamiento 33; 4) aislamiento 35; M) Marcador molecular.

Logramos amplificar fragmentos del tamaño esperado para el gen *phaC* clase I a partir de los aislamientos 7 y 17. En el caso de la reacción de PCR para el gen *phaC* clase II, amplificamos fragmentos de tamaño esperado a partir de los aislamientos 7, 17 y 33. Dentro de los productos de PCR de clase II, obtuvimos bandas de tamaño esperado con los pares de oligonucleótidos *phaC*-E1 a partir del ADN de dos aislamientos (7 y 17), mientras que con el par *phaC*-E2 obtuvimos bandas de tamaño esperado a partir de tres aislamientos (7, 17 y 33).

Por otro lado, no logramos obtener productos de amplificación a partir del genoma del aislamiento 35 (*Bacillus*) en ninguna de las reacciones, aún cuando agregamos DMSO a la reacción de PCR. El ADN genómico a partir de los cuatro aislamientos se purificó mediante un kit comercial. No se observaron diferencias en los perfiles electroforéticos obtenidos a partir de las cuatro preparaciones, tanto en lo que refiere a las intensidades relativas como a la integridad aparente del ADN. Debe indicarse asimismo que a partir del ADN del aislamiento 35 pudo amplificarse el gen 16S ARNr, lo que sugiere que no habría inhibidores de la reacción de PCR que pudiesen interferir con la amplificación

Secuenciamos los productos de amplificación obtenidos empleando los cebadores del gen *phaC* clase I. Al analizar la secuencia obtenida a partir del aislamiento 17 mediante Blastn (GenBank), obtuvimos un único *hit*. Esta secuencia exhibió una identidad del 99% (a lo largo de 462 nucleótidos) con el gen que codifica para una polihidroxibutirato sintasa clase I de la cepa de *Pseudomonas sp* PC17. Al comparar la secuencia obtenida a partir del aislamiento 7, también se obtuvo un único *hit*, aunque mostró un 89% de identidad con la misma secuencia (a lo largo de 453 nucleótidos).

Lamentablemente, las secuencias correspondientes el resto de los productos obtenidos con los oligonucleótidos para la sintasa de clase II no lograron ser secuenciados en el marco de este trabajo y por ende no serán

discutidas. En la Tabla 4.9 resumimos los resultados de los productos de PCR obtenidos con los distintos juegos de cebadores utilizados en esta etapa

Tamaño fragmento Cebadores Aislamiento	<i>phaC</i> de clase I	<i>phaC</i> de clase II	
	500pb phaC	1965pb E1	2335pb E2
7	+	+	+
17	+	+	+
33	-	-	+
35	-	-	-

Tabla 4. 9 Productos de PCR obtenidos con los distintos juegos de cebadores utilizados en esta etapa.

4.9.3 Fingerprinting de los aislamientos seleccionados: rep-PCR

En la Figura 4.23 mostramos los perfiles electroforéticos obtenidos para cada aislamiento por duplicado. Los perfiles de los aislamientos 7 y 17 fueron casi idénticos, mientras que los aislamientos 33 y 35 presentaron perfiles únicos y distintos a los otros dos.

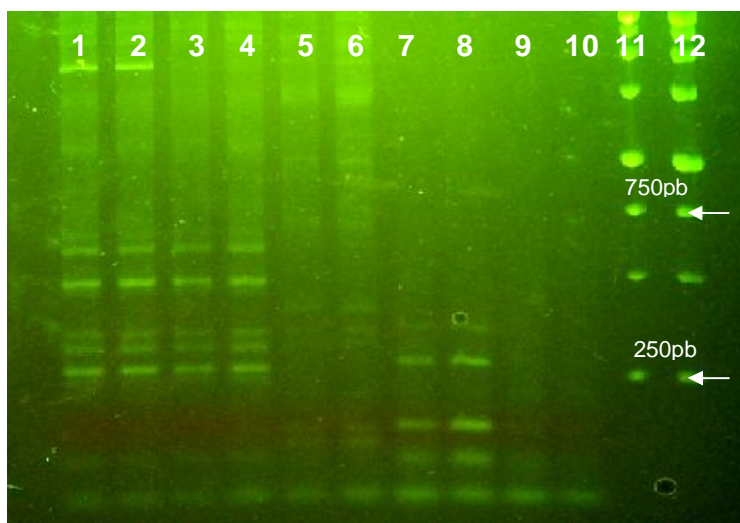


Figura 4. 23 Fotografía de un perfil electroforético en gel de agarosa al 1,2% w/v, teñido con bromuro de etidio, en el cual observamos los distintos perfiles obtenidos en el rep-PCR para los cuatro aislamientos seleccionados. Carriles: 1-2: aislamiento 7; 3-4: aislamiento 17; 5-6: aislamiento 33; 7-8: aislamiento 35; 9-10: Control negativo; 11-12, Marcador Molecular.

Las distintas bandas amplificadas tuvieron tamaños menores a 250pb y hasta 750pb.

4.10 Ensayos en lote de los aislamientos identificados, para determinar la acumulación de polímeros

Se realizaron ensayos en lote con los 4 aislamientos seleccionados para estimar la cantidad de PHB acumulado. Para esto, se cultivaron los aislamientos en medio R2A (10g/l de glucosa) por 48 hrs a 25°C. Una vez finalizada la incubación, se colectaron alícuotas de cada cultivo para analizar la biomasa generada (peso seco de células por unidad de volumen de cultivo), la concentración de polímero (peso de PHB por unidad de volumen de cultivo) y contenido de PHB (porcentaje de PHB en relación al peso celular seco; concentración de PHB/biomasa x 100). En la Tabla 4.10 se detallan los resultados obtenidos en estos ensayos.

Aislamiento	Biomasa (g/l)	PHB (g/l)	% PHB
7	2,362	1,044	44,2
17	2,269	1,497	70
33	1,943	0,994	51,1
35	0,390	0,381	98

Tabla 4.10 Resultados de los ensayos en lote expresados en biomasa (g/l), concentración (g/l de PHB) y contenido en PHB (% en relación al peso seco) de los 4 aislamientos seleccionados en este trabajo.

Obtuvimos biomásas comparables en los ensayos con los aislamientos del género *Pseudomonas*, y a su vez, considerablemente mayores que la del aislamiento 35, del género *Bacillus*. Por otra parte, el contenido (%) de polímero fue bastante superior (70%) en uno de los aislamientos de *Pseudomonas* y en el aislamiento de *Bacillus* (98%). Este último valor quizás se deba a que la etapa de lisis celular con hipoclorito, incluida en el protocolo para extraer el polímero (ver Anexo I, A1.13), no fue efectiva para lisis de las células del aislamiento 35. En base a estos resultados, el aislamiento 17, correspondiente al género *Pseudomonas*, sería el que mayor cantidad de polímero acumularía en las condiciones ensayadas, tanto en contenido como en

concentración de PHB. De hecho, el porcentaje de polímero sería comparable al descrito para *H. seropedicae* Z69 (referencia), aunque la biomasa generada en el mismo período de tiempo fue considerablemente inferior.

4.11 ¿La diversidad molecular contiene los aislamientos seleccionados?

Cuando realizamos la búsqueda de los aislamientos en las bibliotecas de eubacterias, empleando el gen ARNr de 16S, hallamos que notablemente en todos los casos las secuencias de organismos cultivables se agruparon separadas de las secuencias obtenidas en las bibliotecas. Es decir, las tres secuencias de las *Pseudomonas* (cepas 7, 17 y 33) se agruparon en una única OTU de tres secuencias distinta de aquellas otras que también contenían tres secuencias. El *Bacillus* también se ubicó separado en una OTU única con solo una secuencia.

En la Figura 4.24 el histograma muestra la distribución del número de secuencias por OTU calculada. En esta figura destacamos la OTU 25 que contiene las tres secuencias de los aislamientos pertenecientes al género *Pseudomonas* aislados en este trabajo y la OTU 69 que contiene únicamente la secuencia del aislamiento perteneciente al género *Bacillus*. Como mencionamos anteriormente, si bien obtuvimos más de una OTU conteniendo tres secuencias, las obtenidas a partir de los aislamientos y aquellas obtenidas a partir del ADN ge

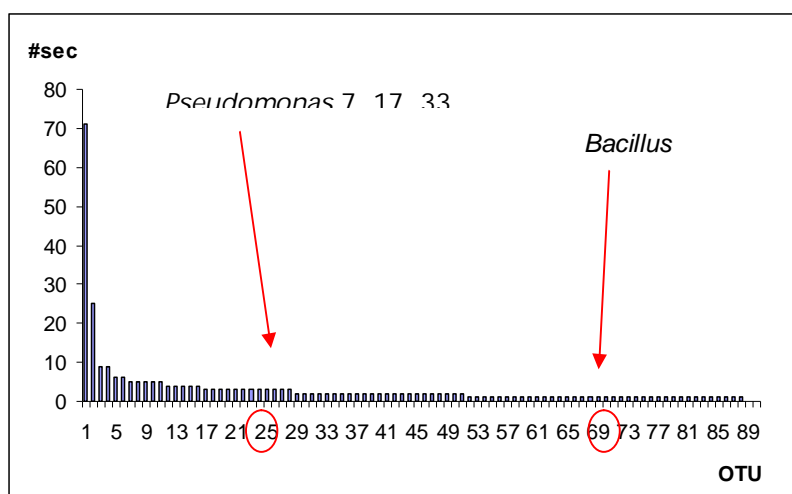


Figura 4. 24 Histograma que muestra el número de secuencias por OTU. Las OTUs fueron calculadas con un cutoff del 99% empleando el programa mothur. Las OTUs conteniendo las secuencias de *Pseudomonas* y *Bacillus* aislados en este trabajo se destacan en rojo.

5 DISCUSIÓN

5.1 *Diversidad microbiana*

En este trabajo describimos la diversidad de microorganismos presentes en un tipo de ecosistema característico de la Antártida marítima. Los resultados obtenidos pueden interpretarse como una fotografía “instantánea” de dichas comunidades durante el verano. Las matas microbianas son ecosistemas en microescala, relativamente diversos y por ende, muy interesantes desde la perspectiva de la Ecología Microbiana. Decidimos estudiar tres grandes grupos taxonómicos: Bacterias (eubacterias), Cianobacterias, previamente descritas como los organismos dominantes en este tipo de ecosistema (Vincent, 2000) y arqueas.

5.1.1 *Colección de muestras y secuenciación de bibliotecas*

En el momento de la colecta todas las matas exhibieron un aspecto y características fisicoquímicas similares. Aunque luego, los análisis de contenido de carbono y nitrógeno totales presentaron valores similares a excepción del sitio 16, en el cual el contenido de N fue superior al resto y el de C fue notoriamente inferior. Quizás esta diferencia se explique por la presencia de fecas animales en las cercanías del sitio de colecta, aportando N al sistema.

Si bien la información que puede ser extraída de estos valores es valiosa y se emplea en el estudio de tramas tróficas en distintos ecosistemas, no encontramos estudios similares que analizaran estos datos. Por este motivo es difícil discutir acerca de cómo podrían correlacionarse las diferencias entre las distintas comunidades microbianas y los valores de sus isótopos estables.

En lo que refiere a la construcción de las bibliotecas de amplicones, deseamos mencionar algunas etapas del protocolo elegido que probablemente hayan contribuido a que las preparaciones de ADN no fuesen lo suficientemente puras. Algunos compuestos, como los exopolisacáridos (EPS),

podieron haber inhibido parcialmente las reacciones de PCR. El método de aislamiento de ADN de Griffith y col. (2000) probablemente no logre eliminar completamente los EPS y esto pudo causar problemas durante la amplificación del gen ARNr de 16S. Para lograr obtener un producto de tamaño esperado ensayamos distintas condiciones de reacción (concentraciones de Mg^{2+} , DMSO, etc.), distintas enzimas polimerasas comerciales (Invitrogen™, Fermentas®, SBS®, entre otras) e inclusive distintos oligonucleótidos como cebadores reversos (1492r o 1525r). Estos problemas podrían haberse solucionado empleando *kits* comerciales para la extracción de ácidos nucleicos.

En la etapa de secuenciación obtuvimos un rendimiento de aproximadamente 60% en la cantidad de *reads* obtenidos. El equipo empleado puede haber limitado la eficiencia de esta etapa. Finalmente, durante la etapa de *filtrado* de estas secuencias (calidad de la secuencia, longitud, quimeras, etc.), este rendimiento disminuyó a aproximadamente un 50%.

En conclusión, de las 144 secuencias esperadas en cada biblioteca, obtuvimos en promedio 70 secuencias en las bibliotecas de eubacterias y 60 en la bibliotecas de Cianobacterias. Empleamos así un total de 529 secuencias en el análisis de diversidad de las cuatro muestras.

Las secuencias mencionadas en el párrafo anterior pertenecen a las bibliotecas de eubacterias y cianobacterias y no incluimos secuencias de arqueas. En el caso de las arqueas, si bien obtuvimos un producto de PCR del tamaño esperado, que a su vez fue empleado para construir las bibliotecas de amplicones, el análisis de secuencia indicó que las mismas pertenecían a bacterias y cianobacterias. Atribuimos estos resultados a una amplificación inespecífica del gen de interés, causada por la baja abundancia de este grupo taxonómico en la comunidad. Esta idea es congruente con otros trabajos realizados en este tipo de muestra en la Antártida (Singh, 2009, Poinitng *et al.*, 2009).

Otra hipótesis que explique esto podría ser la selectividad del oligonucleótido reverso (1492r), empleado para amplificar el gen ARNr de 16S

de arqueas de la comunidad (Vissers et al. 2009). Este oligonucleótido es universal tanto para Bacterias como para Arqueas, por lo que si en las comunidades las arqueas se encontraban en baja abundancia, deberíamos haber empleado un cebador más específico de este grupo de organismos.

5.1.2 Análisis de diversidad basados en OTUs

En una primera instancia, realizamos los análisis de diversidad considerando las OTUs, definidas en base a una identidad mínima del 97 %. En el análisis empleamos secuencias de aproximadamente 400 nucleótidos. Las curvas de rarefacción indicaron que la diversidad presente en cada sitio no fue cubierta satisfactoriamente con la cantidad de secuencias que utilizamos. Esta idea se evidencia observando que ninguna de las curvas alcanzó la región de saturación. Las curvas de rarefacción no se saturaron porque la cantidad de secuencias analizadas en cada biblioteca fue relativamente baja (40-90 secuencias). Este problema probablemente se resuelva aumentando el número de secuencias a analizar.

Siguiendo esta línea de pensamiento, se han publicado recientemente una serie de estudios en los cuales se ha secuenciado de forma masiva el metagenoma presente en distintos ambientes polares (Bowman *et al.*, 2010, Chu *et al.*, 2010, Texeira *et al.*, 2010). En estos trabajos se ha empleado la técnica de pirosecuenciación (Ronaghi *et al.* 1996) para describir la diversidad microbiana, y si bien se analizaron decenas de miles de secuencias, tampoco lograron construir curvas de rarefacción saturadas. Estas curvas construidas a partir de miles de secuencias, serían más útiles para identificar o detectar miembros “raros” (poco frecuentes) de la comunidad, que para describir la diversidad del sistema en estudio.

Debido a las limitaciones de la técnica que utilizamos en nuestro trabajo, no logramos detectar los miembros “raros” o poco frecuentes en cada comunidad. Por esta razón, nuestro estudio se limita entonces a la descripción de los grupos más abundantes. Aún así, la metodología empleada es una de

las más adecuadas para los objetivos planteados, en comparación con las basadas en el estudio de organismos cultivables.

Luego de construir las curvas de rarefacción calculamos los índices de diversidad de Shannon y Chao1. Aunque los valores calculados no fueron representativos de la “real” diversidad en el ambiente, igualmente fueron útiles para comparar la diversidad entre los distintos sitios. De este modo, ambos índices presentaron valores similares en los cuatro sitios analizados (tomando en cuenta los intervalos de confianza de cada valor). Esta tendencia fue la misma para las bibliotecas de Cianobacterias y de eubacterias.

En cuanto al índice de Shannon, obtuvimos valores comparables con los obtenidos en otros trabajos en los que se usaron estrategias similares (DGGE y clonado), a partir de suelos de la Antártida (Pin *et al.*, 2010, Li *et al.*, 2006). El rango de valores de H en estos trabajos fue de H~2-4 cuando se emplearon entre 100 y 300 secuencias. Cuando se estudió por pirosecuenciación la diversidad de las comunidades microbianas asociadas al pasto antártico (*Deschampsia antarctica*) en la Isla Rey Jorge, el H aumentó a H~5 (Texeira *et al.*, 2010). Sin embargo, la información disponible no permite discernir el grado de contribución de dos importantes factores en esta diferencia. Por un lado, puede haber contribuido las diferentes cantidades de secuencias empleadas en cada tipo de estudio (del orden de cientos para los estudios realizados por DGGE y clonado y del orden de miles para la pirosecuenciación) y por el otro, la diversidad microbiana de la rizósfera de la planta, que puede ser mayor que la presente en suelos y matas.

5.1.3 Análisis de diversidad taxonómica

Para establecer la identidad de los organismos que integraban estos consorcios microbianos, comparamos las secuencias obtenidas con secuencias depositadas en bancos de datos de libre acceso en Internet. Los repositorios del gen ARNr de 16S empleados en este trabajo fueron NCBI-Genbank en *Green Genes* y *RDPII*. Los resultados obtenidos con *RDPII* y *Green Genes*

fueron similares al analizar las bibliotecas de eubacterias. Las bibliotecas de Cianobacterias no dieron resultados concordantes entre sí, por esto escogimos la clasificación del *Green Genes* para discutir los resultados, ya que la taxonomía utilizada por el *RDPII* se basa en el agrupamiento por Familias, criterio menos difundido y más confuso para interpretar los resultados. Además, con el clasificador de *RDPII*, la gran mayoría de las secuencias de las bibliotecas de Cianobacterias presentaron similitud con las secuencias de cianobacterias no clasificadas (*Unclassified*). Esto último no aporta información para el análisis, por lo que discutiremos todos los resultados obtenidos usando el clasificador de *Green Genes* y la opción *NCBI-Genbank* como repositorio de secuencias.

i) Eubacterias

Dentro de las bibliotecas de eubacterias, las Proteobacterias fueron los miembros más abundantes en los cuatro sitios estudiados. En general, las Proteobacterias suelen ser los grupos bacterianos más numerosos en suelos de ambientes de la Antártida marítima (Li *et al.*, 2006, Yergeau *et al.*, 2007, Pin *et al.*, 2010). En este trabajo, la mayoría de las secuencias (60-70% aproximadamente), pertenecieron a las clases α y β -Proteobacterias.

Las α proteobacterias tanto como las β proteobacterias son grupos muy diversos que contienen una gran variedad de géneros y de funciones metabólicas. Por ejemplo, dentro de las α proteobacterias se encuentran bacterias fotótrofas y patógenos de animales. Mientras que, dentro de las β preteobacterias se encuentran muchas bacterias aerobias y facultativas pero también se ubican bacterias quimiolitótrofas (Garrity, 2005).

En la clasificación realizada con el RDP, observamos que las α -Proteobacterias mostraron similitud principalmente con dos órdenes, los Rhodobacterales que serían bacterias fotosintéticas y Sphingomonadales que son organismos quimioheterótrofos aerobios. Asimismo, en otros trabajos realizados en suelos de esta región, se han relacionado las α -Proteobacterias

con la presencia de bacterias metilotróficas que participarían en el ciclo del C, oxidando el metano del ambiente (Yergeau *et al.*, 2008).

Las secuencias clasificadas como β -Proteobacterias, mostraron similitud con integrantes de orden Burkorderiales, este grupo de bacterias se caracteriza por tener genomas grandes con una gran variedad de funciones, siendo algunos géneros patógenos de plantas y animales (Garrity, 2005).

Por otro lado, cuando observamos los géneros de α - y β -proteobacterias presentes en las bibliotecas (305 secuencias) empleando el mismo clasificador (Classifier, RDP), encontramos que la gran mayoría de las secuencias de α -Proteobacterias (un 48% las α - proteobacterias) pertenecieron al género Rhodobacter o a secuencias no clasificadas de Rhodobacterales. Cuando observamos los géneros que integran los Sphingomonadales (un 18% de las α -proteobacterias), hallamos que la mayoría de las secuencias no pudieron ser clasificadas.

Las Cianobacterias serían otro de los grupos taxonómicos dominantes junto con el resto de las eubacterias en dos (sitios 15 y 16) de las cuatro bibliotecas estudiadas. Las distintas secuencias presentaron identidad con cianobacterias filamentosas pertenecientes a los órdenes Nostocales y Oscillatoriales. Estos resultados se correlacionaron con las observaciones al microscopio de las muestras (datos no mostrados) en el momento de la colecta. En las muestras provenientes de los sitios 15 y 16, observamos la presencia de abundantes cianobacterias filamentosas.

También identificamos secuencias de Firmicutes (Clostridios) y Bacteroidetes en las cuatro bibliotecas, aunque en menor proporción. Los organismos de ambos grupos han sido descritos como anaerobios (Brenner *et al.*, 2005). También identificamos miembros de Planctomycetes en las cuatro bibliotecas. Estas bacterias marinas sin peptidoglicano, generalmente poseen genomas de gran tamaño, lo que les permite sobrevivir en ambientes “estresantes”. Los Planctomycetes también han sido asociados con el proceso

anamox (oxidación anaerobia de amonio) en ambientes naturales (Shu & Jiao, 2010). Las secuencias halladas en nuestro trabajo pertenecieron a los géneros *Planctomyces*, *Pirelulla* y *Rhodopirellula*, según el clasificador SeqMatch de RDP. Si bien los dos primeros géneros han sido descritos como poseedores de la vía *annamox*, no podemos afirmar que estas secuencias representan a miembros con dicha función.

Otros grupos poco abundantes, presentes en todas las bibliotecas (5-7%), fueron los Verrucomicrobios y Acidobacterias, organismos generalmente difíciles de cultivar y también algunas Actinobacterias.

Cuando analizamos la similitud entre las distintas bibliotecas empleando un análisis de agrupamiento basado en OTUs (*mothur*), confirmamos la diferencia que observamos en la clasificación taxonómica que emplea otro tipo de programas. De este modo, los sitios 7 y 8 fueron más similares entre sí, agrupándose separados del grupo formado por las bibliotecas de los sitios 15 y 16.

Este resultado nos plantea una interrogante acerca de la sucesión de especies que se produciría durante el verano en este tipo de consorcios microbianos. Originalmente se propuso que las cianobacterias serían las precursoras en la colonización y desarrollo de este tipo de biofilms o tapetes (Komárek y Komárek, 1999). En ambientes limitados por nutrientes los organismos fotosintéticos y fijadores de N serían los pioneros.

Aunque, según nuestros resultados, las Proteobacterias serían los organismos más abundantes al comienzo del verano y por lo tanto participarían en el desarrollo de la comunidad durante las primeras etapas y luego, a medida que avanza el verano, comenzarían a crecer las cianobacterias, que hacia final del período, serían junto con las eubacterias, los grupos dominantes en la comunidad. No obstante, es importante tener presente que la metodología empleada no permite realizar observaciones cuantitativas (es un abordaje cualitativo) y que muchas veces las proteobacterias dominan librerías en muchos ambientes, aunque su abundancia real no sea tal.

Si se diera una sucesión estacional, como planteamos anteriormente esta podría fundamentarse también en los tiempos de división celular de cada grupo taxon. Las bacterias, tales como las Proteobacterias, serían *estrategas r*, de crecimiento rápido y por tanto las colonizadoras primarias. Por otro lado, las Cianobacterias podrían ser *estrategas k*, ya que su crecimiento es apreciablemente más lento y son capaces de crecer con escasos recursos ambientales (Langer *et al.*, 2004).

Lamentablemente, el diseño experimental de nuestro trabajo no nos permitió demostrar esta idea, ya que no se colectaron muestras periódicamente a partir de sitios definidos. Por este motivo, las muestras colectadas al comienzo del verano no son comparables con aquellas colectadas al final del mismo. Sería muy interesante entonces, emplear la misma metodología para evaluar los cambios en la diversidad de la comunidad a distintos tiempos, desde el comienzo hasta el fin del verano. Esto permitiría observar la sucesión de especies y corroboraría o refutaría la tendencia que observamos en este trabajo.

En resumen, en el caso de las bibliotecas de eubacterias, la metodología que empleamos nos permitió identificar una gran diversidad de taxones, resolviendo los distintos grupos claramente hasta el nivel de Clase. La resolución taxonómica estaría vinculada a las región del gen analizada, que en nuestro trabajo comprendió las regiones variables V1 y V2 (400pb aproximadamente).

En trabajos recientes se ha propuesto que la región V4 sería la más adecuada para identificar taxonómicamente hasta el nivel de género, cuando se trabaja con secuencias cortas (p. ej.: secuencias provenientes de pirosecuenciación) (Wang *et al.*, 2007, Cole *et al.*, 2009). Quizás esta sea otra de las causas por las cuales se logró resolver las identidades a nivel de Clase y no de Familia o Género.

ii) Cianobacterias

Por otro lado, en las bibliotecas de Cianobacterias, los géneros dominantes pertenecieron a los órdenes Oscillatoriales y Nostocales. Debemos señalar que el oligonucleótido reverso que empleamos fue diseñado para amplificar específicamente cianobacterias filamentosas (Nübel *et al*, 1997). Escogimos analizar las cianobacterias filamentosas debido a que en estudios previos (Callejas *et al.*, 2010), no logramos amplificar el gen empleando oligonucleótidos específicos para cianobacterias unicelulares.

Estos resultados también concuerdan con los obtenidos por Komárek y Komárek (1999) en la Isla Rey Jorge. Debe indicarse, sin embargo, que en estos dos trabajos se usaron metodologías distintas. Los géneros descritos (*Phormidium*, *Leptolyngbia*, *Nostoc*, *Oscillatoria*, etc) por Komárek y Komárek (1999), se describieron mediante microscopía óptica, analizando las características morfológicas, a partir de las muestras naturales sin procesamiento previo. Estos géneros coincidieron con los que identificamos en nuestro estudio (*Microcoleus*, *Phormidium*, *Anabaena*, *Nostoc*, *Cyanospira*, *Oscillatoria* y *Limnotrix*, entre otros), en el cual empleamos una estrategia independiente de cultivo.

Por otro lado, en nuestro trabajo también logramos identificar otros géneros que en principio no pudieron ser detectados mediante microscopía, como *Pleurocapsales*, *Anabaenopsis*, *Calothrix*, *Trichormus*, *Planktothrix* y *Tychonema* entre otros.

Otros organismos identificados en nuestras bibliotecas fueron las diatomeas (Bacillariophyta) y las algas verdes microscópicas (Chrysophyceae, *Olisthodiscus*, Raphidophyceae, *Dolichospermum*, *Chroococidiopsis*), presentes en dos bibliotecas (sitios 15 y 16). Estos fragmentos fueron amplificados con el par de oligonucleótidos utilizado para amplificar de forma específica el gen 16S ARNr de Cianobacterias. La presencia de estas secuencias de diatomeas fue concordante con la observación al microscopio óptico de las muestras al momento de la colecta (datos no mostrados).

En resumen, el análisis de las bibliotecas de Cianobacterias permitió identificar una diversidad de géneros mayor que la obtenida a partir de los estudios por microscopía óptica, publicados anteriormente (Komárek y Komárek, 1999).

En general, es notable la baja resolución taxonómica alcanzada al clasificar las secuencias. En muchas de estas, solo se logró una clasificación a nivel de Familia y en la minoría de los casos se logró definir el género. Esto probablemente se deba a que el clasificador que empleamos (Classify de Green Genes) utilizó el NCBI como banco de secuencias. En este banco de datos se encuentran depositadas más secuencias provenientes de estudios independientes de cultivo que de organismos aislados, lo que dificulta la asignación de categorías taxonómicas. El clasificador de RDP (Classifier) permite la opción de utilizar un subconjunto de secuencias provenientes únicamente de organismos aislados, lo que mejoraría la resolución de la clasificación pero como se mencionó anteriormente, no posee un esquema de clasificación de cianobacterias bueno.

5.1.4 Distribución geográfica de OTUs representativas

En Microbiología existe actualmente un fuerte discusión acerca de si realmente existe una Biogeografía de los microorganismos (con algunas especies cosmopolitas y otras endémicas de ciertas regiones) o si en realidad, se mantiene vigente el postulado de Beijerinck (1898) que sostiene que “todo está en todas partes y es el ambiente el que selecciona”.

En este trabajo encontramos que las secuencias representativas de las bibliotecas tendrían una distribución geográfica a nivel global, es decir, que encontramos la mayoría de las secuencias muy similares a otras presentes en distintas partes del mundo. Aunque algunas secuencias, se encontrarían presentes únicamente en la Antártica, siendo esta tendencia más evidente entre las cianobacterias.

Por otro lado, observamos que notablemente la gran mayoría de las secuencias obtenidas en nuestro análisis, mostraron una alta identidad con secuencias de organismos obtenidos en muestras ambientales de lugares fríos, siendo este un factor común que vincularía todas las secuencias. Otra característica común sería el tipo de ecosistema originario de esas secuencias, que en la mayoría de los casos fue hielo de glaciar, nieve, agua de lagos en lugares fríos y sedimentos. Estas observaciones estarían en concordancia con la idea de los ecotipos (Cohan & Perry, 2007) entre los microorganismos.

Nuestros resultados son concordantes con el trabajo de Schiaffino y cols. (2009) en el cual estudian la diversidad de fitoplancton en una serie de lagos Antárticos, en la Isla rey Jorge, empleando un abordaje independiente de cultivo. En este trabajo si bien se estudia otro tipo de ecosistema, los autores también encontraron que las secuencias de los distintos organismos planctónicos presentes en los lagos, tuvieron una alta identidad con organismos de ambientes fríos distribuidos en distintas partes del mundo. Esta distribución geográfica “global” de los microorganismos antárticos, estaría en discordancia con la idea de que, debido a su aislamiento geográfico el continente Antártico poseería una microbiota encriptada, distinta al resto del mundo.

En nuestros resultados encontramos que la mayoría de los fliotipos estarían distribuidos globalmente, a excepción de algunos que serían endémicos de la Antártica. Aunque, es importante tener presente que este estudio se realizó empleando una única región de un gen (ARNr de 16S) y esto no es suficiente para extrapolar los resultados a organismos completos o comunidades. Sería muy interesante escoger algún género abundante en todos los sitios estudiados y analizarlos mediante un abordaje dependiente de cultivo y técnicas que involucren el genoma completo (por ejemplo técnicas de fingerprinting). Comparando aislamientos obtenidos de la Península de Fildes con cepas aisladas de otros sitios geográficos de la Antártida nos permitiría profundizar el conocimiento acerca de la distribución geográfica de los microorganismos en este continente.

5.2 Búsqueda de organismos acumuladores de PHB y/o triglicéridos

Esta parte del trabajo incluyó el aislamiento de microorganismos heterótrofos a partir de las muestras de los cuatro sitios analizados. Esta colección fue luego usada para buscar y seleccionar organismos productores de triacilglicéridos y/o polihidroxicanoatos (PHAs), con potenciales usos biotecnológicos.

5.2.1 Determinación de las condiciones de cultivo celular

Al establecer una temperatura de cultivo de 25°C y un tiempo de incubación de 48hs excluimos la posibilidad de aislar y trabajar con organismos psicrófilos estrictos. Si bien las bacterias psicrófilas son interesantes desde un punto de vista fisiológico y sobre todo ecológico, en general se considera que son poco abundantes. Esta idea ha surgido a partir de estudios en los que se trabajó con microorganismos antárticos cultivables (Rodríguez y Tiedje, 2008, Peeters *et al.*, 2011).

Algunos investigadores han propuesto que la mayoría de microorganismos presentes en la Antártida serían psicrótrofos o psicrotolerantes y no psicrófilos (Russell *et al.*, 1990, Taton *et al.*, 2006, Peeters, 2011). Además, los organismos psicrófilos no son muy usados en la industria, debido a la necesidad de refrigerar los equipamientos, como por ejemplo los fermentadores, incrementando el costo del proceso.

Por las razones mencionadas anteriormente, escogimos trabajar con aquellos que fueran más adecuados para cumplir con los objetivos planteados en esta parte del trabajo. Es decir, organismos cultivables, heterótrofos, adaptados al frío. Seleccionamos un conjunto de aislamientos presuntamente puros, capaces de crecer a 25°C en medio LB sólido.

Logramos aislar microorganismos a partir de todas las muestras, construyendo una pequeña colección de 45 aislamientos. A partir de las muestras m7 y m8 logramos aislar una mayor cantidad de colonias con

distintas características morfológicas. A partir de la muestra m7, aislamos 17 colonias y de la m8, obtuvimos 14 aislamientos presuntamente distintos. Por otro lado, a partir de la muestra m16 logramos aislar 9 colonias y de m16 sólo 5 (datos no mostrados). La diferencia en el número de colonias obtenidas y su diversidad morfológica quizás se vincule con el período durante el cual las muestras fueran mantenidas en el laboratorio a -20°C previo su procesamiento. Las muestras m15 y m16 permanecieron casi un año en el *freezer* y las muestras m7 y m8 fueron procesadas al mes de la colecta.

El medio R2A, originalmente descrito por Reasoner y col. (1979), ya ha sido empleado para aislar organismos antárticos en distintos trabajos (Gilichinsky *et al.*, 2007, Peeters *et al.*, 2011). Además, este medio resultó ser el más adecuado, ya que permitió el crecimiento de todos los aislamientos en un período de incubación de 24 a 48 horas. Cuando ensayamos el cultivo en los medios LGI y LGI0, el crecimiento fue considerablemente menor y no todos los aislamientos lograron crecer en las condiciones ensayadas.

El medio R2A es un medio semi definido, ya que contiene cas-aminoácidos y extracto de levadura en bajas cantidades, incorporando así varios nutrientes como aminoácidos y vitaminas. Los medios LGI y LGI0 son medios salinos definidos sin vitaminas, cofactores o aminoácidos (Anexo I, A1.10).

En un principio, intentamos trabajar con un medio de cultivo definido (LGI, LGI0), para definir exactamente la composición y concentración de todos los nutrientes. Sin embargo, no todos los aislamientos fueron capaces de crecer en estos medios. El análisis de crecimiento celular y producción de polímero debería incluir un estudio detallado de los requerimientos de cada aislamiento, de modo de diseñar un medio definido para cada uno de ellos. También se debería ajustar el pH, O_2 disuelto y definir la temperatura óptima de crecimiento.

Posteriormente, debería optimizarse el crecimiento y producción de PHB en ese medio, mediante un estudio de diseño factorial con dos variables,

incluyendo por ejemplo, la concentración de la fuente de carbono y de nitrógeno. Al trabajar con un número mayor de aislamientos, optamos por el uso de un medio semi-definido, que nos asegurara el crecimiento de todas las bacterias en un período relativamente corto.

En base a los resultados obtenidos en este ensayo, dividimos los distintos aislamientos en dos categorías: los de crecimiento relativamente mayor y menor, identificados como de “alta D.O.₆₂₀” y “baja D.O.₆₂₀”, respectivamente. Los aislamientos se distribuyeron de forma equitativa entre ambas grupos. El criterio empleado para establecer estas categorías fue el siguiente: los aislamientos de “alta D.O.₆₂₀” alcanzaron valores máximos de D.O._{620nm} comparables (aproximadamente 0,7) a los de los organismos controles, mientras que los de “baja D.O.₆₂₀” alcanzaron valores de D.O._{620nm} considerablemente menores (0,2).

Asimismo, observamos que todos los crecimientos alcanzaron sus valores máximos de D.O._{620nm} alrededor de las 24 hrs de incubación. No obstante, debe recordarse que este fue el perfil de crecimiento obtenido en las condiciones ensayadas, lo que no implica que sean las condiciones ideales de cultivo para todos estos organismos.

5.2.2 Búsqueda y selección de organismos productores de polímeros

La búsqueda de organismos productores de polímeros se basó en tres métodos de análisis: tinción con rojo Nilo, cromatografía de gases (GC-FID) y cromatografía en capa fina (TLC).

A partir de los resultados obtenidos, pudimos establecer que 15 de los 45 aislamientos dieron resultados positivos, sugiriendo su potencial capacidad de acumular polímeros del tipo polihidroxicanoatos (PHAs) o triacilglicéridos. Estos 15 aislamientos tuvieron la capacidad de fluorescer al ser irradiados con luz UV-B, en todas las concentraciones de glucosa ensayadas.

Como puede observarse en la Figura 4.19, tomamos como aislamientos positivos aquellos que exhibieron una intensidad de fluorescencia comparable a la del control positivo.

Este análisis lo efectuamos mediante cromatografía de capa fina. Los resultados indicaron que ninguno de los 12 aislamientos acumulaban triacilglicéridos en las condiciones ensayadas, por lo que presumimos que acumularían distintas clases de PHAs.

5.2.3 Caracterización molecular parcial de los aislamientos seleccionados

Una vez seleccionados los cuatro aislamientos productores de PHB, los identificamos de forma parcial mediante el análisis de secuencia del gen ARNr de 16S. De esta forma, 3 aislamientos (7, 17 y 33) resultaron tener una identidad del 99% con organismos del género *Pseudomonas* y el restante (35) una identidad del 97% con organismos del género *Bacillus*. Casualmente, en un trabajo previo se caracterizó un aislamiento productor de PHB, aislado de un estanque de la Península Antártica, identificado como perteneciente al género *Pseudomonas* sp 14-3 (Ayub *et al.*, 2004 y 2009).

También caracterizamos los cuatro aislamientos mediante REP-PCR (Figura 4.24). El perfil electroforético de los aislamientos 7 y 17 fue casi idéntico y a su vez distinto del correspondiente al aislamiento 33. El perfil del aislamiento 35 fue completamente distinto al del resto.

Luego, empleando el genoma de los cuatro aislamientos como templado, amplificamos el gen que codifica para la enzima principal de la vía de síntesis de PHB (*phaC*, PHA sintasa). Para esto, empleamos tres pares de oligonucleótidos como cebadores. Un par de oligonucleótidos fue diseñado para amplificar el gen de PHA sintasa clase I (*Ralstonia eutropha*) y los otros dos pares de oligonucleótidos fueron diseñados para amplificar los genes de PHA sintasas clase II (*Pseudomonas*).

Logramos obtener productos de amplificación del tamaño esperado para el gen *phaC* clase I a partir del genoma de los aislamientos 7 y 17 y *phaC* clase II a partir de los aislamientos 7, 17 y 33. No logramos obtener productos de PCR al usar el genoma del aislamiento de *Bacillus* como templado con ninguno de los tres pares de cebadores.

Estos resultados serían concordantes con los obtenidos en el REP-PCR. Entre los cuatro aislamientos habría dos *Pseudomonas* muy parecidas entre sí (7 y 17), que contendrían además dos genes que codifican para la PhaC clase I y II. El tercer aislamiento de *Pseudomonas* contendría al menos un tipo de PhaC clase II (aislamiento 33) y el aislamiento caracterizado como *Bacillus* no poseería esta clase de sintasas en su genoma o al menos, el mismo no estaría muy conservado.

Como mencionamos anteriormente, no pudimos amplificar el gen *phaC* a partir del genoma del *Bacillus*, sugiriendo que este aislamiento no poseería el gen de PhaC clase I o II. En cambio, podría poseer en su genoma genes *phaC* clase IV, como ha sido descrito en *Bacillus megaterium* (Singh *et al.*, 2009b). Entonces, se podría confirmar la presencia o ausencia de este gen mediante PCR, empleando cebadores específicos para sintasas de clase IV descritos anteriormente (Satoh, *et al.*, 2002, Hyakutake *et al.*, 2011).

Asimismo, debe tenerse en cuenta que el análisis de secuencia de las PHA sintasas pertenecientes a las cuatro clases, en 45 cepas, mostró una identidad variable entre el 8% y el 96% (Singh *et al.*, 2009b). Esta observación también apoyaría la idea de que no logramos amplificar la sintasa (PhaC) del aislamiento de *Bacillus* (35) y del aislamiento de *Pseudomonas* (33), debido a que los cebadores no fueron los indicados para este grupo de organismos, debiendo emplear otros pares de cebadores.

El análisis de secuencia de los genes *phaC* clase I mediante Blastx (NCBI), mostró que ambos productos de amplificación exhibían similitud, con la de la enzima polihidroxibutirato (PHB) sintasa clase I de *Pseudomonas sp* PC17. La secuencia obtenida a partir del aislamiento 7 tuvo una identidad del

89% (a lo largo de 453 nucleótidos) y la del aislamiento 17, un 99% de identidad con la PHA sintasa de *Pseudomonas sp* PC17 (a lo largo de 456 nucleótidos). Lamentablemente, no pudimos obtener las secuencias de los productos amplificadas con los cebadores diseñados para amplificar los genes *phaC* clase II, a partir de los aislamientos 7, 17 y 33. Esto se debió a que los electroferogramas presentaron demasiado ruido, sugiriendo la presencia de al menos dos secuencias. Esto puede haber sucedido debido a que la amplificación fue inespecífica (a pesar de haber purificado el producto de PCR de una única banda aparente) o a la presencia de más de una copia del gen *phaC*.

Debemos indicar, que en el trabajo en el cual se describen los cebadores para *phaC* de clase II, se empleó la técnica de PCR como herramienta para el *screening* rápido de esta clase de enzima en aislamientos ambientales (Revelo *et al.*, 2007). No obstante, los autores no mencionan haber verificado los resultados positivos (aislamientos ambientales positivos) mediante la secuenciación del producto de PCR.

En base a estos resultados, los tres aislamientos del género *Pseudomonas* (aislamientos 7, 17 y 33) poseerían el gen *phaC* clase I y clase II. Los aislamientos de *Pseudomonas* 7 y 17 poseerían el gen *phaC* clase I y II, mientras que el aislamiento de *Pseudomonas* 33 poseería el gen *phaC* clase II. Debe indicarse, sin embargo, que sólo pudimos analizar las secuencias de 500pb del gen *phaC* clase I de dos de los aislamientos seleccionados (7 y 17).

5.2.4 Evaluación de la capacidad de acumular PHAs de los aislamientos seleccionados

Finalmente, evaluamos de forma preliminar, la capacidad de acumular PHAs de estos cuatro aislamientos mediante ensayos de producción en cultivos en lote. Los tres aislamientos de *Pseudomonas* (7, 17 y 33) alcanzaron un contenido de PHB que varió entre un 40-70% de la biomasa. Este porcentaje es comparable con el alcanzado por el control positivo del ensayo en estudios previos efectuados en condiciones similares (*H. seropedicae* Z69).

Tomando en cuenta este porcentaje de acumulación, los tres aislamientos serían candidatos interesantes para continuar la búsqueda de PHAs.

Debe indicarse, sin embargo, que la biomasa generada por los cuatro aislamientos estudiados fue inferior a la alcanzada por *H. seropedicae* Z69 cultivada en condiciones similares. En el caso de *H. seropedicae* Z69, se obtuvo una biomasa de aproximadamente 3,0 g/l a las 48 hrs de incubación, (Catalán, *et al.*, 2007) mientras que, en las mismas condiciones de ensayo, los aislamientos 7, 17 y 33 alcanzaron una biomasa de aproximadamente 1,5 g/l.

Estos resultados no son definitivos, ya que previamente se debería ajustar el medio y las condiciones de cultivo de cada aislamiento, para optimizar el crecimiento. Una vez definido esto, se debería desarrollar un análisis de diseño factorial de dos variables con punto central, incluyendo como variables la concentración de la fuente carbonada y otro nutriente esencial, para optimizar la biomasa y concentración de PHB acumulado. Por ejemplo, en el caso de *H. seropedicae* Z69 se ha han optimizado las condiciones de cultivo de hasta llegar a una biomasa de 10 g/l en 48 hrs. (Catalán, A.I., 2011, *com. pers.*).

También se debería evaluar la inocuidad desde el punto de vista ambiental y de la salud humana, como factor determinante para determinar su viabilidad como productores de biopolímeros. Esto determinaría la potencialidad de ser aplicados en el área de la Biomedicina.

Los ensayos mencionados anteriormente corresponderían a una etapa de optimización de las condiciones de cultivo y producción, que exceden tanto el tiempo como los objetivos de esta Tesis, por lo que lo planteamos como perspectivas para continuar esta línea de trabajo.

En el caso del aislamiento de *Bacillus* (35), también son válidas las consideraciones acerca de la optimización de las condiciones de cultivo. Esta bacteria generó una biomasa reducida a las 48 horas de cultivo, del orden de 0,5 g/l. Por otro lado, al ser una cepa del género *Bacillus* presentaría la ventaja

de no ser patógena. La cepa de *Bacillus subtilis* capaz de acumular PHB ha sido considerada como segura por la *Food and Drug Administration* en EEUU y es actualmente una cepa ampliamente empleada para la producción de proteínas recombinantes, aminoácidos y químicos finos a gran escala (Singh *et al.*, 2009b).

Los porcentajes de acumulación de PHAs dentro de los *Bacillus spp.* descritos como productores varían entre un 11% hasta un 70 % de su peso seco. Son capaces de sintetizar una variedad de polímeros que van desde el PHB hasta otros copolímeros bastante más complejos (Singh *et al.*, 2009b). Nuestra cepa alcanzó un contenido de PHA del 98% respecto a su peso seco.

Sin embargo, este contenido debería ser considerado con precaución, ya que atribuimos este porcentaje tan alto a problemas de la técnica de extracción del polímero. Probablemente, la etapa de lisis celular con hipoclorito no sea efectiva para este grupo de organismos Gram⁺ y el precipitado que se considera como polímero purificado al final de la extracción, en realidad contenía una cantidad importante de restos de pared celular y células sin lisar. Si bien existen protocolos desarrollados específicamente para la extracción de PHB de *Bacillus*, desistimos de realizarla por la baja biomasa alcanzada. Primero deberíamos optimizar las condiciones de cultivo, para luego optimizar la técnica de extracción del polímero. Nuevamente, esta etapa queda planteada como perspectiva de trabajo.

En resumen, en esta etapa de búsqueda logramos seleccionar cuatro aislamientos bacterianos productores de PHAs. Sin embargo, los resultados obtenidos son muy preliminares y se plantean varias interrogantes acerca de las condiciones de cultivo óptimas para mejorar la biomasa y producción de PHB de los mismos. También resta definir las propiedades y composición de los polímeros, el diseño de técnicas de extracción adecuadas y la identificación del tipo de PHA sintasa de cada cepa. Estas interrogantes a su vez, plantean una nueva línea de investigación que podría desarrollarse en el futuro, ampliando el conocimiento acerca de los distintos mecanismos de sobrevivencia de los microorganismos antárticos.

Queremos destacar que la búsqueda de esta función (acumulación de PHAs) en este ambiente y en particular en este microecosistema, se basó en la amplia diversidad taxonómica y funcional que contienen los tapetes microbianos y la gran variación de condiciones ambientales a las que estos sistemas se encuentran expuestos. Esto resulta en la selección de metabolismos que aseguren el funcionamiento y la sobrevivencia de las células en condiciones estresantes. En los tapetes por ejemplo, el aporte de C (biológicamente disponible) al sistema puede ser muy variable, ya que en principio solo ingresaría a través del aporte de los productores primarios (cianobacterias) o en forma de pulsos ingresados por variaciones en el ambiente. Por lo tanto, sería más probable encontrar algún microorganismo que poseyera la función de interés (acumular C en forma de PHAs) y que además lo hiciera en un rango de bajas temperaturas.

Finalmente, intentando vincular la parte cultivable con la no cultivable en este trabajo, encontramos que la diversidad cultivable no solo no reflejaría la diversidad presente en el ambiente (en este estudio sería que los organismos más abundantes no serían cultivables) sino que además los distintos abordajes (cultivable e independiente de cultivo) estarían revelando distintas diversidades. Esta idea se apoya en el hecho de que las secuencias cultivables no se “mezclaron con aquellas obtenidas por métodos independientes de cultivo.

Aunque, los resultados deben interpretarse con precaución debido a que las cepas seleccionadas tienen un sesgo importante, estas fueron el resultado de una serie de restricciones que pusimos arbitrariamente con el objetivo de seleccionar heterótrofos acumuladores de polímeros. De todos modos este sesgo no explicaría por qué las secuencias no compartieron ninguna OTU, si no que se agruparon en OTUs independientes.

6 CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS

6.1 Conclusiones

Análisis de diversidad

- Observamos diferencias inter-sitio a nivel de *phyum* en la estructura de las bibliotecas de eubacterias:
 - Las α y β Proteobacterias fueron las Clases más abundantes en las bibliotecas m7 y m8, colectadas durante el mes de diciembre del 2008.
 - Por otro lado, las Cianobacterias filamentosas y las α y β Proteobacterias fueron los grupos más abundantes en las bibliotecas de los sitios 15 y 16, colectados.

- Observamos diferencias inter-sitio a nivel de Género en la bibliotecas de Cianobacterias:
 - Si bien los Ordenes Nostocales y Oscillatoriales fueron los más abundantes en los cuatro sitios analizados, el género dominante varió según según el sitio. Los géneros *Anabaena*, *Nostoc*, y *Cyanospira*, pertenecientes al Orden Nostocales y los géneros *Leptolyngbya* y *Microcoleus* pertenecientes al Orden Oscillatoriales fueron los más abundantes.

- Algunos grupos no cultivables como Verrucomicrobia, Plantomyces y Acidobacteria y también algunas diatomeas (*Bacillariophyta*) fueron identificados en baja abundancia.
- No detectamos secuencias de arqueas. Nos plantemos la interrogante de la abundancia de este grupo de organismos. Quizás la metodología empleada no permitió su detección por encontrarse presentes en bajo número.
- No observamos diferencias inter-sitio a nivel de *phylum* en la filogenia de secuencias representativas.
 - Las OTUs representativas en la filogenia de eubacterias pertenecieron principalmente a los taxones: Proteobacterias, Cianobacterias, Bacteroidetes, Acidobacterias, Actinobacterias, Clostridios y Verrucomicrobios. Estos taxones se encontraron presentes en los cuatro sitios, a excepción de las Cianobacterias que no se detectaron en las muestras de los sitios 7 y 8.
 - Las OTUs representativas en la filogenia de Cianobacterias pertenecieron identidad con miembros del Orden Nostocales.
- Los índices de diversidad no mostraron diferencias claras entre las cuatro comunidades analizadas pero sí observamos diferencias a nivel de la estructura de las distintas comunidades analizadas (dominancia y equitatividad).

Búsqueda de productores de PHB

- Pudimos aislar cuatro cepas heterótrofas a partir de las estudiadas previamente (diversidad) con la capacidad de acumular polihidroxialcanoatos.
- Tres de estos aislamientos fueron pertenecientes al género *Pseudomonas* (7, 17, y 33) y el cuarto a *Bacillus* (35).
- Una de estas cepas (17) sería un buen candidato para continuar con los estudios de acumulación de PHB.

6.2 Perspectivas

- Proponemos que el análisis de las comunidades microbianas se efectúe empleando estrategias que permitan aumentar la cantidad de secuencias analizadas. Esto se podría lograr con las nuevas plataformas de secuenciación masiva, por ejemplo, la pirosecuenciación. Esta información nos permitirá la identificación de grupos taxonómicos en baja abundancia.
- Consideramos que sería muy interesante estudiar la sucesión de especies en los consorcios microbianos durante el verano, desde un abordaje filogenético. Esto aún no ha sido establecido para las matas microbianas antárticas y sería muy valioso conocer cuales especies son pioneras en el desarrollo de estos microecosistemas.
- En lo que refiere a la producción de PHAs, estimamos que debería ajustarse las condiciones de cultivos de los aislamientos seleccionados de modo de optimizar el crecimiento y producción de polímero. También se deberían ensayar diferentes técnicas de purificación de dichos polímeros
- Proponemos continuar la caracterización química de los polímeros acumulados por los aislamientos seleccionados en este trabajo y describir la estructura de los polímeros empleando GC-MS, al ser cultivados en presencia de otras fuentes de carbono

BIBLIOGRAFIA

- Adams, D. G. and Duggan, P. S. (1999) Transley Reviews. Heterocyst and akinete differentiation in cyanobacteria. *New Phytol.* **144**: 3-33.
- Ainley, D., Barrett, P., Bindschadler, R., Clarke, A., Convey, P., Fahrbach, E., Gutt, J., Hodgson, D., Meredith, M., Murray, A., Pörtner, H.O., di Prisco, G., Schiel, S., Speer, K., Summerhayes, C., Turner, J., Verde, C., and Willems, A.(2009) En: The Antarctic Environment in the Global System. Ch1 The Antarctic Environment in the Global System. Editors:John Turner, Robert Bindschadler Pete Convey Guido di Prisco Eberhard FahrbachJulian Gutt Dominic Hodgson Paul MayewskiColin SummerhayesPublished by the Scientific Committee on Antarctic Research Scott Polar Research Institute, Lensfield Road, Cambridge, UK.
- Arun, A., Arthi, R., Shanmugabalaji, V., and Eyini, M. (2009) Microbial production of poly- β -hydroxybutyrate by marine microbes isolated from various marine environments. *Biores Tech* 100:2320-2323.
- Ayub, D., Pettinari, M.J., Ruiz, J.A., and López, N.I. (2004) A Polyhydroxybutyrate-Producing *Pseudomonas* sp. Isolated from Antarctic Environments with High Stress Resistance. *Curr Microbiol* 49:170-174.
- Ayub, N.D., Tribelli, P.M., and López, N.I. (2009) Polyhydroxyalkanoates are essential for maintenance of redox state in the Antarctic bacterium *Pseudomonas* sp. 14-3 during low temperature adaptation. *Extremophiles* 13:59-66.
- Baker,G.C., Smith, J.J. & Cowan, D.A. (2003) Review and re-analysis of domain-specific 16S primers. *J Microbiol Meth* 55 (3):541-555.
- Beijerinck, M. W. (1898). "Über ein Contagium vivum fluidum als Ursache der Fleckenkrankheit der Tabaksblätter" (in German). *Verhandelingen der Koninklyke akademie van Wettenschappen te Amsterdam* **65**: 1–22. Translated into English in Johnson, J., Ed. (1942) *Phytopathological classics*. (St. Paul, Minnesota: American Phytopathological Society) No. 7, pp. 33–52 (St. Paul, Minnesota).

- Berlanga, M. and Guerrero, R. (2007) The hidden side of the prokaryotic cell: rediscovering the microbial world. *Int Microbiol* 10:157-168.
- Berlanga, M., Montero, M.T., Hernández-Borrell, J., and Guerrero, R. (2006) Rapid spectrofluorometric screening of poly-hydroxyalkanoate-producing bacteria from microbial mats. *Int Microbiol* 9:95-102.
- Blümel, W.D. and Eitel, B. (1989) Geocological aspects of maritime climatic and continental periglacial regions in Antarctica (S-Shetland, Antarctic Peninsula and Victoria Land). *Geokodynamics* 10: 201-214.
- Bolhuis, H.H., Palm, P.P., Wende, A.A., Falb, M.M., Rampp, M.M., Rodriguez-Valera, F.F., Pfeiffer, F.F., and Oesterhelt, D.D. (2006) The genome of the square archaeon *Haloquadratum walsbyi*: life at the limits of water activity. *BMC Genomics* 7(1):169.
- Bowman, J.S., Rasmussen, S., Blom, N., Deming, J.D., Rysgaard, S., and Sicheritz-Ponten, T. (2011) Microbial community structure of Arctic multiyear sea ice and surface seawater by 454 sequencing of the 16S RNA gene. *ISME J* 1-10.
- Brandl, H.R., Gross, R.A., Lenz, R.W., and Fuller, R. (1988) *Pseudomonas oleovorans* as a Source of Poly(β -Hydroxyalkanoates) for Potential Applications as Biodegradable Polyesters. *Appl Environ Microbiol* 54:1977-1982.
- Brenner, D.J., Krieg, N.R., Staley, J.T. eds. (2005) Bergey's manual of systematic bacteriology. 2nd ed. Vol.2, the proteobacteria. Garrity GM, editor-in-chief. New York: Springer. Composed of 3 subvolumes, parts A–C. p. 2816.
- Cavalcante, V.A. and Dobreiner, J. (1988) A new acid-tolerant nitrogen fixing bacterium associated with sugar cane. *Plant Soil* 108:23-31.
- Callejas, C., Gill, P.R., Catalán, A.I., Azziz, G., Castro-Sowinski, S., and Batista, S. (2011) Phylotype diversity in a benthic cyanobacterial mat community on King George Island, maritime Antarctica. *World J Microbiol Biotechnol* 27(6):1507-1512. DOI 10.1007/s11274-010-0578-1.

- Casamatta, D.A., Johansen, J.R., Vis, M.L., and Broadwater, S.T. (2005) Molecular and morphological characterization of ten polar and near-polar strains within the Oscillatoriales (Cyanobacteria). *J Phycol* 41:421-438. doi: 10.1111/j.1529-8817.2005.04062.x
- Castenholtz, C. (1992) Species usage, concept, and evolution in the Cyanobacteria (blue-green algae). *J Phycol* 28:737-745.
- Case, R.J., Boucher, Y., Dahllöf, I., Holmstrom, C., and Doolittle, F.W. (2007) Use of 16s rRNA and *rpoB* genes as molecular markers for microbial ecology studies. *Appl Environ Microbiol* 73:278-288.
- Catalan, A.I., Ferreira, F., Gill, P.R., and Batista S. (2007) Production of polyhydroxyalkanoates by *Herbaspirillum seropedicae* grown with different sole carbon sources and on lactose when engineered to express the *lacZlacY* genes. *Enzym Microb Tech* 40(5):1352-1357.
- Chao, A. 1984. Non-parametric estimation of the number of classes in a population. *Scand. J. Stat.* 11:265-270.
- Chen, G.Q. and Wu, Q. (2005) The application of polyhydroxyalkanoates as tissue engineering materials. *Biomaterials* 26:6565-6578.
- Christner, B.C., Kvitko II B.H., and Reeve, J.N. (2003) Molecular identification of bacteria and eukarya inhabiting an Antarctic cryoconite hole. *Extremophiles* 7:177-183.
- Chu, H., Fierer, N., Lauber, C.L., Caporaso, J.G., Knight, R., and Grogan, P. (2010) Soil bacterial diversity in the Arctic is not fundamentally different from that found in other biomes. *Environ Microbiol* 12(11):2998-3006.
- Claesson MJ, O'Sullivan O, Wang Q, Nikkilä J, Marchesi JR, et al. 2009 Comparative Analysis of Pyrosequencing and a Phylogenetic Microarray for Exploring Microbial Community Structures in the Human Distal Intestine. *PLoS ONE* 4(8): e6669.

- Cohan FM & Perry EB (2007) A systematics for discovering the fundamental units of bacterial diversity. *Curr Biol* 17:R373–R386
- Cole, J.R., Chai, B., Farris, R.J., Wang, Q., Kulam-Syed-Mohideen, A.S., and McGarrell, D.M. (2007) The Ribosomal Database Project (RDP-II): introducing myRDP space and quality controlled public data. *Nucleic Acids Res* 35:169-72.
- Cole, J.R., Wang, Q., Cardenas, E., Fish, J., and Chai, B. (2009) The Ribosomal Database Project: improved alignments and new tools for rRNA *Nucleic Acids Res* 37:(Database issue):D141–D145. Publicación online 2009 January doi: 10.1093/nar/gkn879.
- 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.
- Convey, P. and Smith, R.I.L. (2006) Responses of terrestrial Antarctic ecosystems to climate change *Plant Ecol* 182:1-10. DOI 10.1007/s11258-005-9022-2.
- D'Amico, S., Collins, T., Marx, J.C., Feller, G., and Gerday, C. (2006) Psychrophilic microorganisms: challenges for life. *EMBO reports.*, 7(4):385-389 University of Liege, Liege,Belgium.
- Davis, R.C. (1981) Structure and function of two Antarctic terrestrial moss communities. *Ecol Monogr* 51:125-143.
- de la Torre, J., Goebel, B.M., Friedmann, E.I., and Pace, N.R. (2003) Microbial Diversity of Cryptoendolithic Communities from the McMurdo Dry Valleys, Antarctica. *Appl Envir Microbiol* 69:3858-3867.
- de los Ríos, A., Ascaso, C., Wierzos, J., Fernández-Valiente, E., and 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.
- de Santis, T.Z., Hugenholtz, P., Larsen, N., Rojas, M., Brodie, E.L., Keller, K., Huber, T., Dalevi, D., Hu, P., and Andersen, G.L. (2006). Greengenes, a Chimera-Checked 16S rRNA Gene Database and Workbench Compatible with ARB. *Appl Environ Microbiol* 72(7):5069-5072.
- Dion, P. (2008) Ch 3: Extreme Views on Prokaryote Evolution. En: Dion, P. and Nautiyal C.S. (eds.), *Microbiology of Extreme Soils. (Soil Biology)* © Springer-Verlag Berlin Heidelberg. Pp 45-70.
- Ellis-Evans, J.C. (1996) Biological and chemical features of lakes and streams. En: López-Martínez J, Thomson MRA, Thomson JW (eds) *Geomorphological map of Byers Peninsula, Livingston Island. BAS GEOMAP Series, Sheet 5-A. British Antarctic Survey, Cambridge*, pp. 20-22.
- Elster, J. (2002) Ecological classification of terrestrial algal communities in polar environments. En: Beyer L, Bölter M (eds) *Geoecology of Antarctic ice-free coastal landscapes. Springer, Berlin Heidelberg New York*, pp. 303-326.
- Escalante, A.E. 2007 Cap. 12 Ecología molecular en el estudio de comunidades bacterianas En: Eguiarte, L. E., V. Souza y X. Aguirre (Compiladores). 2007. *Ecología molecular. Secretaría de Medio Ambiente y Recursos Naturales. Instituto Nacional de Ecología Universidad Nacional Autónoma de México. Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad. Mexico.*
- Ewing, B., Hillier, L., and Wendl, M.C. (1998) Base-calling of automated sequencer traces using Phred. I. Accuracy assessment. *Genome Res* 8:175-185.
- Felsenstein, J. (1989) PHYLIP-Phylogeny Inference Package (Version 3.2). *Cladistics* 5:164-166.
- Felsenstein, J. (1993) PHYLIP (Phylogeny Inference Package) version 3.5c. Distributed by the author. Department of Genetics, University of Washington, Seattle.

- Fernandez Valiente, E., Quesada, A., Howard-Williams, C., and Hawes, I. (2001) N₂-fixation in cyanobacterial mats from ponds on the McMurdo Ice Shelf, Antarctica. *Microbial Ecol* 42:338-349.
- Fernandez Valiente, E., Camacho, A., Rochera, C., Rico E., Vincent, W.F., and Quesada, A. (2007) Community structure and physiological characterization of microbial mats in Byers peninsula, Livingston Island (South Shetland Islands; Antarctica). *FEMS Microbial Ecol* 59:377-385.
- Folland & T.R. Karl. (2001) Observed climate variability and change. En: Climate change 2001: the scientific basis (ed. J. T. Houghton, Y. Ding, D. J. Griggs, M. Noguer, P. J. van den Linden, X. Dai, K. Maskell & C. A. Johnson), Cambridge, UK: Cambridge University Press. pp. 99-182.
- Friedmann, E.I. (1993) Antarctic Microbiology. Wiley-Liss. New York, p. 634.
- Garrity, G.M (2005) Bergey's Manual of Systematic Bacteriology. 2. Auflage. Springer, New York, 2005, Vol. 2: The Proteobacteria Part C: The *Alpha*-, *Beta*-, *Delta*-, and *Epsilonproteobacteria*
- 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.
- Guerrero, R., Piqueras. M., and Berlanga, M. (2002) Microbial mats and the search for minimal ecosystems. *Int Microbiol* 5:177-188.
- Gilichinsky, D.A. , Wilson, G.S., Friedmann, E.I., Mckay, C.P., Sletten, R.S. , Rivkina, E.M., Vishnivetskaya, T.A., Erokhina, L.G., Ivanushkina, N.E., Kochkina, G.A., Shcherbakova, V.A., Soina, V.S., Spirina, E.V., Vorobyova, E.A., Fyodorov-Davydov, D.G., Hallet, B., Ozerskaya, S.M., Sorokovikov, V.A., Laurinavichyus, K.S., Shatilovich, A.V., Chanton, J.P., Ostroumov, V.E., and Tiedje, J.M. (2007) Microbial Populations in Antarctic Permafrost: Biodiversity, State, Age, and Implication for Astrobiology. *Astrobiol* 7(2):275-311. doi:10.1089/ast.2006.0012.

- Giri, B., Giang, P.H., Kumari, R., Prasad, R., and Varma, A. (2005) Microbial diversity in soils. In: Buscot F, Varma A. (ed) *Microorganisms in Soils: Roles in Genesis and Functions*. Springer-Verlag, Berlin Heidelberg, pp. 19-55.
- Griffiths, R.I. Whiteley, A.S., O'Donell, A.G., and Bailey, M.J. (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* 66(12):5488-5491.
- Guerrero, R., Piqueras, M., and Berlanga, M. (2002) Microbial mats and the search for minimal ecosystems. *Int Microbiol* 5:177-188.
- Hall, T.A. (1999) BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symp Ser* 41:95-98.
- Hirsch, P., Gallikowski, C.A., Siebert, J., Peissl, K., Kroppenstedt, R., Schumann, P., Stackebrandt, E., and Anderson, R. (2004) *Deinococcus frigens* sp. nov., *Deinococcus saxicola* sp. nov., and *Deinococcus marmoris* sp. nov., low temperature and draught tolerating, UV-resistant bacteria from continental Antarctica. *Syst Appl Microbiol* 6:636-645.
- Hong, J.W. and Yoon, H.-S. (2010) Isolation and characterization of a novel psychrophilic cyanobacterium *Oscillatoria psychrophilias* KNUA009T from an Antarctic meltwater stream. Unpublished, submitted to the NCBI 26 AUG 2010, ID: HQ201392.1 GI:323126241
- Howard-Williams, C. and Vincent, W.F. (1989) Microbial communities in Southern Victoria Land streams (Antarctica).1. *Photosynthesis Hydrobiologia* 172:27-38.
- Howard-Williams, C., Priscu, J.C., and Vincent, W.F. (1989) Nitrogen dynamics in two Antarctic streams. *Hydrobiologia* 172:51-61.
- Hugenholtz, P. 2002. Exploring prokaryotic diversity in the genomic era. *Genome Biology* 3: 0003.1-0003.8.
- Hulton, C.S.J., Higgins, C.F., and Sharp, P.M. (1991) ERIC sequences: a novel family of repetitive elements in the genomes of *Escherichia coli*, *Salmonella*

typhimurium and other enterobacteria. *Mol Microbiol* 5:825-834.
doi: 10.1111/j.1365-2958.1991.tb00755.x

Hughes, J.B., J.J. Hellmann, T.H. Ricketts y J.M. Bohannan (2001) Counting the uncountable:statistical approaches to estimating microbial diversity. *Appl. Environ Microbiol* 67:4399-4406.

Hyakutake, M., Saito, Y., Tomizawa, S., Mizuno, K., and Tsuge, T. (2011) Polyhydroxyalkanoate (PHA) Synthesis by Class IV PHA Synthases Employing *Ralstonia eutropha* PHB-4 as Host Strain. *Biosci Biotechno Biochem* 75:1615-1617.

Jungblut, A.D., Hawes, I., Mountfort, D., Hitzfeld, B., Dietrich, D.R., Burns, B.P., and 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.

Kadouri, D., Jurkevitch, D., and Okon, Y. (2003) Poly β -hydroxybutyrate depolymerase (PhaZ) in *Azospirillum brasilense* and characterization of a *phaZ* mutant. *Arch Microbiol* 180:309-318.

Keshavarz, T. and Roy, I. (2010) Polyhydroxyalkanoates: bioplastics with a green agenda *Curr Op Microbiol* 13:321-326.

Kirchman, D.L., Cottrell, M.T., and Lovejoy, C. (2010) The structure of bacterial communities in the western Arctic Ocean as revealed by pyrosequencing of 16S rRNA genes. *Environ Microbiol* 12(5):1132-1143.

Komárek, J. (1990) Guide to the Nomenclature and Formal Taxonomic Treatment of Oxiphototroph Procaryotes (Cyanoprokaryotes) Proposal.

Komárek, O. and Komárek, J. (1999) 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.

Komárek, J. (2007) Phenotype diversity of the cyanobacterial genus *Leptolyngbya* in maritime Antarctica. *Pol Polar Res* 28(3):211-231.

- Kong,H.H., Grice,E.A., Conlan,S., Deming,C.B., Freeman,A.F., Beatson,M., Nomicos,E., Young,A.C., Bouffard,G.G., Blakesley,R.W., Candotti,F., Holland,S.M., Murray,P.R., Green,E.D. and Segre,J.A. (2010) National Human Genome Research Institute (NHGRI), National Institutes of Health (NIH), Bethesda, MD 20892, USA. Submitted (04-MAY-2010).
- Lane, D.J. (1991) *En: Nucleic Acid Techniques in Bacterial Systematics*, eds.Stackebrandt, E. & Goodfellow, M. Ed. Wiley, New York, pp.115-175.
- Langer, U., Bohme, L., and Bohme, F. (2004) Classification of soil microorganisms based on growth properties: a critical view of some commonly used terms. *J Plant Nutr. Soil Sci* 167:267-269.
- Lee, K., Lee, H.K., Choi, T.H., and Cho, J.C. 2007. *Robiginftomaculum antarcticum* gen. nov., sp. nov., a member of the family Hyphomonadaceae, from Antarctic seawater. *Int J Syst Evol Microbiol* 57:2595-2599.
- Li., S., Xiao, X., Yin, X., and Wang, F. (2006) Bacterial community along a historic lake sediment core of Ardley Island, west Antarctica *Extremophiles* 10:461-467.
- López, N., Pettinari, N., Stackebrandt, M.J., Tribelli, E., Pötter, P.M., Steinbüchel, A. and Méndez, B. (2009) *Pseudomonas extremaustralis* sp. nov., a Poly(3-hydroxybutyrate) Producer Isolated from an Antarctic. *Environment Curr Microbiol* 59:514-519.
- Lorenz, M.G. and Wackernagel, W. (1994) Bacterial gene transfer by natural genetic transformation in the environment. *Microbiol Mol Biol Rev* 58:563-602.
- Lozupone, C., and Knight, R. (2005) UniFrac: a new phylogenetic method for comparing microbial communities. *Appl Environ Microbiol* 71:8228-8235.
- Madigan, M.T. and Martinko, J.M. (2006) Brock. Biología de los microorganismos. 11ª Edición revisada. Prentice Hall. Upper Saddle River, NJ, USA. Cap. 11, pp. 309-312.
- Madigan, M.T., and Martinko, J.M. (2002) Brock Biology of Microorganisms. 10 ed. Pearson Prentice Hall. New Jersey, USA. p. 396.

- David, B. (2007) Sun-Swilling, Heat-Resistant Extremophile Discovered in Yellowstone. New microbe not only loves the high heat of volcanic hot springs, it also drinks in the sun's energy. *Scientific American*. Publicación online Julio 27. Disponible en: <http://www.scientificamerican.com/article.cfm?id=sun-swilling-heat-resistant-yellowstone-extremophile>
- Madison, L.L. and Huisman, G.W. (1999) Metabolic engineering of poly(3-hydroxyalkanoates): from DNA to plastic. *Microbiol Mol Biol Rev* 63:21-53.
- Margulis, L., Barghoorn, E. S., Ashendorf, D., Banerjee, S., Chase, D., Francis, S., Giovannoni, S., and Stolz, J. (1980) The microbial community in the layered sediments at Laguna Figueroa, Baja California, Mexico: does it have Precambrian analogues? *Precambrian Res* 1:93-123.
- Marion, G.M., Fritsen, C.H., Eicken, H., and Payne, M.C. (2003) The search for life on Europa: Limiting environmental factors, potential habitats, and Earth analogues. *Astrobiology* 3:785-811
- Mark, I., Stevens, I.D., Hogg, D.M., Bergstrom, J., Convey, P., and Huiskes, A.H.L. (2006) (eds.), Trends in Antarctic Terrestrial and Limnetic Ecosystems: Antarctica as a global indicator © ISBN 1-4020-5276-6. Springer, Dordrecht, The Netherlands.
- Martiny, J.B.H., Martiny, B.J.M. Bohannan, J.H., Brown, R.K., Colwell, J.A., Fuhrman, J.L., Green, and Horner-Devine, M.C. (2006) Microbial biogeography: Putting microorganisms on the map. *Nat Rev Microbiol* 4:102-112.
- Mevs, U., Stackebrandt, E., Schumann, P., Gallikowski, C.A., and Hirsch, P., (2000) *Modestobacter multiseptatus* gen. nov., sp. nov., a budding actinomycete from soils of the Asgard Range (Transantarctic Mountains). *Int J Syst Evol Microbiol* 50:337-346.
- Messing, J. (1983) New M13 vectors for cloning. *Meth Enzymol* 101:20-78.

- 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., and Castenholz, R.W. (2001) Evolutionary Relationships of Cultivated Antarctic Oscillatorians (Cyanobacteria) *J Phycol* 37: 650-654. doi: 10.1046/j.1529-8817.2001.037004650.x
- Nicholls, N., Gruza, G., Jouzel, J., Karl, T., Ogallo, I., and Parker, D. (1995) Observed climate variability and change. En: Climate change 1995—The science of climate change (ed. J. T. Houghton, L. G. Meria Filho, B. A. Callander, N. Harris, A. Kattenberg & K. Maskell), Cambridge, UK: Cambridge University Press. pp. 133–192.
- Nübel, U., García, F., and Muyzer, G. (1997) PCR Primers To Amplify 16S rRNA Genes from Cyanobacteria. *Appl Environ Microbiol* 63(8):3327-3332.
- Nunan, N., Wu, K., Young, I.M., Crawford, J.W., and Ritz, K. (2003) Spatial distribution of bacterial communities and their relationships with the micro-architecture of soil. *FEMS Microbiol Ecol* 44:203-215.
- Oren, A. (2004). A proposal for further integration of the cyanobacteria under the Bacteriological Code. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 54(5): 1895-1902.
- Oshima, K., Toh, H., Ogura, Y., Sasamoto, H., Morita, H., Park, S.-H., Ooka, T., Iyoda, S., Taylor, T.D., Hayashi, T., Itoh, K., and Hattori, M. (2008) Complete genome sequence and comparative analysis of the wild-type commensal *Escherichia coli* strain SE11 isolated from a healthy adult. *DNA Res* 15:375-386.
- Pace, N. R., D. A. Stahl, D. J. Lane, and G. J. Olsen (1985) Analyzing natural microbial populations by rRNA sequences. *ASM News* 51:4-12.
- Pace, N.R. (1997) A molecular view of microbial diversity and the biosphere. *Sci* 276:734-740.
- Peeters, K., Ertz, D., and Willems, A. (2011) Culturable bacterial diversity at the Princess Elisabeth Station (Utsteinen, Sør Rondane Mountains, East Antarctica) harbours many new taxa. *System Appl Microbiol* 34(5):360-367.

- Pickard, J. and Seppelt, R.D. (1984): Phytogeography of Antarctica. *J Biogeography* **12**:83-122.
- Pin, F.C., Wong Vui Ling, C.M., and González, M.A. (2010) Metagenomic Analyses of the Dominant Bacterial Community in the Fildes Peninsula, King George Island (South Shetland Islands). *Polar Sci* doi:10.1016/j.polar.2010.05.010
- Pointing S.B., Yuki, C., Donnabella, C., Lacap, M., Lau, C.Y., Joel, A., Jurgensb, C., and Roberta L. F.(2009) Highly specialized microbial diversity in hyper-arid polar desert. *Proc Natl Acad Sci USA* 106:19964-19969.
- Pötter, M. and Steinbüchel, A. (2005) Poly(3-hydroxybutyrate) granule-associated proteins: Impacts on poly(3-hydroxybutyrate) synthesis and degradation. *Biomacromolecules* 6:552-560.
- Priscu, J.P., Fritsen, C.H., Adams, E.E., Giovannoni, S.J., Pearl, H.W., McKay, C.P., Doran, P.T., Gordon, D.A., Lanoil, B.D., and Pinckney, J.L. (1998) Perennial Antarctic Lake Ice: An Oasis for Life in a Polar Desert. *Sci* 280:2095-2098.
- Pruesse, E., Quast, C., Knittel, K., Fuchs, B.M., Ludwig, W., Peplies, J., and Glockner F.O. (2007) SILVA: a comprehensive online resource for quality checked and aligned ribosomal RNA sequence data compatible with ARB. *Nucleic Acids Res* 35:7188-7196.
- Rakusa-Suszczewski, S. (Ed.) (1993) The maritime Antarctic coastal Ecosystem of Admiralty Bay. Warsaw: Polish Academy of Sciences, p. 216.
- Reemer, J (2009) *MMG basic Biotech.* 5:1
- Rehm, B.H.A. (2003) Polyester synthases, catalysts for plastics. *Biochem J* 376:15:33.
- Rehm, B.H.A. (2006) Genetics and biochemistry of polyhydroxyalkanoate granule self-assembly: The key role of polyester synthases. *Biotechnol Lett* 28:207-213.
- Reasoner, D.J., Blannon, J.C., and Geldreich, E.E. (1979) Rapid seven-hour fecal coliform test. *Appl. Environ. Microbiol* 38(2): 229-36.

- Richard, C. (2008) Global Sequencing: A Review of Current Molecular Data and New Methods Available to Assess Microbial Diversity. *Microbes Environ* 23:253-268.
- Rodrigues D.F. and Tiedje J.M. (2008) MINIREVIEWS: Coping with Our Cold Planet *Appl Envir Microbiol* 74:1677-1686.
- Rojas, J.L., Martín, J., Tormo, J.R., Vicente, F., Brunati, M., Ciciliato, M., Losi, D., Van Trappen, S., Mergaert, J., Swings, J., Marinelli, F., and Genilloud, O. (2009) Bacterial diversity from benthic mats of Antarctic lakes as a source of new bioactive metabolites. *Marine Genomics* 2:33-41.
- Romo D.M.R, Grosso, M.V., Moreno, C., and Montoya, D. (2007) A most effective method for selecting a broad range of short and mediumchain-length polyhydroxyalcanoate producing microorganisms. *Electronic J Biotechnol* 10 (3): 348-357.
- Ronaghi, M., Karamohamed, S., Pettersson, B., Uhlen, M., and Nyren, P. (1996) Real-time DNA sequencing using detection of pyrophosphate release. *Anal. Biochem.* 242:84-89.
- Rothschild, L.J. and Mancinelli. R.L. (2001) Life in extreme environments. *Nature* 409:1092-1101.
- Russell, N.J., Harrison, P., Johnston, I.A., Jaenicke, R., Zuber, M., Franks, F., and Wynn-Williams, D. (1990) Cold Adaptation of Microorganisms [and Discussion] *Phil Trans R Soc B* 326:595-611.
- Satoh Y., Minamoto N., Tajima K., and Munekata M. (2002) Polyhydroxyalkanoate synthase from *Bacillus* sp. INT005 is composed of *phaC* and *phaR*. *JBB* 94(4): 343-350.
- Säbacka, M. and Elster, J. (2006) Response of cyanobacteria and algae from Antarctic wetland habitats to freezing and desiccation stress *Polar Biol* 30:31-37.

- Sabbe, K., Hodgson, D.A., Verleyen, E., Taton, A., Wilmotte, A., Vanhoutte, K., and Vyverman, W. (2004) Salinity, Depth and the Structure and Composition of Microbial Mats in Continental Antarctic Lakes. *Freshwat Biol* 49:296-319.
- Sanger, F., Nicklen, S., and Coulson, A.R. (1997) DNA sequencing with chain terminating inhibitors. *PNAS* 74:5463-5467.
- Schloss, P.D. and Handelsman, J. (2005) Introducing DOTUR, a computer program for defining operational taxonomic units and estimating species *Appl Envir Microbiol* 71:1501-1506.
- Schloss, P.D., Larget, B.R., and Handelsman, J. (2004) Integration of Microbial Ecology and Statistics: a Test to Compare Gene Libraries. *Appl Environ Microbiol* 70(9): 5485-5492.
- Schloss, P.D., Westcott, S.L., Ryabin, T., Hall, J.T., Hartmann, M., Hollister, E.B., Lesniewski, R.A., Oakley, B.B., Parks, D.H., Robinson, C.J., Sahl, J.W., Stres, B., Thallinger, G.G., Van Horn, D.J., and Weber, C.F. (2009) Introducing *mothur*. Open-Source, Platform-Independent, Community-Supported Software for Describing and Comparing Microbial Communities *Appl Envir Microbiol*, 75: 7537-7541.
- Siegesmund, M.A., Johansen, J.R., Karsten, U. and Friedl, T. (2008) COLEOFASCICULUS GEN. NOV. (CYANOBACTERIA): MORPHOLOGICAL AND MOLECULAR CRITERIA FOR REVISION OF THE GENUS MICROCOLEUS GOMONT J. Phycol. 44 (6), 1572-1585
- Serrano-Cañadas (2001) Espacios protegidos y política territorial en las islas Shetland del Sur (Antártida). *Bol A G E* 31:5-21.
- Shang, L., Jiang, M., and Chang, H.N. (2003) Poly(3-hydroxybutyrate) synthesis in fed-batch culture of *Ralstonia eutropha* with phosphate limitation under different glucose concentrations. *Biotechnol Lett* 25:1415-1419.
- Shu, Q. and Jiao, N. (2008) Profiling Planctomycetales diversity with reference to anammox-related bacteria in a South China Sea, deep-sea sediment. *Mar Ecol* 29:413-420. doi: 10.1111/j.1439-0485.2008.00251.

- Singh, B.N., Pereira, N & Ravindra, R. (2009) Archaea in hyper-arid polar deserts. *Proc Natl Acad Sci USA* 107.
- Singh. M., Patel S.K., and Kalia V.C. (2009b) *Bacillus subtilis* as potential producer for polyhydroxyalkanoates. *Microb Cell Fact* 8:38.
- Singleton, D.R., Furlong, M.A., Rathbun, S.L., and Whitman, W.B. (2001) Quantitative comparisons of 16S rRNA gene sequence libraries from environmental samples. *Appl Environ Microbiol* 67:4374-4376.
- Spiekermann, P., Rehm, B. H.A., Kalscheuer, R., Baumiester, D., and Steinbüchel, A. (1999) A sensitive, viable-colony staining method using Nile red for direct screening of bacteria that accumulate polyhydroxyalkanoic acids and other lipid storage compounds. *Arch Microbiol* 171(2):73-80.
- 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). Kluwer Academic Press, Dordrecht, the Netherlands. pp. 61-120.
- Staley, J.T. and Konopka, A. (1985) Measurement of in situ activities of non-photosynthetic microorganisms in aquatic and terrestrial habitats. *Ann Rev Microbiol* 39:321-346.
- Steinbüchel, A. and Lutke-Eversloh, T. (2003) Metabolic engineering and pathway construction for biotechnological production of relevant polyhydroxyalkanoates in microorganisms. *Biochem Eng J* 16:81-96.
- Tang E.P.Y., Tremblay, R., and Vincent, W.F. (1997) Cyanobacterial dominance of polar freshwater ecosystems: are high-latitude mat-formers adapted to low temperature? *J Phycol* 33:171-181.
- Taton, A., Grubisic, S., Balthasart, P., Hodgson, D.A., Laybourn-Parry, A., and Wilmette, 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 Antarctic Cyanobacterial Strains. *J Phycol* 42:1257-1270.
- Taton, A., Grubisic, S., Brambilla, E., Wit, R., and 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.
- Teixeira, L., Peixoto, R.L., Cury, J.C., Sul, W.S., Pellizari, V.H., Tiedje, J., Rosado, A.S. (2010) Bacterial diversity in rhizosphere soil from Antarctic vascular plants of Admiralty Bay, maritime Antarctica *ISME J* 4:989-1001.
- Tomitani, A., Knoll, A., Cavanaugh, C. M and Ohno, T. (2006) The evolutionary diversification of cyanobacteria: Molecular-phylogenetic and paleontological perspectives. *PNAS* **103**(14): 5442–5447.
- Torsvik, V., Goksoyr, J., and Daae, F.L. (1990) High diversity in DNA of soil bacteria. *Appl Environ Microbiol* 56:782-787.
- Torsvik, V. and Øvreås, L. (2002) Microbial diversity and function in soil: From genes to ecosystems. *Curr Opin Microbiol* 5:240-245.
- Torsvik, V. and Øvreås, L. (2008) Chapter 2 Microbial Diversity, Life Strategies and Adaptation to Life in Extreme En: Microbiology of Extreme Soils. Soil Biology Soils P. Dion and C.S. Nautiyal (eds.) © Springer-Verlag Berlin Heidelberg.
- Torsvik, V. and Øvreås, L. (2006) Microbial phylogeny and diversity in soil. In: van Elsas JD, Jansson JK, Trevors JT (eds) Modern Soil Microbiology, 2nd edn. CRC Press, Taylor and Francis Group, Boca Raton, FL, pp. 23-54.
- Turner, J., Colwell, S. R., Marshall, G. J., Lachlan-Cope, T. A., Carleton, A. M., Jones, P. D., Lagun, V., Reid, P. A., and Iagovkina, S. (2005) Antarctic climate change during the last 50 years. *Int J Climatol* 25:279-294. doi:10.1002/joc.1130
- van Gemerden, H. (1993) Microbial mats: A joint venture. *Mar Geol* 113:3-25.

- Van Trappen, S., Vandecandelaere, I., Mergaert, J.S., and Swings, J. (2004) *Gillisia limnaea* gen. nov., sp. nov., a new member of the family Flavobacteriaceae isolated from a microbial mat in Lake Fryxell, Antarctica. *Int J Syst Evol Microbiol* 54:445-448.
- Van Trappen, S., Vandecandelaere, I., Mergaert, J.S., and Swings, J. (2005) *Flavobacterium fryxellicola* sp. nov. and *Flavobacterium psychrolimnae* sp. nov., novel psychrophilic bacteria isolated from microbial mats in Antarctic lakes. *Int J Syst Evol Microbiol* 55:769-772.
- Vaughan, D.G., Marshall, G.J., Connolley, W.M., Parkinson, C.L., Mulvaney, R., Hodgson, D.A., King, J.C., Pudsey, C.J., and Turner, J. (2003) Recent rapid regional climate warming on the Antarctic Peninsula. *Clim Change* 60:243-274. doi:10.1023/A:1026021217991
- Vincent, W.F., Downes, M.T., Castenholz, R.W., and Howard-Williams, C. (1993a) Community structure and pigment organization of cyanobacteria-dominated microbial mats in Antarctica. *Eur J Phycol* 28:213-221.
- Vincent, W.F. (2000) Evolutionary origins of Antarctic microbiota: invasion, selection and endemism. *Ant Sci* 12:374-385.
- Vinocur, A. and Pizarro, H. (2000) Microbial mats of twenty-six lakes from Potter Peninsula, King George Island, Antarctica. *Hydrobiol* 437:171-185.
- Visscher, P.T. and Stolz, J.S. (2005) Microbial mats as bioreactors: populations, processes, and products. *Palaeogeography, Palaeoclimatology, Palaeoecology* 219(1-2):87-100.
- 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.
- Vos, M., and Velicer, G.J. (2006) Genetic population structure of the soil bacterium *Myxococcus xanthus* at the centimeter scale. *Appl Environ Microbiol* 72:3615-3625.

- Wacklin, P. (2006) Biodiversity and Phylogeny of Planktic Cyanobacteria in Temperate Freshwater Lakes. Academic Dissertation in Microbiology, Helsinki, 2006
- Wall, D.H. and Virginia, R.A. (1999) Controls on soil biodiversity: insights from extreme environments. *Appl Soil Ecol* 13:137.
- Walter, M.R. (1976) Stromatolites. (Developments in Sedimentology, 20.) Elsevier, Amsterdam, pp. 790.
- Wang, Q., Yu, H., Xia, Y., Kang, Z., and Qi, Q. (2009) Complete PHB mobilization in *Escherichia coli* enhances the stress tolerance: a potential biotechnological application *Microbial Cell Factories* 8:47.
- 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.
- Ward, D.M., Weller, R., and Bateson, M.M. (1990) 16S ribosomal-RNA sequences reveal numerous uncultured microorganisms in a natural community. *Nature* 345:63-65.
- Woese, C.R. (1987) Bacterial evolution. *Microbiol Rev* 51:221-271.
- Woese, C.R., and Fox, G.E. (1977) Phylogenetic structure of the prokaryotic domain: the primary kingdoms. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 74(11):5088-5090.
- Wynn-Williams, D.D. (1990) Ecological aspects of Antarctic microbiology. *Adv Microb Ecol* 11: 71-146.
- Wynn-Williams, D.D. (1996) Antarctic microbial diversity: the basis of polar ecosystem processes. *Biodivers Conserv* 5:1271-1293.

- 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. *Antarct Sci* 19:11-16. doi:10.1017/S095410200700003.x
- Yachi, S. and Loreau, M. (1999) Biodiversity and ecosystem productivity in a fluctuating environment: The insurance hypothesis. *Proc Natl Acad Sci USA* 96:1463-1468.
- Yergeau, E., Bokhorst, S., Huiskes, A.L, Boschker, H., Aerts, R., and Kowalchuk, G. (2007) Size and structure of bacterial, fungal and nematode communities along an Antarctic environmental gradient. *FEMS Microbiol Ecol* 59:436-451.
- Yergeau, E., Newsham, K., Pearce, D.A., and Kowalchuk, G. (2007) Patterns of bacterial diversity across a range of Antarctic terrestrial habitats. *Environ Microbiol* 9(11):2670-2682.
- Yergeau, E., Schoondermark-Stolk, S.A., Brodie, E.L., De'jean, S., DeSantis, T.Z., Goncalves, O., Piceno, Y.M., Andersen, G.L., and Kowalchuk, G. (2009) Environmental microarray analyses of Antarctic soil microbial communities. *ISME J* 1-12.
- Yi, H., Yoon, H.I., and Chun, J. (2005) *Sejongia antarctica* gen. nov., sp.nov and *Sejongia jeonii* sp. nov., isolated from the Antarctic. *Int. J Syst Evol Microbiol* 55: 409-416.

ANEXO I

A1.1 Extracción de ADN genómico ambiental

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 primera 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 15ml frío: aproximadamente 1,0g de muestra junto con igual volumen de cuentas de zircornio (0,1mm zircornia/silica beads, BioSpec Products Inc.), 1ml de buffer TE “alto” (TRIS 100 mM, EDTA 100 mM, pH 8,0), 0,5ml de *buffer* de extracción (CTAB 5% w/v, NaCl 0,35 M en buffer fosfato 200 mM, pH 8,0) y 0,5ml de una mezcla de fenol: cloroformo: alcohol isoamílico (25:24:1).

Las células se lisaron durante 3 min en vortex y luego los tubos se centrifugaron a 8×10^3 r.p.m. por 10 min a temperatura ambiente (T.A.). La fase acuosa (superior) se transfirió de forma aséptica 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 8×10^3 r.p.m. La fase acuosa (superior) se transfirió a un tubo Corex[®] de 15ml 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 de centrifuga Sigma[®] estéril de 25ml.

Los ácidos nucleicos totales se precipitaron agregando igual volumen de polietilenglicol (PEG 8000 30% en solución acuosa de NaCl 1,6 M) e incubando en hielo durante 2 hrs. Luego se centrifugó a 16×10^3 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 150µl 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 3µl 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 µg/ml.

A1.2 Extracción de ADN de banda de gel de agarosa

DNA EXTRACTION KIT K0513 FERMENTAS ®

1 Se separaron los productos de reacción mediante electroforesis en agarosa. Cortamos el trozo de gel que contenía la banda de ADN (minimizando el tiempo de exposición al UV tanto como fuese necesario). Determinamos el volumen aproximado del gel por su peso (1g equivale a 1ml) y lo colocamos en un tubo de 1,5ml.

2 Agregamos 3 volúmenes de *binding solution* por cada volumen de gel. Incubamos 5 min a 55°C para derretir la agarosa. Para extraer el ADN de un gel de TBE agregamos ½ volumen de *TBE conversión buffer* y 4,5 volúmenes de *binding solution*.

3 Agregamos la suspensión de *sílica powder*: hasta 5,5µg de ADN agregamos 15µl de la suspensión, por encima de esta cantidad, agregamos 2µl de la suspensión, cada 1µg de ADN e incubamos por 10 min en hielo. Mezclamos con *vortex* cada 2 min.

4 Centrifugamos a máxima velocidad ($> 10^3$ g / 13^3 r.p.m.) por 5 seg para formar un *pellet* y eliminamos el sobrenadante.

5 Agregamos 500µl de *wash buffer* bien frío, mezclamos con *vortex*, centrifugamos por 5 seg y retiramos el sobrenadante. Repetimos el procedimiento 3 veces. Durante cada lavado el *pellet* fue resuspendido

completamente. Luego que el sobrenadante del último lavado fue removido, centrifugamos el tubo nuevamente y removimos el líquido remanente con micropipeta. Secamos el *pellet* por 10-15 min.

6 Se resuspendió el *pellet* en agua miliQ[®] o buffer TE e incubamos el tubo a 55°C por 5 min. Centrifugamos y transferimos el sobrenadante a un tubo nuevo.

A1.3 Clonado de producto de PCR y transformación

Clonado

Incubamos a 16°C durante toda la noche:

Producto de PCR	4,0µl
Solución salina	1,0µl
Vector TOPO [®]	1,0µl

Transformación

En un tubo Eppendorf se agregó 150µl de células *E. coli* químicamente competentes (Top10 *E. coli*, Invitrogen) y 10µl de la reacción de clonado. Se incubó por 20 min en hielo.

Se incubó por un minuto a 42°C e inmediatamente después se incubó por 2 min en hielo, en donde se agregó 1ml de medio LB (5,0g bacto triptona, 3,0g de extracto de levadura, 5,0g de NaCl y agua destilada c.s.p. 1L).

El cultivo se incubó por 40 min a 37°C con agitación constante. Finalmente la suspensión de células se transfirió a placas, con medio sólido LB-Agar con antibiótico por rastrillado en volúmenes de 100µl. Las placas se incubaron durante toda la noche a 37°C.

A1.4 Crecimiento y almacenamiento de las bibliotecas de amplicones

a) Almacenamiento de bacterias en solución de glicerol

1) Al recibir las placas a ser secuenciadas las colonias, fueron almacenadas inmediatamente en solución de glicerol a -20°C. Para esto se debe seguir el siguiente protocolo:

2) Adicionamos 100µl de medio Terrific Broth conteniendo 50 µg/ml de ampicilina a cada pocillo de las placas de poliestireno.

3) Inoculamos las colonias con la ayuda de un repicador e incubamos la placa cubierta sólo con su tapa (sin adhesivo) a 37°C, sin agitación por aproximadamente 20 hrs.

4) Verificamos el crecimiento en todos los pocillos, adicionamos 100µl de glicerol 50% a cada pocillo y aplicamos la membrana adhesiva. Conservamos en freezer a -20 o -70°C.

b) Crecimiento para miniprep

OBS: Para obtener un rendimiento homogéneo de ADN al final de la *miniprep* es esencial que el crecimiento de las bacterias sea homogéneo. Para obtener un crecimiento homogéneo es necesario que el *stock* de glicerol sea pre-cultivado antes de ser inoculado para la *miniprep*. Este pre-crecimiento puede realizarse en medio sólido o en medio líquido. Por practicidad y economía se recomienda el medio sólido.

Para esto, repicamos las bacterias en placas de medio sólido (LB sólido con ampicilina 50 $\mu\text{g}/\text{ul}$) con la ayuda de un repicador.

Antes de abrir la placa incubada en *freezer* en presencia de glicerol, se la centrifugó rápidamente (1500 r.p.m. por 10 seg.) para remover el líquido del adhesivo. La placa inoculada se incubó hasta que todos los pocillos tuviesen un crecimiento apreciable.

Se efectuó un segundo repique a otra placa con el mismo procedimiento. Este repique se realizó con el repicador mojado para garantizar homogeneidad en la cantidad de inóculo. El repicador puede ser humedecido en cualquier solución estéril (agua, medio, salina). Luego de 16 a 18 hrs de incubación, se verificó si hubo crecimiento homogéneo y sólo entonces se inoculó el medio líquido para desarrollar la *miniprep*.

1) Se aplicó en cada pocillo de una placa de microtitulación, 1ml de medio Terrific Broth con 250 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de ampicilina.

2) Se inoculó cada pocillo con colonias individuales con ayuda de palillos o repicador. Se selló la placa con la tapa adhesiva. Se hizo un pequeño agujero en un costado del pocillo con una aguja para facilitar la aireación (se quemó la punta de la aguja para evitar contaminaciones).

3) Se incubó la placa a 37°C con agitación a 150-200 r.p.m. durante toda la noche (14-16 hrs). Los cultivos debían tener un crecimiento homogéneo con una DO_{600} de aprox. 1.

4) Centrifugamos la placa por 7 min. a 4000 r.p.m. para sedimentar las células

5) Retiramos el adhesivo y descartamos el sobrenadante en una solución de hipoclorito. Dejamos la placa invertida en papel absorbente para eliminar completamente el resto de sobrenadante (1min). Observamos que todo el líquido hubiese escurrido de las paredes sin perder el *pellet*.

A1.5 Miniprep en placas de ELISA de 96 pocillos

6) Agregamos 180µl de GET a cada placa con los *pellets* y agitamos con *vortex* para resuspender las células.

7) Centrifugamos 7 min a 4000 r.p.m. hasta sedimentar las células.

8) Retiramos el adhesivo y descartamos el sobrenadante en solución de hipoclorito. Dejamos la placa invertida en papel absorbente para eliminar completamente el sobrenadante. (1 min).

9) Adicionamos a cada pocillo 80µl de GET conteniendo 0,5µl de ARNasa. Sellamos con el adhesivo y agitamos con *vortex* para resuspender las células.

Nota: Para dos placas mezclamos en el momento 17ml de GET y 100µl de ARNasa.

10) Transferimos 80µl de la suspensión de células para una microplaca de 250µl de polipropileno de fondo en V.

Nota: Esta placa puede ser reutilizada una vez que fue lavada y autoclavada. Observamos que todo el volumen fue pipeteado y transferido en todos los punteros. En caso contrario repetimos la transferencia hasta que todo el volumen fue transferido. La homogeneidad en la concentración de ADN final depende de una transferencia completa.

11) Agregamos a cada pocillo 80µl de NaOH 0,18 N/SDS 1% (Preparamos 17ml para 2 placas iguales en el momento; esta solución no puede guardarse).

Preparación de la solución de lisis:

1,7ml NaOH 1,8 M + 1,7 ml SDS 10% + agua MilliQ[®] c.s.p. 17 mL (solución para 2 placas).

12) Sellamos bien la placa con el adhesivo usado en el crecimiento y mezclamos 20 veces por inversión, tratando de no ubicar los agujeros sobre los pocillos.

Note: Observamos que la mezcla se tornó translúcida y que no hubo formación de grumos. El rendimiento del ADN depende de una lisis homogénea.

13) Incubamos 5 min a temperatura ambiente (iniciamos el conteo a partir de la adición de la solución de lisis). Centrifugamos unos segundos para remover el líquido del adhesivo (llegamos a 4000rpm y esperamos 8 segundos).

14) Agregamos 80µl de KOAC 3 M (el acetato de potasio debe guardarse en la heladera) en el mismo orden que se agregó la solución de lisis. Sellamos la placa y mezclamos por inversión 30 veces. Observamos la formación de precipitado.

15) Incubamos por 10 min a temperatura ambiente. Centrifugamos por algunos segundos para remover el líquido del adhesivo.

16) Quitamos el adhesivo e incubamos en la estufa a 90°C por 30 min exactos.

17) Sellamos la placa y enfriamos en hielo por 15 min. Centrifugamos por 10 min a 4000 r.p.m. y 4°C.

18) Fijamos con cinta adhesiva una placa de filtro milipore (MAGV N22) encima de un placa de fondo en V de 250µl de polipropileno. Verificamos que los pocillos estuviesen alineados.

19) Transferimos 120µl del sobrenadante a la placa Millipore con cuidado de no transferir restos celulares. Usamos el pipeteador multicanal en velocidad 3 y transferimos 60µl cada vez (2X). Centifugamos sin tapa a 20°C por 5 min a 4000 r.p.m. o hasta que todo el volumen se transfiriera a la placa con fondo en V. Nota: La placa Milipore se puede rajarse si se centrifuga mucho más tiempo que 5 min.

20) Removimos la placa Milipore y agregamos 80µl de isopropanol (Merck) al filtrado (que está en la microplaca).

21) Sellamos bien las placas con un adhesivo nuevo y mezclamos 30 veces por inversión.

22) Centrifugamos por 45 min a 4000 r.p.m. a 20°C. Si la placa fuese centrifugada a baja temperatura o si estuvo en hielo, las sales precipitarían y esto compromete seriamente la reacción de secuenciación y la corrida electroforética en el Megabase.

23) Retiramos el adhesivo y descartamos el sobrenadante (invirtiendo la placa) y dejamos escurrir en papel absorbente.

24) Agregamos 150µl de etanol 70% preparada en el mismo día y sellamos la placa con el mismo adhesivo.

25) Centrifugamos 15 min a 4000 r.p.m. y 20°C. Removimos el sobrenadante como en el paso anterior.

26) Dejamos la placa secar a 37°C por una hora cubierta con papel toalla o en vacío 10 min.

27) Agregamos 30µl de agua miliQ[®]. Cubrimos con el mismo adhesivo, rotulamos el adhesivo y las placas y dejamos a temperatura ambiente hasta la disolución completa.

28) Guardamos la placa a -20°C.

29) Se hizo una corrida electroforética (3µl) para conocer el rendimiento. (TBE 0,7% de agarosa). Utilizamos 100ng de pUC18 intacto para validar la concentración de las muestras.

Soluciones y reactivos:

GET (Glucosa, EDTA, Tris)

glucosa	4,5g
0,5M EDTA pH 8,0 autoclavado	10ml
1M Tris-HCl pH 7,4 autoclavado	12,5ml
Agua	c.s.p. 500ml

Autoclavado y mantenido en heladera

Acetato de potasio 3 M

60ml acetato de potasio 5 M
11,5ml ácido acético glacial
28,5ml agua milli Q autoclavada
Guardado en heladera.

Sol. stock 5 M Acetato de Potasio
246,87g acetato de potasio en agua c.s.p. 500ml.

A1.6 Reacción de secuenciación

1) Pipeteamos un volumen de plásmido que contuviese 200-400ng de ADN, 4 μ l de la pre-mix (ET terminador), 5pmol de primers (0,5 μ l a 10 pmol/ μ l) y agua miliQ[®] para completar un volumen final de 10 μ l.

2) Parámetros de la reacción de secuenciamiento:

Temperatura de la trampa 103°C

Modo: Wait (Espera hasta que la trampa llegue a 103°C antes de comenzar)

1 ciclo:

95°C 1 min

35 ciclos:

94°C 20 seg

60° 1 min 30 seg

Nota: La temperatura de *annealing* no es necesaria porque la T_m de los primers es superior a 60°C.

Purificación posterior a la reacción de secuenciación:

- 1) Agregamos 10 μ l de agua miliQ estéril, 2 μ l de acetato de amonio 7,5 M estéril y 60 μ l de etanol 96%.
- 2) Centrifugamos 45 min. El uso de 60 μ l de etanol reduce el exceso de terminadores luego de la reacción y facilita la eliminación de sales que aún pueden estar presentes en la solución y que comprometerían la inyección en el Megabase.
- 3) Descartamos el sobrenadante. Escurrimos sobre papel absorbente.
Nota: Atención a los volúmenes pipeteados, los volúmenes pequeños pueden tener menor precisión en el pipeteo. Usamos la función *bb* en la multicanal, cuyo objetivo es eliminar cualquier resto en los punteros.
- 4) Agregamos 150 μ l de etanol 70% preparado en el mismo día. No usamos etanol helado porque causa la precipitación de sales de la solución.
- 5) Centrifugamos 10 min. Descartamos el sobrenadante invirtiendo la placa.
- 6) Centrifugamos la placa invertida sobre papel absorbente a 300 r.p.m. por 5 seg. (atención! No se debe usar un spin tradicional, programamos la centrifuga a 300 r.p.m.)
- 7) Secamos a temperatura ambiente o a 37°C por 15 min. Resuspendimos en agua miliQ[®] o loading buffer Megabase. Cubrimos con el adhesivo, envolvimos la placa en papel aluminio y guardamos en el freezer, congelador o heladera hasta el momento de la inyección en el Mega BACE.

A1.7 pipeline mothur

Crear alineamiento:

Se crea un alineamiento de secuencias múltiple (Multiple Sequence Alignment MSA) de nuestras secuencias de 16S. Luego se utiliza el MSA para obtener una matriz de distancia y un árbol filogenético, necesarios para la mayoría de los análisis en *mothur*. Para este protocolo se utilizó *Green Genes* para alinear las secuencias.

Protocolo:

- 1- Ir a la página principal de *Green Genes* y marcar el ícono *Align*.
- 2- Clickear en el ícono "Choose file" y cargar el archivo *multifasta* que se quiere alinear
- 3- En el campo "*Batch size for NAST*" ingresar "50"
- 4- Cambiar el campo "*Minimum length*" a la longitud que se desee (300)
- 5- Ingresar la dirección de correo electrónico y marcar "*Process FASTA File*"

No cerrar la página hasta recibir un email de Todd de Santis. Este email contendrá un archivo con la extensión XXXX_NAST_jobXxxx.tgz. Descomprimir el archivo. Se puede observar el archivo Exel el cual contiene información acerca de la calidad del alineamiento. El archivo XXXX_NAST.fasta contiene el MSA en un formato canónico de 7682 nt de longitud, empleado por *Green Genes*.

Crear una matriz de distancia:

Se emplea *Green Genes* para crear la matriz de distancia. *Green Genes* posee una interfase amigable al programa PHYLIP DNAdist. También enmascara convenientemente regiones hipervariables del archivo del alineamiento, lo cual es deseable ya que nuestras secuencias en general cubren un amplio rango de diversidad filogenética de modo que en estos sitios es improbable que contengan señal filogenética útil.

El análisis subsiguiente en *mothur* y en otros programas generalmente requiere un árbol con raíz externa por lo que se precisa agregar una secuencia a modo de grupo externo en nuestro archivo de secuencias. Utilizamos el gen 16S ARNr de *Haloquadratum walsbyi* (arquea) como grupo externo. Esta

secuencia debería alinearse usando *Green Genes NAST aligner* en la misma forma en que se describió anteriormente.

Para construir la matriz de distancia:

- 1-Copiar y pegar la secuencia alineada de *Haloquadratum walsbyi* (job31369.tgz) en el archivo con todas las secuencias alineadas (NAST.fasta)
- 2- Ir a la página web de *Green Genes* y marcar "*More Tools*" del menú "*Functions*"
- 3- Marcar el ícono "*Create Distance Matrix*"
- 4- Marcar el *link* "*Browse*" y seleccionar el archivo
- 5- Ingresar una dirección de correo electrónico y marcar "*Calculate Distance*". No cerrar la página hasta recibir un email de Todd de Santis, este email contendrá instrucciones de como bajar el archivo con la matriz de distancia. Descomprimir el archivo y renombrar la matriz.

Crear un árbol filogenético:

Se utiliza el programa *PHYLIP Neighbor* para construir un árbol filogenético, se emplea el programa de *Neighbor joining* de nuestras secuencias.

Para generar un árbol enraizado con un grupo externo:

- 1- Copiar neighbor.exe en el directorio junto con los datos a analizar y ejecutar el programa.
- 2- Cuando se tenga que ingresar el nombre del archivo, escribir "nombre.dist" y luego dar Enter.
- 3- *Teclar* O seguido de Enter para indicar que queremos una secuencia de grupo externa.
- 4- *Teclar* 1 seguido de Enter para indicar que la primer secuencia debería ser empleada como grupo externo (por eso es importante que el grupo externo esté ubicado al comienzo de del archivo con las secuencias cuando se crea la matriz de distancias).
- 5- *Teclar* Y seguido de Enter para construir un árbol NJ.

Este comando producirá 2 archivos: "*outfile*" y "*outtree*". El primero contiene información útil acerca de la construcción del árbol, mientras que el último el árbol NJ en formato Newik.

El archivo "*outfile*" indica que algunas ramas han sido asignadas con valores negativos pequeños. Esto sugiere que se necesita un método más robusto par inferir la historia filogenética de ese grupo de secuencias analizadas. Aunque ese árbol será suficiente para su uso en *mothur*. Renombrar el "*outtree*". Se puede inspeccionar el árbol empleando programas tales como *Figtree* o *TreeView*.

Análisis basados en OTUs:

Una vez que se obtiene la matriz de distancias (XXX.dst) y el árbol filogenético (XXX.tre) de nuestras secuencias se puede determinar el número de Unidades Taxonómicas operacionales OTUs usando *mothur*.

Abrir el *mothur* y usar el comando "read.dist" para cargar nuestra matriz de distancia e indicar que estamos interesados en OTUS a una distancia menor o igual que 0,10.

```
mothur > read.dist(phylip=EUB_TODASDM.dist, cutoff=0.1)
```

```
mothur > unique.seqs(fasta=multifastaeubaln.fasta)
```

```
mothur > cluster()
```

Creo un archivo.GROUPS

```
mothur > make.group(fasta=eub7.fasta-eub8.fasta-eub15.fasta-eub16.fasta,  
groups=EUB7-EUB8-EUB15-EUB16)
```

Creo un archivo .SHARED

```
mothur > read.otu(list=EUB_TODASDM.fn.list, group=EUB_TODASDM.groups,  
label=unique-0.03-0.05-0.10)
```

Indice de Shannon

```
mothur > read.dist(phylip=eub7DM.dist, cutoff=0.10)
```

```
mothur > cluster()
```

```
mothur > summary.single(calc=shannon)
mothur > read.dist(phylip=cia7DM.dist, cutoff=0.10)
mothur > cluster()
mothur > summary.single(calc=shannon)
```

Indice Chao1

```
mothur > read.dist(phylip=eub7DM.dist, cutoff=0.10)
mothur > cluster()
mothur > summary.single(calc=chao)
mothur > read.dist(phylip=cia7DM.dist, cutoff=0.10)

mothur > cluster()
mothur > summary.single(calc=chao)
```

Curvas de rarefacción

```
mothur > read.dist(phylip=eub7DM.dist)
mothur > cluster(cutoff=0.10)
mothur > rarefaction.single(freq=1)
mothur > read.dist(phylip=cia7DM.dist)
mothur > cluster(cutoff=0.10)
mothur > rarefaction.single(freq=1)
```

Creo archivo SUMMARY

```
mothur > read.otu(shared=EUB_TODASDM.fn.shared, label=unique-0.03-0.05-
0.10)
mothur > summary.shared()
```

Creo DIAGRAMAS DE VENN

```
mothur > venn(groups=EUB7-EUB8-EUB15-EUB16)
```

HEATMAPS

```
mothur > heatmap.bin(scale=log2, label=0.03)
```

Dendogramas COMMUNITY TREE

```

mothur > read.otu(list=EUB_TODASDM.fn.list, group=EUB_TODASDM.groups,
label=0.03)

```

```

mothur > tree.shared(calc=thetayc, groups=EUB7-EUB8-EUB15-EUB16)

```

Lista de OTUs

```

mothur > read.dist(phylip=EUB_TODASDM.dist)

```

```

mothur > cluster()

```

```

mothur > read.otu(list=EUB_TODASDM.fn.list)

```

```

mothur > get.otulist(list=EUB_TODASDM.fn.list, label=unique-0.03-0.05-0.10)

```

Creo *multifasta* con OTUs representativas

```

mothur > get.oturep(phylip=EUB_TODASDM.dist, fasta=multifastaeubaln.fasta,
list=EUB_TODASDM.fn.list, label=unique-0.03-0.05-0.10, sorted=name)

```

A1.8 Análisis de PHB por GC-FID

- 1- Colocamos aprox. 4mg de células liofilizadas en un tubo con tapa rosca
- 2- Agregamos 1ml de CHCl_3
- 3- Agregamos 1ml de mezcla $\text{MeOH}/\text{H}_2\text{SO}_4$ 75:15. No agitamos
- 4- Incubamos en baño de aceite por 140 min
- 5- Luego, agregamos 0,5ml de agua destilada, agitamos en *vortex* vigorosamente.
- 6- Una vez que se separaron las fases, la fase orgánica (inferior) se transfirió a un nuevo tubo.
- 7- Agregamos una punta de espátula de Na_2SO_4 .y transferimos a un tubo limpio.
- 8- Guardamos a 5°C o a -20°C dependiendo del tiempo de espera hasta su análisis.

Estándar interno:

Agregamos 100 μl a cada tubo de ácido benzoico 10 mg/ml en cloroformo..

Condiciones de corrida cromatográfica

Columna HP-5 (30mx0, 25mmx250 μm)

- 1 80°C por 2min
- 2 Rampa: aumento de 8°C por min hasta 220°C
- 3 220°C por 2 min

Temp Inyector: 280°C

Temp detector: 280°C

A1.9 Extracción de lípidos y cromatografía en capa fina (TLC) de cultivos bacterianos

- 1 Recuperación de las células bacterianas por centrifugación.

Colocamos 1,5 ml de un cultivo en un tubo de microcentrífuga y centrifugamos a 12×10^3 r.p.m. durante 5 min. Realizamos un lavado con solución fisiológica (NaCl 0,85%) estéril.

- 2 Extracción de lípidos

Se extrajeron los lípidos celulares con una mezcla de metanol: cloroformo (1:2 vol/vol) (300µl de volumen total) durante 30 min alternando con agitación en *vortex* y reposo a bajas temperaturas.

- 3 Separación e identificación de lípidos por TLC

La separación cromatográfica se realizó en una placa de sílica gel 60F254 (Merck, Alemania) aplicando el siguiente sistema de solventes: hexano/ dietiléter/ ácido acético (80:20:1) y aplicando 10µl de cada muestra en la placa. Las fracciones de lípidos se visualizaron luego de una exposición a vapores de Yodo. La identificación de cada fracción se realizó por comparación de los respectivos R_f con sustancia mezcla de referencia.

Análisis por GC-FID

Recuperamos las células bacterianas por centrifugación, seguido por una liofilización de las células.

Metanólisis

Pesamos 4-7mg de células liofilizadas. Colocamos 1ml de cloroformo y 1 ml de metanol conteniendo 15% de ácido sulfúrico e incubamos durante 3h a 100°C.

A1.10 Medios de cultivo empleados

Medio LB agar

Bacto-tryptona	10g
Extracto de levadura	5,0g
NaCl	10g
Agua destilada	c.s.p. 1L
Ajustamos pH 7,5 con NaOH	
Agregamos 15 g de agar	
Esterilizamos con autoclave	

Medio R2A

Extracto de levadura	0,5g
Proteosa Peptona	0,5g
Casaminoácidos	0,5g
Glucosa	0,5g
Almidón soluble	0,5g
Piruvato de Sodio	0,3g
Fosfato de Dipotasio	0,3g
Sulfato de Magnesio	0,05g
Agua desionizada c.s.p.	1L
Agar	15g
Esterilizar con autoclave	

Medio LGI (*para Herbaspirillum*)

Sulfato de amonio	20 mM 2,64g
Fuente carbonada	55 mM 1%
KH ₂ PO ₄ anh	87,7 mM
K ₂ HPO ₄ anh	12,3 mM
MgSO ₄	0,1g
CaCl ₂	15mg
FeCl ₂ .6H ₂ O	10mg
NaMo ₄ .2H ₂ O	2mg
pH6,8	

Terrific Broth

Triptona	12g
Extracto de levadura	24g
Glicerol	4ml
Agua desionizada c.s.p.	900ml

Buffer fosfato salino PBS 1x

1 Disolvimos en 800ml de agua destilada:

8,0 g	de NaCl
0,2 g	de KCl
1,44 g	de Na ₂ HPO ₄
0,24g	de KH ₂ PO ₄

2 Ajustamos el pH a 7,4

3 Ajustamos el volumen a 1L con agua destilada

4 Esterilizamos por autoclave

A1.11 Purificación de PHB

Colectamos las células en fase estacionaria de crecimiento por centrifugación (15 min a 10 000 r.p.m.). Se resuspendieron en igual volumen de hipoclorito de sodio (5% p/vol) e incubó por 2 h a 37°C. Se centrifugó por 10 min a 10000 r.p.m. y se lavó el *pellet* dos veces con 5ml de agua destilada y 2ml de metanol, centrifugando 10 min a 10000 r.p.m. cada vez .

Resuspendimos el *pellet* en 2-3 ml de cloroformo caliente. Centrifugamos por 10 min a 10000 r.p.m..

El sobrenadante conteniendo el material polimérico se transfirió a un tubo nuevo y se precipitó con cuatro volúmenes de metanol durante toda la noche a 4°C. El precipitado se separó por centrifugación (10-20 min a 10000 r.p.m.) y se secó bajo flujo de nitrógeno.

A1.12 Lisado de colonias bacterianas para PCR

Se picaron individualmente las colonias frescas de las placas de cultivo con palillos de madera estériles, en cámara de flujo laminar. Cada colonia fue suspendida 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. Inmediatamente fueron incubados a -20 °C en el *freezer* por 20 min. Finalmente se centrifugaron a 10000 r.p.m. por 5 min y se empleó el sobrenadante como templado para las reacciones de PCR.

Anexo II

A2.1 Secuencias del gen 16S ARNr de los cuatro aislamientos seleccionados en la sección *Resultados 4.12 Identificación filogenética de los organismos seleccionados*

Identificación	Secuencia
7	<p>GCGGNCTACACATGCAGTCGAGCGGTAGAGAGAAGCTT GCTTCTCTTGAGAGCGGCGGACGGGTGAGTAATGCCTAGGAATCTGCCTG GTAGTGGGGATAACGCTCGGAAACGGACGCTAATACCGCATACGTCCTA CGGGAGAAAGCAGGGGACCTTCGGGCCTTGCCTATCAGATGAGCCTAGG TCGGATTAGCTAGTTGGTGAGGTAATGGCTACCAAGGCGACGATCCGTA ACTGGTCTGAGAGGATGATCAGTCACACTGGAAGTGGACACGGTCCAGA CTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGAATATTGGACAATGGGCGAAAGCCTG ATCCAGCCATGCCGCGTGTGTGAAGAAGGTCTTCGGATTGTAAAGCACTT TAAGTTGGGAGGAAGGGCAGTTACCTAATACGTATCTGTTTTGACGTTAC CGACAGAATAAGCACCGGCTAACTCTGTGCCAGCAGCCGCGTAATACAG AGGGTGCAAGCGTTAATCGGAATTAAGCGGCGTAAAGCGCGTAGGTGG TTTTGTTAAGTTGGATGTGAATCCCTCGGGCTCAACTAGGGAAGTGCATT TAACTGACAGCTAGACTATGGCACCCCGGCGCTGAAATTCCTGCGTAC CAACAAACCGACCACATTTACTCCCCGCCCCCTCTCTACTTACGCC CGTACTCATTCAACTGAGTGTATATCCTCTTCTGCATTCACTCTCCACT CTAATCACAGAGGCTGAGTAGAATCAAAACAAATAAAAATCANTNCAACN GTCTAGTTCTGGGGTTCTAGCACCTAATCTATAGAAAACCTATTTGTAT ACTCCAACTCAAGCGTGTCTATATGTCTAGGTTCTTTTTTTCTAGGA CTTCTGCTTATCTTCGCCCGCTTCTTTACCAAGCCCGCAACGTCTAGCA</p>
17	<p>GCGCTACACATGCAGTCGAGCGGTAGAGAGAAGCTTGCTTCT CTTGAGAGCGGCGGACGGGTGAGTAATGCCTAGGAATCTGCCTGGTAGTG GGGGATAACGCTCGGAAACGGACGCTAATACCGCATACGTCCTACGGGAG AAAGCAGGGGACCTTCGGGCCTTGCCTATCAGATGAGCCTAGGTCGGAT TAGCTAGTTGGTGAGGTAATGGCTACCAAGGCGACGATCCGTAAGTGGT CTGAGAGGATGATCAGTCACACTGGAAGTGGACACGGTCCAGACTCCTA CGGGAGGCAGCAGTGGGAATATTGGACAATGGGCGAAAGCCTGATCCAG CCATGCCGCGTGTGTGAAGAAGGTCTTCGGATTGTAAAGCACTTTAAGTT GGGAGGAAGGGCAGTTACCTAATACGTATCTGTTTTGACGTTACCGACAG AATAAGCACCGGCTAACTCTGTGCCAGCAGCCGCGTAATACAGAGGGTG CAAGCGTTAATCGGAATTAAGCGGCGTAAAGCGCGTAGGTGGTTTTGTT AAGTTGGATGTGAATCCCCGGGCTCAACCTGGGAAGTGCATTCAAACT GACAAGCTAGAGTATGGTAGAGGGTGGTGAATTTCTGTGTAGCGGTGA AATGCGTACATATAGGAAGGAACACCAGTGGCGAACCGACCACTGGAC TGATACTGACACTGAGGTGCCAAAGCGGGGAGCAACACGATTAGATA CCCTGGTAGGTCCACGCTCGTAAACGATGTCAACTAGCCGTTGGGAGCCT TGAGCTTTAGTGGCGCAGCTAACGCATTAAGCTTGACCGTCTGGGGAG CACNGGCGCAGGGTAAACTCAATGAATTGACGGGGCCTGCACAAGCA GTGGAGCATGTGGCTTACTNCCAAGAACGCGAGAATCTTACCAGGGCTTG</p>

33	<p>AAGNCTANACATGCAAGTCGAGCGGTAGAGAGAAGCTTGCTTCTCTTGAG AGCGGCGGACGGGTGAGTAATGCCTAGGAATCTGCCTGGTAGTGGGGGAT AACGTTTCGAAACGGACGCTAATACCGCATAACGCTCCTACGGGAGAAAGCA GGGGACCTTCGGGCCCTTTCGCTATCAGATGAGCCTAGGTCGGATTAGCTA GTTGGTGAGGTAATGGCTCACCAAGGCGACGATCCGTAACCTGGTCTGAGA GGATGATCAGTCACACTGGAAGTGGACACGGTCCAGACTCCTACGGGAG GCAGCAGTGGGAATATTGGACAATGGGCGAAAGCCTGATCCAGCCATGC CGCGTGTGTGAAGAAGGTCTTCGGATTGTAAAGCACTTTAAGTTGGGAGG AAGGGCATTAACTAATACGTTAGTGTTCGACGTTACCGACAGAATAAG CACCGGCTAACTCTGTGCCAGCAGCCGCGTAATACAGAGGGTGAAGCG TTAATCGGAATTACTGGGCGTACAGCGCGCTAGGTGGTTGTAAAGTTG GATGTGAAATCCCCCCCCTCAACTCGGGAAGTGCATTCCAAACTGACTG ACTATAGTACGGCCCAGCCTGCCTGCAAATAATTCCTCCTCCCTACAAT GCACTCCTCTAGATCCTTCGTCCTCCGACCATCTGGTTACACAATA CACATTCATATAAACCGATACGACTACATCCCTCCTCCACCTATACCCTC CATTTCGAAATAAAACAGTACACTGACCAATTAACAACCCATTCTACAGT CGACCAACAGTCACTATTACCCTCACTGTCACACACGCATGCTCTT ATGAAAAGGTACTATCAATTATAAAGAAGTCGTCAAATCTTACCCCGCCC GCTTTACCACTGACATCACCTCTAGCATCAACTATTA</p>
35	<p>GCGTGCTATACATGCAGTCGAGCGAATGGATTGAGAGCTTGCTCTCAAGA AGTTAGCGGCGGACGGGTGAGTAACACGTGGGTAACCTGCCATAAGACT GGGATAACTCCGGGAAACCGGGGCTAATACCGGATAACATTTTGAACCGC ATGGTTCGAAATTGAAAGGCGGCTTCGGCTGTCACCTATGGATGGACCCG CGTCGCATTAGCTAGTTGGTGAGGTAACGGCTCACCAAGGCAACGATGCG TAGCCGACCTGAGAGGGTGATCGGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCCA GACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCGCAATGGACGAAAGTC TGACGGAGCAACGCCGCGTGAGTGATGAAGGCTTCGGGTCGTAAAACCTC TGTTGTTAGGGAAGAAACAAGTCTAGTTGAATAAGCTGGCACCTTGACGG TACCTAACAGAAAGCCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATA CGTAGGTGGCAAGCGTTATCCGGAATTATTGGGCGTAAAGCGCGCGCAGG TGGTTTCTTAAGTCTGATGTGAAAGCCACGGCTCAACCGTGGAGGGTCA TTGGAAACTGGGAGACTTGAGTGCAGAAGAGGAAAGTGAATTCCATGTG TAGCGGTGAAATGCGTAGAGATATGGAGGAACACCAGTGGCGAACGCGAC TTTCTGATCTGTAACCTGACACTGATGTGCGAAAGCAGTGGGAGCAACAG AGATAAGATAACCTGGCACTACACGCCGTACACTATGAGTGCTAGTGTTA GAGGGTTTCCGACCCTTAGTGTGAAGTTAACGCAGTATGCTCCTCCATC TGGGGAGTACGGCCGACAGGCTGATACGCAAATGTATTGACGCGGGGTC CGGCACCAGCGGTGGCACTTGTGCTTCTAGTTTGTAGCC</p>

A2.2 Secuencias de regiones del gen *phaC* de los aislamientos seleccionados en la sección *Resultados: 4.13 Identificación de los genes que codifican para las polihidroxialcanoato sintasas (phaC y phaC1) en los aislamientos seleccionados*

Identificación	Secuencia
7	GCACCCAGTGTTCTGATGTCGTGGCGCAACTTTGACGCGGCGCACGCCGGCACCACC TGGGATGACTTGATCGAGACCGGCATTATCAAAGGCCTGCAAGTCACCCGCGAGATCA GTGGCGAACAAACGCCCAACTGCGTGGGTTTCTGTATCGGCGGCACGTTGCTGAGCAC GGCGCTGGCGGTATTGGCGGCGCGGCGGACAAAGACATCGCCAGTGTGAGCCTGTT GACCACCTTCTCGATTACCTGGACACCGGCCCATCGACATCTTTGTCGACGAGCAAC TGGTGGCTTACCGCGAGCGACCATCGGCGGACTGGATGGCCCGTCGGCCTGTTCA AGGGCGAGGACATGGGCAACACCTTTTCGCTTCTGCGCCCTAATGACTTGTGGTGGAA CTACAACGTCGACAAATACCTCAAGGGCCAGAAACCAATGCCNTCGA
17	GTANTTCCACCACAAGTCATTAGGGCGCANAAAGCGAAAAGGTGTTGCCCATGTCCTCGC CCTTGAACAGGCCGACGGGGCCATCCAGTCCGCCNATGGTGCGCTCGCGGTAAGCCA CCAGTTGCTCGTCNACAAAGATGTCNATGGGGCCGTTGTCAGGTAATCGAGGAAGGT GGTCAACAGGCTCACACTGGCGATGCTTTGTGCGCGCGCCGCCAATACCGCCAGC GCCGTGCTCAGCAACGTGCCGCCNATACAGAAACCCACGCAGTTGGGGCGTTGTTGCGC CACTGATCTCGCGGTGACTTGCAGGCCTTTGATAATGCCGGTCTCGATCAAGTCATCC CAGGTGGTGCCGGCGTGCGCCGCTCAAAGTTGCGCCACGACATCAGGAACACTGGG TGCCCTTGCTGCAACAAGTGGCNAACCATCGAGTTGTCCGGGCGCANGTCGAGNAN

A2.3 Curvas de crecimiento de aislamientos heterótrofos a 25°C

Aislam/ T(hrs)	0	15	19	46	68	92	112
1	0.01	0.07	0.0775	0.0175	0.039	0.025	0.0275
2	0.0125	0.048	0.51	0.5			
3	0.0175	0.08	0.0675	0.175	0.04	0.025	0.03
4	0.05	0.545	0.58	0.63			
5	0.0225	0.435	0.485	0.575	0.755		
6	0.0275	0.0825	0.225	0.025	0.0575	0.025	0.04
7	0.05	0.59	0.615	0.66			
8	0.01	0.0675	0.06	0.15	0.035	0.0475	
9	0.045	0.3725	0.39	0.355			
10	0	0.0625	0.0425				0.0225
11	0.025	0.41	0.385	0.365			
12	0.01	0.445	0.52	0.505			
13	0.005	0.15	0.13	0.0975	0.125	0.135	0.09
14	0.01	0.065	0.054	0.0125	0.0425	0.0575	0.035
15	0.025	0.415	0.4825	0.455			
16	0.03	0.525	0.585	0.58			
17	0.04	0.58	0.625	0.6			
18	0	0.07	0.05	0.015	0.0625	0.0235	0.1075
19	0.005	0.06	0.0525	0.0075	0.0275	0.07	0.055
20	0.03	0.415	0.45	0.44			
21	0.0125	0.43	0.04	0	0.03	0.04	0.025
22	0.035	0.51	0.605	0.58			
23	0.025	0.385	0.265	0.335			
24	0.025	0.0525	0.0525				

Aislam/ T(hrs)	0	15	19	46	68	92	112
25	0.0075	0.065	0.065	0	0.025	0.0375	0.03
26	0.0325	0.08	0.08	0.48	0.035	0.0375	0.025
27	0.0325	0.41	0.41	0.475			
28	0.005	0.075	0.075	0	0.0275	0.0975	0.1
29	0.005	0.1	0.1	0.1425	0.19	0.125	
30	0.0475	0.01	0.325	0.665			
31	0.0075	0.08	0.08	0.0075	0.03	0.03	0.055
32	0.0325	0.105	0.105	0.005	0.0425		
33	0.01	0.445	0.445	0.52			
34	0.0625	0.55	0.55	0.61			
35	0.04	0.545	0.545	0.42			
36	0.0125	0.27	0.27	0.335	0.335	0.285	0.195
37	0.08	0.675	0.675	0.65			
38	0.0225	0.1025	0.1025	0.0175	0.05	0.055	0.0325
39	0.0225	0.245	0.245	0.23	0.17	0.1	0.0475
40	0.0375	0.08	0.08	0	0.0325	0.0275	0.03
41	0.02	0.19	0.19	0.175			
42	0.0175	0.38	0.38	0	0.025	0.0275	0.0275
43	0.0375	0.35	0.35	0.34			
44	0.045	0.43	0.43	0.395			
45	0.0575	0.435	0.435	0.38			
46	0.055	0.515	0.515	0.395			
47	0.0375	0.275	0.275	0.19			
48	B						

Repetición de los aislamientos de DO baja

Aislam/ T(hrs)	0	18	25	71	120	144	192
1	0.045	0.0375	0.0175	0.035	0.035	0.025	0.03
3	0.0425	0.045	0.02	0.035	0.035	0.025	0.03
5	0.1	0.375	0.36	0.64	0.75	0.8	0.73
6	0.04	0.33	0.015	0.64	0.0675	0.015	0.0375
8	0.04	0.025	0.0125	0.015	0.21	0.035	0.045
10	0.05	0.045	0.03	0.04	0.085	0.0375	0.075
13	0.04	0.25	0.02	0.05	0.165	0.085	0.13
14	0.0375	0.0515	0.015	0.105	0.06	0	0.025
18	0.065	0.095	0.09	0.01	0.165	0.715	0.085
19	0.0725	0.135	0.1525	0.05	0.255	0.26	0.295
24	0.025	0.02	0.0075	0.18	0.055	0	0.005
25	0.025	0.035	0.015	0	0.06	0.02	0.13
26	0.0375	0.0525	0.02	0.0175	0.045	0.015	0.02
28	0.045	0.06	0.0225	0.0125	0.08	0.035	0.035
29	0.045	0.105	0.115	0.015	0.3	0.35	0.07
31	0.0375	0.03	0.01	0.01	0.06	0.01	0.015
32	0.05	0.16	0.1025	0.01	0.23	0.1	0.115
36	0.055	0.0925	0.105	0.035	0.405	0.21	0.145
38	0.0425	0.035	0.01	0.025	0.07	0.015	0.0225
39	0.0375	0.0375	0.03	0.0825	0.29	0.08	0.055
40	0.035	0.0375	0.01	0.0125	0.06	0.015	0.03
42	0.04	0.04	0.02	0.04	0.08	0.02	0.045
46	0.075	0.295	0.33	0.525	0.7	0	0
47	0.06	0.16	0.13	0.115	0.225	0.115	0.15

A2.4 Comandos empleados en el *Mothur*

1 AGRUPAMIENTO O CLUSTER

```
mothur > read.dist(phylip=EUB_TODASDM.dist, cutoff=0.1)
```

```
mothur > unique.seqs(fasta=multifastaeubaln.fasta)
```

```
mothur > cluster()
```

2 CREO UN ARCHIVO .GROUPS

```
mothur > make.group(fasta=eub7.fasta-eub8.fasta-eub15.fasta-eub16.fasta,  
groups=EUB7-EUB8-EUB15-EUB16)
```

3 CREO UN ARCHIVO .SHARED

```
mothur > read.otu(list=EUB_TODASDM.fn.list, group=EUB_TODASDM.groups,  
label=unique-0.03-0.05-0.10)
```

4 CREO CURVAS RAREFACCIÓN PARA CADA MUESTRA

```
mothur > read.otu(list=EUB_TODASDM.fn.EUB7.rabund)
```

```
mothur > rarefaction.single()
```

```
mothur > read.otu(list=EUB_TODASDM.fn.EUB8.rabund)
```

```
mothur > rarefaction.single()
```

```
mothur > read.otu(list=EUB_TODASDM.fn.EUB15.rabund)
```

```
mothur > rarefaction.single()
```

```
mothur > read.otu(list=EUB_TODASDM.fn.EUB16.rabund)
```

```
mothur > rarefaction.single()
```

5 LIBSHUFF

```
mothur > read.dist(phylip=EUB_TODASDM.dist, group=EUB_TODASDM.groups)
```

```
mothur > libshuff()
```

6 ÍNDICES

I) SHANNON

```
mothur > read.dist(phylip=eub7DM.dist, cutoff=0.10)
```

```
mothur > cluster()
```

```
mothur > summary.single(calc=shannon)
```

```
mothur > read.dist(phylip=cia7DM.dist, cutoff=0.10)
```

```
mothur > cluster()
```

```
mothur > summary.single(calc=shannon)
```

II) CHAO1

```
mothur > read.dist(phylip=eub7DM.dist, cutoff=0.10)
```

```
mothur > cluster()
```

```
mothur > summary.single(calc=chao)
```

```
mothur > read.dist(phylip=cia7DM.dist, cutoff=0.10)
```

```
mothur > cluster()
```

```
mothur > summary.single(calc=chao)
```

7 RAREFACCIÓN VARIAS

```
mothur > read.otu(shared=EUB_TODASDM.fn.shared)
```

```
mothur > rarefaction.shared()
```

8 RAREFACCIÓN SIMPLES

```
mothur > read.dist(phylip=eub7DM.dist)
```

```
mothur > cluster(cutoff=0.10)
```

```
mothur > rarefaction.single(freq=1)
```

```
mothur > read.dist(phylip=cia7DM.dist)
```

```
mothur > cluster(cutoff=0.10)
```

```
mothur > rarefaction.single(freq=1)
```

9 SUMMARY

```
mothur > read.otu(shared=EUB_TODASDM.fn.shared, label=unique-0.03-0.05-0.10)
```

```
mothur > summary.shared()
```

DIAGRAMAS DE VENN

```
mothur > venn(groups=EUB7-EUB8-EUB15-EUB16)
```

10 HEATMAPS

```
mothur > heatmap.bin(scale=log2, label=0.03)
```

11 AGRUPAMIENTO: COMMUNITY TREE

```
mothur > read.otu(list=EUB_TODASDM.fn.list, group=EUB_TODASDM.groups,
label=0.03)
```

```
mothur > tree.shared(calc=thetayc, groups=EUB7-EUB8-EUB15-EUB16)
```

12 LISTA DE OTUs

```
mothur > read.dist(phylip=EUB_TODASDM.dist)
```

```
mothur > cluster()
```

```
mothur > read.otu(list=EUB_TODASDM.fn.list)
```

```
mothur > get.otulist(list=EUB_TODASDM.fn.list, label=unique-0.03-0.05-0.10)
```

13 OTUs REPRESENTATIVAS

```
mothur > get.oturep(phylip=EUB_TODASDM.dist, fasta=multifastaeubaln.fasta,
list=EUB_TODASDM.fn.list, label=unique-0.03-0.05-0.10, sorted=name)
```

A2.5 OTUs calculadas emplando distintas distancias p para las bibliotecas de cinaobacterias y eubacterias.

	99%	97%	95%
Cianobacreas			
Sitio			
7	44	37	40
8	39	32	25
15	41	33	33
16	65	49	47
Eubacterias			
sitio	70	63	60

60	51	47
43	41	45
56	43	36

A 2.6 Valores de abundancia de los distintos grupos taxonómicos presentes en las cuatro bibliotecas de eubacterias analizadas con el Classifier de RDP.

<i>Eubacteria</i>	<i>Abundancia (%)</i>			
	7	8	15	16
Planctomicetes	3,4	2,8	1,6	0
Bacteriodetes	4,5	4,2	6,3	7,5
Cloroflexi	2,2	2,8	3,1	0
Gematimonadetes	2,2	2,8	3,1	0
Actinobacteria	3,4	1,4	0	1,3
Acidobacteria	1,1	1,4	1,6	0
Firmicutes	5,6	13,9	0	0
Verrucomicrobia	2,2	1,4	6,3	1,3
α Proteobacteria	30,3	36,2	3,1	13,7
β Proteobacteria	30,3	27,8	4,7	31,3
γ Proteobacteria	4,5	0,0	0	0
δ Proteobacteria	3,4	1,4	0	1,2
Familia I	0	0	15,7	2,7
Familia XIII	0	0	1,5	3,8
Familia VIII	0	0	3,2	1,2
Familia IX	0	0	4,7	2,5
Familia IV	0	0	0	2,5
Familia III	0	0	0	0
Familia VI	0	0	3,2	1,2
cias no clasificadas	0	0	39,0	17,5
cloroplasto	0	0	0	10,0
eub no clasificadas	0	3,4	3,1	1,3

Cianobacteria	Abundancia %			
	7	8	15	16
Familia VI	1,5	2,6	0	0
Familia VIII	1,5	0	1,3	1,2
Familia IV	1,5	23,7	3,8	0
Familia I	17,9	21,1	21,8	6,9
Familia IX	3,0	5,3	1,3	0
Familia XIII	0	0	1,3	2,3
Familia VI	0	0	0	12,7
Cloroplastos	1,5	0	10,3	18,4
cia no clasificadas	62,7	47,4	53,8	32,2
Verrucomicrobiales	1,5	0	1,3	11,5
Planctomicetes	3,0	0	0	3,4
Proteobacteria	0	0	2,6	1,1
SR1	0	0	0	1,1
Acidobacteria	0	0	0	4,6
eub no clasificadas	6,0	0	2,6	4,6

Valores de abundancia de los distintos grupos taxonómicos presentes en las cuatro bibliotecas de eubacterias analizadas con Classify de Green Genes.

Proteobacterias GG	Abundancia %			
	7	8	15	16
Acidobacteria	1	1	2	0
Actinobacteria	8	3	3	1
Bacteroidetes	4	4	7	8
Chloroflexi	1	1	3	0
Chroococcales	0	0	7	4
Nostocales	0	0	39	13
Oscillatoriales	0	0	14	13
Prochlorales	0	0	2	0
Firmicutes	10	15	0	0
Planctomycetes	4	6	3	0
α - Proteobacteria	27	31	3	10
β - Proteobacteria	26	25	5	21
γ - Proteobacteria	4	1	0	3
δ - Proteobacteria	5	3	0	3
Unclassified	6	6	0	14
stramenopiles	0	0	0	8
Viridiplantae	0	0	0	3
Verrucomicrobia	3	1	7	0
Pleurocapsales	0	0	5	0

<i>Cianobacterias GG</i>	<i>Abundancia %</i>			
	7	8	15	16
Cand. Koribacter	0	0	0	1
Bacteroidia	0	0	0	1
Chroococcales	2	3	4	4
Epsilonproteobacteria	2	0	0	0
Clostridia	0	0	0	4
Planctomycetacia	4	5	0	2
Pleurocapsales	8	3	3	2
Unclassified	2	5	0	0
Bacillariophyta	0	0	9	12
Chrysophyceae	0	0	0	1
Olisthodiscus	0	0	0	2
Raphidophyceae	0	0	0	1
Mollicutes	0	0	0	1
Thermotogales	0	0	0	1
Verrucomicrobiae	0	3	1	16
Anabaena	26	16	23	6
Anabaenopsis	4	0	0	0
Cyanospira	8	16	9	9
Dolichospermum	0	3	1	0
Calothrix	0	5	1	1
Nodularia	0	5	0	0
Nostoc	28	8	14	0
Trichormus	2	0	0	0
Unclassified	15	5	1	0
Leptolyngbya	0	18	1	1
Limnothrix	0	0	0	6
Microcoleus	0	3	6	21
Oscillatoria	0	0	0	5
Phormidium	0	3	4	0
Planktothrix	0	0	1	0
Tychonema	0	0	3	0
Unclassified	0	0	3	0
Chroococciopsis	0	0	1	0
Pleurocapsa	0	0	1	0
Pseudanabaena	0	0	0	1
Bacillariophyceae	0	0	9	0
Unclassified	0	0	1	0

