

APROXIMACIÓN POLIFÁSICA A LA CARACTERIZACIÓN DE CIANOBACTERIAS CON HETEROCISTO AISLADAS DE SUELO DE ARROZALES

Tesina de Grado
Licenciatura en Bioquímica
Facultad de Ciencias, UdeLaR
María Victoria Cerecetto González
Tutor: Ing. Agr. (Msc.) Pilar Irisarri
Co-tutor: Msc. Germán Pérez
Lab. Microbiología, Depto. Biología Vegetal, Facultad de Agronomía, UdeLaR
Febrero 2014



FACULTAD DE
CIENCIAS
UDELAR | fcien.edu.uy



FACULTAD DE
AGRONOMIA
UNIVERSIDAD DE LA REPUBLICA

Si de algo soy rico es de perplejidades y no de certezas.

Jorge Luis Borges

AGRADECIMIENTOS

Quisiera agradecer a todos aquellos que me han acompañado en el transcurso de estos cinco años de carrera, comenzando por mis tutores, Pilar y Germán, que sin ellos este trabajo no hubiese podido ser posible. Gracias por haberme dado la oportunidad de trabajar con estas bichas tan lindas, por enseñarme todo lo que necesitaba saber de ellas y por guiarme en este trabajo.

Gracias a mis compañeros del laboratorio de Microbiología por ayudarme en un montón de cosas, a Gastón y Andrea por ayudarme en la parte molecular, a Gabriela por ayudarme en la estadística, a Pame, Silvi y Tania por hacerme más divertidas las tardes de laboratorio, y a Jorgito por los chusmeríos y por ser mi Guru Molecular.

Gracias al Laboratorio de Bioquímica de la Facultad de Agronomía y al Laboratorio de Ecología Microbiana y Microbiología Ambiental de la Facultad de Química, por dejarme utilizar todos sus equipos, etc. Especialmente a Maxi, por ayudarme con los árboles filogenéticos y a Pedro, por ayudarme con las enzimas, etc. Gracias a la Facultad de Agronomía por dejarme utilizar sus instalaciones para desempeñar este trabajo, y a la ANII por aceptarme como becaria.

Gracias a Sylvia Bonilla por evaluar esta tesina.

Gracias a mis amigos de la facu por acompañarme en esas tardes de estudio, mate, nargui, meriendas, etc. Especialmente a Flor, por haberme acompañado en este camino desde el primer día del curso introductorio.

Gracias a mis amigos de la vida por su apoyo incondicional durante todos estos años. Especialmente a Ro por hacer la carátula de esta tesina.

Gracias a Gonchi por acompañarme en estos últimos años y estar ahí siempre.

Gracias a mi familia, abuelos, tías, primos, por acompañarme y apoyarme en este camino, aunque todavía no saben bien de que se trata. Y especialmente a mis viejos y mis hermanos con los que viví día a día esta experiencia, gracias por su apoyo y consejos, y por haberme animado todos los días a continuar con esta carrera.

Gracias!!!!!!!!!!!!!!

RESUMEN

Las cianobacterias tienen un rol relevante en la biosfera, ya que además de fijar dióxido de carbono, muchas pueden fijar nitrógeno molecular, lo que las convierte en organismos capaces de colonizar diversos ecosistemas. Los arrozales constituyen un ambiente favorable para su desarrollo, y a su vez, se ha demostrado que estos microorganismos pueden ser utilizados como inoculantes para aumentar la producción de este cultivo. En este trabajo se propuso caracterizar diez aislamientos de cianobacterias con heterocisto seleccionados de una colección de aislamientos de cianobacterias provenientes de arrozales de la Estación Experimental de Paso de la Laguna (INIA, Treinta y Tres) (SU 1, SU 5, SU 8, SU 10, SU 11, SU 16, SU 37, SU 40 y SU 45) mediante un abordaje polifásico. La clasificación de las cianobacterias es compleja debido a que existen diferentes sistemas de clasificación para estos microorganismos, tanto botánicos como bacteriológicos, y además algunos de sus caracteres pueden modificarse a través del tiempo y de acuerdo a las condiciones de cultivo o ambientales. Por esas razones, un abordaje polifásico resulta apropiado para una adecuada identificación, donde además de su morfología, se consideren caracteres bioquímicos, moleculares y fisiológicos. En este caso los caracteres fisiológicos y bioquímicos evaluados incluyeron: velocidad de crecimiento, contenido de pigmentos fotosintéticos, tasas de producción fotosintética de O₂ y actividad de algunas enzimas relacionados al metabolismo del nitrógeno (Nitrogenasa, Nitrato reductasa y Glutamina sintetasa). También se realizaron análisis filogenéticos con los genes ARNr 16S y *hetR*. Todos los aislamientos lograron ser identificados a nivel de género. De los diez aislamientos, siete se identificaron morfológica y molecularmente dentro del género *Nostoc*, Familia Nostocaceae, Orden Nostocales (SU 1, SU 5, SU 8, SU 10, SU 11, SU 40 y SU 54) y tres dentro del género *Calothrix*, Familia Rivulariaceae, Orden Nostocales (SU 16, SU 37 y SU 45). En el caso de pretender identificar los aislamientos a nivel de especie, se debería de continuar con la investigación utilizando otros marcadores moleculares u otras técnicas. Si bien en base a las secuencias de los genes ARNr 16S podría inferirse que SU 10 pertenece a la especie *Nostoc piscinale* y SU 40 a *Nostoc calcicola*. A su vez, se concluyó que los parámetros bioquímicos y fisiológicos determinados en este trabajo no fueron útiles para identificar a los diferentes aislamientos, ni para diferenciar entre aislamientos pertenecientes a un mismo género. Sin embargo, estos datos podrán ser tenidos en cuenta para evaluar estas cianobacterias como posibles inoculantes para arroz. Del análisis en conjunto todos los parámetros evaluados se concluye que todos los aislamientos estudiados eran diferentes entre sí. Este trabajo contribuyó al conocimiento de los géneros de cianobacterias con heterocisto presentes en los arrozales del país y es uno de los pocos sobre caracterización de cianobacterias de arrozales con un abordaje polifásico.

Palabras claves: Cianobacterias, Caracterización Polifásica, Arroz

Tabla de Contenidos

Tabla de Contenidos.....	i
Abreviaturas.....	iii
1. INTRODUCCIÓN.....	2
1.1. Generalidades sobre Cianobacterias.....	2
1.1.1. Pigmentos Fotosintéticos.....	2
1.1.2. Células de Especialización y de Diferenciación.....	4
1.2. Metabolismo de las Cianobacterias.....	5
1.2.1. Metabolismo del Nitrógeno.....	5
1.2.1.1. Asimilación del Nitrato.....	6
1.2.1.2. Fijación Biológica de Nitrógeno.....	7
1.2.1.3. Ciclo Glutamina Sintetasa-Glutamato Sintasa.....	8
1.2.1.4. Regulación del Metabolismo del Nitrógeno.....	10
1.3. Caracterización de Cianobacterias.....	10
1.3.1. Clasificación Botánica.....	10
1.3.2. Clasificación Bacteriológica.....	11
1.3.3. Caracterización Polifásica.....	13
1.4. Cianobacterias Diazótrofas en Arrozales.....	15
1.5. Antecedentes.....	16
2. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS.....	20
2.1. Hipótesis de Trabajo.....	20
2.2. Objetivo General.....	20
2.2.1. Objetivos Específicos.....	20
3. MATERIALES Y MÉTODOS.....	22
3.1. Cultivo de Cianobacterias.....	22
3.2. Curva y Tasa de Crecimiento.....	22
3.3. Análisis Morfológico de los Aislamientos.....	23
3.4. Determinación de Pigmentos Fotosintéticos.....	24
3.4.1. Clorofila <i>a</i>	24
3.4.2. Carotenoides.....	24
3.4.3. Ficobiliproteínas.....	24
3.5. Tasa de Producción Fotosintética de O ₂	25
3.6. Actividades Enzimáticas.....	25
3.6.1. Actividad Nitrogenasa.....	25
3.6.2. Actividad Nitrato Reductasa.....	26
3.6.3. Actividad Glutamina Sintetasa.....	27
3.7. Cuantificación de Proteínas Totales.....	28
3.8. Extracción y Cuantificación de ADN Genómico.....	29
3.9. Amplificación del Gen ARNr 16S.....	30
3.10. Amplificación del Gen <i>hetR</i>	30
3.11. Identificación Molecular y Análisis Filogenético.....	31
3.12. Análisis Estadístico.....	31
4. RESULTADOS.....	34

4.1. Curva y Tasa de Crecimiento.....	34
4.2. Caracterización Morfológica.....	38
4.3. Caracterización Bioquímica.....	43
4.3.1. Determinación de Pigmentos Fotosintéticos.....	43
4.3.2. Tasa de Producción Fotosintética de O ₂	44
4.3.3. Actividades Enzimáticas.....	45
4.3.3.1. Actividad Nitrogenasa.....	45
4.3.3.2. Actividad Nitrato Reductasa.....	45
4.3.3.3. Actividad Glutamina Sintetasa.....	46
4.4. Caracterización Molecular.....	47
4.4.1. Extracción y Cuantificación de ADN Genómico.....	47
4.4.2. Amplificación, Secuenciación y Análisis Filogenético del Gen ARNr 16S.....	48
4.4.3. Amplificación, Secuenciación y Análisis Filogenético del Gen <i>hetR</i>	51
4.5. Resumen de Resultados.....	54
5. DISCUSIÓN.....	56
5.1. Curva y Tasa de Crecimiento.....	56
5.2. Caracterización Morfológica.....	57
5.3. Caracterización Bioquímica.....	59
5.3.1. Determinación de Pigmentos Fotosintéticos.....	59
5.3.2. Tasa de Producción Fotosintética de O ₂	60
5.3.3. Actividades Enzimáticas.....	60
5.3.3.1. Actividad Nitrogenasa.....	60
5.3.3.2. Actividad Nitrato Reductasa.....	61
5.3.3.3. Actividad Glutamina Sintetasa.....	61
5.4. Caracterización Molecular.....	63
5.4.1. Gen ARNr 16S.....	63
5.4.2. Gen <i>hetR</i>	65
6. CONCLUSIONES.....	69
6.1. Conclusiones.....	69
Bibliografía.....	71
ANEXOS.....	81
Anexo I.....	81
Anexo II.....	82
Anexo III.....	83
Anexo IV.....	86

Abreviaturas

γ-GH	γ -glutamil hidroxamato
λ	Longitud de onda
$\lambda_{\text{máx}}$	Longitud de onda máxima
μ	Velocidad de crecimiento
Abs	Absorbancia
ADN	Ácido desoxirribonucleico
ADNg	ADN genómico
ADP	Adenosina difosfato
ATP	Adenosin trifosfato
BSA	Proteína seroalbúmina bovina
C	Carbono
C/N	Balance Carbono/Nitrógeno
cf	Concentración final
Chl α	Clorofila α
CTAB	Bromuro de cetil-trimetilamonio
DGGE	Electroforesis en gel con gradiente de desnaturalización
dNTPs	Desoxinucleótidos
DO	Densidad óptica
e⁻	Electrones
EDTA	Ácido etilendiaminotetracético
FAD	Flavín adenina dinucleótido
FBN	Fijación Biológica de Nitrógeno
FID	Detector de ionización de llama
FMN	Flavin mononucleótido
GOGAT	Glutamato Sintasa
GS	Glutamina Sintetasa
GS/GOGAT	Ciclo Glutamina Sintetasa-Glutamato Sintasa
IRRI	<i>International Rice Research Institute</i>
Mo-bis-MGD	Molibdeno-bis-molibdopterina guanina dinucleótido
MPM	Marcador de peso molecular
MTAB	Bromuro mixto de alquil-trimetilamonio
N	Nitrógeno
NADPH	Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato
NCBI	<i>National Center for Biotechnology Information</i>
NiR	Nitrito Reductasa
NNDA	N-(1-naftil)-etilenodiamina diclorhidrato
NR	Nitrato Reductasa
pb	Pares de bases
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
Pi	Fosfato Inorgánico
PS	Peso seco

PSI	Fotosistema I
PSII	Fotosistema II
RDP II	<i>Ribosomal Database Project II</i>
PVP	Polivinilpirrolidona
RFLP	Fragmentos de restricción de longitud polimórfica
S	Azufre
SDS	Dodecilsulfato sódico
SDS-PAGE	Gel de poliacrilamida con dodecilsulfato sódico
U	Unidades de enzima
UV	Ultravioleta
UV-A	Ultravioleta onda larga
UV-B	Ultravioleta onda media

INTRODUCCIÓN

1. INTRODUCCIÓN.

1.1. Generalidades sobre Cianobacterias

Las cianobacterias son un grupo filogenéticamente primitivo de procariotas Gram negativas que surgieron en la era Precámbrica (Zak *et al.*, 2001). Dichos microorganismos pertenecen al dominio Bacteria (Eubacterias) y comparten algunas características estructurales con las bacterias heterótrofas (pared y membrana) y otras funcionales con las algas y plantas superiores (fotosíntesis oxigénica) (revisado en Bonilla & Aubriot, 2009). Su aparato fotosintético es muy similar a nivel molecular, funcional y estructural al contenido en los cloroplastos de células eucariotas (Stanier & Cohen Bazire, 1977). Las cianobacterias, además, representan una de las líneas filogenéticas principales en el árbol de la vida (Madigan *et al.*, 1999).

La pared celular de las cianobacterias es del tipo Gram negativo, pero la capa de péptidoglicano es más gruesa que en el resto de estas bacterias. Muchas cianobacterias presentan una envoltura en el exterior de la membrana externa, conocida como matriz, glicocálix o cápsula, o dependiendo de la consistencia como gel, mucílago o baba. Por otro lado, su composición en polisacáridos y péptidos puede variar para cada cepa (Castenholz, 2001b).

Las cianobacterias son microorganismos que a veces se pueden apreciar a simple vista como manchas incrustadas sobre una superficie húmeda del suelo, rocas o en la corteza de los árboles. Estas pueden ser de color verde-azul, pardas o negras y presentarse en forma de almohadillas macroscópicas o en capas viscosas. Por otro lado, es usual encontrarlas viviendo de forma planctónica en aguas dulces o saladas. Su intervalo de pH óptimo es de 6.5 a 8.5 (Lee, 1999; Ramírez *et al.*, 2004). A su vez, son capaces de sobrevivir a sequías prolongadas, por lo que muchas de ellas están bien adaptadas a crecer sobre la superficie de suelo (Kannaiyan, 2002).

A nivel morfológico, las cianobacterias pueden ser unicelulares, coloniales o filamentosas (con o sin ramificaciones) (Lyra *et al.*, 2001). Pueden encontrarse células únicas que se separan luego de la fisión binaria, o agregadas, formando colonias irregulares, en las cuales una matriz de naturaleza viscosa es secretada por las células durante el crecimiento de la colonia. A través de una serie de divisiones celulares más o menos regulares, combinada con la formación de una vaina, se pueden producir colonias más ordenadas. La morfología filamentosa es el resultado de divisiones celulares repetidas en un mismo plano, sucediéndose en ángulos rectos al eje principal del filamento (Mur *et al.*, 1999). Como resultado de estas divisiones se produce una hilera de células contiguas denominada tricoma (Thajuddin & Subramanian, 2005). Los tricomas incluidos en una matriz se denominan filamentos. Adicionalmente los tricomas se presentan en forma uni o multiseriada. En el segundo caso se pueden observar ramificaciones falsas o verdaderas, dependiendo del origen de ramificación (Castenholz, 2001b).

1.1.1. Pigmentos Fotosintéticos

Al ser organismos fotosintéticos las cianobacterias presentan diversos pigmentos como clorofila *a* (Chl *a*) y pigmentos accesorios como ficobilinas (revisado por Bonilla & Aubriot, 2009), que actúan como si fueran el complejo colector de luz en plantas superiores (Xu *et al.*, 2001). Sin embargo en la cianobacteria unicelular, *Acaryochloris marina*, el principal pigmento es la clorofila *d*

(Mohr *et al.*, 2010) y los géneros *Prochlorococcus*, *Prochlorothrix* y *Prochloron* presentan Clorofila *a* y *b* (Giddings *et al.*, 1980). El trabajo de capturar la energía lumínica eficientemente, no solo depende de las moléculas de clorofila contenidas en los centros de reacción fotosintéticos. Esto se debe a que esta molécula no absorbe luz en todo el espectro, sino entre los 430 y 440 nm y a los 670 nm. Para superar este problema, los organismos fotosintéticos desarrollaron complejos antena que absorben en los rangos no cubiertos por la clorofila. En el caso particular de las cianobacterias, los ficobilisomas actúan como complejos antena que se anclan a las membranas externas de los tilacoides (Stanier & Cohen-Bazire, 1977). Los ficobilisomas están conformados por pigmentos proteicos solubles en agua asociados con el fotosistema II (PSII)¹. Dependiendo de la intensidad lumínica y de la longitud de onda este complejo también puede transferir energía al fotosistema I (PSI)² (DeRuyter & Fromme, 2008).

Las ficobiliproteínas son las moléculas responsables del color de las cianobacterias (Fay, 1992). Dichos colores son el resultado de la absorción de luz por cromóforos tetrapirrólicos lineales asociados covalentemente a las apoproteínas (Grossman *et al.*, 2001). Estas cromoproteínas pueden representar hasta un 50% de la masa proteica de la célula. Las apoproteínas, ayudan a la estabilización física del ficobilisoma y a la eficiente transferencia de energía entre las diferentes ficobiliproteínas y con el fotosistema (DeRuyter & Fromme, 2008). Las cianobacterias pueden tener cuatro ficobiliproteínas: C-ficocianina que absorbe luz a una longitud de onda máxima ($\lambda_{\text{máx}}$) de 620 nm, aloficocianina ($\lambda_{\text{máx}}$ 650 nm), C-ficoeritrina ($\lambda_{\text{máx}}$ 565 nm) y la ficoeritrocianina ($\lambda_{\text{máx}}$ 568 nm). Las dos últimas aparecen solo en algunas especies de cianobacterias, mientras que las dos primeras se encuentran en todas las especies (Lee, 1999). En determinados organismos, la ficoeritrocianina reemplaza a la C-ficoeritrina (DeRuyter & Fromme, 2008).

Estos complejos proteicos transfieren la energía lumínica a los centro de reacción fotosintéticos en el siguiente orden:

Ficoeritrina → Ficocianina → Aloficocianina → Clorofila *a* (DeRuyter & Fromme, 2008)

En diferentes estudios se sugiere que los ficobilisomas, poseerían un mecanismo alternativo para disipar el exceso de energía absorbida (Eckardt, 2006; Wilson *et al.*, 2006). A su vez, presentan pigmentos protectores para las altas intensidades lumínicas como los carotenoides (revisado en Bonilla & Aubriot, 2009), scitonemina para la radiación UV-A y/o aminoácidos del tipo de las micosporinas que actúan como protectores frente a la radiación UV-B (Häder *et al.*, 2007). Los carotenoides pueden aceptar energía de las clorofilas excitadas y disiparlas en forma de calor. A su vez los carotenoides del PSI contribuyen a la estabilización estructural del complejo y a la absorción de luz. El espectro de absorción de los carotenoides es muy diferente al de la Chl *a*, estos pueden absorber desde los 450 a los 570 nm (DeRuyter & Fromme, 2008).

Se ha propuesto que estos mecanismos de fotoprotección habrían surgido en respuesta a las condiciones presentes en la Tierra hace unos 3500 millones de años (Hoiczky & Hansel, 2000).

¹ Siglas en inglés para *Photosystem* II.

² Siglas en inglés para *Photosystem* I.

Por otro lado, la Chl a , se encuentran inserta en los tilacoides que a diferencia de los organismos fotosintéticos eucariotas, se encuentran libres en el citoplasma y separados de forma equidistante, en vez de apilarse dentro de los cloroplastos (Van den Hoek *et al.*, 1995).

1.1.2. Células de Especialización y de Diferenciación

Las cianobacterias presentan a nivel fenotípico otras estructuras celulares, como son los hormogonios, heterocistos y acinetes.

Los hormogonios se definen como cadenas cortas de 5 a 15 células con diámetros menores a los de las células vegetativas en los tricomas. La formación y liberación de hormogonios parece ser un proceso medido en el tiempo asociado con las condiciones ambientales o con etapas particulares del ciclo morfogénico (Castenholz, 2001b). Los hormogonios son fragmentos móviles relacionados a la reproducción asexual.

Los acinetes pueden ser considerados como esporas. Se producen bajo condiciones de deficiencia de nutrientes y/o limitaciones de luz. Son células vegetativas diferenciadas, las cuales adquieren una pared gruesa que rodea a la pared vieja y acumulan cianoficina, glicógeno, lípidos y carotenoides (Castenholz, 2001b).



Figura 1. Fotografía de un filamento de *Anabaena planctonica* (1000X). Donde la flecha roja señala un acinete intercalar y la flecha verde un heterocisto intercalar (modificado de Bonilla & Aubriot, 2009).

Los heterocistos son células especializadas en la fijación de nitrógeno molecular (N_2). Se encuentran en las terminaciones de los tricomas o intercaladamente. Se diferencian a partir de células vegetativas, cuando el nitrógeno combinado en el medio que las rodea ha disminuido considerablemente (Castenholz, 2001b). Su desarrollo comienza cuando la división celular cesa, luego le sigue la formación de la envoltura celular del heterocisto, formada por una capa de glicolípidos que se encuentra entre una capa externa de polisacáridos y la pared celular. Los glicolípidos constituyen la barrera que impide el ingreso de oxígeno (O_2) a esta célula diferenciada, permitiéndose, así, la fijación biológica de nitrógeno molecular (FBN). Gránulos de cianoficina, un copolímero de arginina y ácido aspártico, no sintetizado ribosomalmente, se acumulan en los poros polares de los heterocistos maduros. Este polímero actúa como una reserva de nitrógeno (N), presente en los heterocistos. A su vez, los heterocistos maduros de la mayoría de las especies muestran una disminución de la concentración de ficobiliproteínas. Pero la característica fisiológica principal de un heterocisto maduro, es la presencia de actividad nitrogenasa. Con el fin de preservar la actividad de dicha enzima, la tasa de respiración de estas células es más alta. Las proteínas que

realizan este incremento, son las pertenecientes a la vía de oxidación de las pentosas fosfato, cuyas actividades son mayores en heterocistos que en las células vegetativas. A su vez, las proteínas citocromo oxidasa y la oxidasa respiratoria terminal alternativa son importantes para la respiración en el heterocisto y la fijación de N₂ aeróbica (Xu *et al.*, 2008).

HetR, el producto de expresión del gen *hetR*, en coordinación con otro factor de transcripción, como el NtcA, actúa como el regulador principal del desarrollo de los heterocistos. Mutaciones en el gen *hetR*, impiden el desarrollo de los heterocistos, mientras que la sobreexpresión de *hetR* causa la formación de múltiples heterocistos contiguos, y lleva a su vez, a la diferenciación de los heterocistos en presencia de N fijado. HetR forma homodímeros que se unen corriente arriba de dicho gen y de otros genes involucrados en el desarrollo. A su vez, HetR presenta actividad proteasa del tipo serina, por lo que puede digerirse a sí misma. Esta actividad proteasa depende del calcio que es crucial para el desarrollo del heterocisto (Luque & Forchhammer, 2008).

1.2. Metabolismo de las Cianobacterias

Las cianobacterias presentan tres tipos de nutrición, una proporción de estas son quimioheterótrofas facultativas, otras fotóautótrofas obligadas y otras fotoheterótrofas (Lee, 1999).

Las cianobacterias fotoautótrofas obligadas, emplean las reacciones de la fotosíntesis oxigénica, utilizando Adenosin trifosfato (ATP)³ y Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato (NADPH)⁴ generados en las reacciones luminosas para la asimilación de dióxido de carbono (CO₂) por el ciclo de Calvin-Benson o ciclo reductor de las pentosas fosfato (Stanier & Cohen-Bazire, 1977; Summers *et al.*, 1995). Tanto el flujo electrónico fotosintético como respiratorio ocurren en la membrana tilacoidal (Scherer *et al.*, 1982). A su vez, el transporte de electrones (e⁻) de la cadena respiratoria también ocurre en la membrana plasmática (Fay, 1992).

Las cianobacterias quimioheterótrofas facultativas, pueden utilizar la vía de las pentosas fosfato, como la principal vía de degradación de carbohidratos exógenos, durante el crecimiento heterótrofo en la oscuridad. Luego, el NAD(P)H generado en el catabolismo de los carbohidratos aportaría el poder reductor para la fijación de N₂ y la respiración en heterocistos y para la respiración de células vegetativas en oscuridad (Summers *et al.*, 1995). A su vez, este tipo de cianobacterias podrían crecer fototróficamente en presencia de luz.

Y por último, las cianobacterias fotoheterótrofas, menos comunes, son aquellas que son capaces de utilizar compuestos orgánicos como fuente de carbono en presencia de luz pero no en ausencia de esta (Zubkov, 2009).

1.2.1. Metabolismo del Nitrógeno

El N es un elemento esencial para la vida y se encuentra presente en proteínas, ácidos nucleicos, y en numerosas biomoléculas. A su vez, es un nutriente limitante en plantas y microorganismos. En los ecosistemas, el N puede presentarse en compuestos orgánicos o inorgánicos. El N inorgánico es encontrado en varios estados de oxidación, desde -3 (amonio, NH₄⁺),

³ Siglas en inglés para *Adenosin triphosphate*.

⁴ Siglas en inglés para *Nicotinamide adenine dinucleotide phosphate*.

que es la forma más reducida, hasta la forma más oxidada, +5 (nitrato, NO_3^-). Sin embargo, en los compuestos orgánicos, el N se encuentra en su estado más reducido, como grupos amino, amido o imino. Los organismos procariotas, juegan un rol predominante en los procesos de conversión de diferentes compuestos en el ciclo del N (Cabello *et al.*, 2012).

El N es un importante bioelemento que es incorporado en la biosfera a través de procesos de asimilación llevado a cabo por microorganismos y plantas. Numerosos compuestos que contienen N pueden ser utilizados por diferentes organismos como fuente de N, como por ejemplo: iones inorgánicos, como nitrato o amonio, o simples compuestos orgánicos, como urea, aminoácidos, o bases nitrogenadas. A su vez, muchas bacterias son capaces de fijar N_2 (Herrero *et al.*, 2001).

Las fuentes de N utilizadas más comúnmente por las cianobacterias son NO_3^- , NH_4^+ , urea y N_2 (Herrero *et al.*, 2001). Los compuestos nitrogenados captados del ambiente deben ser convertidos a NH_4^+ intracelularmente para ser finalmente asimilados (Luque & Forchhammer, 2008).

En el contexto de este trabajo solo se discutirán las siguientes enzimas, Nitrato Reductasa (NR), Nitrogenasa y Glutamina Sintetasa (GS), debido a que el análisis de estas enzimas relacionadas con la asimilación del N en las cianobacterias, provee una herramienta valiosa para la clasificación de estos microorganismos (Mishra *et al.*, 2013).

1.2.1.1. Asimilación de Nitrato

El NO_3^- es la fuente más abundante de N combinado en numerosos ambientes. De acuerdo con esto, la mayoría de las cianobacterias presentan la capacidad de asimilarlo (revisado en Flores & Herrero., 2005). Su asimilación involucra a un transportador activo para su transporte al interior celular y ser reducido a NH_4^+ mediante las enzimas ferredoxin-Nitrato Reductasa y ferredoxin-Nitrito Reductasa (Herrero *et al.*, 2001). En la primer etapa el NO_3^- es reducido a nitrito (NO_2^-) y luego este a NH_4^+ . En cianobacterias, las enzimas Nitrato y Nitrito Reductasa utilizan a la ferredoxina reducida fotosintéticamente o a la flavodoxina como donador de electrones fisiológico (Cabello *et al.*, 2012). Por lo que las reducciones de NO_3^- y NO_2^- compiten, por la ferredoxina, con la fijación de CO_2 , bajo condiciones de luz limitantes. Bajo estas condiciones, las células tienen que ajustar las actividades de Nitrato y Nitrito Reductasas, para prevenir la acumulación de NO_2^- excesiva (Luque & Forchhammer, 2008). La asimilación del nitrato se encuentra inducida por la presencia de NO_3^- y la ausencia de NH_4^+ en el medio. Los genes que codifican para los transportadores de NO_3^- , en el caso de *Anabaena* sp. PCC 7120 son *nrtA*, *nrtB*, *nrtC* y *nrtD*, codifican un transportador del tipo ATP- *binding cassette* (ABC). Estos genes constituyen un operón junto con los genes que codifican para las Nitrato y Nitrito Reductasas. Este operón es expresado en altos niveles cuando se encuentra presente en el medio NO_3^- o NO_2^- y no se encuentra presente el NH_4^+ (Herrero *et al.*, 2001). El NH_4^+ inhibe la actividad NR debido a que es la fuente preferida de N para las cianobacterias (Luque & Forchhammer, 2008), al ser fácilmente permeable a través de las membranas biológicas, o si se encuentra en bajas concentraciones en el medio extracelular (debajo de 1 μM) es tomado por permeasas (Herrero *et al.*, 2001) sin gasto energético. A su vez, la fijación de CO_2 es requerida para mantener la captación de NO_3^- y NO_2^- pues se necesitan esqueletos carbonados para evitar la acumulación a niveles tóxicos de NH_4^+ en el citosol. Estos procesos reguladores se encuentran coordinados por la proteína señal de transducción P_{II} (Luque & Forchhammer, 2008).

La NR es una molibdoenzima que cataliza la reducción de 2 electrones de NO_3^- a NO_2^- . Es una proteína citoplasmática, que se une a un cofactor Molibdeno-bis-molibdopterina guanina dinucleótido (Mo-bis-MGD) y por lo menos a un centro [4Fe-4S]. La NR de las cianobacterias, es un monómero de 80 kDa, codificada por el gen *narB*. Los electrones de la ferredoxina o flavodoxina son transferidos al centro [4Fe-4S] y al cofactor Mo-bis-MGD, el sitio de reducción del NO_3^- (Cabello *et al.*, 2012).

La enzima Nitrito Reductasa (NiR) es una enzima asociada a los tilacoides que cataliza la reducción de NO_2^- a NH_4^+ , como una única reacción de 6 electrones mediante intermediarios catalíticos como el óxido nítrico e hidroxilamina. Esta enzima contiene al grupo prostético sirohemo y un centro [4Fe-4S]. La NiR de las cianobacterias, es un monómero de 55 kDa, codificada por el gen *narA*. Esta enzima recibe electrones desde la ferredoxina o flavodoxina, que son transferidos al centro [4Fe-4S] y luego al grupo sirohemo para reducir al NO_2^- (Cabello *et al.*, 2012).

1.2.1.2. Fijación Biológica de Nitrógeno

La FBN es un proceso esencial en el ciclo del N y provee una fuente importante de N para los organismos en sistemas acuáticos y terrestres. Se estima que, aproximadamente, unos 2.2×10^{11} kg de N es fijado biológicamente anualmente, de los cuales, 1.4×10^{11} kg de N por año son fijados en ecosistemas terrestres y 0.8×10^{11} kg de N por año son fijados en ambientes marinos (Cabello *et al.*, 2012). A su vez, la mayor fuente de N en la Tierra es el N_2 gaseoso, que es el mayor constituyente de la atmósfera (Stal & Zehr, 2008). El triple enlace entre los dos átomos de N, hace que la molécula de N_2 sea una molécula muy estable, siendo muy difícil de romper.

La Nitrogenasa es el complejo enzimático que cataliza la formación de dos moléculas de NH_4^+ al reducir al N_2 . La reducción de protones a hidrógeno (H_2), también ocurre durante la catálisis. A su vez, la Nitrogenasa también puede reducir varios sustratos con dobles o triples enlaces, como el acetileno, entre otras moléculas. La fijación de N_2 es muy costosa energéticamente al requerir ATP y poder reductor (Cabello *et al.*, 2012), ambos generados a partir del metabolismo de los carbohidratos, un proceso que es suplementado, en presencia de luz, por la actividad de PSI (Wolk *et al.*, 1994). Los carbohidratos sintetizados en las células vegetativas se movilizan hacia los heterocistos, probablemente en forma de sacarosa, y a su vez los heterocistos transportan hacia las células vegetativas el N fijado, en forma de aminoácidos (Wolk *et al.*, 1994).

A continuación se representa la estequiometría de dicha reacción:



Existen tres tipos de Nitrogenasa, la mayoría de las cianobacterias presentan una Nitrogenasa con molibdeno (Mo). Esta se encuentra compuesta por dos componentes: la dinitrogenasa (proteína MoFe) y la dinitrogenasa reductasa (proteína Fe). La proteína MoFe de 230 kDa es un $\alpha_2\beta_2$ tetramero, codificada por los genes *nifD* y *nifK*, que contienen dos pares de dos inusuales y únicos metalocentros, el cofactor FeMo y el centro P. Cada cofactor FeMo está compuesto de $\text{Mo}_1\text{Fe}_7\text{S}_9$ y

⁵ Sigla en inglés para *Adenosine diphosphate*.

⁶ Fosfato inorgánico.

homocitrato, ya que consta de dos [4Fe-3S] y [Mo-3Fe-3S] unidos por tres sulfihídridos y con el homocitrato coordinado con el átomo de Mo. Cada centro P está compuesto por Fe_8S_7 y consiste en un centro [4Fe-4S] que comparte un átomo de azufre (S) con el centro [4Fe-3S]. La proteína Fe es un homodímero de 64 kDa, codificada por el gen *nifH*, con un solo centro [4Fe-4S] que une a las dos subunidades. Un sitio de unión a MgATP se encuentra en cada subunidad. La proteína MoFe contiene el sitio catalítico para la reducción de N_2 , y la proteína Fe es el donador de electrones para la proteína MoFe. Estas dos proteínas forman un complejo durante la catálisis. Los eventos catalíticos secuenciales, incluyen dos ciclos conectados:

- el ciclo de la proteína Fe consiste en, la formación del complejo, la transferencia de electrones desde la proteína Fe a la proteína MoFe, la hidrólisis del ATP, y la reducción de la proteína Fe oxidada con el donador de electrones fisiológico (ferredoxina o flavodoxina)
- el ciclo de la proteína MoFe incluye las reacciones parciales de la proteína MoFe para reducir al sustrato (Cabello *et al.*, 2012).

Bajo condiciones de limitación de Mo, algunas especies de *Anabaena* expresan una Nitrogenasa alternativa que contiene vanadio como cofactor (Stal & Zehr, 2008).

La Nitrogenasa se encuentra, únicamente, en organismos procarióticos diazotrofos que fijan N_2 en vida libre, en simbiosis o en asociación con plantas (Cabello *et al.*, 2012).

La Nitrogenasa es sensible al oxígeno atmosférico y al oxígeno producido intracelularmente por la fotosíntesis oxigénica, por lo que existen diferentes mecanismos para protegerla de este. Ejemplos de estos mecanismos pueden ser las cianobacterias unicelulares que presentan ritmos circadianos, donde fijan N_2 durante la noche, y realizan la fotosíntesis oxigénica durante el día y por otro lado, las cianobacterias filamentosas, que fijan el N_2 en células especializadas, los heterocistos (Cabello *et al.*, 2012). El interior de los heterocistos es microaeróbico, como resultado del incremento de la respiración, inactivación del fotosistema productor de oxígeno (PSII), y la formación de una envoltura celular engrosada (Xu *et al.*, 2008) que impide la difusión de oxígeno exterior hacia el interior del heterocisto.

1.2.1.3. Ciclo Glutamina Sintetasa-Glutamato Sintasa

En las cianobacterias el NH_4^+ , tomado del medio o producido intracelularmente, es incorporado a los esqueletos carbonados a través del ciclo Glutamina Sintetasa-Glutamato Sintasa (GS/GOGAT) (revisado en Flores & Herrero, 1994). El esqueleto carbonado utilizado para la incorporación de NH_4^+ a través del mencionado ciclo es 2-oxoglutarato, el cual es proporcionado por la NADP^+ -Isocitrato Deshidrogenasa. Se utiliza este esqueleto carbonado principalmente para la biosíntesis de glutamato y de sus derivados, ya que las cianobacterias carecen de la enzima 2-Oxoglutarato Deshidrogenasa. Este rol importante del esqueleto carbonado para la asimilación de N, hace que el 2-oxoglutarato sea un sensor apropiado del balance carbono-nitrógeno (C/N) en la célula de la cianobacteria (Herrero *et al.*, 2001), y por ende, la principal molécula utilizada como señal de N limitante (Cabello *et al.*, 2012).

La GS es una enzima ubicua que cataliza el agregado de un grupo amida al glutamato para generar glutamina, mediante consumo de ATP y presencia de cationes divalentes, como magnesio o manganeso. La Glutamato Sintasa (GOGAT), cataliza la transferencia del grupo amida de la glutamina

hacia el 2-oxoglutarato y produce dos moléculas de glutamato. Por lo tanto el proceso global del ciclo GS/GOGAT resulta en la incorporación de amonio en la molécula 2-oxoglutarato para producir una molécula de glutamato con consumo de ATP (actividad GS) y poder reductor (Cabello *et al.*, 2012), proveniente de la ferredoxina reducida del fotosistema I (actividad GOGAT) (Luque & Forchhammer, 2008); como se observa a continuación:

GS: Glutamato + NH₃ + ATP → Glutamina + ADP + Pi

GOGAT: Glutamina + 2-Oxoglutarato + 2 [H] → 2 Glutamato

GS/GOGAT: 2-Oxoglutarato + NH₃ + ATP + 2 [H] → Glutamato + ADP + Pi

El glutamato y la glutamina son los mayores donadores de N para la síntesis de otras moléculas nitrogenadas (Luque & Forchhammer, 2008).

Hay tres tipos de GS, la mayoría de las cianobacterias presentan la GSI, esta es una proteína dodecamérica con subunidades idénticas de 50 kDa (codificadas por el gen *glnA*), organizadas en dos anillos hexagonales con una abertura cilíndrica, hueca, que contiene moléculas de agua (H₂O). La cianobacteria *Pseudanabaena* sp. PCC 6903 contiene a la GSIII, enzima hexamérica con subunidades idénticas de 80 kDa, codificadas por el gen *glnN*. Otras cianobacterias, como *Synechocystis* y *Synechococcus* sp. PCC 7942, contienen GSI y GSIII, aunque esta última solo se observa en condiciones de deficiencia de N. Estas dos enzimas son diferentes en su secuencia aminoacídica, pero comparten 5 dominios conservados que incluyen residuos del sitio catalítico y a los mismos cationes divalentes unidos (Cabello *et al.*, 2012).

GOGAT es una flavoproteína hierro-sulfurosa. Hay tres tipos diferentes de GOGAT, dependiendo del donador de electrones. Las enzimas GOGAT ferredoxin y NADH dependientes, se encuentran presentes en las cianobacterias. La ferredoxin GOGAT, es un monómero de 170 kDa (codificada por el gen *glsF*) con un flavin mononucleótido (FMN)⁷ y un centro [3Fe-4S]. NADH-GOGAT, contiene dos subunidades de 160 y 60 kDa, codificadas por los genes *gltB* y *gltD*, respectivamente. La subunidad mayor contiene los mismo cofactores que la ferredoxin GOGAT, y la subunidad menor contiene flavín adenina dinucleótido (FAD)⁸ como cofactor (Cabello *et al.*, 2012). La actividad de la ferredoxin GOGAT se encuentra muy influenciada por la presencia de los sustratos 2-oxoglutarato y ferredoxina reducida, evitando así el consumo inútil de glutamina (Luque & Forchhammer, 2008).

A su vez, existen otras reacciones biológicas mediante las que el NH₄⁺ es asimilado. Enzimas como la Glicina sintasa, y otras aminoácidos deshidrogenasas, como Glutamato Deshidrogenasa, Alanina Deshidrogenasa, Aspartato Deshidrogenasa, etc., catalizan este tipo de reacciones. Aunque únicamente la GS es esencial para la asimilación de NH₄⁺, como se reveló en estudios genéticos y fisiológicos de varias cepas de cianobacterias (Luque & Forchhammer, 2008).

⁷ Sigla en inglés para *Flavin mononucleotide*.

⁸ Sigla en inglés para *Flavin adenine dinucleotide*.

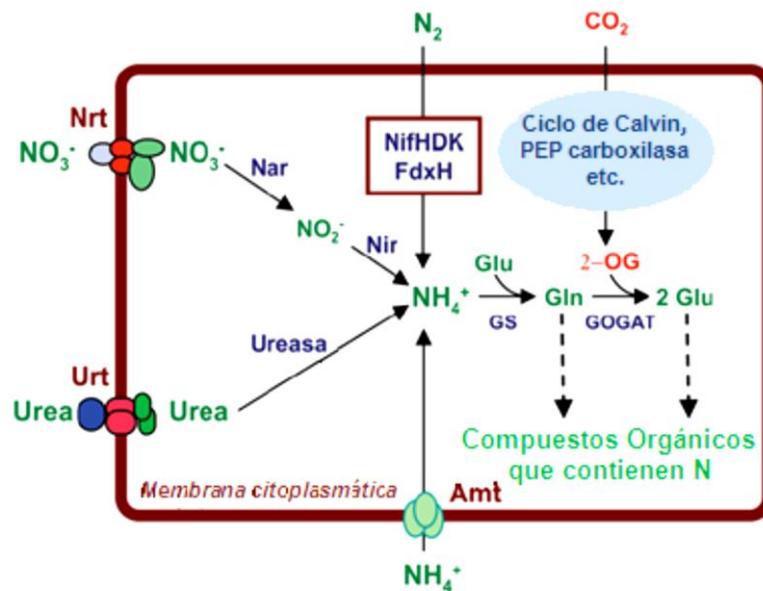


Figura 2. Principales vías de asimilación de N en las cianobacterias. NRT: Permeasas tipo ABC transportadoras de nitrito /nitrato; Urt: tipo ABC - transportador de urea; Amt: permeasa de amonio; Nar: nitrato reductasa; Nir: nitrito reductasa; NifHDK: complejo nitrogenasa; FdxH: ferredoxina específica de heterocistos; PEP carboxilasa: fosfoenolpiruvato carboxilasa; 2-OG: 2-oxoglutarato; GS: glutamina sintetasa; GOGAT: glutamato sintasa. (modificado de Flores & Herrero, 2005).

1.2.1.4. Regulación del Metabolismo del Nitrógeno

La asimilación del N se encuentra muy regulada en respuesta a la fuente de N ambiental y a la de carbono (C) inorgánico. El NH_4^+ reprime, metabólicamente, las actividades de las enzimas relacionadas con la asimilación del N, como a NR, NiR, Nitrogenasa y GS, o a los transportadores de NO_3^- y NO_2^- (revisado en Flores & Herrero, 1994). En presencia de NH_4^+ , los niveles de actividad de estas enzimas o transportadores son basales pero en ausencia de éste son altos (Luque & Forchhammer, 2008).

El factor de transcripción NtcA, también participa en la regulación del N controlando la expresión de la mayoría de los genes involucrados en su metabolismo. La proteína de señal P_{II} regula las actividades de las diferentes enzimas en respuesta a las fluctuaciones de las condiciones C/N (Luque & Forchhammer, 2008).

La diferenciación del heterocisto en respuesta a la acumulación de 2-oxoglutarato es mediada por la unión de este al NtcA (Laurent *et al.*, 2005). En *Anabaena*, NtcA se une a las regiones promotoras de varios genes involucrados en la asimilación del N, en el desarrollo de los heterocistos, o en el desarrollo de la fotosíntesis (Herrero *et al.*, 2004).

1.3. Caracterización de Cianobacterias

1.3.1. Clasificación Botánica

Tradicionalmente la identificación de cianobacterias se basaba en sus características morfológicas. Estas eran clasificadas, según el código botánico, como algas eucariotas denominadas

algas verde-azules (Cyanophyta). A través de los años se han propuesto y adoptado varias revisiones y cambios para este tipo de clasificación botánica. La clasificación de Anagnostidis & Komárek (1985) divide a las cianobacterias (cianoprocarotas) en cuatro órdenes, Nostocales, Stigonematales, Chroococcales y Oscillatoriales. Estos a su vez, son divididos en familias, subfamilias, géneros y especies (Wacklin, 2006) (ver tabla 1.). Este sistema de clasificación se basa en la identificación morfológica de especies en muestras naturales sin previo aislamiento (Anagnostidis & Komárek, 1985).

1.3.2. Clasificación Bacteriológica

En 1960, se descubrió que las cianobacterias presentaban características de procarotas, por lo que Stanier y colaboradores (1978) propusieron incluirlas en el código bacteriológico para su clasificación. Rippka y colaboradores (1979) crearon la clasificación bacteriológica de las cianobacterias (Wacklin, 2006) que ha sido tomada y modificada en el *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology* que es la autoridad reconocida en la clasificación de bacterias (Wacklin, 2006). La aproximación bacteriológica se basa en características morfológicas, modos de reproducción, ultraestructuras, fisiología, química y, en algunos casos, genética de las cianobacterias presentes en cultivos puros.

Dentro del filo cianobacteria, se encuentran dos fotótrofos oxigénicos, las cianobacterias y prochlorales que contienen clorofila-*b/a* (Prochlorophyta). Las cianobacterias se encuentran divididas en cinco subdivisiones, y estas a su vez en subgrupos y géneros (Castenholz, 2001a) (ver tabla 1.). Las descripciones de las subdivisiones y de los géneros, se basan aún en la morfología, principalmente, debido a la falta de datos fenotípicos y genéticos (Castenholz, 2001b).

Recientemente, las aproximaciones bacteriológicas y botánicas han convergido por lo que la clasificación botánica utiliza información genética además de la morfológica, citológica, ecológica y bioquímica. Los nombres botánicos son utilizados en la clasificación bacteriológica, pero la nomenclatura continua difiriendo (Wacklin, 2006). Los autores de ambas clasificaciones, han enfatizado en que la actual clasificación de cianobacterias es temporaria, ya que la información genética es inadecuada, y futuras revisiones de estos sistemas de clasificación deberán realizarse (Castenholz, 2001b). Esta revisión es complicada por la presencia de especies clasificadas según sus características morfológicas pero sin la información genética, y por lo contrario, las secuencias genéticas, presentes en las bases de datos, no presentan una descripción morfológica (Wilmotte & Herdman, 2001).

Las subdivisiones de las cianobacterias, no han sido respaldadas por el análisis de las secuencias del gen ARNr 16S (Wacklin, 2006). Por ejemplo, las cianobacterias con heterocisto que pertenecen a las subdivisiones IV y V, parecen pertenecer a un mismo grupo monofilético⁹ en el análisis del gen ARNr 16S (Tomitani *et al.*, 2006). A su vez, el agrupamiento filogenético de varios géneros de cianobacterias parecen ser incongruentes con la morfología de estas bacterias, por lo tanto, también con su clasificación corriente (Wacklin, 2006). Esta incongruencia entre el análisis filogenético y la clasificación de las cianobacterias ha sido tomada en cuenta en la clasificación

⁹ Se dice que un grupo de especies es monofilético cuando todos los organismos incluidos en él han evolucionado a partir de un ancestro en común, y todos los descendientes de este ancestro están incluidos en el grupo.

propuesta por Hoffmann y colaboradores (2005) (Wacklin, 2006). El sistema de clasificación propuesto por Hoffmann y colaboradores (2005) se basa en las relaciones genéticas de las cianobacterias (principalmente el gen ARNr 16S), en su morfología y en los arreglos tilacoidales (Wacklin, 2006). Estos autores propusieron dos grandes cambios: que las cianobacterias con heterocistos se unifiquen en una sola subdivisión y que las prochlorophyta se incluyan dentro del sistema de clasificación de cianobacterias (Hoffmann *et al.* 2005).

Tabla 1. Clasificación de cianobacterias de acuerdo al sistema bacteriológico (*Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*) y botánico (Komárek & Anagnostidis). (modificado de Wacklin, 2006).

Clasificación según el <i>Bergey's Manual of Systematic Bacteriology</i> (Boone & Castenholz, 2001)	Clasificación según Komárek & Anagnostidis (Anagnostidis & Komárek, 1985; Komárek & Anagnostidis, 1989, 1999, 2005)	Clasificación según Hoffman, Komárek & Kaštovský (2005)
Subdivisión I: unicelular o colonias, división por fisión binaria en 1 o 3 planos o por gemación.	Chroococcales: unicelular o colonias.	Gloeobacterales: cocoides, sin tilacoides.
Subdivisión II: unicelular o colonias, división por fisión múltiple o en combinación con fisión binaria.		Synechococcales: unicelular o colonias, organización de tilacoides paralelos a la superficie celular.
		Chroococcales: unicelular o colonias, organización radial de los tilacoides.
Subdivisión III: filamentosas, sin heterocistos.	Oscillatoriales: filamentosas, sin heterocistos.	Oscillatoriales: filamentos largos, organización radial de los tilacoides.
		Pseudoanabaenales: filamentos finos, organización de tilacoides paralelos a la superficie celular.
Subdivisión IV: filamentosas, con heterocistos, sin ramificaciones verdaderas.	Nostocales: filamentosas, con heterocistos, acinetes, algunas pueden presentar ramificaciones falsas.	Nostocales: filamentosas con heterocistos.
Subdivisión V: filamentosas, con heterocistos y ramificaciones verdaderas.	Stigonematales: filamentosas, con heterocistos, acinetes y ramificaciones verdaderas.	

En el contexto de este trabajo se estudiarán cianobacterias pertenecientes a la subdivisión IV, Orden Nostocales, ya que es el Orden dentro del cual se encuentran las cianobacterias con heterocistos sin ramificaciones. La subdivisión IV está conformada por tres secciones, según el *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, aunque Komárek & Anagnostidis (1985, 1989, 1999) reconocen cuatro secciones (familias) y 32 géneros (Holt *et al.*, 2000). A continuación se muestran las tres secciones del *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, con sus respectivos géneros.

- Sección A (Familia: *Nostocaceae*):
 - ❖ *Anabaena*
 - ❖ *Nostoc*
 - ❖ *Nodularia*
 - ❖ *Cylindrospermum*
 - ❖ *Aphanizomenon*

Existen otros géneros dentro de la Familia *Nostocaceae*, incluidos en el sistema de clasificación botánico de Beitel, Desikachary y Bourrelly, como: *Richelia*, *Wollea*, *Anabaenopsis*, *Hormothamnion* y *Aulosira*.

- Sección B (Familia: *Scytonemataceae*):
 - ❖ *Scytonema*

Otros géneros dentro de la Familia *Scytonemataceae*, descritos por otros autores, son los siguientes: *Hydrocoryne*, *Coleodesmium* (= *Desmonema*), *Petalonema*, *Scytonematopsis* y *Diplocolon*.

- Sección C (Familia: *Rivulariaceae*):
 - ❖ *Calothrix*

Los géneros tradicionales, o botánicos, de la Familia *Rivulariaceae* son *Gloetrichia*, *Rivularia*, *Sacconema*, *Isactis*, *Dichothrix*, *Gardnerula* (= *Polythrix*) y *Microchaete* (= *Fremyella*) (Holt et al., 2000).

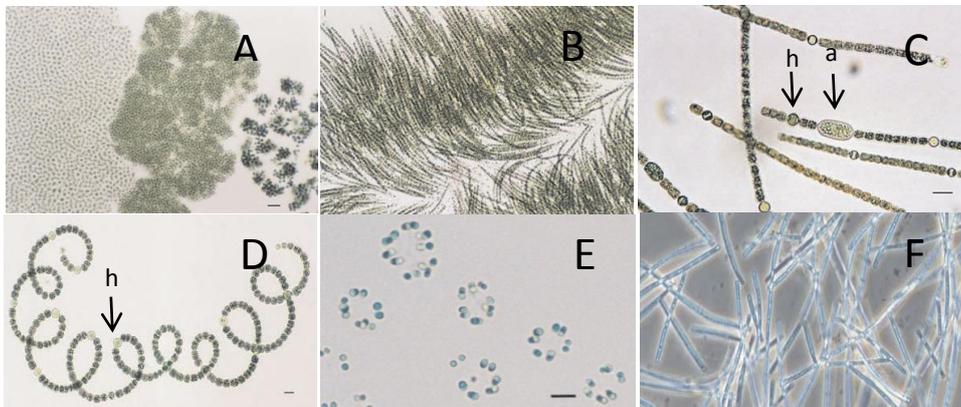


Figura 3. Micrografías de diferentes colonias y cepas de cianobacterias, representando la diversidad morfológica de estas bacterias. (A) Colonias de *Microcystis* sp. (B) Colonias de *Aphanizomenon flos-aquae* 1tu29S19. (C) Tricomas de *Anabaena planctónica* 1tu28s8. (D) Tricoma de *Anabaena crassa* 1tu33S12. (E) Colonia de *Snowella litoralis* 0tu35S07. (F) *Limnothrix redekei* 007a (contraste de fase). Heterocistos (h) y acinetes (a) se indican mediante flechas. (modificado de Wacklin, 2006).

1.3.3. Caracterización Polifásica

Las cianobacterias son un grupo monofilético pero morfológicamente diverso (Tomitani et al., 2006). Tradicionalmente, el abordaje morfológico, a través de la observación microscópica, ha permitido clasificar a las cianobacterias, no obstante dichas características pueden variar de acuerdo

a las condiciones de cultivo o crecimiento o también llegar a perderse (Lyra *et al.*, 2001). A su vez, los heterocistos, acinetes y hormogonios, pueden ser difíciles de caracterizar bajo el microscopio, por lo que la diversidad puede ser subestimada (Nübel *et al.*, 2000). Incluso se ha estimado que el 50% de las cepas existentes en colecciones tiene un nombre taxonómico que no se corresponde con la descripción morfológica del taxón (Komárek & Anagnostidis, 1989). Debido a esto, se ha recurrido también a un abordaje donde se utilizan marcadores moleculares para su identificación (Prassana *et al.*, 2006), complementado con un abordaje morfológico. Un gen ampliamente utilizado es el de la subunidad 16S del ARNr que codifica un ARNr de la subunidad menor de los ribosomas (30S), presente en todos los procariontes. Este gen tiene un tamaño de aproximadamente 1500 pares de bases (pb), posee un dominio muy conservado como también nueve regiones hipervariables y tiene una distribución universal (Nübel *et al.*, 1997). El poder de resolución del gen ARNr 16S es a nivel de especie o por encima de este (Wacklin, 2006). Por esto es recomendable realizar el análisis filogenético con otros marcadores moleculares, como el gen *hetR* para el caso de cianobacterias que presentan heterocistos, ya que este gen es esencial para la diferenciación de esta célula especializada (Tomitani *et al.*, 2006), o el gen *nifH*, que codifica para la proteína Fe perteneciente a la enzima Nitrogenasa (Foster & Zehr, 2006), o el gen *rbcl*, que codifica a la subunidad grande de la enzima Ribulosa 1,5-bisfosfato carboxilasa /oxigenasa, enzima esencial para la fijación de CO₂ en el ciclo de Calvin (Tomitani *et al.*, 2006). Los genes, son amplificados mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR)¹⁰ y luego secuenciados. Este tipo de procedimiento, ha sido muy utilizado en el estudio de la diversidad de procariontes, y permite tanto la identificación como la predicción de las relaciones filogenéticas (Tilak *et al.*, 2010).

Para realizar la PCR se utilizan cebadores¹¹ 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, existen varios bancos de datos de secuencias del gen ARNr 16S, como el NCBI¹² (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>); RDP II¹³ (<http://www.rdp.cme.msu.edu/>) y Greengenes (<http://www.greengenes.lbl.gov>) (Callejas, 2011). El primero también es un banco de datos de secuencias del gen *hetR*. Estas bases de datos *on line*, poseen a su vez una serie de herramientas informáticas para la clasificación y alineación de secuencias múltiples, facilitando la identificación de los microorganismos que se quieren determinar (Callejas, 2011). Luego se puede realizar un análisis filogenético que se utiliza para estimar las relaciones evolutivas entre los organismos en estudio.

Otras aproximaciones para caracterizar a dichos organismos incluyen su capacidad de fijar N₂, su actividad fotosintética y la actividad de ciertas enzimas relacionadas al metabolismo del N como lo son la GS o la NR. Sin embargo, el análisis aislado de cada uno de sus atributos no es suficiente para poder clasificarlos y una aproximación polifásica resulta más apropiada y confiable (Mishra *et al.*, 2013). En dicho abordaje caracteres morfológicos, moleculares, bioquímicos y fisiológicos son tomados en cuenta para poder caracterizar e identificar a estas bacterias.

¹⁰ Siglas en inglés para *Polymerase Chain Reaction*.

¹¹ En este texto también se utilizará la terminología en inglés: *primer*.

¹² Sigla en inglés para *National Center for Biotechnology Information*.

¹³ Sigla en inglés para *Ribosomal Database Project II*.

1.4. Cianobacterias Diazótrofas en Arrozales

La capacidad dual de las cianobacterias de fijar CO_2 y N_2 los convierte en microorganismos con una independencia trófica relevante que les permite colonizar con éxito diversos hábitats muchas veces inhóspitos. Además estos organismos utilizan otras fuentes de N y su capacidad para usar esas otras fuentes varía entre especies y refleja una adaptación evolutiva a ciertos hábitats (Luque & Forchhammer, 2008).

Las cianobacterias se encuentran tanto en sistemas acuáticos como terrestres (Herrero *et al.*, 2001). Entre todos los ecosistemas en los que pueden ser encontradas, los suelos húmedos son un ambiente ideal para el crecimiento de estas bacterias. Por ende el cultivo de arroz en condiciones de inundación constituye un ambiente favorable para el crecimiento de las cianobacterias respecto a sus requerimientos de luz, agua, temperatura y disponibilidad de nutrientes (Roger, 1995). A su vez, estos microorganismos, son resistentes a desecación debido a la presencia de células vegetativas modificadas como los acinetes (Singh *et al.*, 2011). Las cianobacterias fijadoras de N_2 son ubicuas a este cultivo, atribuyéndoles la fertilidad natural de estos suelos (Roger & Simpson, 1996) y en general casi un 50% de los géneros de cianobacterias encontrados en arrozales forman heterocistos (Whitton, 2000).

En los arrozales, las cianobacterias podrían crecer y fijar N_2 en cuatro microhábitats: la superficie del suelo, la columna de agua, la superficie del agua y epifíticas sobre el arroz o malezas (Roger & Watanabe, 1986).

Algunas cepas de cianobacterias liberan pequeñas cantidades de NH_4^+ y pequeños polipéptidos durante el crecimiento activo, mientras que la mayoría de los productos de fijación son accesibles a la planta a través de autólisis y descomposición (Martínez, 1984). El rol de las cianobacterias diazótrofas en la mejora de la fertilidad del suelo, particularmente en los arrozales inundados, ha sido profusamente documentada (Venkataraman, 1981). La existencia de un potencial agronómico de las cianobacterias en los cultivos de arroz fue reconocida por De (1939), quien atribuyó la fertilidad natural de los campos de arroz tropicales a la FBN por estos organismos. Utilizando ^{15}N se ha demostrado que el N fijado por las cianobacterias es realmente tomado por las plantas de arroz durante el ciclo del cultivo (Irisarri *et al.*, 2006). El aporte de N por FBN de las cianobacterias en cultivos de arroz se estima en $30 \text{ kg N} \cdot \text{ha}^{-1}$. Utilizando ^{15}N , se han determinado valores entre 40-80 kg N/ha/año , de aporte de N por las cianobacterias, en el IRRI¹⁴, Filipinas (Tilak *et al.*, 2010). Por esto, se ha considerado a estos microorganismos como potenciales biofertilizantes en cultivos de arrozales.

Los biofertilizantes o inoculantes microbianos, son preparaciones que contienen microorganismos benéficos en un estado viable para adicionarlo a semillas o para su aplicación en suelos, y están diseñados para proveer fertilidad y ayudar al crecimiento de la planta, incrementando la actividad biológica de los suelos agrícolas (Rao, 2002).

El empleo de cianobacterias fijadoras de N_2 como sustitutos parciales de los fertilizantes químicos es una aproximación biotecnológica con ventajas no sólo para el medio ambiente sino también a nivel económico, ya que el arroz es uno de los pilares de la dieta de millones de personas

¹⁴ Sigla en inglés para *International Rice Research Institute*.

en el mundo y requiere grandes cantidades de fertilizantes nitrogenados, y la producción industrial de estos es costosa y en países emergentes cultivadores de arroz, el fertilizante nitrogenado es un factor limitante en la producción (Sinha & Hader, 1996). Uruguay actualmente es el octavo exportador de arroz en el mundo y el área que ocupaba este cultivo se ha extendido desde el este hacia el norte y centro del país. Se han exportado 937838 toneladas de arroz en la zafra 2011/2012 (ACA, 2013).

Los estudios de inoculación de arroz con cianobacterias para aumentar la productividad del cultivo han tenido resultados dispares. Se han observado fracasos en la sobrevivencia del inoculante (Reddy & Roger, 1988) pero también aumentos significativos en el rendimiento del arroz inoculado con cianobacterias (Yanni, 1996). El éxito o fracaso de la inoculación dependerá de las condiciones locales (Irisarri *et al.*, 1999). La mayoría de los datos publicados en cuanto a inoculación con cianobacterias refieren a arrozales tropicales.

La fertilización nitrogenada en arrozales uruguayos es más baja que en otras regiones arroceras del mundo. No obstante, la respuesta al fertilizante en nuestros arrozales ha resultado errática en algunos casos. Por lo que se podría suponer que existen otras fuentes complementarias de N para cubrir las necesidades en el cultivo. Debido a la relevancia que se le ha dado a las cianobacterias en el aporte de N en otros arrozales, es importante para nuestro medio contar con información de su función en el arrozal y de su uso como biofertilizantes. La densidad de cianobacterias en los arrozales uruguayos es menor a los reportados en otros arrozales del mundo (Irisarri *et al.*, 2001), por lo que la inoculación con aislamientos de cianobacterias nativas aparece como un posible suplemento de N en estos ecosistemas (Irisarri *et al.*, 2006). Por ende, conocer qué géneros de cianobacterias se encuentran presentes en los suelos de arrozales del Uruguay resulta entonces fundamental. Prasanna y colaboradores (2011) demostraron la competencia entre un consorcio de cepas de cianobacterias utilizadas como biofertilizantes, en el cual domina uno o dos géneros, generalmente *Anabaena* o *Nostoc*. Estos exhibieron una capacidad superior de establecimiento y adaptación en suelos y agro-ecosistemas diferentes de la India (revisado en Prasanna *et al.*, 2011). Se ha observado que los inoculantes presentan problemas para establecerse, ya que compiten con las cepas nativas (Prasanna *et al.*, 2011), por esto es importante la caracterización e identificación taxonómica de estas cepas nativas y además evaluar su competitividad frente al agregado de un potencial inoculante.

Además de N, las cianobacterias proveen a las plantas de arroz muchas otras sustancias orgánicas solubles necesarias para la planta (Tilak *et al.*, 2010), los metabolitos secundarios que pueden ser mineralizados por la microflora del ambiente. Estos pueden ser factores de crecimiento, vitaminas, inhibidores de otros microorganismos que forman parte de la microbiota del suelo. Reportes de cianobacterias como agentes de control biológico, muestran que estos organismos son efectivos contra los patógenos de plantas. Los biofertilizantes de cianobacterias movilizan no solo elementos como el N, sino también el fósforo, desde una forma no utilizable a una forma utilizable por las plantas (Singh *et al.*, 2011).

Las cianobacterias utilizadas generalmente como inóculos de arrozales pertenecen a los géneros *Aulosira*, *Tolypothrix*, *Scytonema*, *Nostoc*, *Anabaena* y *Plectonema* (Tilak *et al.*, 2010).

1.5. Antecedentes

La diversidad de cianobacterias ha sido estudiada en una variedad de locaciones geográficas, incluyendo el Cañón del Colorado, dolomita expuesta en Suiza central, aguas termales, en el hielo, en el Mar Báltico Sur, etc., utilizando una combinación de PCR del gen ARNr 16S y electroforesis en gel con gradiente de desnaturalización (DGGE)¹⁵. Un número considerable de estudios, han realizado DGGE, para identificar y caracterizar filogenéticamente a cianobacterias tóxicas (revisado en Srivastava *et al.*, 2009). En Uruguay se han realizado numerosos trabajos en cuanto a identificación de cianobacterias presentes en cuerpos de agua (revisado en Vidal *et al.*, 2009). En contraste con lo anterior, las cianobacterias de arrozales han sido caracterizadas en general solo a nivel morfológico en India (Nayak & Prasanna, 2007; Tiwari & Singh, 2005), Bangladesh (Khan *et al.*, 1994), Chile (Pereira *et al.*, 2005), Pakistan (Ali & Sandhu, 1972), Korea (Kim & Lee, 2006) y Uruguay (Irisarri *et al.*, 2001). Pero existen muy pocos estudios de biodiversidad de cianobacterias en arrozales utilizando herramientas moleculares. Se encuentran presentes en la bibliografía estudios de caracterización molecular de cianobacterias en arrozales de la India, que revelan que los géneros de cianobacterias *Nostoc* y *Anabaena* son los predominantes, en un 80%, de los aislamientos de la rizósfera de las plantas de arroz (Nayak *et al.*, 2008; Prasanna *et al.*, 2008). Estos resultados coinciden con otros estudios de diversidad de cianobacterias en arrozales realizados en India desde una aproximación morfológica. También se encontraron otros géneros de cianobacterias presentes en los arrozales, pero en menor abundancia, como *Calothrix*, *Scytonema*, *Cylindrospermum*, *Aphanocapsa*, *Lyngbya*, *Phormidium*, *Oscillatoria*, *Aulosira*, *Hapalosiphon*, *Westiellopsis*, algunos de estos géneros no presentan heterocistos (Prasanna & Nayak, 2007). Existen otros trabajos que utilizan herramientas moleculares para caracterizar la biodiversidad de cianobacterias en arrozales de China, donde también encontraron que los géneros que se encuentran en una mayor proporción son *Nostoc* y *Anabaena* y otro género sin heterocistos como *Cyanothece*. A su vez, se encontraron otros géneros en menor proporción similares a los encontrados en los arrozales de la India (Mårtensson *et al.*, 2009). Otro estudio similar realizado en Indonesia concluyó que el género dominante en estos ecosistemas era *Nostoc* (Hendrayanti *et al.*, 2012).

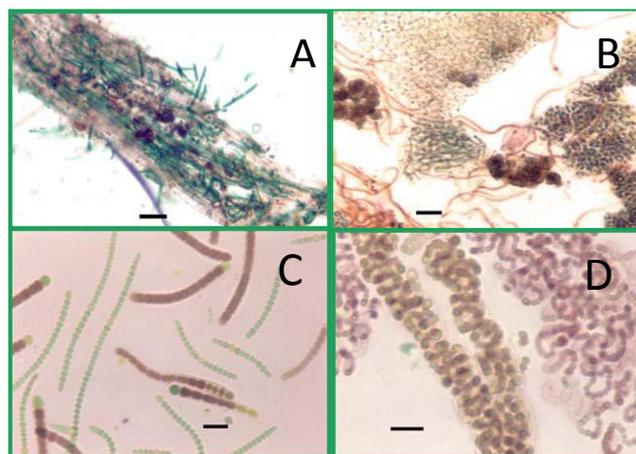


Figura 4. Fotomicrografías de cianobacterias aisladas de la rizósfera de arrozales. (A) Fragmentos de raíz con cianobacterias. (B) Diversidad de cianobacterias en muestras de rizósfera enriquecidas. (C) *Anabaena* sp. y *Calothrix* sp. (D) *Nostoc* sp. (modificado de Prasanna *et al.*, 2010).

¹⁵ Sigla en inglés para *Denaturing gradient gel electrophoresis*.

La mayoría de los estudios mencionados anteriormente fueron realizados en arrozales de países tropicales, los cuales son diferentes en características y en el manejo agronómico a los de clima templado, como en Uruguay (Irisarri *et al.*, 2006). En este país no se ha realizado hasta el momento un estudio polifásico de caracterización de cianobacterias presentes en arrozales. Irisarri y colaboradores (2001) mediante el cultivo y caracterización morfológica de cianobacterias de un arrozal del este del país encontraron que los géneros dominantes eran *Anabaena* y *Nostoc*. Otros géneros presentes en menor proporción fueron *Calothrix*, *Cylindrospermum*, *Nodularia*, *Scytonema* y *Tolypotrix*. También se encontraron abundantes cianobacterias que no forman heterocisto pertenecientes a los órdenes *Chroococcales*, unicelulares del género *Gloeotheca*, y *Oscillatoriales*, filamentosas de los géneros *Lyngbya*, *Oscillatoria*, *Pseudoanabaena*. A su vez se encontraron colonias epifitas macroscópicas de *Gloeotrichia* sp. Las cianobacterias con heterocistos estaban en el suelo inundado (bentónicas). No obstante, las cianobacterias unicelulares o filamentosas sin heterocistos eran planctónicas.

HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

2. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS.

2.1. Hipótesis de Trabajo

Es posible encontrar diferencias a nivel morfológico, bioquímico, fisiológico y molecular que permitan la clasificación de cianobacterias con heterocisto provenientes de arrozales del este del Uruguay.

2.2. Objetivo General

Caracterizar a través de una aproximación polifásica a 10 aislamientos de cianobacterias con heterocisto nativas de un arrozal.

2.2.1. Objetivos Específicos

- Determinar las velocidades de crecimiento de 10 aislamientos de cianobacterias con heterocisto.
- Identificar a nivel morfológico y molecular (mediante el análisis de los genes ARNr 16S y *hetR*) a los aislamientos.
- Determinar las tasas de producción fotosintética de O₂ y evaluar los pigmentos fotosintéticos de los diferentes aislamientos.
- Evaluar las actividades enzimáticas de enzimas relacionadas con el metabolismo del nitrógeno, Nitrogenasa, Nitrato Reductasa y Glutamina Sintetasa de las cianobacterias.

MATERIALES Y MÉTODOS

3. MATERIALES Y MÉTODOS.

3.1. Cultivo de Cianobacterias

Las cepas de cianobacterias utilizadas en este trabajo provienen de una colección de aislamientos provenientes de la Estación Experimental Paso de La Laguna (INIA, Treinta y Tres) que cuenta nuestro laboratorio de investigaciones anteriores (Irisarri *et al.*, 1999; Irisarri *et al.*, 2001; Irisarri *et al.*, 2006). Se trabajó con 10 aislamientos que se encontraban liofilizados, SU 1, SU 5, SU 8, SU 10, SU 11, SU 16, SU 37, SU 40, SU 45 y SU 54. Estos aislamientos se hicieron crecer en medio líquido BG₁₁ modificado sin N (BG₁₁₀) a un pH de 7.6 (Ripka *et al.*, 1979) (ver Anexo 1). Las cianobacterias se cultivaron en agitación continua a 126 rpm, con un fotoperíodo de 16 horas luz, con una intensidad lumínica de 71 $\mu\text{moles de fotones}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ y a una temperatura de 24°C.



Figura 5. Fotografía de los cultivos de cianobacterias con heterocisto estudiadas en agitador.

Para el cultivo de estas cianobacterias en placas se utilizó medio BG₁₁₀ con 1.5% de agar.

Para los diferentes ensayos, se partió de cultivos que se hicieron crecer en matraces estériles de 250 mL, con 150 mL de medio líquido BG₁₁₀ y 4 mL de inóculo de cianobacterias previamente fraccionado con un homogeneizador Potter-Elvehjem. La inoculación y la toma de muestras se realizaron en condiciones de esterilidad. La toma de muestras, para los diferentes ensayos, se realizó luego de los 10 días de haber realizado la inoculación.

Para la observación de acinetes y/o hormogonios se dejó a los cultivos sin agitación y sin agregado de medio fresco al menos un mes.

3.2. Curva y Tasa de Crecimiento

Se realizaron curvas de crecimiento tomando en cuenta la densidad óptica (DO) de cada cultivo de acuerdo a Vézina & Vincent (1997). Se tomó 1 mL de cultivo (homogeneizado), al cual se le midió la absorbancia (abs) a una longitud de onda (λ) de 750 nm en una celda de 1 cm en un espectrofotómetro UV-1201V (Shimadzu). Se tomaron muestras cada 2 días durante 10 días. Las curvas de crecimiento obtenidas se ajustaron mediante una regresión sigmoideal.

A su vez, se realizaron curvas de crecimiento para cada aislamiento midiendo el peso seco (PS) de cada cultivo a través del tiempo según Sorokin (1973) modificado. Se tomó 1 mL de cultivo (homogeneizado), el cual se centrifugó a 12000 rpm durante 5 min en una centrífuga MSE MicroCentaur (Sanyo). Luego se descartó el sobrenadante y se secó la muestra en estufa a 60°C por 48 horas. Posteriormente se pesó el precipitado¹⁶ en una balanza analítica Sartorius. En este caso, las muestras también fueron tomadas cada 2 días durante 10 días, y las curvas también se ajustaron con la misma regresión utilizada anteriormente.

Para determinar la tasa de crecimiento (μ) de cada cultivo para ambas curvas de crecimiento, se utilizó la siguiente fórmula (Myers & Kratz, 1955 modificado):

$$\mu \text{ (día}^{-1}\text{)} = (\ln(N_2/N_1))/(T_2-T_1)$$

Donde, N_1 = DO_{750 nm} o PS inicial en el tiempo T_1 de la fase exponencial

N_2 = DO_{750 nm} o PS final en el tiempo T_2 de la fase exponencial

3.3. Análisis Morfológico de los Aislamientos

Se tomaron 100 μ L de cultivo líquido para observar los aislamientos bajo microscopio óptico Labophot-2 (Nikon) con aumentos de 40X y 100X. Se observaron al menos 20-30 filamentos en 4 campos. Las características morfológicas evaluadas fueron:

- Filamento: forma, polaridad, es decir si es isopolar (igual morfología en los extremos) o heteropolar (diferente morfología en los extremos) (Kruk *et al.*, 2009) y presencia o ausencia de ramificaciones falsas
- Células vegetativas: forma (barriles, cilíndricas, esféricas, ovales, ovoides, piriformes o susb esféricas) (Kruk *et al.*, 2009)
- Heterocistos: forma, distribución (pareados o solitarios) y posición (apicales, subapicales o intercalares) (Kruk *et al.*, 2009)
- Acinetes: presencia o ausencia, forma, distribución y posición
- Mucílago: presencia o ausencia.

Se utilizó la clave de clasificación de Ripka *et al.* (1979) presente en el *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology* (Holt *et al.*, 2000). Además, se complementó la identificación morfológica a través del crecimiento de los aislamientos en placa y la observación de las colonias con microscopio estereoscópico Nikon según Castenholz (1984).

Para determinar la presencia o no de mucílago en los diferentes aislamientos, se tiñó el preparado con una gota de tinta china negra.

¹⁶ En este texto también se utilizará la terminología en inglés: *pellet*.

3.4. Determinación de Pigmentos Fotosintéticos

3.4.1. Clorofila *a*

La Chl *a* se cuantificó según el método de Wellburn (1994). Se centrifugó 1 mL de cultivo (homogeneizado) a 12000 rpm durante 5 min. Se descartó el sobrenadante, y luego se agregó 1 mL de metanol absoluto. Se incubó a 4°C durante toda la noche en oscuridad. Al día siguiente, se separaron los restos celulares por centrifugación (12000 rpm durante 5 min) y se leyó la absorbancia del sobrenadante a 665 nm en una celda de 1 cm de largo de trayectoria óptica, utilizando metanol absoluto como blanco.

La concentración de Chl *a* se calculó de acuerdo a la siguiente fórmula:

$$\text{Chl } a \text{ (}\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}\text{)} = \text{Abs}_{665\text{ nm}} / \epsilon_{665\text{ nm}} * d$$

Donde, $\text{Abs}_{665\text{ nm}}$ = absorbancia a 665 nm

d = diámetro de la celda utilizada

$\epsilon_{665\text{ nm}}$ = coeficiente de extinción molar de la Chl *a* a 665 nm = 16.72 mL. $\mu\text{g}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$

Las concentraciones de Chl *a* obtenidas a partir de cada aislamiento se normalizaron respecto al peso seco del volumen de cultivo utilizado ($[\text{Chl } a] = \mu\text{g}\cdot\text{mg PS}^{-1}$).

3.4.2. Carotenoides

Los carotenoides se determinaron de acuerdo a Liaaen-Jensen (1978). Se centrifugaron 2 mL de cultivo (homogeneizado) a 12000 rpm durante 5 min. Se descartó el sobrenadante y luego se resuspendió el precipitado en acetona 85% (v/v). Se incubó a 4°C durante 48 h en oscuridad. Se centrifugó a 12000 rpm por 5 min, y se midió la absorbancia del sobrenadante a 450 nm en una celda de 1 cm de largo de trayectoria óptica, utilizando acetona 85% como blanco.

La concentración de carotenoides se calculó utilizando la siguiente fórmula:

$$\text{Carotenoides (}\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}\text{)} = \text{Abs}_{450\text{ nm}} / (\epsilon_{450\text{ nm}} * d)$$

Donde, $\text{Abs}_{450\text{ nm}}$ = absorbancia a 450 nm

d = diámetro de la celda utilizada

$\epsilon_{450\text{ nm}}$ = coeficiente de extinción molar de los carotenoides a 450 nm = 2.5 mL. $\mu\text{g}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$

Las concentraciones de carotenoides obtenidas a partir de cada aislamiento se normalizaron en relación al peso seco del volumen de cultivo utilizado ($[\text{Carotenoides}] = \mu\text{g}\cdot\text{mg PS}^{-1}$).

3.4.3. Ficobiliproteínas

Las ficobiliproteínas se cuantificaron según el método de digestión enzimática y congelamiento de Bennet & Bogorad (1973). Se centrifugó 4 mL de cultivo (homogeneizado) a 12000 rpm durante 5 min. Se descartó el sobrenadante, luego se resuspendió el *pellet* en la disolución I (Na_2HPO_4 0.01 M; NaCl 0.15 M (pH 7)) y se dejó a temperatura ambiente. Inmediatamente después,

se agregó 150 μL de la disolución II (0.5% (p/v) de lisozima en disolución I) y se incubó con agitación a 37°C durante 2 horas. Finalizada la incubación se dejaron los microtubos a -20°C en oscuridad. Se realizaron ciclos de descongelado y congelado hasta aparición de color. Luego, se mezcló el contenido de los microtubos por agitación y se centrifugó a 12000 rpm por 5 min. Se leyó la absorbancia del sobrenadante a diferentes λ : 562, 615 y 652 nm, en una celda de 1 cm de largo de trayectoria óptica, utilizando la disolución II como blanco.

La concentración de ficobiliproteínas se calculó utilizando las siguientes fórmulas:

$$\text{Ficocianina } (\mu\text{g.mL}^{-1}) = (((\text{Abs}_{615 \text{ nm}} - 0.474) * (\text{Abs}_{652 \text{ nm}})) / 5.34) * 1000$$

$$\text{Aloficocianina } (\mu\text{g.mL}^{-1}) = (((\text{Abs}_{652 \text{ nm}} - 0.208) * \text{Abs}_{615 \text{ nm}}) / 5.06) * 1000$$

$$\text{Ficoeritrina } (\mu\text{g.mL}^{-1}) = ((\text{Abs}_{562 \text{ nm}} - ((2.41 * [\text{FC}]) - (0.849 * [\text{AFC}]))) / 9.62) * 1000$$

Donde, $\text{Abs}_{562 \text{ nm}}$ = absorbancia a 562 nm

$\text{Abs}_{615 \text{ nm}}$ = absorbancia a 615 nm

$\text{Abs}_{652 \text{ nm}}$ = absorbancia a 652 nm

[FC] = concentración de ficocianina ($\mu\text{g.mL}^{-1}$)

[AFC] = concentración de aloficocianina ($\mu\text{g.mL}^{-1}$)

Las concentraciones de ficobiliproteínas obtenidas a partir de cada aislamiento se normalizaron respecto al peso seco del volumen de cultivo utilizado ($[\text{Ficobilinas}] = \mu\text{g.mg PS}^{-1}$).

3.5. Tasa de Producción Fotosintética de O_2

La fotoevolución de O_2 se midió con un electrodo de O_2 tipo Clark (Hansatech Instruments Ltd.) durante de acuerdo a Irisarri *et al.* (1999). Se tomó 2 mL de cultivo (homogeneizado), y se colocaron en la celda del electrodo con temperatura controlada de 21°C, con agitación e iluminada con un flujo de densidad cuántica de 6300 $\mu\text{moles de fotones.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$.

La tasa de producción fotosintética de O_2 , equivale a la pendiente calculada a partir de la curva de fotoevolución de O_2 (concentración de O_2 en función del tiempo).

Las tasas de producción fotosintética de O_2 obtenidas a partir de cada aislamiento se normalizaron en relación a la cantidad de Chl *a* presente en el volumen de cultivo utilizado (Tasa de producción fotosintética de $\text{O}_2 = \text{nmol.min}^{-1}.\mu\text{g Chl } a^{-1}$).

3.6. Actividades Enzimáticas

3.6.1. Actividad Nitrogenasa (EC 1.18.6.1)

La actividad nitrogenasa se estimó mediante el ensayo de reducción del acetileno (ARA) de acuerdo a Irisarri *et al.* (1999).

Se seleccionaron, debido a sus diferencias fenotípicas, cuatro aislamientos, SU 5, SU 8, SU 10 y SU 16, para realizar este ensayo. Estos aislamientos se incubaron con 5 mL de acetileno, en frascos estériles de 60 mL, durante 4 horas bajo las mismas condiciones especificadas en el apartado 3.1.

Luego de transcurridas las 4 horas, se tomó 1 mL del *headspace* de cada cultivo, en los cuales se determinaron la reducción de acetileno con un cromatógrafo de gases SRI 8610 con detector de ionización de llama (FID). Estas medidas se realizaron en el Laboratorio de Ecología Microbiana y Microbiología Ambiental, Cátedra de Microbiología, Departamento de Biociencias, Facultad de Química, UdelaR.

La concentración del producto de la reacción enzimática, etileno, se cuantificó utilizando la curva de calibración obtenida a partir de diluciones de un estándar de etileno de 205,1 ppm.

La actividad nitrogenasa se expresó en unidades de enzima (U), definiendo a U como la cantidad (μmol) de etileno formado por minuto. A su vez, se normalizaron respecto a la cantidad de proteínas totales presente en el volumen de cultivo utilizado para realizar este ensayo (Actividad Nitrogenasa = $\text{U} \cdot \text{mg proteínas totales}^{-1}$).

3.6.2. Actividad Nitrato Reductasa (EC. 1.7.7.7.2)

La actividad NR se realizó según el protocolo de Herrero *et al.* (1981) que se basa en la habilidad de esta enzima de reducir NO_3^- a NO_2^- .

Luego de transcurridos 5 días de crecimiento, se tomó 2 mL de cultivo (homogeneizado), los cuales se utilizaron como inóculo para iniciar un cultivo nuevo en un vial estéril de 25 mL, al cual se le agregó 10 mL de medio BG₁₁ con KNO_3 20 mM concentración final (cf) durante otros 5 días.

Transcurridos los 5 días de incubación, se tomaron 2 mL de este cultivo que se centrifugaron durante 5 min a 12000 rpm. Posteriormente, se descartó el sobrenadante y se lavó el *pellet* con 0.1 mL de tampón Tricina-NaOH 5 mM (pH 8.1). La mezcla se agitó y se centrifugó a 12000 rpm por 5 min. Se descartó el sobrenadante, se resuspendió el precipitado en 0.2 mL de tampón Tricina-NaOH 5 mM (pH 8.1), y se maceró.

A la resuspensión se le agregó y mezcló 1 mL de mezcla de ensayo/blanco, las cuales se conforman por:

- 1.5 mL de tampón $\text{Na}_2\text{CO}_3/\text{NaHCO}_3$ 100 mM (pH 10.5)
- KNO_3 cantidad suficiente para una concentración final de 100 mM en la mezcla
- Bromuro mixto de alquil-trimetilamonio (MTAB) $250 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$
- 28.5 mL de H_2O destilada, en un volumen final de 30 mL

La mezcla que se utilizó para realizar los blancos no contenía KNO_3 .

Luego se le agregó 0.1 mL de Metil viológeno 40 mM, y se volvió a mezclar. Se inició la reacción con el agregado de 50 μL de Ditionito preparado fresco a razón de $100 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ de NaHCO_3 200 mM, se mezcló y se incubó durante 15 min a 28°C.

La reacción se detuvo oxidando el Ditionito con agitación vigorosa y agregando 0.1 mL de Acetato de cinc 1 M. Se centrifugó la muestra durante 5 min a 12000 rpm.

Se tomaron 0.5 mL del sobrenadante que se transfirieron a un microtubo nuevo. Para cuantificar el NO_2^- se agregaron a los 0.5 mL del sobrenadante, 0.5 mL de Sulfanilamida al 10% (p/v) y 0.5 mL de N-(1-naftil)-etilenodiamina diclorhidrato (NNDA) al 0,1 % (p/v). Se incubó durante 30 min a temperatura ambiente.

Luego, se midió la absorbancia de la mezcla contra los blancos preparados anteriormente, a una λ de 540 nm.

Mediante concentraciones conocidas de NO_2^- se realizó una curva de calibración, a partir de la cual se cuantificaron las concentraciones de NO_2^- que se obtuvieron en este ensayo para las diferentes muestras.

La actividad NR se expresó en U, definiendo a U como la cantidad (μmol) de NO_2^- formado por minuto.

Estas actividades se normalizaron respecto a la cantidad de proteínas totales presentes en el volumen de cultivo utilizado para realizar este ensayo (Actividad NR = U.g proteínas totales⁻¹).

3.6.3. Actividad Glutamina Sintetasa (EC 6.3.1.2)

La actividad GS se realizó de acuerdo a Dobrogosz (1981). La actividad transferasa de la GS se determinó midiendo la cantidad de γ -glutamil hidroxamato (γ -GH) formada utilizando glutamina como sustrato en presencia de ADP y arsenato.

Se tomaron 2 mL de cultivo (homogeneizado) y se centrifugaron durante 5 min a 12000 rpm. Se descartó el sobrenadante, se lavó el *pellet* con 0.1 mL de Tris 1 M (pH 8.8) y se agitó. Se volvió a centrifugar a 12000 rpm por 5 min. Se descartó el sobrenadante, se resuspendió en 0.2 mL de Tris 1 M (pH 8.8), y se maceró.

A la resuspensión se le agregó 0.45 mL de la mezcla de ensayo/blanco y se agitó. La mezcla contenía:

- 4 mL de Glutamina 0.2 M
- 1 mL de Tris 1 M (pH 8.8)
- 1 mL de MnCl_2 0.01 M
- 1 mL de Arsenato de potasio 0.2 M
- 1 mL de Hidroxilamina 0.6 M
- 1 mL de ADP 0.005 M (pH 7)
- MTAB 250 $\mu\text{g}.\text{mL}^{-1}$, en un volumen final de 9 mL

La mezcla que se utilizó para realizar los blancos no contenía Arsenato de potasio 0.2 M y ADP 0.005 M (pH 7), los cuales fueron sustituidos por H_2O destilada. La mezcla se incubó durante 15 min a 30°C.

La reacción se detuvo mediante el agregado de 0.25 mL del reactivo cloruro férrico:

- 3 mL de FeCl₃ 10% (p/v) en HCl 2 N
- 3 mL de Ácido tricloroacético acuoso 24% (p/v)
- 3 mL de HCl acuoso 50% (v/v), en un volumen final de 9 mL

La mezcla se centrifugó a 12000 rpm durante 5 min.

Luego, se leyó la absorbancia del sobrenadante contra los blancos previamente preparados a una λ de 540 nm en una celda de 1 cm de largo de trayectoria óptica.

La concentración del producto de la reacción enzimática, es decir γ -GH, se calculó utilizando la siguiente fórmula:

$$\gamma\text{-GH (M)} = \text{Abs}_{540 \text{ nm}} / (\epsilon_{540 \text{ nm}} * d)$$

Donde, $\text{Abs}_{540 \text{ nm}}$ = absorbancia a 540 nm

$\epsilon_{540 \text{ nm}}$ = coeficiente de extinción molar de γ -GH a 540 nm = 298 M⁻¹.cm⁻¹

d = diámetro de la celda utilizada

La actividad GS se expresó en U, definiendo a U como la cantidad (μ mol) de γ -GH formado por minuto.

Estas actividades obtenidas a partir de cada aislamiento se normalizaron en relación a la cantidad de proteínas totales presente en el volumen de cultivo utilizado para realizar este ensayo (Actividad GS = U.mg proteínas totales⁻¹).

3.7. Cuantificación de Proteínas Totales

La cuantificación de proteínas totales se realizó según Lowry *et al.* (1951). Se tomó una muestra de cultivo (homogeneizada), de acuerdo a los mL utilizados en cada técnica, que se centrifugó a 12000 rpm durante 5 min. En el caso que se haya utilizado 1 mL de cultivo y luego de haber descartado el sobrenadante, se agregaron 0.3 mL de reactivo A (NaOH 1 M). Luego se incubó a 100°C durante 10 min. Finalizada la incubación, se enfrió el microtubo hasta alcanzar temperatura ambiente y se agregó 1.5 mL de reactivo B (50 mL de Na₂CO₃ 5% (p/v), 2 mL de CuSO₄.5H₂O 0,5% (p/v) en disolución de Tartrato de sodio potasio 1% (p/v), en un volumen final de 52 mL). La mezcla se incubó durante 10 min a temperatura ambiente, y luego 0.2 mL de esta se transfirieron a un microtubo nuevo al que se agregó 1 mL de Azul de Coomassie. Por último, se midió la absorbancia de esta nueva mezcla a una λ de 595 nm en una celda de 1 cm de largo de trayectoria óptica, utilizando como blancos H₂O destilada y Azul de Coomassie.

La concentración de proteínas totales se calculó a partir de una curva de calibración realizada con concentraciones conocidas de la proteína seroalbúmina bovina (BSA) en función de la absorbancia a 595 nm. Esta concentración se expresó en mg.mL⁻¹.

3.8. Extracción de ADN Genómico y Cuantificación

La extracción de ADN genómico (ADNg) se realizó mediante el protocolo modificado de Zhou *et al.* (1996) modificado. Se tomaron 5 mL de cultivo (homogeneizado) que se centrifugaron a 6000 rpm durante 10 min a temperatura ambiente en una centrifuga 2K15 (Sigma). Se descartó el sobrenadante y al precipitado se le agregaron 10 mL de buffer de extracción (Tris-HCl (pH 8.0) 100 mM, Ácido etilendiaminotetraacético (EDTA) (pH 8.0) 100 mM, NaH₂PO₄ (pH 8.0) 100 mM, NaCl 1.5 M, Bromuro de cetil-trimetilamonio (CTAB) 1% (p/v)). Luego, se agregó 38.6 µL de Proteinasa K para una concentración final de 0.038 mg.mL⁻¹. La mezcla se incubó a 37°C en agitación durante 30 min.

Finalizada la incubación, se agregó 1 mL de Dodecilsulfato sódico (SDS) 20% (p/v) y nuevamente se incubó a 65°C, en agitación, por 2 horas.

Luego, se centrifugó a 6000 rpm durante 10 min a temperatura ambiente. Posteriormente, se transfirió el sobrenadante a un tubo de polivinilpirrolidona (PVP) nuevo de 50 mL, se le agregó un volumen igual de 24:1 cloroformo/alcohol isoamílico, y se mezcló cuidadosamente por agitación.

Se centrifugó a 6000 rpm por 20 min a temperatura ambiente. Se colectó la fase acuosa, es decir la fase superior del sobrenadante, con *tips* de 10 mL con la punta cortada, y se transfirió a un tubo de PVP nuevo de 50 mL, donde, nuevamente, se le agregó un volumen igual de 24:1 cloroformo/alcohol isoamílico.

Se mezcló y se centrifugó a 6000 rpm durante 20 min a temperatura ambiente. Nuevamente, se colectó la fase acuosa del sobrenadante y se la transfirió a un tubo de PVP nuevo de 50 mL. Se precipitó el ADN mediante la adición de 0.6 volúmenes de isopropanol. Se mezcló cuidadosamente por agitación y se incubó a temperatura ambiente durante 1 hora.

Por último, se centrifugó a 7000 rpm por 40 min a temperatura ambiente, y se descartó el sobrenadante cuidadosamente. Posteriormente, se lavó el *pellet* con 10 mL de etanol 70% (v/v) frío. Se volvió a centrifugar a 7000 min⁻¹ durante 20 min a temperatura ambiente y a descartar el sobrenadante cuidadosamente. Se dejó el tubo semi invertido toda la noche a temperatura ambiente para que el precipitado se secase.

Al otro día, se resuspendió el *pellet* en 0.2 mL de H₂O miliQ estéril y se alicuotó la disolución de ADN en un microtubo de 1.5 mL que se guardó a -20°C.

El ADN genómico extraído se cuantificó midiendo la absorbancia a 260 nm en un espectrofotómetro NanoDrop 2000 (Thermo Scientific), utilizando como blanco agua miliQ estéril. El valor de 1 absorbancia a esta λ equivale a un estándar de ADN de 50 µg.mL⁻¹.

A su vez, para verificar su pureza se leyeron las absorbancias a las λ : 230, 260 y 280 nm en el mismo equipo mencionado anteriormente. Mediante estas absorbancias se calcularon las constantes Abs_{260nm}/Abs_{280nm} y Abs_{260nm}/Abs_{230nm} . Además se chequeó la integridad del ADN mediante una corrida electroforética (Clever Scientific, Ltd.) de estos ADN y un marcador de peso molecular (MPM) GeneRuler 100 pb (Fermentas) en un gel de agarosa 0.8% (p/v) (0.24 g de agarosa, 30 mL de buffer TBE 0.5X, en un volumen final de 30 mL) durante 40 min a 85 voltios (ver apartado 3.10).

3.9. Amplificación del Gen ARNr 16S

A partir de cada disolución de ADN genómico extraído se amplificó una región específica del gen de la subunidad 16S del ARNr mediante la reacción en cadena de la polimerasa. Los fragmentos fueron amplificadas con el cebador universal para Eubacteria 27F1 (5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3') (Muyzer *et al.*, 1993) y con el cebador específico para cianobacterias, 809R (5'-GCTTCGGCACGGCTCGGGTCGATA-3') (Jungblut *et al.*, 2005).

Las reacciones de PCR se realizaron en 25 µL totales (2.50 µL de Buffer de reacción 10x, 1.00 µL de desoxinucleótidos (dNTPs) 10 mM, 3.00 µL de MgCl₂ 50 mM, 0.50 µL de *primer forward* 10 µM, 0.50 µL de primer reverso 10 µM, 0.22 µL de BSA 50 mg.mL⁻¹, 0.20 µL de Taq polimerasa U.µL⁻¹, 15.08 µL de H₂O estéril y 2 µL de ADN genómico extraído como molde o 2 µL de H₂O estéril en el caso del control negativo). Las reacciones de PCR fueron realizadas en un termociclador Px2 (Thermo Electron Corporation), utilizándose el siguiente programa: un ciclo inicial de desnaturalización de 5 min a 94°C; luego 30 ciclos de desnaturalización de 1 min a 94°C, hibridación de los cebadores a 55°C y 62.4°C durante 30 segundos y un tiempo de extensión de 1 min a 72°C; y finalmente, una etapa de extensión final de 10 min a 72°C. Se utilizó una temperatura de hibridación¹⁷ de 55°C para todos los aislamientos, excepto para el aislamiento SU 5, para el cual se utilizó una temperatura de hibridación de 62.4°C.

3.10. Amplificación del Gen *hetR*

Se amplificó el gen *hetR* utilizando los *primers* específicos para cianobacterias HETR-F1 (5'-TATCTGGCTTTTAGYGCCATG-3') y HETR-R1 (5'-CTTGGTGATATTTATCWGCCC-3') (Tomitani *et al.*, 2006) (en el Anexo 2 se adjunta una tabla donde se indica a que corresponde cada letra de las bases degeneradas empleadas en estos cebadores).

Las reacciones de PCR se realizaron en 25 µL totales, como se explicó para la amplificación del gen ARNr 16S, en un termociclador con gradiente de temperatura Px2 (Thermo Electron Corporation). Con este termociclador se probaron posibles temperaturas de hibridación de los cebadores, desde los 56°C a los 62.1°C, utilizándose el siguiente programa: un ciclo inicial de desnaturalización de 5 min a 95°C; luego, 35 ciclos de desnaturalización de 30 segundos a 95°C, hibridación de los cebadores a 56.2°C, 58.5°C, 59.3°C, 60.1°C y 62.1°C durante 30 segundos y un tiempo de extensión de 1 min a 72°C; y por último, una etapa de extensión final de 10 min a 72°C. Para la mayoría de los aislamientos se utilizó una temperatura de *annealing* de 60.1°C, excepto para los aislamientos SU 45 que se hibridó con su cebador a 56.2°C, SU 11 a 58.5°C, SU 54 a 59.3°C y SU 1 a 62.1°C.

Para visualizar los productos de amplificación obtenidos para estos dos genes estudiados, se mezclaron 5 µL de cada producto amplificado y 2 µL de un buffer de carga 10X (5 mL de Glicerina comercial, 0.1 mL de EDTA 0.5 M (pH 8), 30 mg de Azul de bromofenol, 0.5 mL de Tris-HCl 1 M (pH 8), 4.4 mL de H₂O destilada, para un volumen final de 10 mL), y se cargaron en un gel de agarosa 1% (p/v) horizontal, en buffer TBE 0.5X (5.40 g de Tris, 2.75 g de H₃BO₃, 2.00 mL de EDTA 0.5 M (pH 8), 998 mL de H₂O destilada, para un volumen final de 1 L). La electroforesis en gel se realizó a 85 V, durante 40 min (Clever Scientific, Ltd.). En todas las corridas electroforéticas se utilizó un MPM

¹⁷ En este texto se utilizará la terminología en inglés: *annealing*.

GeneRuler 100 pb (Fermentas), para determinar aproximadamente el tamaño del producto amplificado.

Los fragmentos de ADN se observaron por tinción con el colorante de ácidos nucleicos *GoodView* y exposición a luz UV en un transiluminador, y se preservaron en forma de imagen utilizando el Gel Logic 100 Imaging System (Carestream Health, INC.). El colorante *GoodView* se incluyó en el gel, agregando 0.3 µL del mismo cada 10 mL de TBE 0.5X.

Los productos de amplificación de los dos genes en estudio fueron secuenciados en Macrogen (Corea).

3.11. Identificación Molecular y Análisis Filogenético

Los cromatogramas de secuencia obtenidos se editaron manualmente con el *software* Chromas Lite versión 2.1. (Technelysium Pty Ltd., 2012) para eliminar las porciones de secuencias con señales de fluorescencia bajas o con superposición de picos. Así se obtuvieron la secuencia del fragmento de ADN secuenciado en sentido *forward* y la secuencia complementaria del fragmento de ADN secuenciado en sentido reverso, para obtener ambas secuencias en el mismo sentido de lectura. Estas secuencias fueron comparadas entre sí para verificar su fidelidad. La secuencia definitiva se identificó por comparación con las bases de datos de la NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) utilizando el programa BLAST de nucleótidos (BLASTn). A su vez, las secuencias obtenidas a partir de la secuenciación del gen ARNr 16S se compararon con las bases de datos exclusivas para este gen, como lo son: RDP II (<http://www.rdp.cme.msu.edu/>) y *Greengenes* (<http://www.greengenes.lbl.gov>). En estas últimas dos bases de datos también se utiliza la herramienta de alineación de secuencias múltiples.

Por último, se construyeron árboles filogenéticos, con el método de Agrupamiento por Vecindad¹⁸ de Jukes & Cantor utilizando el programa MEGA versión 4 (Tamura *et al.*, 2007). Para esto, las secuencias nucleotídicas obtenidas a partir de la secuenciación de ambos genes y las secuencias de referencia obtenidas del *GenBank* (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank>) se alinearon utilizando la herramienta ClustalW presente en el *software* MEGA 4. A partir de esta alineación, se eliminaron los *gaps* presentes en las secuencias y las secuencias ambiguas. Para el árbol filogenético del gen ARNr 16S se utilizó como grupo externo a *Chlorobium limicola* y para el caso del gen *hetR*, se utilizó a *Trichodesmium sp.*

3.12. Análisis Estadístico

Cada aislamiento se cultivó por cuadruplicado, y en el caso de las actividades NR y GS se realizaron dos experimentos independientes, por lo que de los datos obtenidos en cada variable se obtuvieron los parámetros que describen a las poblaciones muestrales (medias, varianzas, etc). A los efectos de comparar diferencias entre los distintos aislamientos, para todas las variables se verificaron los supuestos de normalidad con el test de Shapiro-Wilkis y la homogeneidad de varianza con el test de Levene. Cuando las variables analizadas no cumplieron con los supuestos anteriores, estas fueron transformadas. Para cada variable se realizó el análisis de varianza (ANOVA) y

¹⁸ En este texto se utilizará la terminología en inglés: *Neighbor Joining*.

posteriormente pruebas de comparación múltiples de medias de tratamientos como lo es el Test de Tuckey. Para esto, se utilizó el software InfoStat/E (Di Rienzo *et al.*, 2012).

RESULTADOS

4. RESULTADOS

4.1. Curva y Tasa de Crecimiento

A partir de la colección de cianobacterias nativas liofilizadas, se obtuvieron cultivos de cianobacterias con heterocistos unialgales viables. Esto se logró gracias al medio selectivo BG₁₁₀, que al no presentar fuentes de C y N, permite únicamente el crecimiento de bacterias autótrofas y diazótrofes, como son las cianobacterias fijadoras de C y N.

En la Figura 6. se muestran las curvas de crecimiento de los aislamientos de cianobacterias con heterocisto estudiados realizadas en base a la DO a 750 nm en función del tiempo.

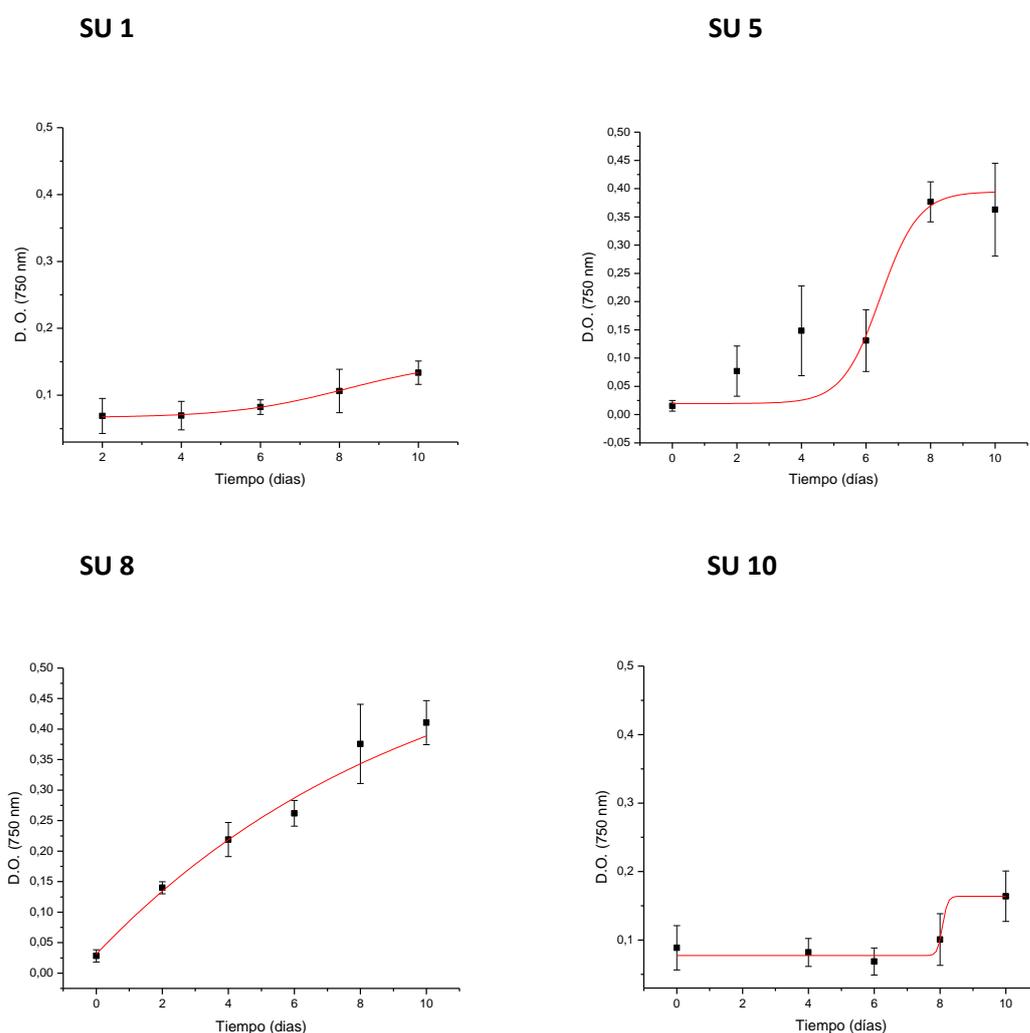


Figura 6.A. Curvas de crecimiento de los aislamientos de cianobacterias con heterocistos SU 1, SU 5, SU 8 y SU 10, realizadas con la DO a 750 nm durante 10 días. Los puntos del gráfico corresponden a la media de 4 repeticiones \pm el desvío estándar (DS).

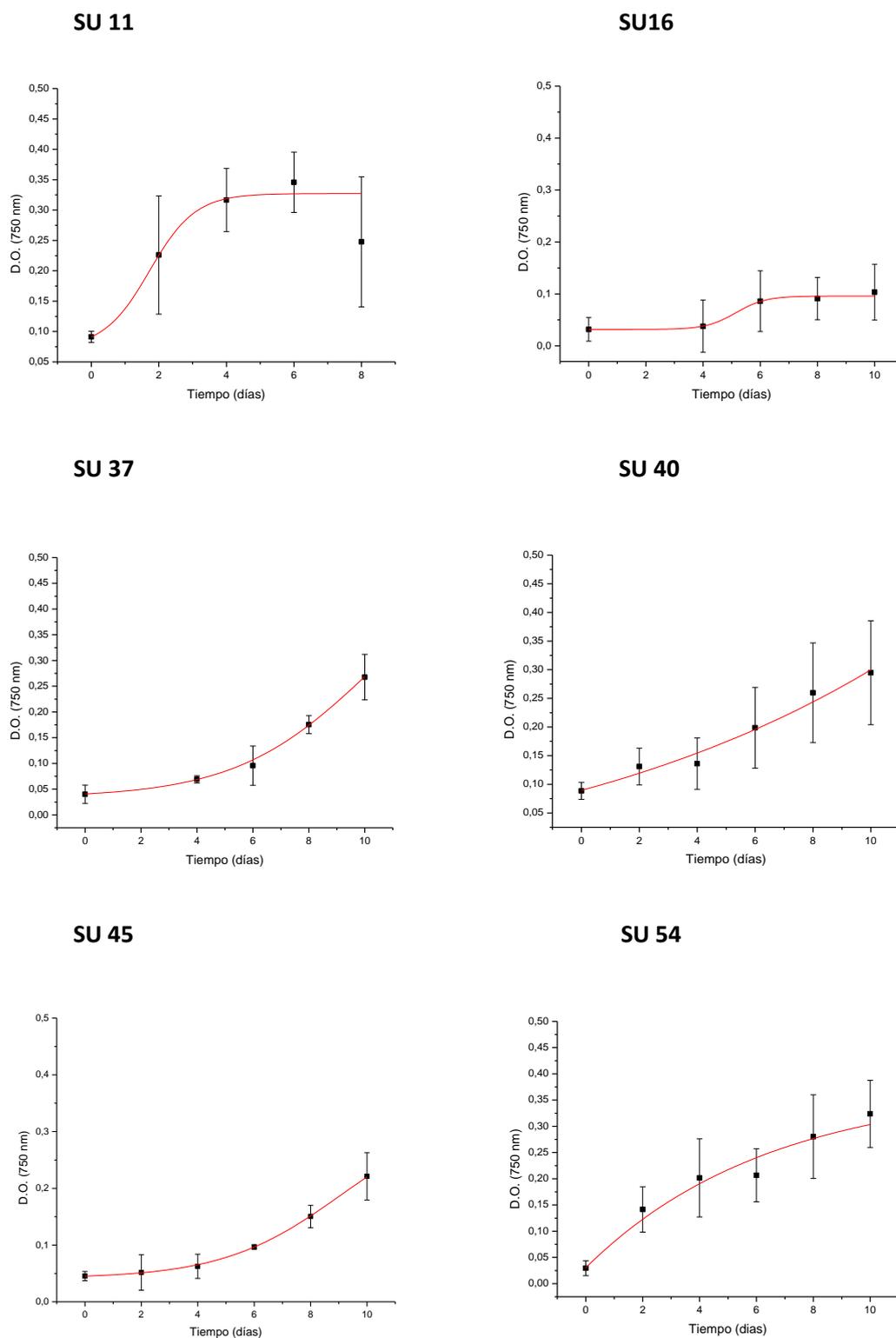


Figura 6.B. Curvas de crecimiento de los aislamientos de cianobacterias con heterocistos SU 11, SU 16, SU 37, SU 40, SU 45 y SU 54, realizadas con la DO a 750 nm durante 10 días. Los puntos del gráfico corresponden a la media de 4 repeticiones \pm DS.

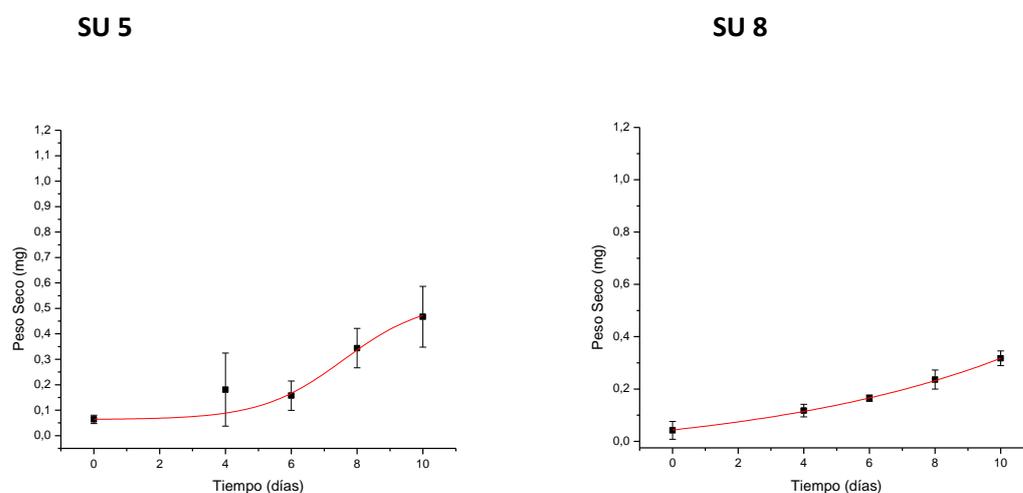
A los 10 días de cultivo algunos aislamientos se encontraban en fase exponencial, y otros como SU 5, SU 11 y SU 16 podrían haber empezado la fase estacionaria. Además, se pudo observar que para los aislamientos SU 8, SU 11, SU 40 y SU 54 la fase de aclimatación fue breve.

El aislamiento con una mayor tasa de crecimiento media fue SU 16, seguido por SU 5, SU 11 y SU 37 aunque, igualmente, no presentaron diferencias significativas entre ellos ($p > 0.05$). A su vez, los aislamientos con una menor tasa de crecimiento fueron SU 8, SU 1, SU 54 y SU 40 (Tabla 2.). Estadísticamente, solo los aislamientos SU 5 y SU 16 presentaron una tasa de crecimiento mayor a la de SU 40 ($p < 0.05$).

Tabla 2. Tasas de crecimiento de los 10 aislamientos de cianobacterias con heterocisto estudiados. Los promedios con una letra en común, no son significativamente diferentes ($p > 0.05$). Los valores de la tabla corresponden al promedio de 4 repeticiones \pm DS.

Aislamiento	μ (día ⁻¹)
SU 1	0.12 \pm 0.02 A B
SU 5	0.55 \pm 0.22 A
SU 8	0.11 \pm 0.01 A B
SU 10	0.17 \pm 0.1 A B
SU 11	0.31 \pm 0.05 A B
SU 16	0.67 \pm 0.42 A
SU 37	0.31 \pm 0.02 A B
SU 40	0.13 \pm 0.07 B
SU 45	0.18 \pm 0.02 A B
SU 54	0.14 \pm 0.01 A B

En la Figura 7. se muestra que solo fue posible determinar las curvas de crecimiento realizadas a partir del peso seco para los aislamientos SU 5, SU 8, SU 11, SU 37, SU 40 y SU 54. A su vez, se observa que a los 10 días de crecimiento SU 11, SU 40 y SU 54 se encontraban en la fase estacionaria. No obstante, los aislamientos SU 5, SU 8 y SU 37 se encontraban en la fase exponencial. SU 8 y SU 11 presentaron breves fases de aclimatación.



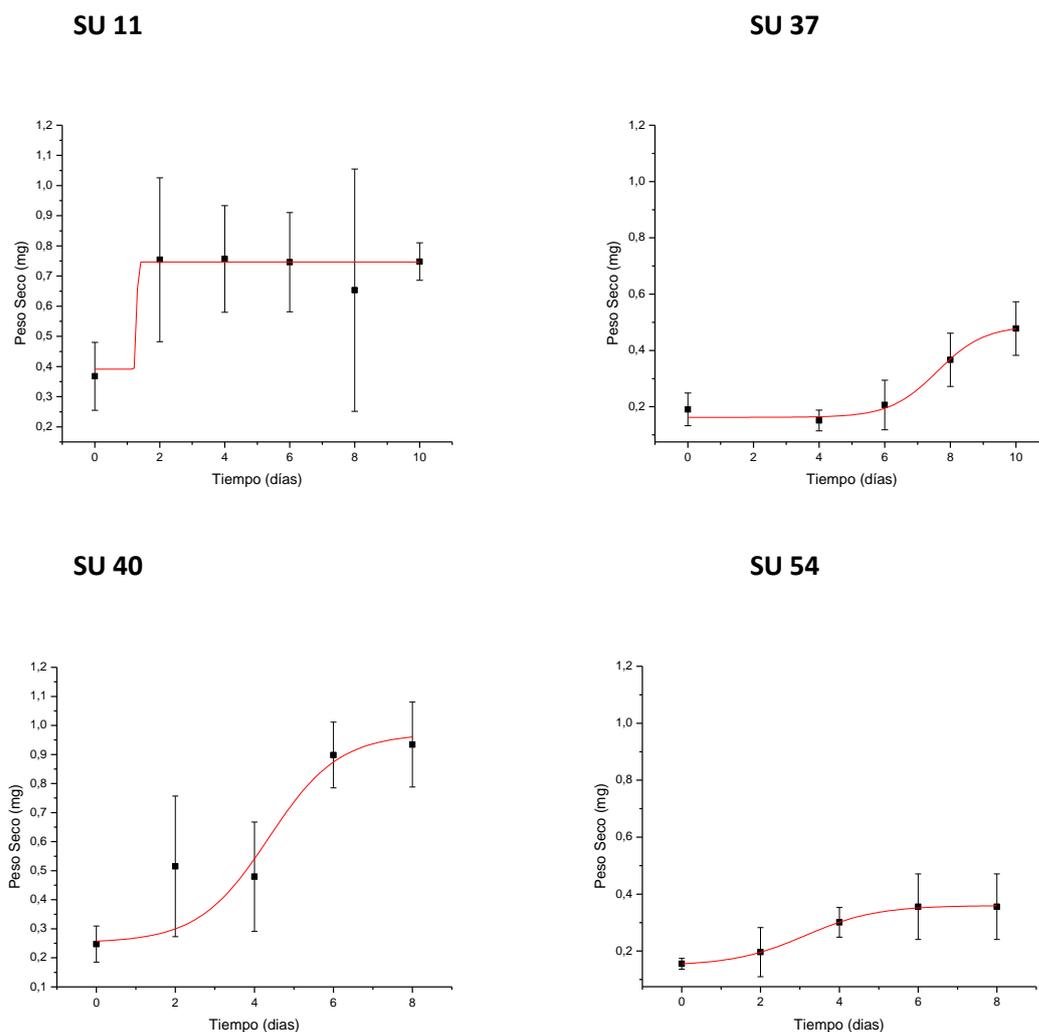


Figura 7. Curvas de crecimiento de 6 aislamientos de cianobacterias con heterocisto que cumplieron con el comportamiento típico de una curva de crecimiento durante 10 días, realizadas con el peso seco a través del tiempo. Los puntos del gráfico corresponden a la media de 4 repeticiones \pm DS.

Como se muestra en la Tabla 3., no hubo diferencias significativas en la tasa de crecimiento para estos aislamientos ($p > 0.05$). Los valores de tasa de crecimiento promedio también en este caso fueron mayores para SU 5 que para SU 40, aunque la diferencia no fue significativa ($p > 0.05$). Aunque, en este caso, las μ promedio mayores fueron SU 11 y SU 37.

Tabla 3. Tasas de crecimiento de 6 aislamientos de cianobacterias con heterocisto que cumplieron con el comportamiento típico de una curva de crecimiento. Los promedios con una letra en común, no son significativamente diferentes ($p > 0.05$). Los valores de la tabla corresponden al promedio de 4 repeticiones \pm DS.

Aislamiento	μ (día ⁻¹)
SU 5	0.27 ± 0.17 A
SU 8	0.17 ± 0.02 A
SU 11	0.35 ± 0.34 A
SU 37	0.32 ± 0.20 A
SU 40	0.04 ± 0.22 A
SU 54	0.18 ± 0.13 A

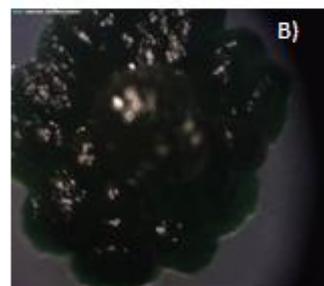
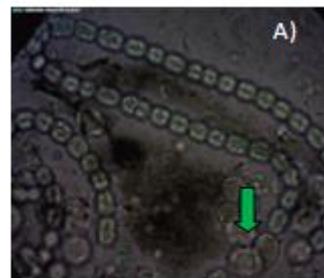
4.2. Caracterización Morfológica

De acuerdo a los datos morfológicos obtenidos, todos los aislamientos estudiados pertenecen a la subdivisión IV (Orden Nostocales) según clasificación de Ripka *et al.* (1979) presente en el *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology* (Holt *et al.*, 2000). Estos aislamientos son cianobacterias filamentosas, uniseriadas, con heterocistos, sin ramificaciones o con ramificaciones falsas.

Las fichas que se presentan a continuación contienen una tabla con las características morfológicas de cada aislamiento, una fotografía de cada aislamiento observado bajo microscopía óptica con aumento 100X (A) y una fotografía de las colonias de cada aislamiento creciendo en medio sólido observadas bajo microscopio estereoscópico (B). En cada ficha, las flechas verdes señalan heterocistos apicales, y la flecha azul un heterocisto intercalar.

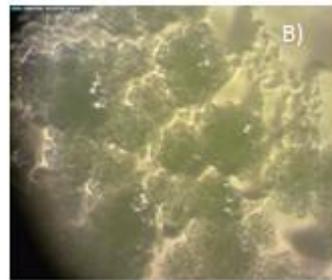
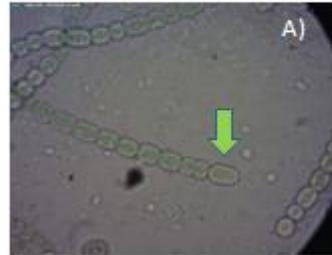
SU 1: Familia Nostocaceae, Género *Nostoc*

Nivel de Organización	Filamentoso
Forma Filamento	Recto/Flexuoso
Ramificaciones	No
Polaridad Filamento	Heteropolar
Células Vegetativas	Cilíndricas
Heterocistos	Si
Posición Heterocistos	Apicales/Intercalares
Distribución Heterocistos	Solitarios
Forma Heterocistos	Ovales
Acinetes	Presencia tardía
Posición Acinetes	Intercalares
Distribución Acinetes	Solitarios
Forma Acinetes	Esféricos
Mucílago	Si



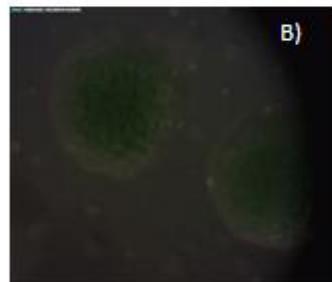
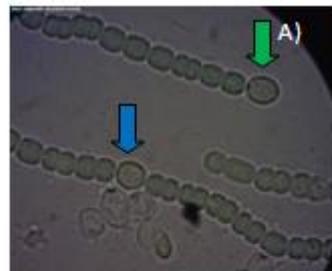
SU 5: Familia Nostocaceae, Género *Nostoc*

Nivel de Organización	Filamentoso
Forma Filamento	Recto
Ramificaciones	No
Polaridad Filamento	Heteropolar
Células Vegetativas	Barriles/Cilíndricas
Heterocistos	Si
Posición Heterocistos	Apicales
Distribución Heterocistos	Solitarios
Forma Heterocistos	Ovales
Acinetes	Presencia tardía
Posición Acinetes	Sueltos
Distribución Acinetes	-
Forma Acinetes	Esféricos
Mucílago	Si



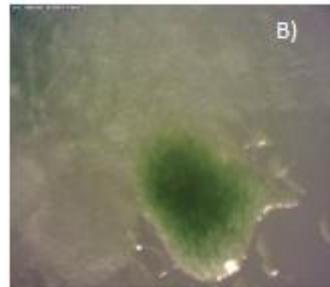
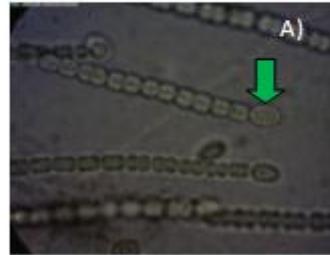
SU 8: Familia Nostocaceae, Género *Nostoc*

Nivel de Organización	Filamentoso
Forma Filamento	Recto
Ramificaciones	No
Polaridad Filamento	Heteropolar
Células Vegetativas	Barriles/Cilíndricas
Heterocistos	Si
Posición Heterocistos	Apicales/Intercalares
Distribución Heterocistos	Solitarios
Forma Heterocistos	Esféricos
Acinetes	Presencia tardía
Posición Acinetes	Sueltos
Distribución Acinetes	-
Forma Acinetes	Esféricos
Mucílago	Si



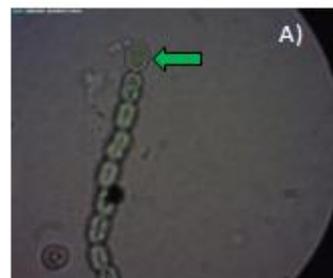
SU 10: Familia Nostocaceae, Género *Nostoc*

Nivel de Organización	Filamentoso
Forma Filamento	Recto
Ramificaciones	No
Polaridad Filamento	Heteropolar
Células Vegetativas	Cilíndricas
Heterocistos	Si
Posición Heterocistos	Apicales/Intercalares
Distribución Heterocistos	Solitarios
Forma Heterocistos	Ovales/Piriformes
Acinetes	Presencia tardía
Posición Acinetes	Sueltos
Distribución Acinetes	-
Forma Acinetes	Esféricos
Mucílago	Si



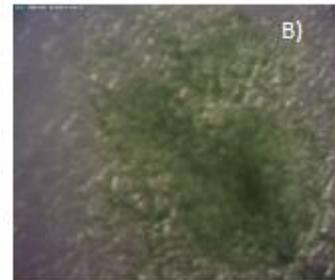
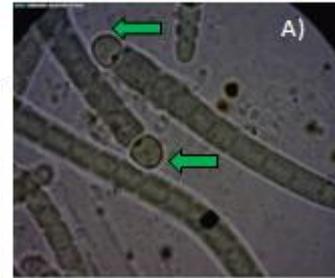
SU 11: Familia Nostocaceae, Género *Nostoc*

Nivel de Organización	Filamentoso
Forma Filamento	Recto
Ramificaciones	No
Polaridad Filamento	Heteropolar
Células Vegetativas	Cilíndricas
Heterocistos	Si
Posición Heterocistos	Apicales
Distribución Heterocistos	Solitarios
Forma Heterocistos	Ovales
Acinetes	Presencia tardía
Posición Acinetes	Subapicales/Intercalares
Distribución Acinetes	Solitarios/Pareados
Forma Acinetes	Esféricos
Mucílago	Si



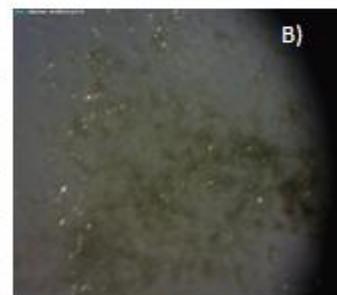
SU 16: Familia Rivulariaceae, Género *Calothrix*

Nivel de Organización	Filamentoso
Forma Filamento	Recto con terminación cónica
Ramificaciones	No
Polaridad Filamento	Heteropolar
Células Vegetativas	Cilíndricas
Heterocistos	Si
Posición Heterocistos	Apicales
Distribución Heterocistos	Solitarios
Forma Heterocistos	Esféricos
Acinetes	No
Mucílago	Si



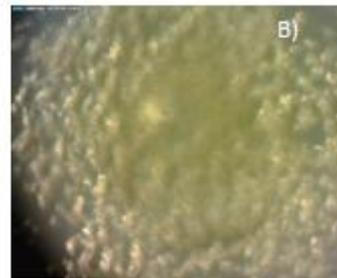
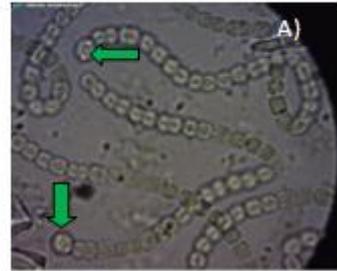
SU 37: Familia Rivulariaceae, Género *Calothrix*

Nivel de Organización	Filamentoso
Forma Filamento	Recto con terminación cónica
Ramificaciones	Algunos filamentos presentaron ramificaciones falsas
Polaridad Filamento	Heteropolar
Células Vegetativas	Barriles/Cilíndricas
Heterocistos	Si
Posición Heterocistos	Apicales
Distribución Heterocistos	Solitarios
Forma Heterocistos	Esféricos
Acinetes	No
Mucílago	Si



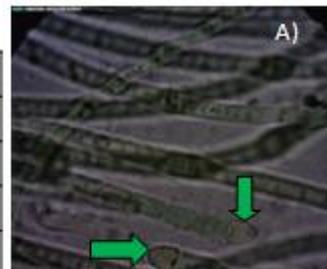
SU 40: Familia Nostocaceae, Género *Nostoc*

Nivel de Organización	Filamentoso
Forma Filamento	Recto/Flexuoso
Ramificaciones	No
Polaridad Filamento	Heteropolar
Células Vegetativas	Barriles
Heterocistos	Si
Posición Heterocistos	Apicales
Distribución Heterocistos	Solitarios
Forma Heterocistos	Esféricos
Acinetes	Presencia tardía
Posición Acinetes	Intercalares
Distribución Acinetes	Solitarios
Forma Acinetes	Esféricos
Mucílago	Si



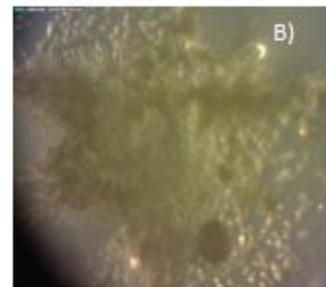
SU 45: Familia Rivulariaceae, Género *Calothrix*

Nivel de Organización	Filamentoso
Forma Filamento	Recto con terminación cónica
Ramificaciones	No
Polaridad Filamento	Heteropolar
Células Vegetativas	Cilíndricas
Heterocistos	Si
Posición Heterocistos	Apicales
Distribución Heterocistos	Solitarios
Forma Heterocistos	Ovoides
Acinetes	No
Mucílago	Si



SU 54: Familia Nostocaceae, Género *Nostoc*

Nivel de Organización	Filamentoso
Forma Filamento	Recto/Flexuoso
Ramificaciones	No
Polaridad Filamento	Heteropolar
Células Vegetativas	Cilíndricas/Esféricas
Heterocistos	Si
Posición Heterocistos	Apicales
Distribución Heterocistos	Solitarios
Forma Heterocistos	Esféricos/Ovales
Acinetes	Presencia tardía
Posición Acinetes	Intercalares
Distribución Acinetes	Solitarios
Forma Acinetes	Esféricos
Mucílago	Si



A modo de resumen, de los 10 aislamientos de cianobacterias con heterocisto estudiados, 7 pertenecerían, según su morfología, al género *Nostoc* y el resto al género *Calothrix*.

4.3. Caracterización Bioquímica

4.3.1. Determinación de Pigmentos Fotosintéticos

En la Tabla 4. se muestra el análisis de pigmentos fotosintéticos de los aislamientos.

Tabla 4. Contenido de clorofila a , carotenoides y ficobiliproteínas de los 10 aislamientos de cianobacterias con heterocisto estudiados. Los promedios con una letra en común, no son significativamente diferentes ($p > 0.05$). Los valores de la tabla corresponden al promedio de 4 repeticiones \pm DS.

Aislamiento	Chl a ($\mu\text{g} \cdot \text{mg PS}^{-1}$)	Carotenoides ($\mu\text{g} \cdot \text{mg PS}^{-1}$)	Ficobiliproteínas		
			Ficoeritrina ($\mu\text{g} \cdot \text{mg PS}^{-1}$)	Ficocianina ($\mu\text{g} \cdot \text{mg PS}^{-1}$)	Aloficocianina ($\mu\text{g} \cdot \text{mg PS}^{-1}$)
SU 1	0.04 ± 0.03 A B	0.26 ± 0.08 A B C	19.52 ± 4.84 B C	258.99 ± 42.50 F	49.92 ± 9.67 C
SU 5	$0.05 \pm 2.90 \times 10^{-3}$ B C	0.75 ± 0.20 D	6.64 ± 2.76 A	108.75 ± 6.36 E	26.99 ± 6.80 B
SU 8	$0.07 \pm 4.00 \times 10^{-3}$ C	0.81 ± 0.06 D	28.88 ± 5.95 C D E	265.29 ± 41.47 F	95.33 ± 15.41 D
SU 10	0.04 ± 0.01 A B	0.19 ± 0.04 A B	7.58 ± 0.89 A	76.72 ± 9.52 D E	8.27 ± 5.90 A B
SU 11	0.03 ± 0.01 A B	0.25 ± 0.01 A B C	43.53 ± 12.35 D E	62.24 ± 14.52 D	16.67 ± 9.82 A B
SU 16	0.02 ± 0.02 A B	0.29 ± 0.08 B C	26.35 ± 5.70 C D	40.00 ± 6.31 C	15.06 ± 9.68 A B
SU 37	$0.04 \pm 3.80 \times 10^{-3}$ A B C	0.38 ± 0.07 C	12.09 ± 1.43 A B	8.86 ± 1.27 A	5.80 ± 1.94 A
SU 40	0.03 ± 0.01 A B	0.18 ± 0.01 A	26.36 ± 3.47 C D E	20.42 ± 2.00 B	No detectada
SU 45	0.02 ± 0.01 A	0.37 ± 0.03 C	21.70 ± 7.64 B C	15.69 ± 1.83 B	18.07 ± 1.93 A B
SU 54	0.04 ± 0.01 A B	0.65 ± 0.08 D	54.33 ± 13.89 E	64.06 ± 11.25 D	17.84 ± 5.37 A B

El aislamiento que presentó un mayor contenido promedio de Chl *a*, fue SU 8, seguido por los aislamientos SU 5 y SU 37. No hubo entre estos tres aislamientos diferencias significativas ($p>0.05$). Por otro lado, los aislamientos que presentaron una menor cantidad promedio de Chl *a* fueron SU 45 y SU 16. El contenido de este pigmento, en todos los aislamientos, fue menor que el de carotenoides y ficobiliproteínas. El aislamiento SU 8, también, fue el que presentó una mayor concentración promedio de carotenoides, aunque no mostró diferencias significativas con los aislamientos SU 5 y SU 54 ($p>0.05$). Los aislamientos con una menor concentración promedio de estos pigmentos fueron SU 10 y SU 40. En el caso de la ficoeritrina, el aislamiento SU 54 presentó una mayor cantidad promedio de este pigmento, seguido por los aislamientos SU 11, SU 8 y SU 40, aunque el contenido de ésta no fue significativamente diferente entre estos aislamientos ($p>0.05$). Los aislamientos SU 5 y SU 10 fueron los que mostraron una menor cantidad de ficoeritrina ($p>0.05$). Por otro lado, los aislamientos que presentaron una mayor concentración de ficocianina fueron SU 1 y SU 8, los cuales no mostraron diferencias significativas entre sí ($p>0.05$). El aislamiento SU 37 fue el que presentó una menor concentración de este pigmento ($p<0.05$). Por último, el aislamiento con mayor contenido de aloficocianina fue SU 8 ($p<0.05$) y el de menor contenido promedio fue SU 37. Cabe destacar que en el aislamiento SU 40 no pudo detectarse aloficocianina. Las ficobiliproteínas, en general, fueron los pigmentos que se encontraron en mayor proporción en los 10 aislamientos.

4.3.2. Tasa de Producción Fotosintética de O₂

En la Figura 8. se muestran las tasas de producción fotosintética de O₂.

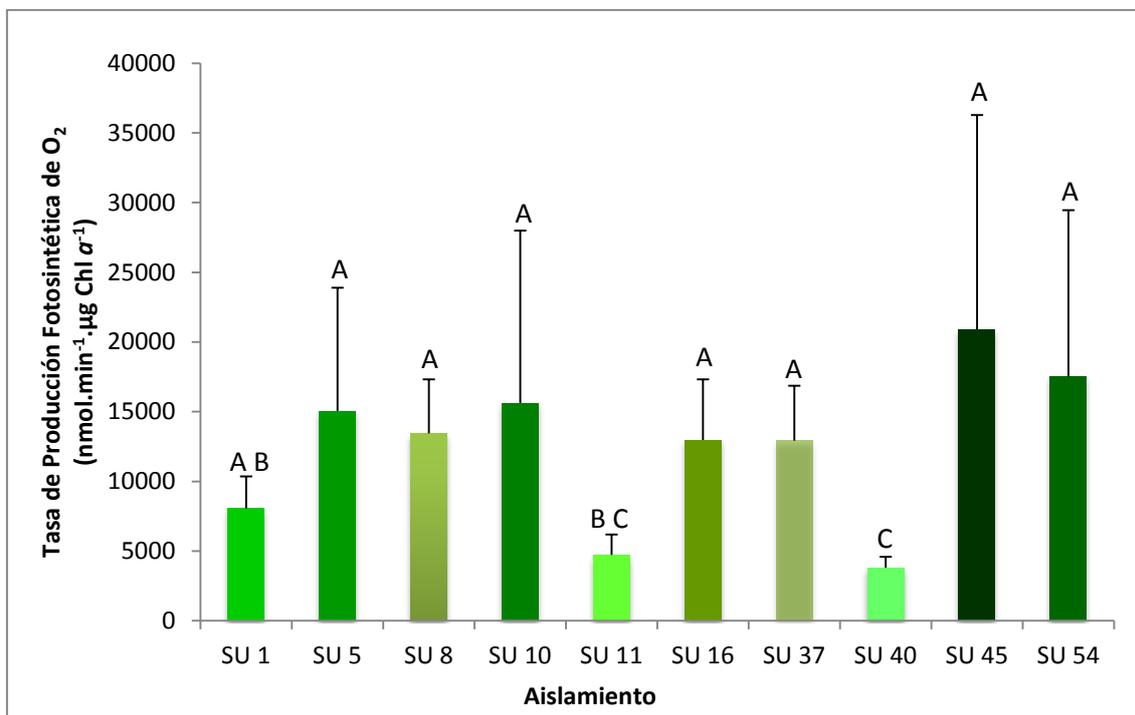


Figura 8. Tasas de producción fotosintética de O₂ de los 10 aislamientos de cianobacterias con heterocisto estudiados. Los promedios con una letra en común, no son significativamente diferentes ($p>0.05$). Las barras del gráfico corresponden al promedio de 4 repeticiones \pm DS (líneas verticales).

A excepción de SU 11 y SU 40 que tuvieron las tasas de producción fotosintética de O_2 más bajas ($p < 0.05$), el resto de los aislamientos presentó valores que superaron los $8000 \text{ nmol } O_2 \cdot \text{min}^{-1} \cdot \mu\text{g Chl } a^{-1}$. Entre estos últimos aislamientos no existieron diferencias significativas ($p > 0.05$).

4.3.3. Actividades Enzimáticas

4.3.3.1. Actividad Nitrogenasa

Las actividades Nitrogenasa calculadas para los 4 aislamientos de cianobacterias seleccionados se muestran en la Figura 9., donde se observa que el aislamiento SU 10 presentó la mayor actividad promedio, seguido por los aislamientos SU 5 y SU 16, aunque entre estos tres no existieron diferencias significativas ($p > 0.05$). Por ende, los aislamientos que presentaron diferente actividad Nitrogenasa fueron SU 8 (menor) y SU 10 (mayor).

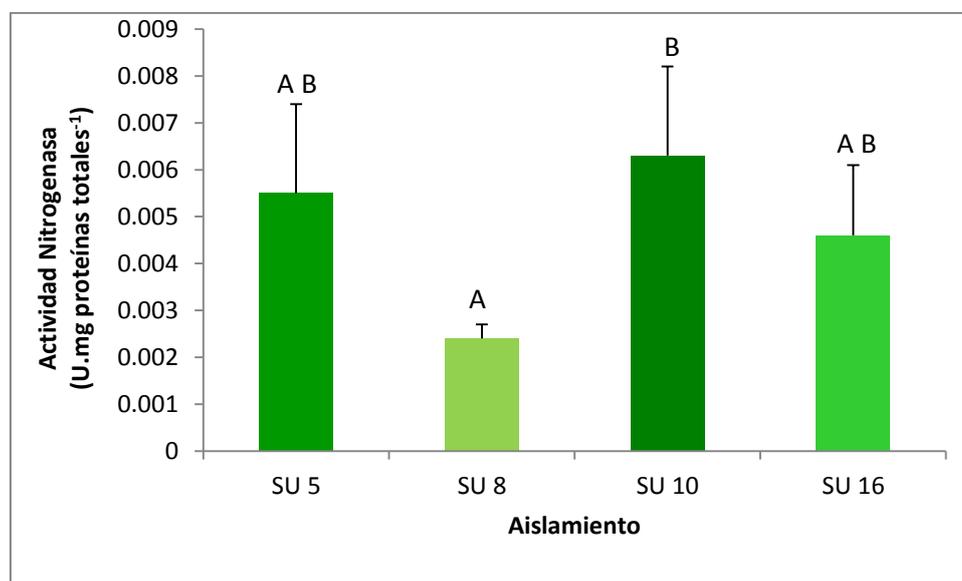


Figura 9. Actividades Nitrogenasa de los 4 aislamientos seleccionados de la colección de cianobacterias con heterocisto. Los promedios con una letra en común, no son significativamente diferentes ($p > 0.05$). Las barras del gráfico corresponden al promedio de 4 repeticiones \pm DS (líneas verticales).

4.3.3.2. Actividad Nitrato Reductasa

Las actividades NR obtenidas se muestran en la Figura 10., donde se ve que el aislamiento SU 40 fue el que presentó una mayor actividad promedio seguido por SU 10, SU 1 y SU 8, sin presentar diferencias significativas entre ellos ($p > 0.05$). A su vez, el aislamiento SU 37 fue el que presentó una menor actividad enzimática promedio, presentando diferencias significativas únicamente con los aislamientos mencionados anteriormente ($p < 0.05$).

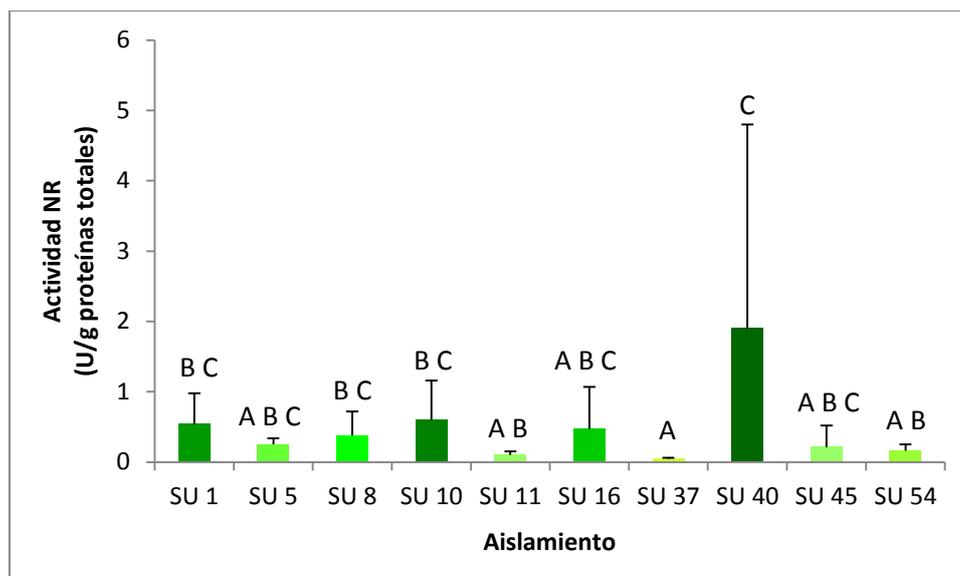


Figura 10. Actividades NR de los 10 aislamientos de cianobacterias con heterocisto estudiados. Los promedios con una letra en común, no son significativamente diferentes ($p > 0.05$). Las barras del gráfico corresponden al promedio de 4 repeticiones de 2 experimentos independientes \pm DS (líneas verticales).

4.3.3.3. Actividad Glutamina Sintetasa

Las actividades GS calculadas se muestran en la Figura 11., donde se observó que el aislamiento que presentó una mayor actividad promedio fue SU 10, seguido por SU 54, SU 8, SU 5, SU 45 y SU 16, pero entre ellos no hubo diferencias significativas ($p > 0.05$). Por otro lado, el aislamiento SU 37 fue el que presentó un menor valor de esta actividad enzimática promedio.

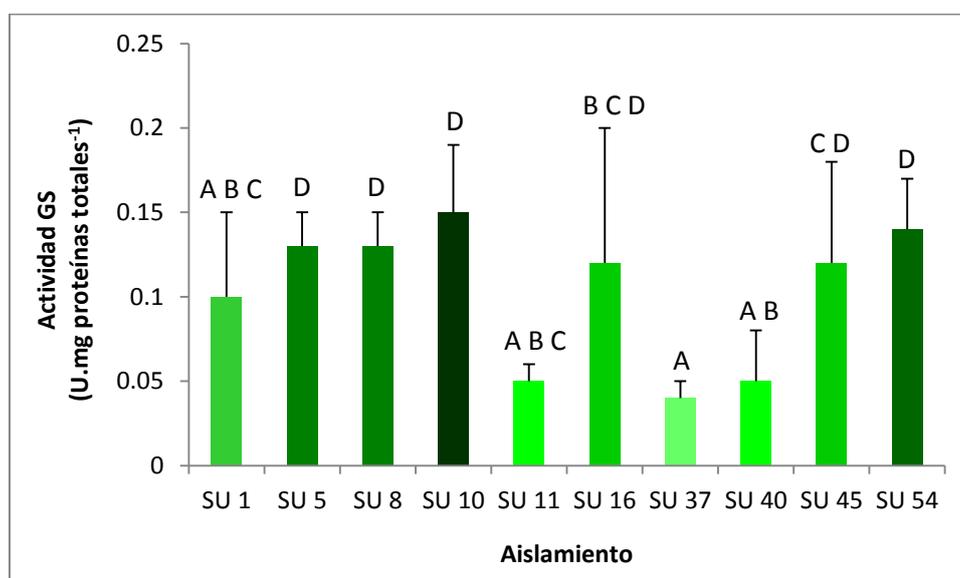


Figura 11. Actividades GS de los 10 aislamientos de cianobacterias con heterocisto estudiados. Los promedios con una letra en común, no son significativamente diferentes ($p > 0.05$). Las barras del gráfico corresponden al promedio de 4 repeticiones de 2 experimentos independientes \pm DS (líneas verticales).

4.4. Caracterización Molecular

4.4.1. Extracción y Cuantificación de ADN Genómico

En la Tabla 5. se muestran las concentraciones de ADN_g obtenidas para cada aislamiento a partir de la extracción y sus cocientes de pureza. Se obtuvieron concentraciones altas de estos ADN_s para los 10 aislamientos. A su vez, se puede afirmar que estos ADN_s se encuentran relativamente puros, ya que para el caso de la relación Abs_{260nm}/Abs_{280nm} , la mayoría de los valores se encuentran por arriba de 1.8, y los dos aislamientos que no se encuentran por encima de este valor, SU 1 y SU 5, son muy cercanos a este. Si se encontraran muy por debajo de este valor, la disolución de ADN_g extraído estaría contaminada por proteínas, que afectarían la calidad de este ADN. En el caso de la relación Abs_{260nm}/Abs_{230nm} , la mayoría de las extracciones obtenidas se encuentran por debajo del valor de pureza establecido (1.67), por lo que las disoluciones de ADN_s genómicos podrían encontrarse contaminadas con compuestos como EDTA y carbohidratos. La mayoría de estas disoluciones presentan entonces cierto grado de impureza, excepto las de los aislamientos SU 10, SU 40 y SU 54, que se encuentran por encima de los valores de pureza establecidos para ambas relaciones.

Tabla 5. Concentraciones de ADN_s genómicos extraídos de cada aislamiento de cianobacterias con heterocisto estudiado, con las respectivas relaciones que indican la pureza de los ADN_s.

Aislamiento	ADN Genómico (ng.uL ⁻¹)	Abs_{260nm}/Abs_{280nm}	Abs_{260nm}/Abs_{230nm}
SU 1	10.20	1.53	1.44
SU 5	602.60	1.77	1.15
SU 8	9.20	2.43	0.77
SU 10	57.30	2.19	2.01
SU 11	417.70	2.09	1.57
SU 16	77.20	2.17	1.07
SU 37	21.30	1.82	1.2
SU 40	101.90	1.94	2.85
SU 45	43.80	2.05	1.13
SU 54	128.00	2.16	1.91

En la Figura 12. se observa el perfil electroforético de los ADN_s genómicos extraídos, realizado para verificar la integridad de los mismos. En cada carril de esta figura, se observa la presencia de *smears*¹⁹, infiriendo, así, que estos ADN_s genómicos se encuentran parcialmente degradados. A su vez, se observa la presencia de bandas de menor tamaño a las de los ADN_s genómicos, los cuales, a diferencia de los anteriores, migran muy poco en la corrida electroforética. Estas bandas menores, pueden corresponder a ADN_s plasmídicos, que no fueron correctamente eliminados en la extracción.

¹⁹ Según la terminología en inglés para manchas esfumadas.

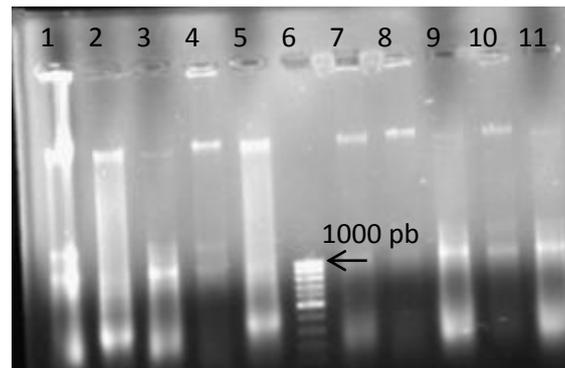


Figura 12. Fotografía del perfil electroforético en gel de agarosa 0.8% en buffer TBE 0.5X teñido con *GoodView*, donde se muestran los ADNs genómicos extraídos. Carriles: 1-5, ADN de los aislamientos SU 1, SU 5, SU 8, SU 10 y SU 11; 6, MPM *GeneRuler* 100 pb (Fermentas); 7-11, ADN de los aislamientos SU 16, SU 37, SU 40, SU 45 y SU 54.

4.4.2. Amplificación, Secuenciación y Análisis Filogenético del Gen ARNr 16S

En la Figura 13. se muestran los productos de amplificación parcial del gen ARNr 16S de cada aislamiento. Se logró amplificar el producto del tamaño deseado (800 pb), sin la amplificación de productos inespecíficos ni la formación de dímeros de cebadores durante la reacción.

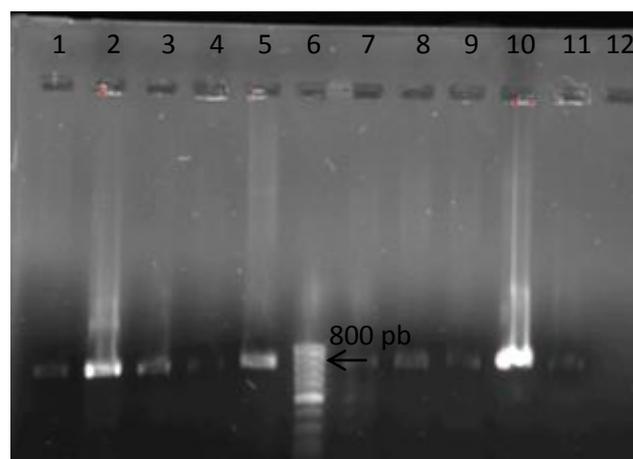


Figura 13. Fotografía del perfil electroforético en gel de agarosa 1% en buffer TBE 0.5X teñido con *GoodView*, donde se muestran los productos de amplificación del gen ARNr 16S. Carriles: 1-5, productos de amplificación del gen ARNr 16S de los aislamientos SU 1, SU 5, SU 8, SU 10 y SU 11; 6, MPM *GeneRuler* 100 pb (Fermentas); 7-11, productos de amplificación del gen ARNr 16S de los aislamientos SU 16, SU 37, SU 40, SU 45 y SU 54; 12, control negativo.

La comparación de las secuencias editadas (ver Anexo 3) con las secuencias de las bases de datos mostró que la mayoría de los aislamientos se afiliaron con el género *Nostoc*, excepto para los aislamientos SU 16, SU 37 y SU 45. El primero perteneció al género *Tolypothrix*, y el segundo coincidió con una cianobacteria aún no identificada por esta aproximación. Por último, el aislamiento SU 45 concordó en un 99% con el género *Calothrix* (Tabla 6.).

Tabla 6. Identificación de los 10 aislamientos de cianobacterias con heterocisto estudiados mediante la comparación del gen ARNr 16S con los bancos de secuencias de NCBI, RDP II y *Greengenes*. Nótese que los aislamientos SU 5 y SU 10 se identificaron con dos especies distintas, mientras que el resto solo con una.

Aislamiento	Base de Datos	Identidad	% Concordancia
SU 1	NCBI/ <i>Greengenes</i>	<i>Nostoc elgonense</i>	98 ^{NCBI} /98 ^{Greengenes}
SU 5	NCBI	<i>Nostoc piscinale</i>	88 ^{NCBI}
SU 5	NCBI/ <i>Greengenes</i> /RDP II	<i>Nostoc</i> sp.	88 ^{NCBI} /88 ^{Greengenes} /44 ^{RDP II}
SU 8	NCBI/ <i>Greengenes</i> /RDP II	<i>Nostoc</i> sp.	100 ^{NCBI} /100 ^{Greengenes} /100 ^{RDP II}
SU 10	NCBI/ <i>Greengenes</i> /RDP II	<i>Nostoc</i> sp.	99 ^{NCBI} /99 ^{Greengenes} /88 ^{RDP II}
SU 10	NCBI	<i>Nostoc piscinale</i>	99 ^{NCBI}
SU 11	NCBI/ <i>Greengenes</i> /RDP II	<i>Nostoc</i> sp.	99 ^{NCBI} /98 ^{Greengenes} /94 ^{RDP II}
SU 16	NCBI/ <i>Greengenes</i> /RDP II	<i>Tolypothrix</i> sp.	99 ^{NCBI} /99 ^{Greengenes} /93 ^{RDP II}
SU 37	NCBI/RDP II	Cianobacteria no cultivable	96 ^{NCBI} /81 ^{RDP II}
SU 40	NCBI/ <i>Greengenes</i>	<i>Nostoc calcicola</i>	100 ^{NCBI} /100 ^{Greengenes}
SU 45	NCBI/ <i>Greengenes</i> /RDP II	<i>Calothrix</i> sp.	99 ^{NCBI} /99 ^{Greengenes} /92 ^{RDP II}
SU 54	NCBI/ <i>Greengenes</i> /RDP II	<i>Nostoc</i> sp.	99 ^{NCBI} /98 ^{Greengenes} /93 ^{RDP II}

En la Figura 14. se muestra el árbol filogenético construido a partir de las secuencias del gen 16S rRNA de los 10 aislamientos por medio del método *Neighbor Joining* para determinar el parentesco entre éstos con cianobacterias de diversos géneros ya descritos. En dicho árbol se formaron dos agrupaciones²⁰ A y B. En el A se observaron a su vez varios sub *clusters* donde se distribuyeron la mayoría de los aislamientos, excepto los aislamientos SU 37 y SU 45. En particular, la distribución de los aislamientos que fueron afiliados a nivel morfológico con el género *Calothrix* (SU 16, 37 y 45) fue heterogénea en el árbol. Estos aislamientos no formaron un *cluster* único sino que estuvieron mezclados entre los diferentes grupos analizados y en ambos *clusters*. Solo SU 45 se agrupó con una especie de *Calothrix*. El aislamiento SU 16 presentó un 99% de identidad con *Tolypothrix* (Tabla 6.) y en el árbol se afilió también con este género. Por otro lado, las secuencias de los aislamientos con caracteres morfológicos de *Nostoc* se encontraron solo en el cluster A y también estuvieron distribuidas heterogéneamente en el árbol. Cabe destacar que los aislamientos SU 5 y SU 10 se agruparon en un mismo sub *cluster* con un valor de *bootstrap*²¹ de 92. Sucediendo lo mismo en el caso de SU 11 y SU 54 que se agruparon con un valor de *bootstrap* un poco menor (74).

²⁰ En este texto se utilizará la terminología en inglés: *cluster*.

²¹ *Bootstrap* es un método de remuestreo que permite estimar ciertos parámetros estadísticos.

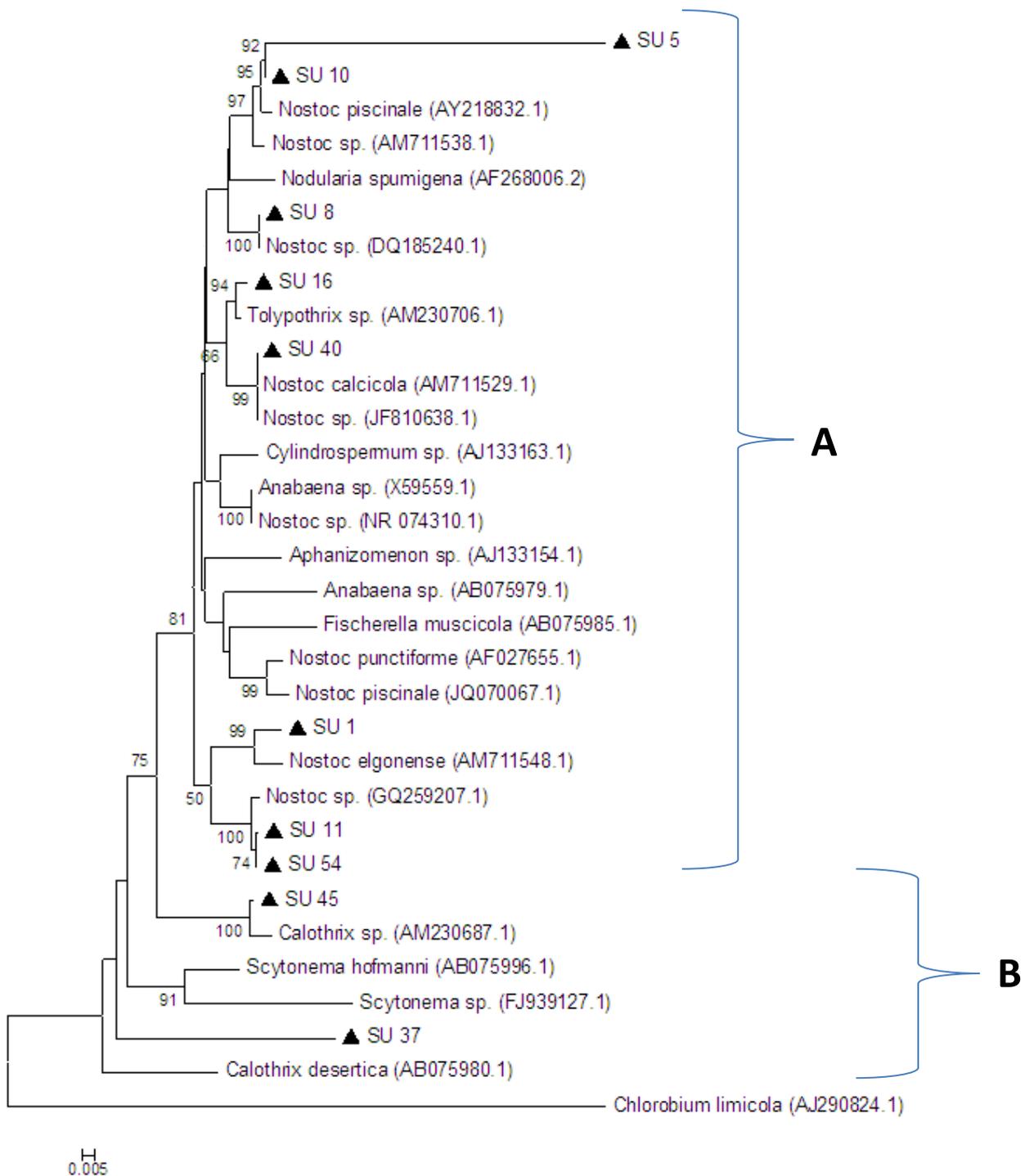


Figura 14. Árbol filogenético donde se muestra las relaciones filogenéticas entre las secuencias nucleotídicas del gen ARNr 16S de los 10 aislamientos de cianobacterias con heterocisto estudiados y las obtenidas a partir de la base de datos de *GenBank* del NCBI. *Chlorobium limicola* se utilizó como grupo externo. Los triángulos rellenos corresponden a las secuencias del gen ARNr 16S de los 10 aislamientos en estudio. Los números de acceso en el *GenBank* de las secuencias utilizadas se presentan entre paréntesis. En esta figura solo se muestran los *bootstrap* mayores o iguales a 50.

4.4.3. Amplificación, Secuenciación y Análisis Filogenético del Gen *hetR*

En la Figura 15. se muestran los productos de amplificación del gen *hetR* (740 pb) de cada aislamiento. En este caso tampoco se formaron productos inespecíficos ni dímeros de cebadores en la reacción, como se puede observar en el perfil electroforético que se presenta a continuación.

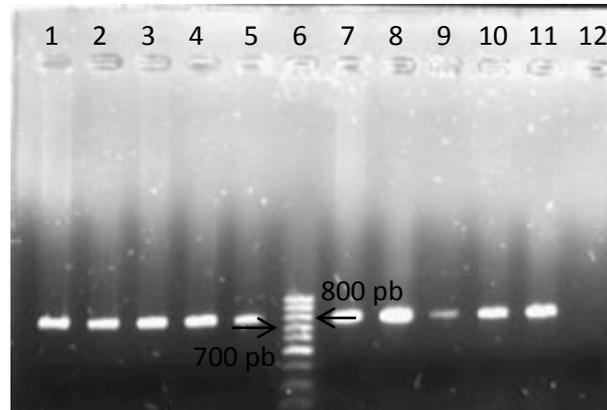


Figura 15. Fotografía del perfil electroforético en gel de agarosa 1% en buffer TBE 0.5X teñido con *GoodView*, donde se muestran los productos de amplificación del gen *hetR*. Carriles: 1-5, productos de amplificación del gen *hetR* de los aislamientos SU 1, SU 5, SU 8, SU 10 y SU 11; 6, MPM *GeneRuler* 100 pb (Fermentas); 7-11, productos de amplificación del gen *hetR* de los aislamientos SU 16, SU 37, SU 40, SU 45 y SU 54; 12, control negativo.

La comparación de las secuencias editadas (ver Anexo 4) con las secuencias de la base de datos del NCBI mostró que 4 aislamientos, como SU 1, SU 5, SU 8 y SU 10, coincidieron con la especie *Nodularia spumigena* (88-92%). A su vez, SU 16, SU 37 y SU 45, concordaron con el género *Calothrix* (92, 95 y 96% respectivamente). En cambio, los aislamientos SU 40 y SU 54, se afiliaron con cianobacterias del género *Nostoc* (89 y 79% respectivamente). En el caso del aislamiento SU 11, el porcentaje de concordancia, con las especies *Anabaena variabilis* y *Fischerella muscicola* fue igual (81%) (Tabla 7.).

Tabla 7. Identificación de los 10 aislamientos de cianobacterias con heterocisto estudiados mediante la comparación del gen *hetR* con el banco de datos de NCBI. Los aislamientos SU 11 y SU 16 se identificaron con dos especies distintas, mientras que los demás aislamientos solo con una.

Aislamiento	Identidad	% Concordancia
SU 1	<i>Nodularia spumigena</i>	88
SU 5	<i>Nodularia spumigena</i>	88
SU 8	<i>Nodularia spumigena</i>	92
SU 10	<i>Nodularia spumigena</i>	88
SU 11	<i>Anabaena variabilis</i>	81
SU 11	<i>Fischerella muscicola</i>	81
SU 16	<i>Calothrix desertica</i>	92
SU 16	<i>Calothrix sp.</i>	92
SU 37	<i>Calothrix sp.</i>	95
SU 40	<i>Nostoc sp.</i>	89
SU 45	<i>Calothrix sp.</i>	96
SU 54	<i>Nostoc azollae</i>	79

En la figura 16 se presenta el árbol filogenético con las secuencias del gen *hetR* construido a través del método *Neighbor Joining*. En dicho árbol se forman dos grandes *clusters* A y B pero con un *bootstrap* muy bajo. A su vez éstos están compuestos por varios sub *clusters* donde se distribuyeron heterogéneamente las secuencias analizadas. En el caso de los aislamientos con caracteres morfológicos de *Calothrix*, en este árbol se agrupan con especies de ese género. Cabe destacar, que en este caso, los aislamientos SU 1, SU 5, SU 8 y SU 10 se agruparon dentro de un mismo sub *cluster*, con un valor de *bootstrap* de 92. Sucediendo lo mismo con SU 37 y SU 45, pero en este caso se agruparon con un menor valor de *bootstrap* (58).

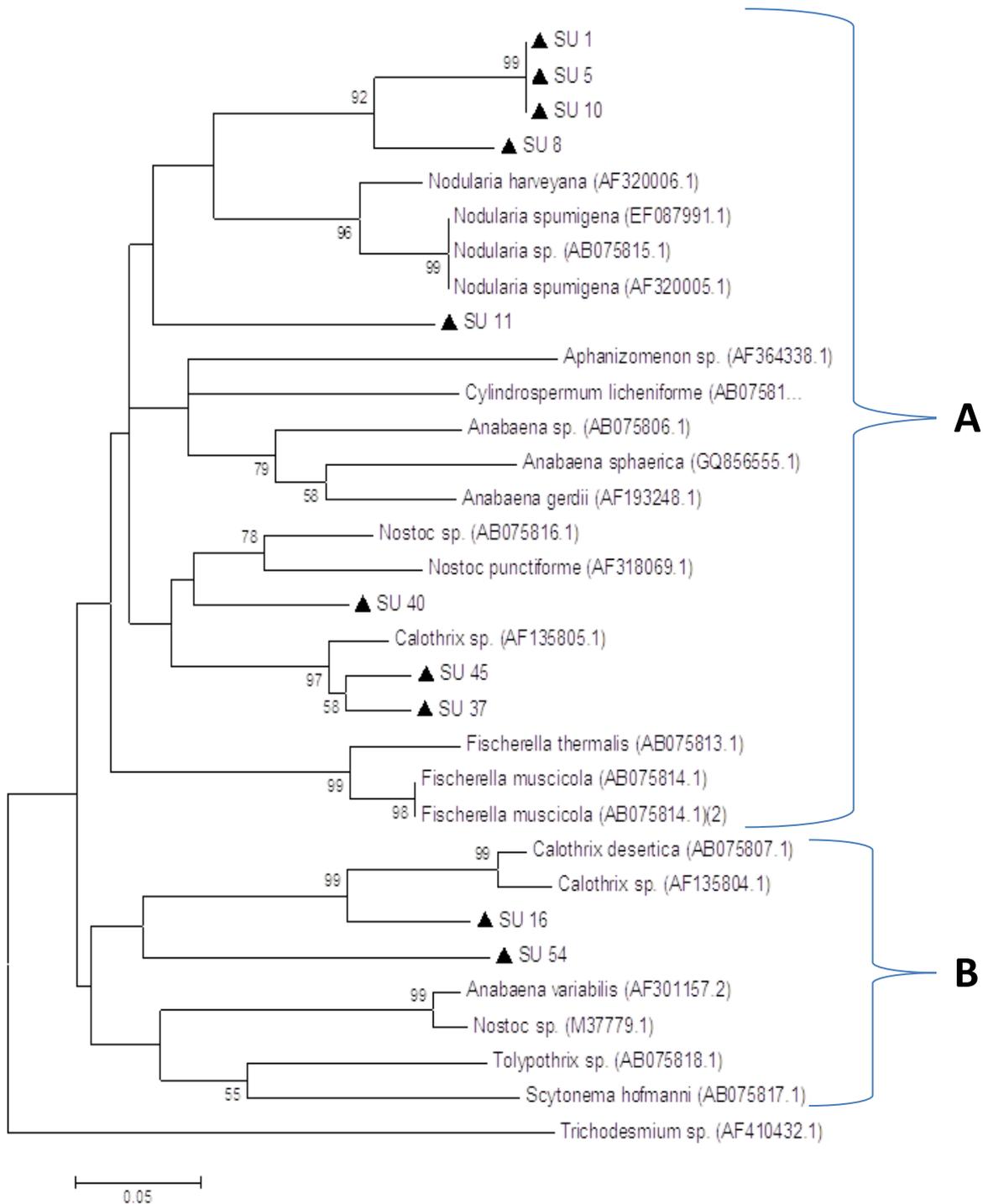


Figura 16. Árbol filogenético donde se muestra las relaciones filogenéticas entre las secuencias nucleotídicas del gen *hetR* de los 10 aislamientos de cianobacterias con heterocisto estudiados y las obtenidas a partir de la base de datos de *GenBank* del NCBI. *Trichodesmium sp.* se utilizó como grupo externo. Los triángulos rellenos corresponden a las secuencias del gen *hetR* de los 10 aislamientos estudiados. Los números de acceso en el *GenBank* de las secuencias utilizadas se presentan entre paréntesis. En esta figura solo se muestran los *bootstrap* mayores o iguales a 50.

4.5. Resumen de Resultados

A continuación se muestra en la Tabla 8., a modo de resumen, los resultados obtenidos en este trabajo. En este caso solo se consideraron los promedios de cada parámetro determinado, para analizar la estadística de cada uno remitirse a las tablas/gráficos correspondientes.

Tabla 8. Resumen de los resultados promedio obtenidos para los aislamientos de este estudio. Los géneros que se indican en las columnas ARNr 16S y *hetR*, son los que presentaron una mayor homología entre estos dos tipos de secuencias, al realizar la comparación de las secuencias obtenidas a partir de la secuenciación de cada gen presente en cada aislamiento con las secuencias ya reportadas presentes en la base de datos *GenBank* del NCBI. Para μ_{DO} , ++: valores $> 0.17 \text{ día}^{-1}$, y +: valores $\leq 0.17 \text{ día}^{-1}$. Para Chl a , ++: valores $> 7,00 \times 10^{-3} \mu\text{g.mg PS}^{-1}$, y +: valores $< 7,00 \times 10^{-3} \mu\text{g.mg PS}^{-1}$. Para carotenoides, ++: valores $> 0,30 \mu\text{g.mg PS}^{-1}$, y +: valores $< 0,30 \mu\text{g.mg PS}^{-1}$. Para ficoeritrina, ++: valores $> 25,00 \mu\text{g.mg PS}^{-1}$, y +: valores $< 25,00 \mu\text{g.mg PS}^{-1}$. Para ficocianina, ++: valores $> 70,00 \mu\text{g.mg PS}^{-1}$, y +: valores $< 70,00 \mu\text{g.mg PS}^{-1}$. Para aloficocianina, ++: valores $> 20,00 \mu\text{g.mg PS}^{-1}$, +: valores $< 20,00 \mu\text{g.mg PS}^{-1}$, y -: no se encuentra presente. Para fotosíntesis, ++: valores $> 8000 \text{ nmol.min}^{-1} \cdot \mu\text{g Chl } a^{-1}$, y +: valores $< 8000 \text{ nmol.min}^{-1} \cdot \mu\text{g Chl } a^{-1}$. Para Nitrogenasa, ++: valores $> 3,00 \times 10^{-3} \text{ U.mg proteínas totales}^{-1}$, y +: valores $< 3,00 \times 10^{-3} \text{ U.mg proteínas totales}^{-1}$. Para NR, ++: valores $> 3,00 \times 10^{-4} \text{ U.g proteínas totales}^{-1}$, y +: valores $< 3,00 \times 10^{-4} \text{ U.g proteínas totales}^{-1}$. Para GS, ++: valores $> 0,11 \text{ U.mg proteínas totales}^{-1}$, y +: valores $< 0,11 \text{ U.mg proteínas totales}^{-1}$. ND: no determinada.

Aislamiento	Morfología	ARNr 16S	<i>hetR</i>	μ_{DO}	Chl a	Carotenoides	Ficoeritrina	Ficocianina	Aloficocianina	Fotosíntesis	Nitrogenasa	NR	GS
SU 1	<i>Nostoc</i>	<i>Nostoc elgonense</i>	<i>Nodularia spumigena</i>	+	++	+	+	++	++	++	ND	++	+
SU 5	<i>Nostoc</i>	<i>Nostoc</i>	<i>Nodularia spumigena</i>	++	++	++	+	++	++	++	++	+	++
SU 8	<i>Nostoc</i>	<i>Nostoc</i> sp.	<i>Nodularia spumigena</i>	+	++	++	++	++	++	++	+	++	++
SU 10	<i>Nostoc</i>	<i>Nostoc</i>	<i>Nodularia spumigena</i>	+	++	+	+	++	+	++	++	++	++
SU 11	<i>Nostoc</i>	<i>Nostoc</i> sp.	<i>Anabaena/Fischerella</i>	++	+	+	++	+	+	+	ND	+	+
SU 16	<i>Calothrix</i>	<i>Tolypathrix</i> sp.	<i>Calothrix</i>	++	+	+	++	+	+	++	++	++	++
SU 37	<i>Calothrix</i>	Cianobacteria no cultivable	<i>Calothrix</i> sp.	++	++	++	+	+	+	++	ND	+	+
SU 40	<i>Nostoc</i>	<i>Nostoc calcicola</i>	<i>Nostoc</i> sp.	+	+	+	++	+	-	+	ND	++	+
SU 45	<i>Calothrix</i>	<i>Calothrix</i> sp.	<i>Calothrix</i> sp.	++	+	++	+	+	+	++	ND	+	++
SU 54	<i>Nostoc</i>	<i>Nostoc</i> sp.	<i>Nostoc azollae</i>	+	++	++	++	+	+	++	ND	+	++

DISCUSIÓN

5. DISCUSIÓN

La identificación y clasificación taxonómica de cianobacterias se ha realizado tradicionalmente a través de características morfológicas, utilizando los códigos taxonómicos Botánico y/o Bacteriológico. Otros datos pueden ser utilizados para realizar esta caracterización, como la capacidad de fijar N_2 de estos microorganismos, actividades enzimáticas, contenido de pigmentos, actividades fotosintéticas, análisis de lípidos y ácidos grasos, etc. Pero, la identificación taxonómica basada en los caracteres morfológicos, de desarrollo, fisiológicos y bioquímicos no siempre se relaciona con las relaciones evolutivas entre las cianobacterias, por lo que se tiene que realizar, a su vez, una caracterización molecular. Sin embargo, el análisis aislado de todas estas características no es suficiente para poder identificar y clasificar taxonómicamente a estos microorganismos, por lo que una aproximación polifásica resulta más apropiada y confiable (Mishra *et al.*, 2013). En este caso, se identificaron diez aislamientos de cianobacterias con heterocisto provenientes de un arrozal gracias a las caracterizaciones morfológicas y moleculares, a su vez, estas permitieron diferenciar aislamientos muy similares entre sí. Pero los parámetros bioquímicos y fisiológicos utilizados en este estudio no aportaron a la identificación de estos aislamientos pero en contadas ocasiones permitieron diferenciar aislamientos pertenecientes al mismo género.

5.1. Curva y Tasa de Crecimiento

Los primeros caracteres que se evaluaron en esta aproximación polifásica fueron las velocidades de crecimiento. Este parámetro se calculó por dos métodos diferentes, mediante la medida de la densidad óptica a 750 nm y a través del peso seco en función del tiempo. En el primer caso se midió la absorbancia a una λ de 750 nm, ya que se relaciona con la concentración celular de cianobacterias filamentosas y de unicelulares (Vézina & Vincent, 1997). Los aislamientos con una mayor tasa de crecimiento promedio fueron SU 16 y SU 5, y el de menor fue SU 8. Estas diferencias pueden deberse a los diferentes contenidos de proteínas, carbohidratos, pigmentos fotosintéticos y actividades enzimáticas de cada uno de los aislamientos, ya que todos crecieron en condiciones similares (Fiore *et al.*, 2005; Schwarz & Forchhammer, 2005; de Figueiredo *et al.*, 2011). Mishra y colaboradores (2013), mostraron que las velocidades de crecimiento eran inversamente proporcionales al contenido celular de carbohidratos. Es decir, que a medida que aumentaba el crecimiento de estos microorganismos disminuía el contenido de carbohidratos. Por lo que probablemente, una mayor cantidad de carbohidratos era necesaria para sustentar la respiración, la síntesis de biopolímeros y proteínas, para un máximo crecimiento de estos microorganismos.

En este estudio, no se pudo utilizar este parámetro para diferenciar a los diferentes géneros de cianobacterias. Ya que los aislamientos que presentaron una mayor velocidad de crecimiento corresponden a diferentes géneros de acuerdo a su morfología (ver apartado 5.2.), y aislamientos dentro del mismo género presentaron tasas de crecimiento de las más altas y de las más bajas. Por lo que solo se podría considerar esta característica para discriminar entre aislamientos que pertenezcan al mismo género.

En el análisis del crecimiento utilizando peso seco en función del tiempo, se descartaron las curvas de cuatro aislamientos, SU 1, SU 10, SU 16 y SU 45, que no presentaron un comportamiento

típico o presentaron un R^2 muy bajo. En este caso, el aislamiento que presentó una mayor tasa de crecimiento promedio fue SU 11 y el que presentó una menor tasa de crecimiento promedio fue SU 40, aunque no hubo diferencias significativas entre los aislamientos. A su vez, se observa que las curvas obtenidas a partir de los datos de peso seco, difieren de las obtenidas con los datos de absorbancia para algunos aislamientos mientras que para otros son similares. Muchas especies producen agregados compactos difíciles de disgregar y por lo tanto pueden interferir con las mediciones realizadas a través de la absorbancia. La toma de muestras para realizar cada estudio pudo no haber sido homogénea por las mismas razones. A pesar de los inconvenientes enumerados del cálculo de la tasa de crecimiento mediante la densidad óptica a 750 nm, este método resultó el mejor de los utilizados con valores de R^2 mayores a los obtenidos con el peso seco. A su vez, los desvíos estándar de los datos de peso seco fueron muy altos. Stacey y colaboradores (1977) encontraron sin embargo que las tasas de crecimiento calculadas por ambos métodos fueron similares. Podrían verificarse los resultados utilizando otros métodos como es el conteo celular o de filamentos.

Si se tuvieran en cuenta los datos obtenidos mediante el método de la densidad óptica, se podría decir que los aislamientos SU 5 y SU 16 podrían considerarse como inoculantes para arroz, ya que aumentan su biomasa más rápidamente. Según Prasanna y colaboradores (2009), las cepas que presentan una adaptación más rápida a ciertas condiciones, pueden ser buenas competidoras cuando se la utiliza como inoculante. Aunque se debería estudiar su comportamiento en el campo, ya que pueden comportarse en forma diferente que bajo las condiciones controladas del laboratorio.

5.2. Caracterización Morfológica

Todos los aislamientos estudiados pertenecen al orden Nostocales, y de acuerdo a sus características morfológicas la mayoría de los aislamientos podrían asignarse al género *Nostoc* (SU 1, SU 5, SU 8, SU 10, SU 11, SU 40 y SU 54), y unos pocos al género *Calothrix* (SU 16, SU 37 y SU 45). Los aislamientos que pertenecen al mismo género pueden diferenciarse entre sí, al observarlos micro y/o macroscópicamente, ya que exhiben combinaciones particulares de características morfológicas, como la forma de las células vegetativas, la forma, posición y distribución de los acinetes, si estos se encuentran presentes, y la forma, posición y distribución de los heterocistos. Sin embargo, algunos aislamientos, como SU 11 y SU 54, son muy similares entre sí considerando todas estas características.

A través de la caracterización morfológica, distintos autores han llegado a nivel de especie, midiendo el tamaño de las distintas células, vegetativas y especializadas, el tamaño de los tricomas, con la observación de ciclos de desarrollo para cada cultivo, etc. Los parámetros morfológicos pueden cambiar a través del tiempo en un medio de cultivo o pueden cambiar según el medio de cultivo utilizado (Berrendero *et al.*, 2008) lo que dificulta la identificación a nivel de especie. Las cianobacterias presentan una gran capacidad de aclimatación que las ayuda a sobrevivir en respuesta a su hábitat o a las condiciones de laboratorio, a través de mínimos o importantes cambios morfológicos, lo que puede ser una razón de su gran diversidad morfológica (Mishra *et al.*, 2013) incluso dentro de una misma especie. En algunas ocasiones, esto ha llevado a errores en la clasificación taxonómica de estos microorganismos (Mishra *et al.*, 2013). Por otro lado, en diferentes estudios, la clasificación de cianobacterias aisladas se ha basado en aproximaciones bacteriológicas

(Whitton, 2002) como la que se encuentra en el *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*. Estas aproximaciones se refieren únicamente, a las cianobacterias que forman parte de colecciones que son clasificadas a nivel de género, evitando así los nombres específicos. En cambio, las descripciones tradicionales de comunidades naturales se han realizado en base a caracteres de las especies botánicas (Whitton, 2002).

Por otro lado, los aislamientos clasificados como *Nostoc* podrían pertenecer al género *Anabaena*, ya que el límite entre estos dos géneros es difuso. Según el *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology* (2000), *Nostoc* es aparentemente idéntico morfológicamente a *Anabaena*, excepto que posee tricomas vegetativos no móviles y los del género *Anabaena* sí (Holt *et al.*, 2000). En este caso, ninguno de los tricomas vegetativos estudiados presentaron movilidad, por esta razón fueron clasificados dentro del género *Nostoc*. Aunque en algunas ocasiones al cultivar cianobacterias se pierde movilidad. Otra característica que se puede tener en cuenta para diferenciar a estos dos géneros, es que los hormogonios pertenecientes al género *Nostoc* son diferentes morfológicamente a los tricomas "parentales", a diferencia de lo que sucede en *Anabaena*. Los hormogonios de *Nostoc* son más estrechos que los tricomas vegetativos, son móviles y presentan vesículas de gas, a diferencia de los tricomas que les dan origen (Holt *et al.*, 2000). Pero al haber observado cada cultivo, a los diez días de crecimiento, no se pudo determinar las características de los hormogonios de cada aislamiento. Otra característica del género *Nostoc* a considerar podría ser la formación de colonias gelatinosas grandes o pequeñas y de distintas formas (Holt *et al.*, 2000). Por estas razones se ha clasificado como *Nostoc* a los aislamientos SU 1, SU 5, SU 8, SU 10, SU 11, SU 40 y SU 54. Igualmente, las características evaluadas no permiten descartar totalmente que alguno de estos aislamientos pertenezca al género *Anabaena*.

Existe una confusión general en cuanto a las diferencias entre estos dos géneros. Por ejemplo, ciertas cepas que fueron clasificadas morfológicamente dentro del género *Anabaena*, como *Anabaena* PCC 7120, han presentado un alto grado de similitud de ADN-ADN con el género *Nostoc* y han sido transferidas a este último género (revisado en Prasanna *et al.*, 2006). A su vez, en un estudio realizado por Lyra y colaboradores (1997) al construir un dendograma basado en los patrones proteicos obtenidos a partir de una electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecilsulfato sódico (SDS-PAGE²²), no pudieron diferenciar los géneros *Nostoc* y *Anabaena*. Estos datos sugieren que *Nostoc* y *Anabaena* no se encuentran claramente separados a nivel de género y tendrían también un origen común (Mishra *et al.*, 2013). Teneva y colaboradores (2012) sin embargo, plantean que *Nostoc* y *Anabaena* serían géneros diferentes, debido al análisis filogenéticos del locus *cpcB-IGS-cpcA* del operon que codifica a la ficocianina.

Los resultados obtenidos en este estudio concuerdan con distintos estudios de caracterización morfológica de las cianobacterias presentes en arrozales. El estudio realizado por Nayak & Prasanna (2007) concluye que uno de los géneros de cianobacterias predominantes en cultivos de arroz en India es *Nostoc*, además de los géneros *Anabaena* y *Phormidium*, siendo este último un género de cianobacterias sin heterocisto, perteneciente al orden Oscillatoriales. Esto indicaría que estos géneros son competitivos en este hábitat, ya sea en forma epifita o flotando. *Nostoc* es conocido por ser uno de los géneros de cianobacterias diazótrofes más versátil, que se

²² Sigla en inglés para *sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis*.

encuentra en cualquier tipo de ambiente, en forma libre o en simbiosis. Los miembros de este género son capaces de presentar una variedad de modos de captación y utilización del C y del N, lo que les permite adaptarse a diferentes nichos ecológicos (Prasanna & Nayak, 2007). Otros géneros encontrados por Prasanna & Nayak (2007) pero en menor proporción fueron *Calothrix*, *Oscillatoria*, *Hapalosiphon*, *Cylindrospermum*, *Aphanocapsa*, *Westiellopsis*, *Scytonema*, *Lyngbya* y *Aulosira*. A su vez, Ali & Sandhu (1972) y Tiwari & Singh (2005) caracterizaron morfológicamente a cianobacterias presentes en arrozales de Pakistán e India, respectivamente, las cuales pertenecían a los géneros *Anabaena*, *Nostoc*, *Aulosira*, *Cylindrospermum*, *Gloetrichia*, *Rivularia* y *Tolypothrix*, dentro del orden Nostocales, y a otros géneros pertenecientes a ordenes como Oscillatoriales, Stigonematales y Chroococcales. También Pereira y colaboradores (2005) hallaron algunos de estos géneros en los arrozales chilenos como *Nostoc*, *Anabaena*, *Cylindrospermum* y *Gloetrichia*. Los géneros *Nostoc* y *Calothrix* al que pertenecerían los aislamientos estudiados según esta caracterización morfológica, coinciden con los encontrados en otros arrozales del mundo mediante esta metodología.

En Uruguay, Irisarri y colaboradores (2001) caracterizaron morfológicamente a las cianobacterias encontradas en los arrozales de la Estación Experimental Paso de la Laguna, INIA Treinta y Tres. Los géneros dominantes fueron *Anabaena* y *Nostoc* y en menor proporción estaban presentes *Calothrix*, *Cylindrospermum*, *Nodularia*, *Scytonema* y *Tolypotrix*. También se hallaron abundantes cianobacterias que no formaban heterocisto pertenecientes a los órdenes Chroococcales y Oscillatoriales. A su vez se encontraron colonias epifitas macroscópicas de *Gloetrichia* sp. Estos resultados coinciden con los encontrados en otros países y en este trabajo.

5.3. Caracterización Bioquímica

5.3.1. Determinación de Pigmentos

Se observó que los pigmentos que se encuentran en mayor cantidad en los diez aislamientos son las ficobiliproteínas, dependiendo de cada aislamiento cuál de las tres ficobiliproteínas estudiadas se encuentra en mayor proporción. Estas cromoproteínas pueden representar hasta un 50% de la masa proteica de la célula en las cianobacterias según DeRuyter & Fromme (2008).

El color que tendría cada cianobacteria dependerá de las proporciones de las cuatro ficobiliproteínas que presente (Fay, 1992). Por ejemplo, el color rojo se debe a un mayor contenido de pigmento ficoeritrina y el color verde-azulado al pigmento ficocianina (Stomp *et al.*, 2004). En este caso, los aislamientos SU 1, SU 5, SU 8, SU 10 y SU 16, presentan una mayor cantidad de ficocianina comparado con los demás pigmentos, lo que concuerda con su color verde-azulado. Los aislamientos SU 37 y SU 40 presentan una mayor cantidad de ficoeritrina, lo que al combinarse con los demás pigmentos, les otorga el color marrón que presentan. Otros aislamientos que también son marrones presentan distintas cantidades de las diferentes ficobiliproteínas, ya que las diferentes combinaciones de pigmentos pueden llevar al desarrollo de diferentes colores. Además el mucílago puede ser pigmentado y en ocasiones puede opacar los pigmentos celulares. Por estas razones el color de un aislamiento no presenta mucho valor taxonómico, al haber distintas combinaciones de pigmentos dentro de una misma especie (Prasanna *et al.*, 2006). Por ejemplo, dos *Synechococcus* (cianobacteria unicelular) que genéticamente son muy similares, con menos de 1% de divergencia en

sus secuencias ITS-1²³, eran muy diferentes en cuanto a su color (Stomp *et al.*, 2004). Igualmente, esta característica se puede utilizar como un primer distintivo entre diferentes cianobacterias crecidas en las mismas condiciones (Prasanna *et al.*, 2006).

Según el *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology* (2000), los diferentes géneros de cianobacterias presentan determinado contenido de ficobiliproteínas, por ejemplo el género *Nostoc* contiene ficocianina y ficoeritrina o ficoeritrocianina, y los organismos pertenecientes al género *Calothrix* que presentan ficoeritrina, muestran adaptación cromática, o sino contienen ficocianina o ficoeritrocianina. Estos concuerda con los resultados obtenidos, ya que todos los aislamientos pertenecientes al género *Nostoc* (según la caracterización morfológica) contienen ficocianina y ficoeritrina, y todos los aislamientos clasificados morfológicamente como *Calothrix*, también presentan estos dos pigmentos. A su vez, la mayoría de los aislamientos estudiados presentan el pigmento aloficocianina, excepto SU 40 en el que no se detectó. El pigmento aloficocianina se encuentra en todas las especies de cianobacterias encontradas en la naturaleza (Lee, 1999), sin embargo con la metodología utilizada no pudo determinarse. La ficoeritrina no siempre es hallada en las cianobacterias (Bryant, 1982), pero en este caso se hallaba presente en los diez aislamientos.

Sinha y colaboradores (1997) observaron que el género aislado de arrozales indios con un mayor contenido de ficocianinas era *Anabaena*.

5.3.2. Tasa de Producción Fotosintética de O₂

Las cianobacterias son microorganismos que realizan fotosíntesis oxigénica, por lo que se midió la fotoevolución de O₂ en cada uno de los aislamientos. Las tasas de producción fotosintética de O₂ fueron similares en la mayoría de los diez aislamientos y aunque SU 45 es el que presenta un promedio mayor, no muestra diferencias significativas con los demás aislamientos, excepto con SU 11 y SU 40. Estos dos últimos fueron los que presentaron menores valores de tasa de producción fotosintética de O₂.

Al comparar estos datos obtenidos con las tasas de crecimiento calculadas a partir de la densidad óptica a 750 nm, el aislamiento SU 40 se encuentra dentro de los aislamientos con las tasas de crecimiento menores. Esto coincide con que menor es la tasa de producción fotosintética de O₂, menor producción de fotosintatos, por ende, una menor tasa de crecimiento. A su vez, este aislamiento fue el que presentó una menor concentración de carotenoides y no se le detectó aloficocianina, hechos que pueden estar influyendo en la fotosíntesis. Para el desarrollo de un inoculante para arroz y de acuerdo a estas características, este aislamiento no sería el más adecuado.

5.3.3. Actividades Enzimáticas

5.3.3.1. Actividad Nitrogenasa

En este trabajo se estudiaron las actividades enzimáticas de enzimas relacionadas con el metabolismo del N para cada aislamiento.

²³ La región ITS-1 es el espacio intergénico entre los genes que codifican el ARNr 16S y el ARNr 23S.

La actividad Nitrogenasa se midió en cuatro aislamientos seleccionados, SU 5, SU 8, SU 10 y SU 16. El aislamiento SU 10 fue el que presentó una mayor actividad y SU 8 la menor actividad. Ambos aislamientos habían sido caracterizados morfológicamente como *Nostoc*. Estos dos aislamientos pueden diferenciarse entre sí a través de la actividad Nitrogenasa. El aislamiento caracterizado como *Calothrix* (SU 16), presentó una actividad Nitrogenasa intermedia. Prasanna y colaboradores (2008) hallaron que los mayores valores de actividad Nitrogenasa pertenecían a los aislamientos de los géneros *Nostoc* y *Anabaena* aislados de la rizósfera de un arrozal de la India. Fiore y colaboradores (2005) hallaron que dos cepas del género *Nostoc*, aisladas de tierras inundables del Amazonas, Brasil (*N. piscinale* CENA21 y *N. muscorum* CENA61), presentaron valores extremadamente variables en cuanto a las actividades Nitrogenasa, ya que una de ellas presentaba la mayor actividad y la otra la menor actividad. Las diferencias entre las actividades Nitrogenasa de los distintos aislamientos, y entre un mismo género, puede deberse a la frecuencia de heterocistos que presente cada uno (Mishra *et al.*, 2013). La frecuencia de estas células especializadas varía dependiendo de la especie de cianobacteria y de las condiciones ambientales (Wolk *et al.*, 1994). A su vez, el complejo enzimático Nitrogenasa requiere para su síntesis y ensamblaje de unos 20 productos de expresión génica. Los diferentes arreglos de los *clusters* génicos y el diferente número de copias de algunos de estos genes en las distintas cianobacterias diazotrófas podría afectar la eficiencia en la fijación biológica (Fiore *et al.*, 2005).

El aislamiento SU 10 presentó una mayor actividad Nitrogenasa respecto a SU 8, por lo que sería un candidato para la elaboración de un inoculante para el cultivo de arroz.

5.3.3.2. Actividad Nitrato Reductasa

Los diez aislamientos de cianobacterias con heterocisto estudiados muestran valores muy bajos de actividad Nitrato Reductasa con respecto a valores obtenidos por Mishra y colaboradores (2013). Esto puede deberse al poco tiempo en que los aislamientos fueron incubados en el medio de cultivo BG₁₁₀ con KNO₃ 20 mM. Mishra y colaboradores (2013), encontraron que enseguida de haber inoculado con cianobacterias con heterocisto el medio BG₁₁₀ con nitrato 5 mM no se detectó actividad Nitrato Reductasa hasta por lo menos ocho días de incubación.

Entre los diez aislamientos, SU 37 fue el que presentó la menor actividad promedio y diferencias significativas con respecto a SU 40, el aislamiento de mayor actividad promedio. Igualmente la mayoría de los aislamientos no presentaron diferencias significativas entre sí, por lo que en este caso esta característica no se podría utilizar para diferenciar géneros distintos ni para diferenciar aislamientos dentro de un mismo género.

5.3.3.3. Actividad Glutamina Sintetasa

La mayoría de los aislamientos presentaron altas actividades enzimáticas sin diferencias significativas entre ellos al compararlas con estudios como el de Mishra y colaboradores (2013). Este carácter no tuvo valor taxonómico en este trabajo, no permite diferenciar entre géneros, pero si permitiría diferenciar distintos aislamientos dentro de un mismo género.

Las altas actividades Glutamina Sintetasa obtenidas pueden deberse a que en las cianobacterias, el ciclo GS/GOGAT es una de las principales vías de asimilación del amonio bajo condiciones de fijación biológica del nitrógeno (Riccardi *et al.*, 1989). A su vez, las cianobacterias se

cultivaron en medio sin nitrógeno por lo que no se produjo aumento del amonio intracelular que reprimiría su actividad (Mishra *et al.*, 2013). El aislamiento que presentó una mayor actividad Glutamina Sintetasa promedio, SU 10, fue el que presentó una mayor actividad Nitrogenasa promedio de los cuatro aislamientos evaluados y por ende mayor amonio fijado a partir del N₂ para asimilar en esqueletos carbonados. La asimilación de N₂, que es llevada a cabo en los heterocistos, se acopla a la síntesis de glutamina. En cianobacterias filamentosas con heterocisto la Glutamina Sintetasa además de encontrarse en las células vegetativas, también se halla en los heterocistos, a diferencia de la enzima Glutamato Sintasa, que solo se encuentra presente en las células vegetativas. De hecho, se ha hallado que *Anabaena cylindrica* muestra altos valores de actividad Glutamina Sintetasa, y que estos valores son aún mayores en los heterocistos que en las células vegetativas (Riccardi *et al.*, 1989). Por esto las cianobacterias con heterocisto presentan altos valores de actividades Glutamina Sintetasa, como sucedió en este caso.

En este caso el aislamiento que presentó una mayor actividad Glutamina Sintetasa, se encuentra dentro de los aislamientos que presentaron valores más altos de tasa de producción fotosintética de O₂, ya que la Glutamina Sintetasa además de encontrarse regulada por la presencia de nitrógeno ambiental también se encuentra regulada por la asimilación del carbono inorgánico. Si existe una limitación en cuanto al carbono inorgánico, la asimilación del nitrógeno comienza a descender. El 2-oxoglutarato se utiliza como señal del balance C/N en la célula, ya que su síntesis depende de la fijación de CO₂ y su consumo del ciclo GS/GOGAT. La disponibilidad de 2-oxoglutarato es necesaria para la asimilación del amonio, ya que este es tóxico a altas concentraciones. A su vez, un exceso de 2-oxoglutarato, indica que la asimilación de N se encuentra por debajo de la fijación de CO₂ (Luque & Forchhammer, 2008).

Aunque las características bioquímicas estudiadas en este trabajo no presenten valor taxonómico, estas permitirían diferenciar algunos pocos aislamientos dentro de un mismo género, pero lo más importante, se las puede utilizar para evaluar que aislamiento podría considerarse para elaborar un posible inoculante. Un inoculante de cianobacterias ideal debería de presentar capacidad fotosintética, una Nitrogenasa no reprimible y con altas actividades Nitrogenasa y un rápido crecimiento junto con una gran cantidad de liberación de amonio debido a una Glutamina Sintetasa defectuosa (Rai & Prakasham, 1991).

Mishra y colaboradores (2013) en su estudio polifásico de doce cepas de cianobacterias con heterocisto, realizaron un análisis de los componentes principales para visualizar el efecto de los diferentes parámetros morfológicos y fisiológicos, ya que previamente Kim y colaboradores (2006), habían demostrado que las cianobacterias podían ser discriminadas taxonómicamente por sus huellas metabólicas. Estos autores hallaron que los parámetros morfológicos y fisiológicos demuestran una gran diversidad entre las diferentes cepas que estudiaron, pero que los parámetros morfológicos, como tipo de filamento y ramificación, y presencia o ausencia de acinetes, no pueden ser tomados como un criterio confiable para identificar a las cepas de cianobacterias. También encontraron que parámetros fisiológicos, como contenido de pigmentos y actividades enzimáticas, en especial Glutamina Sintetasa y Nitrato Reductasa, son atributos específicos de cada cepa y se podrían utilizar para deducir relaciones filogenéticas. En este estudio se puede observar sin necesidad de realizar estos tipos de análisis, que las características fisiológicas y bioquímicas de los diferentes aislamientos no discriminaron entre los mismos.

5.4. Caracterización Molecular

5.4.1. Gen ARNr 16S

Al comparar con la base de datos las secuencias obtenidas a partir de la secuenciación de los genes ARNr 16S de cada aislamiento, se encontró que seis de los diez aislamientos en estudio tenían más del 97% de homología con secuencias depositadas correspondientes al género *Nostoc* y una con *Calothrix*. Existe una abundante evidencia documentada que prueba que si dos cepas comparten menos del 97% de similitud en su gen ARNr 16S no son miembros de la misma especie. Algunos autores como por ejemplo, Stackebrandt & Ebers (2006), sugieren que la similitud entre secuencias debería ser de un 98.7 a 99% para que sean de la misma especie. Por otro lado, a nivel de género la similitud de secuencia para este gen entre dos cepas debería de ser de un 95% (revisado por Berrendero *et al.*, 2011). En este estudio, la mayoría de los aislamientos presentaron un valor mayor a 97% de similitud con las secuencias del gen ARNr 16S de las bases de datos con las que fueron identificadas, excepto en el caso de SU 5 y SU 37. Incluso en los casos de los aislamientos SU 10 y SU 40, se podrían clasificar a nivel de especie, a través de la secuencia del gen ARNr 16S, como *Nostoc piscinale* y *calicicola* respectivamente, ya que estos presentan un valor mayor a 98.7% de similitud de secuencia.

Se podría, decir que en la mayoría de los casos, la caracterización molecular con el gen ARNr 16S no fue suficiente para distinguir las diferentes especies dentro de un mismo género, excepto en el caso de los aislamientos SU 10 y SU 40. En el caso de las secuencias presentes en las bases de datos, algunas tampoco se clasifican dentro de una especie, ya que se denominan como *Nostoc* sp., *Calothrix* sp., etc. lo que refiere a que pertenecen a ese género pero no se les ha podido asignar una especie, como en la mayoría de los aislamientos estudiados en este caso. Lu y colaboradores (1997) plantean que los fragmentos de restricción de longitud polimórfica (RFLP)²⁴ del gen ITS-1 podría ser más apropiado para caracterizar a nivel de especie. La región ITS-1 es extremadamente diversa genéticamente y puede no estar correlacionada con la diversidad del gen ARNr 16S (Lu *et al.*, 1997). Por lo que, a futuro, se podría continuar con la caracterización a través de este gen.

Estos resultados concuerdan con lo que puede inferirse a partir del árbol filogenético. Cada aislamiento es agrupado en un mismo *cluster* con el mismo género con el que se había identificado previamente al realizar la comparación con la base de datos. La mayoría de los aislamientos se encuentran dentro de un *cluster* mayor (A) excepto por SU 37 y SU 45. Mishra y colaboradores (2013) también hallaron que las especies pertenecientes al género *Calothrix* se agrupaban en un *cluster* separado de las demás cepas de cianobacterias en estudio. A su vez, es razonable que SU 37 se excluya de este *cluster* mayor y de cualquier otro *cluster*, ya que no fue afiliado a ningún género reportado hasta el momento al compararlo con las bases de datos consultadas. Sin embargo en el árbol filogenético presenta cierta proximidad a *Calothrix desertica*, por lo que podría formar parte del género *Calothrix*, como se planteó al realizar la caracterización morfológica. El aislamiento SU 45 conformó un sub *cluster* con otra secuencia obtenida de la base de datos (*Calothrix* sp.), presentando un valor de *bootstrap* de 100, solventando ampliamente los resultados obtenidos con la comparación con la base de datos. En este caso las cepas de *Calothrix* sp. y *Calothrix desertica* obtenidas del NCBI se ubicaron en dos *clusters* diferentes. Otros estudios también han demostrado,

²⁴ Sigla en inglés para *Restriction Fragment Length Polymorphism*.

mediante hibridación de ADN-ADN y secuencias del gen ARNr 16S, que existe una gran diversidad genética dentro de este género (Lyra *et al.*, 2001).

El *cluster* A agrupa a todos los aislamientos clasificados dentro del género *Nostoc* y al aislamiento SU 16. Este aislamiento se agrupa con una secuencia de *Tolypothrix* sp. obtenida de la base datos con un valor de *bootstrap* de 94. Esto no era de esperarse, ya que *Tolypothrix* pertenece a la misma familia Rivulariaceae, a la cual pertenece *Calothrix*, según el código bacteriológico (Berrendero *et al.*, 2011). Pero este agrupamiento de *Tolypothrix* con cepas del género *Nostoc*, ocurrió con un valor de *bootstrap* demasiado bajo (6), y como plantean Lyra y colaboradores (2001), en general, los valores de *bootstrap* menores a 50, sustentan la incertidumbre de este agrupamiento. Berrendero y colaboradores (2011) también hallaron que las cianobacterias del género *Calothrix* formaban un *cluster* separado de aquellas que formaban parte del género *Tolypothrix*, por lo que serían distantes genéticamente aún siendo morfológicamente similares.

Por otro lado, dentro de este *cluster* A, aislamientos como SU 11 y SU 54, y SU 5 y SU 10, se agrupan entre ellos con valores *bootstrap* de 74 y 92, respectivamente. Esto indica que podrían ser cepas relacionadas filogenéticamente. Los primeros dos aislamientos, por ejemplo, se agrupan junto con *Nostoc* sp., con un valor de *bootstrap* de 100 y los otros dos, con *Nostoc piscinale*, con un valor de *bootstrap* de 95. Pero SU 5, presentó un 88% de similitud de secuencia con *Nostoc piscinale*, sugiriendo que probablemente se hayan agrupado juntas porque no había otra secuencia cercanamente similar disponible (Berrendero *et al.*, 2011). Por lo que, se debería realizar una caracterización molecular más extensiva utilizando otros marcadores moleculares u otras técnicas, como RFLP. Por último, cabe destacar, que dos secuencias obtenidas de la base de datos, *Nostoc* sp. y *Anabaena* sp., formaron un sub *cluster* dentro de este *cluster* A, con un valor de *bootstrap* de 100. Lo que demuestra la similitud genética que existe entre estos dos géneros, y cuán difícil es clasificar cianobacterias que creemos se encuentran dentro de un género o el otro.

Todos estos resultados obtenidos a partir del árbol filogenético, confirman el origen polifilético del orden Nostocales (Mishra *et al.*, 2013), como la heterogeneidad entre las cepas de *Calothrix* (Berrendero *et al.*, 2011) y entre cepas de *Nostoc*, la cual se puede demostrar con la hibridación ADN-ADN (Mishra *et al.*, 2013). Un estudio realizado por Hongmei y colaboradores (2005) ha mostrado que un solo morfotipo de una cianobacteria termófila presente en una mata bacteriana perteneciente al género *Calothrix* contenía cinco genotipos de ARNr 16S diferentes. Otros autores han sugerido que ciertas cepas de *Calothrix* pertenecían a géneros diferentes (revisado por Berrendero *et al.*, 2011), por lo que todavía queda mucho por investigar sobre la taxonomía de este género.

La mayoría de los géneros asignados a los aislamientos mediante la comparación de la secuencia del gen ARNr 16S con las bases de datos coincidió con la caracterización morfológica realizada previamente, excepto los aislamientos SU 16 y SU 37. El primero fue clasificado morfológicamente como *Calothrix* pero su secuencia coincidió con una secuencia publicada del NCBI perteneciente al género *Tolypothrix*, aunque coincidió con el mismo porcentaje de similitud (99%) con una secuencia no publicada perteneciente al género *Calothrix*. En el segundo caso, este también se clasificó morfológicamente como *Calothrix* pero al compararlo con las diferentes secuencias de las bases de datos coincidió con una cianobacteria no cultivable, la cual no había sido identificada

taxonómicamente. En estos casos la utilización de otros marcadores moleculares como *hetR* para poder identificar a estos aislamientos resultó útil.

Las cianobacterias pertenecientes al género *Calothrix*, presentan filamentos rectos con terminación cónica, heteropolares, sin ramificaciones o con ramificaciones falsas ocasionales, rodeados por un mucílago firme. En cambio, las cianobacterias que pertenecen al género *Tolypothrix* están rodeadas por un mucílago delgado el cual en algunas ocasiones no presenta color, presentan ramificaciones falsas asociados con uno o dos heterocistos y los filamentos no presentan una terminación cónica tan notoria (Berrendero *et al.*, 2011). En este caso, el aislamiento SU 16 presentó la mayoría de las características morfológicas correspondientes al género *Calothrix* con un filamento recto y pronunciada terminación cónica, heteropolar, sin ramificaciones falsas y con mucílago notorio. Las cianobacterias *Calothrix* cambian sus caracteres morfológicos de acuerdo al medio en el que se encuentran (Berrendero *et al.*, 2011) lo que pudo haber llevado a una errónea clasificación en base a su morfología y su secuencia del gen ARNr 16S haber sido depositada como perteneciente al género *Tolypothrix*. Sihvonen y colaboradores (2007) hallaron dos cepas con una terminación cónica atenuada que morfológicamente corresponderían al género *Tolypothrix*, pero al realizar el análisis filogenético del gen ARNr 16S, una fue identificada como *Tolypothrix* y otra como *Calothrix*.

Existen pocos estudios que versen sobre el análisis filogenético del gen ARNr 16S de cianobacterias de arrozales. Song y colaboradores (2005) realizaron este tipo de análisis en un arrozal de China y encontraron que las únicas cianobacterias con heterocisto presentes eran *Nostoc* y *Scytonema*. Cianobacterias dentro del género *Nostoc* fueron encontradas en gran abundancia y durante todo el ciclo del cultivo. También encontraron otras cianobacterias filamentosas pero sin heterocisto, como *Microcoleas*, *Phormidium*, *Leptolyngbya*, *Spirulina* y *Chamaesiphon*, y cianobacterias unicelulares como *Synechococcus*, *Cyanothece*, *Chroococcidiopsis* y *Synechocystis*. En ese trabajo se encontró una menor frecuencia de géneros de cianobacterias con heterocisto respecto al resto. En otro estudio realizado con este mismo análisis del gen ARNr 16S por Srivastava y colaboradores (2009) en arrozales de la India con diferentes niveles de salinidad, se encontró que los géneros más abundantes eran *Nostoc* y *Anabaena*. También se encontraron otros géneros de cianobacterias con heterocisto, como *Tolypothrix*, *Cylindrospermum*, *Rivularia*, *Aulosira*, *Gloeotrichia*, *Fischerella* y *Hapalosiphon*, otros géneros de cianobacterias filamentosas sin heterocisto, como *Lyngbya*, *Oscillatoria* y *Phormidium*, y otros géneros de cianobacterias unicelulares, como *Aphanothece* y *Gloeothece*. Los resultados obtenidos en este trabajo coinciden con los anteriormente citados en que la mayoría de los aislamientos pertenecen al género *Nostoc*, el cual predomina en arrozales. Con este análisis no se había identificado ninguna cianobacteria perteneciente a *Calothrix* en los estudios anteriores. Cabe destacar que estos estudios fueron realizados en países asiáticos, tropicales y este trabajo es el primer estudio de este tipo que se realiza en la región.

5.4.2. Gen *hetR*

Al comparar con la base de datos las secuencias obtenidas a partir de la secuenciación de los genes *hetR* de cada aislamiento, los aislamientos SU 40, SU 54 y SU 45 concordaron con los resultados obtenidos, a nivel de género, al realizar la caracterización molecular y el análisis filogenético del gen ARNr 16S.

Con el análisis del gen *hetR*, se logró dilucidar a que género pertenecería SU 37, ya que anteriormente la secuencia del gen ARNr 16S de este aislamiento había coincidido con una cianobacteria no cultivable aun no identificada. Según el análisis de este nuevo gen, el aislamiento

SU 37 pertenecería al género *Calothrix*, ya que su porcentaje de similitud para su secuencia del gen *hetR* con la secuencia de la base de datos sería de un 95%, valor aceptado para que dos cepas de cianobacterias correspondan al mismo género (revisado por Berrendero *et al.*, 2011). Este resultado concuerda con lo planteado en la caracterización morfológica, aunque no pudo atribuírsele una especie determinada.

Al comparar la secuencia obtenida para el gen *hetR* del aislamiento SU 16 con las secuencias presentes en la base de datos, presentó un porcentaje de similitud del 92% con *Calothrix desertica* y *Calothrix sp.*, lo que concuerda con su caracterización morfológica. A su vez, este aislamiento se agrupó con *Calothrix sp.* y *Calothrix desertica* en el árbol filogenético con un valor muy alto de *bootstrap*, 99 y se encuentra separado de la cepa de *Tolypothrix sp.*, por lo que a través de este gen se podría confirmar que este aislamiento pertenecería al género *Calothrix*.

En el caso del aislamiento SU 11, este fue identificado como *Nostoc sp.*, con un porcentaje de similitud de secuencia de 99%, en el caso del gen ARNr 16S, pero al analizar el gen *hetR* concordó con dos especies diferentes, con el mismo porcentaje de similitud de secuencia, *Anabaena variabilis* y *Fischerella muscicola*. Se descarta que este aislamiento pueda pertenecer al género *Fischerella*, ya que este género forma parte del orden Stigonematales (Holt *et al.*, 2000), y este aislamiento presenta inconfundibles características del orden Nostocales, como no presentar ramificaciones, ni falsas ni verdaderas. Igualmente, tampoco se agrupa con ninguna de las secuencias de *Anabaena* del gen *hetR* obtenidas de la base de datos, ni con las de *Fischerella*. Seguramente, debido a que la base de datos para secuencias del gen *hetR* es menor en comparación con la base de datos del ARNr 16S (Ludwing & Klenk, 2001), se haya alineado con la secuencia que halló más cercana. La secuenciación del ARNr 16S es un procedimiento de rutina, resultando en una larga y creciente base de datos, lo que mejora la robustez de las reconstrucciones filogenéticas y los resultados de identificación taxonómica. No es el caso del gen *hetR*, ya que este solo pertenece a cierto grupo de cianobacterias por lo que es estudiado por menos investigadores. Cabe destacar que SU 11 no se agrupó con SU 54 como sucedió en el árbol filogenético del gen ARNr 16S, lo que indica que estos dos aislamientos serían dos cepas diferentes. Una situación similar ocurre con los aislamientos SU 1, SU 5, SU 8 y SU 10 que fueron identificados como *Nodularia spumigena* al realizar la comparación de sus secuencias del gen *hetR* con las demás secuencias de la base de datos. En el caso del gen ARNr 16S todas fueron identificadas dentro del género *Nostoc*. Estos aislamientos formaron un sub *cluster* con distintas secuencias del género *Nodularia* obtenidas de la base de datos, con un valor de *bootstrap* menor a 50, lo que indica la incertidumbre de este agrupamiento. Este resultado junto con el hecho de que los porcentajes de similitud de secuencia son muy bajos nos dan una pauta de que seguramente estos aislamientos no pertenezcan al género *Nodularia*. Mediante la caracterización morfológica se clasificó a todos estos aislamientos dentro del género *Nostoc*. Estos hechos se explicarían, nuevamente, ya que se encuentran pocas secuencias del gen *hetR* en la base de datos, y que por ende estos aislamientos se alinearon con la secuencia más similar que hallaron o por la transferencia horizontal de genes. Barker y colaboradores (2000) hallaron que existe transferencia horizontal de genes en diferentes cepas de *Nodularia* a nivel ambiental y no solo a nivel de laboratorio. Esta transferencia horizontal de genes puede darse mediante conjugación entre cepas del mismo género o entre cepas de diferentes géneros de cianobacterias, o puede darse a través de la transducción ya que existen cianofagos en altas concentraciones en ambientes acuáticos. El gen ARNr 16S no sufre de transferencia horizontal de genes debido a que es más conservado, en función y estructura, que

los genes que codifican para proteínas (revisado por Barker *et al.*, 2000), como es el caso del gen *hetR*.

Hay resultados de distinto tipo respecto al análisis de distintos genes para identificar cianobacterias. Mientras Janson y colaboradores (1999a) encontraron correlación entre los datos aportados por el ARNr 16S y el *hetR* en la cianobacteria marina *Trichodesmium*, Rudi y colaboradores (1998) encontraron el tipo de incongruencia hallada en este trabajo, pero con los genes ARNr 16S y *rbcl* (revisado por Barker *et al.*, 2000). También Han y colaboradores (2009) encontraron que el árbol filogenético que realizaron a partir del gen *hetR* era incongruente con el realizado con las secuencias del gen ARNr 16S para distintas cepas del género *Nostoc*. El análisis del gen ARNr 16S en algunos casos puede presentar incongruencias con los demás genes codificadores de proteínas.

En este caso los aislamientos que se agruparon entre sí en el árbol filogenético fueron SU 45 y SU 37, con un valor de *bootstrap* de 58, lo que indicaría que podrían estar relacionados filogenéticamente. Y los aislamientos SU 1, SU 5 y SU 10 se agruparon con un valor de *bootstrap* de 99 y a su vez estos se agruparon junto con el aislamiento SU 8, presentando también un valor alto de *bootstrap* (92). Esto concuerda con lo obtenido en el árbol filogenético realizado a partir del gen ARNr 16S, en el cual SU 5 y SU 10 se agrupaban en un mismo sub *cluster*. Lo que indica que podrían estar relacionados filogenéticamente entre sí, pero no ser la misma cepa, ya que los resultados obtenidos a partir de las comparaciones de los genes ARNr 16S con las bases de datos de cada aislamiento, resultaron diferentes.

Cabe destacar que no se ha encontrado información previa a este trabajo donde se haya realizado algún análisis filogenético del gen *hetR* en cianobacterias con heterocisto presentes en arrozales. Debido a que algunos resultados no son concluyentes en términos de identificación de especies, se debería continuar con la caracterización de estos aislamientos mediante otros marcadores moleculares, como ITS-1 u otras técnicas, como RFLP, ARDRA²⁵, etc.

²⁵ Sigla en inglés para *Amplified rDNA Restriction Analysis*.

CONCLUSIONES

6. CONCLUSIONES

6.1. Conclusiones

El abordaje polifásico realizado en este trabajo permitió identificar a los aislamientos SU 1, SU 5, SU 8, SU 10, SU 11, SU 40 y SU 54 dentro del género *Nostoc*, y a SU 16, SU 37 y SU 45 dentro del género *Calothrix*. Únicamente dos aislamientos pudieron caracterizarse dentro de una especie, SU 10 fue caracterizado como *Nostoc piscinale* y SU 40 como *Nostoc calcicola*. Los parámetros bioquímicos y fisiológicos determinados en este trabajo no aportaron a la identificación de los aislamientos, si lo hicieron el análisis morfológico y el genético. Igualmente los datos bioquímicos y fisiológicos pueden ser útiles al evaluar a un aislamiento como herramienta biotecnológica.

A su vez, se concluyó que los diez aislamientos estudiados pertenecían a diferentes cepas, gracias a la caracterización molecular y el análisis filogenético que permitieron diferenciar aislamientos muy similares entre sí. Los parámetros bioquímicos y fisiológicos permitieron diferenciar a aislamientos del mismo género en contadas ocasiones. Por lo que, se reafirma el hecho de utilizar diferentes parámetros, morfológicos, bioquímicos, fisiológicos y genéticos, para caracterizar a este tipo de microorganismos.

BIBLIOGRAFÍA

Bibliografía

Asociación Cultivadores de Arroz (ACA), 2013. www.aca.com.uy. Consultado el 31 de Agosto de 2013.

Ali, S. & Sandhu, G. R. (1972) Blue-green algae of the saline soils of the Punjab. *Oikos*. 23: 268-272.

Anagnostidis, K. & Komárek, J. (1985) Modern approach to the classification system of Cyanophytes 1- Introduction. *Arch Hydrobiol Suppl.* 71: 291-302.

Barker, G. L. A.; Handley, B. A.; Vacharapiyasophon, P.; Stevens, J. R. & Hayes, P. K. (2000) Allele-specific PCR shows that genetic exchange occurs among genetically diverse *Nodularia* (Cyanobacteria) filaments in the Baltic Sea. *Microbiol.* 146: 2865-2875.

Bennet, A. & Bogorad, L. (1973) Complementary chromatic adaptation in a filamentous blue-green algae. *J. Cell. Biol.* 58: 419-435.

Berrendero, E.; Perona, E. & Mateo, P. (2008) Genetic and morphological characterization of *Rivularia* and *Calothrix* (Nostocales, Cyanobacteria) from running water. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 58: 447-460.

Bonilla, S. & Aubriot, L. (2009) Biología, floraciones y distribución de las cianobacterias. En: *Cianobacterias Planctónicas del Uruguay*. Bonilla, S. (ed.). 2^{da} ed. Programa Hidrológico Internacional de la Unesco. Montevideo, Uruguay. Pp: 1-4.

Bryant, D. A. (1982) Phycoeritrocyanin and phycoerythrin: properties and occurrence in cyanobacteria. *J. Gen. Microbiol.* 128: 835-844.

Cabello, P., Roldan, M.D., Castillo, F. & Moreno-Vivian, C. (2012) The Nitrogen cycle. En: *Topics in Ecological and Environmental Microbiology*. Schmidt, T.M. & Schaechter, M. (ed.) Elsevier. San Diego, California, USA.

Callejas, M. C. (2011) Caracterización ecofisiológica de matas microbianas dominadas por Cianobacterias en suelos de la isla Rey Jorge, Antártida Marítima. Tesis de Maestría. Facultad de Ciencias, UdelaR. Montevideo, Uruguay.

Castenholz, R. W. (2001a) Oxygenic photosynthetic bacteria. En: *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. Boone, D. R. & Castenholz, R. W. (eds). 2^{da} ed. Springer-Verlag. New York, USA. Pp: 474.

Castenholz, R. W. (2001b) General characteristics of the cyanobacteria. En: *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. Boone, D. R. & Castenholz, R. W. (eds). 2^{da} ed. Springer-Verlag. New York, U.S.A. Pp: 474-487.

Castenholz, R. W. (1984) SUBSECTION III. Order OSCILLATORIALES. SUBSECTION IV. Order NOSTOCALES. En: *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. Holt-Baltimore, J. G. (ed.) Williams y Wilkins.

Chromas Lite versión 2.1 (2012) Technelysium Pty Ltd, South Brisbane, Queensland, Australia.

- De, P. K. (1939) The role of blue green algae in nitrogen fixation in rice fields. Proc. Res. Soc. Lon. 127: 121-139.
- De Figuereido, D. R.; Goncalves, A. M. M.; Castro, B. B.; Goncalves, F.; Pereira, M. J. & Correia, A. (2011) Differential inter- and intra-specific responses of *Aphanizomenon* strains to nutrient limitation and algal growth inhibition. J. Plankton Res. 33: 1606-1616.
- DeRuyter, Y. S. & Fromme, P. (2008) Molecular structure of the photosynthetic apparatus. En: The Cyanobacteria. Molecular Biology, Genomics and Evolution. Herrero, A. & Flores, E. (ed.) Caister Academic Press. Norfolk, UK. Pp: 217-269.
- Di Rienzo, J. A.; Casanoves, F.; Balzarini, M. G.; González, L.; Tablada, M. & Robledo, C. W. (2012) InfoStat versión 2012. Grupo InfoStat, FCA, Universidad Nacional de Córdoba, Argentina. URL <http://www.infostat.com.ar>
- Dobrogosz, W. J. (1981) Enzymatic activity. En: Manual of Methods for General Bacteriology. Gerhardt, P.; Murray, R. G. E.; Costilow, R. N.; Nester, E. W.; Wood, W. A.; Krieg, N. R. & Phillips, G. B. (eds.). American Society for Microbiology, Washington D. C. Pp: 365-392.
- Eckardt, N. A. (2006) In Brief. Energy dissipation: new role for a carotenoid protein in cyanobacteria. Plant Cell. 18: 785.
- Fay, P. (1992) Oxygen relations of nitrogen fixation in cyanobacteria. Microbiol. Rev. 56: 340-373.
- Fiore, M. de F.; Neilan, B. A.; Copp, J. N.; Rodrigues, J. L. M.; Tsai, S. M.; Lee, H. & Trevors, J. T. (2005) Characterization of nitrogen-fixing cyanobacteria in the Brazilian Amazon floodplain. Water Res. 39: 5017-5026.
- Flores, E. & Herrero, A. (2005) Nitrogen assimilation and nitrogen control in cyanobacteria. Bioch. Soc. Trans. Microbiol. Lett. 221: 155-159.
- Flores, E. & Herrero, A. (1994) Assimilatory nitrogen metabolism and its regulation. En: The molecular biology of cyanobacteria. Bryant, D. A. (ed.) Kluwer Academic Publishers. Dordrecht, NL. Pp: 488-517.
- Foster, R. A. & Zehr, J. P. (2006) Characterization of diatom-cyanobacteria symbioses on the basis of *nifH*, *hetR* and 16S rRNA sequences. Env. Microbiol. 8: 1913-1925.
- Giddings, T. H.; Withers, N. W. & Staehelin, L. A. (1980) Supramolecular structure of stacked and unstacked regions of the photosynthetic membranes of *Prochloron* sp., a prokaryote. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 77: 352-356.
- Grossman, A. R.; Bhaya, D. & He, Q. (2001) Tracking the light environment by cyanobacteria and the dynamic nature of light harvesting. J. Biol. Chem. 276: 11449-11452.
- Häder, D. P.; Kumar, H. D.; Smith, R. C. & Worrest, R. C. (2007) Effects on solar UV radiation on aquatic ecosystems and interactions with climate change. Photochem. Photobiol. Sci. 10: 267-285.
- Han, D.; Fan, Y. & Hu, Z. (2009) An evaluation of four phylogenetic markers in *Nostoc*: implications for cyanobacterial phylogenetic studies at the intrageneric level. Curr. Microbiol. 58: 170-176.

- Hendrayanti, D.; Kusmadji, L. R.; Yuliana, P.; Amanina, M. A. & Septiani, A. (2012) Phylogeny of Indonesian *Nostoc* (cyanobacteria) isolated from paddy fields as inferred from partial sequence of 16S rRNA gene. *Mak. J. Sci.* 16: 203-208.
- Herrero, A.; Flores, E. & Guerrero, M. G. (1981) Regulation of nitrate reductase levels in the cyanobacteria *Anacystis nidulans*, *Anabaena* sp. Strain 7119, and *Nostoc* sp. Strain 6719. *J. Bacteriol.* 145: 175-180.
- Herrero, A.; Muro-Pastor, A. M. & Flores, E. (2001) Nitrogen control in cyanobacteria. *J. Bacteriol.* 183: 411-425.
- Herrero, A., Muro-Pastor, A. M., Valladares, A. & Flores, E. (2004) Cellular differentiation and the NtcA transcription factor in filamentous cyanobacteria. *FEMS Microbiol. Rev.* 28: 469-487.
- Hoffmann, L.; Komárek, J. & Kaštovský, J. (2005) System of cyanoprokaryotes (cyanobacteria) -state 2004. *Algol Stud.* 117: 95-115.
- Hoiczuk, E. & Hansel, A. (2000) Cyanobacterial cell walls: news from an unusual prokaryotic envelope. *J. Bacteriol.* 182: 1191-1199.
- Holt, J. G.; Krieg, N. R.; Sneath, P. H. H.; Staley, J. T.; Williams, S. T. (2000) *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*. 9^{na} ed. Hensyl, W. R. (ed.) Lippincott Williams y Wilkins. A Wolters Kluwer Company. Philadelphia, USA. Pp: 377-425.
- Irisarri, P.; Gonnet, S.; Deambrosi, E. & Monza, J. (2006) Cyanobacterial inoculation and nitrogen fertilization in rice. *World J. Microbiol. Biotechnol.* DOI 10.1007/s11274-006-9219-0
- Irisarri, P., Gonnet, S., Deambrosi, E. & Monza, J. (1999) Diversidad de cianobacterias con heterocistos en suelos con arroz. *Agrociencia*. 1: 31-37.
- Irisarri, P.; Gonnet, S. & Monza, J. (2001) Cyanobacteria in Uruguayan rice fields: diversity, nitrogen fixing ability and tolerance to herbicides and combined nitrogen. *J. Biotechnol.* 91: 95-103.
- Janson, S.; Bergman, B.; Carpenter, E. J.; Giovannoni, S. J. & Vergin, K. (1999a) Genetic analysis of natural populations of the marine diazotrophic cyanobacterium *Trichodesmium*. *FEMS Microbiology, Ecology*. 30: 57-65.
- Jungblut, A. D.; Hawes, I.; Mountfort, D.; Hitzfeld, B. C.; Dietrich, D. R.; Bums, B. P. & Neilan, B. A. (2005) Diversity within cyanobacterial mat communities in variable salinity meltwater ponds of McMurdo Ice Shelf, Antarctica. *Environ. Microbiol.* 4: 519-529.
- Kannaiyan, S. (2002) Biofertilizers for sustainable crop production. En: *Biotechnology of Biofertilizers*. Kannaiyan, S. (ed.) Kluwer Academic Publishers and Narosa Publishing House. India. Pp: 9-39.
- Khan, Z.; Tahmida B. Z. N.; Mandal, R. & Hossain, M. (1994) Cyanobacteria in rice soil. *World J. Microbiol. Biotechnol.* 10: 296-298.

- Kim, J. D. & Lee, C. G. (2006) Diversity of heterocystous filamentous cyanobacteria (blue-green algae) from rice paddy fields and their differential susceptibility to ten fungicides used in Korea. *J. Microbiol. Biotechnol.* 16: 240-246.
- Komárek, J. & Anagnostidis, K. (1989) Modern approach to the classification system of Cyanophytes 4 *Nostocales*. *Algolog. Stud.* 56: 247-345.
- Kruk, C.; Vidal, L.; Aubriot, L.; Bonilla, S. & Brena, B. (2009) Parte II-Metodología y gestión. Cap. 5- Metodologías de análisis de cianobacterias. En: *Cianobacterias Planctónicas del Uruguay*. Bonilla, S. (ed.). 2^{da} ed. Programa Hidrológico Internacional de la Unesco. Montevideo, Uruguay. Pp: 19-26.
- Laurent, S.; Chen, H.; Bédu, S.; Ziarelli, F.; Peng, L. & Zhang, C. C. (2005) Nonmetabolizable analogue of 2-oxoglutarato elicits heterocyst differentiation under repressive conditions in *Anabaena* sp. PCC 7120. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 102: 9907-9912.
- Lee, R. E. (1999) *Phycology*. 3^{era} ed. Cambridge University Press. United Kingdom. Pp: 67-110.
- Liaaen-Jensen, S. (1978) Marine carotenoids. En: *Marine Natural Products*. Vol: 2. Pp: 1-73.
- Lowry, O. H.; Rosenbrough, N. J.; Fair, A. L. & Randall, R. J. (1951) Protein measurement with the Folin Phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 193: 265-274.
- Lu, W.; Evans, E. H.; McColl, S. K. & Saunders, V. A. (1997) Identification of cyanobacteria by polymorphisms of PCR-amplified ribosomal DNA spacer region. *FEMS Microbiol. Let.* 153:141-149.
- Ludwing, W. & Klenk, H. P. (2001) Overview: A phylogenetic backbone and taxonomic framework for prokaryotic systematics. En: *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. Boone, D. R. & Castenholz, R. W. (eds.) 2^{da} ed. Springer-Verlag. New York, USA. Pp: 49-65.
- Luque, I. & Forchhammer, K. (2008) Nitrogen assimilation and C/N balance sensing. En: *The Cyanobacteria. Molecular Biology, Genomics and Evolution*. Herrero, A. & Flores, E. (eds.) Caister Academic Press. Norfolk, UK. Pp: 335-382.
- Lyra, C.; Hantula, J.; Vanio, E.; Rapal, J.; Roushiainen, L. & Sivonen, K. (1997) Characterization of cyanobacteria by SDS-PAGE of whole cell proteins and PCR/RFLP of 16S rRNA gene. *Arch. Microbiol.* 168: 176-184.
- Lyra, C.; Suomalainen, S.; Gugger, M.; Vezie, C.; Sundman, P.; Paulin, L. & Sivonen, K. (2001) Molecular characterization of planktic cyanobacteria of *Anabaena*, *Aphanizomenon*, *Microcystis* and *Planktothrix* genera. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 51: 513-526.
- Madigan, M. T.; Parker, J. & Martinko, J. M. (1999) Diversidad procariotica: dominio Bacteria. En: *Brock Biología de los Microorganismos*. Prentice Hall Iberia. Capella. Madrid, España. Pp: 654-658.
- Mårtensson, L.; Díez, B.; Warttinen, I.; Zheng, W.; El-Shehawy, R. & Rasmussen, U. (2009) Diazotrophic diversity, *nifH* gene expression and nitrogenase activity in a rice paddy field in Fujian, China. *Plant Soil.* 325: 207-218.
- Martínez, M. R. (1984) Algae: biofertilizer for rice. *Philipp. Counc. Agric. Res. Resour. Dev (PCARRD) Monit.* 12: 9-12.

- Meeks, J. C.; Wycoff, K. L.; Chapman, J. S. & Enderlin, C. S. (1983) Regulation of expression of nitrate and dinitrogen assimilation by *Anabaena* species. *J. Apply Env. Microbiol.* 54: 1351-1359.
- Mishra, A. K.; Shukla, E. & Singh, S. S. (2013) Phylogenetic comparison among the heterocystous cyanobacteria based on a polyphasic approach. *Protoplasma.* 250: 77-94.
- Mohr, R.; Voss, B.; Schliep, M.; Kurz, T.; Maldener, I.; Adams, D. G.; Larkum, A. D.; Chen, M. & Hess, W. R. (2010) A new chlorophyll d-containing cyanobacterium: evidence for niche adaptation in the genus *Acaryochloris*. *ISME J.* 4: 1456-1469.
- Mur, L. R.; Skulberg, O.M. & Utkilen, H. (1999). Chapter 2: Cyanobacteria in the environment. En: *Toxic Cyanobacteria in Water: A guide to their public health consequences, monitoring and management.* Chorus, I. & Bartram, J. (eds.) © WHO. E&FN Spon. Routledge, London, UK.
- Muyzer, G.; De Waal, E. C. & Uitterlinden, A. G. (1993) Profiling of complex microbial populations by denaturing gradient gel electrophoresis analysis of polymerase chain reaction amplified genes coding for 16S rRNA. *Appl. Environ. Microbiol.* 59: 695-700.
- Myers, J. & Kratz, W. A. (1955) Relations between pigment content and photosynthetic characteristics in a blue-green alga. *JGP.* 39: 11-22.
- Nayak, S. & Prasanna, R. (2007) Soil pH and its role in cyanobacteria abundance and diversity in rice field soils. *Appl. Ecol. Environ. Res.* 5: 103-113.
- Nayak, S.; Prasanna, R.; Prasanna, B. M. & Sahoo, D. B. (2008) Genotypic and phenotypic diversity of *Anabaena* isolates from diverse rice agroecologies of India. *J. Basic Microbiol.* 49: 165–177.
- Nübel, U.; García-Pichel, F.; Clavero, E. & Muyzer, G. (2000) Matching molecular diversity and ecophysiology of benthic cyanobacteria and diatoms in communities along a salinity gradient. *Environ. Microbiol.* 2: 217-226.
- Nübel, U.; García-Pichel, F. & Muyzer, G. (1997) PCR primers to amplify 16S rRNA genes from cyanobacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* 63: 3327-3332.
- Pereira, I.; Moya, M.; Reyes, G. & Kramm, V. (2005) A survey of heterocystous nitrogen-fixing cyanobacteria in Chilean rice fields. *Gayana Bot.* 62: 26-32.
- Prasanna, R.; Jaiswal, P.; Nayak, S.; Sood, A. & Kaushik, B. D. (2008) Cyanobacterial diversity in the rhizosphere of rice and its ecological significance. *Indian J. Microbiol.* 49: 89–97.
- Prasanna, R.; Kumar, R.; Sood, A.; Prasanna, B. M. & Singh, P. K. (2006) Morphological, physiochemical and molecular characterization of *Anabaena* strains. *Microbiol. Res.* 161: 187-202.
- Prasanna, R.; Nain, L.; Ancha, R.; Srikrishna, J.; Joshi, M. & Kaushik, B. D. (2009) Rhizosphere dynamics of inoculated cyanobacteria and their growth promoting role in rice crop. *Egy. J. Biol.* 11: 26-36.
- Prasanna, R.; Nain, L.; Pandey, A. K. & Nayak, S. (2010) Exploring the ecological significance of microbial diversity and networking in the rice ecosystem. En: *Soil Biology and Agriculture in the Tropics.* Dion, P. (ed.) Springer-Verlag. Berlin. Pp: 139-161.

- Prasanna, R. & Nayak, S. (2007) Influence of diverse rice soil ecologies on cyanobacterial diversity and abundance. *Wetlands Ecol. Manage.* 15: 127-134.
- Prasanna, R.; Singh, R. N.; Joshi, M.; Madhan, K.; Pal, R. K. & Nain, L. (2011) Monitoring the biofertilizing potential and establishment of inoculated cyanobacteria in soil using physiological and molecular markers. *J. Appl. Phycol.* 23: 301-308.
- Rai, A. N. & Prakasham, R. (1991) Transport of inorganic nitrogen in cyanobacteria and its relevance in use of cyanobacteria as biofertilizers. En: *Biological Nitrogen Fixation Associated with Rice Production*. Dutta, S. K. & Sloger, C. (eds.). Oxford and IBH. India. Pp: 177-189.
- Ramírez, P.; Martínez, E.; Martínez, M. D. & Eslava, C. (2004) Cianobacterias, microorganismos del fitoplancton y su relación con la salud humana. En: *Microbiología Ambiental*. Rosas, I.; Cravioto, A. & Ezcurra, E. 1^{era} ed. INE-SEMARNAT. México. Pp: 83-88.
- Rao, N. S. S. (2002) An appraisal of biofertilizers in India. En: *Biotechnology of Biofertilizers*. Kannaiyan, S. (ed.) Kluwer Academic publishers and Narosa Publishing House. India. Pp: 1-7.
- Reddy, P. M. & Roger, P. A. (1988) Dynamics of algal populations and acetylene-reducing activity in five rice soils inoculated with blue-green algae. *Biol. Fert. Soils.* 6: 14-21.
- Riccardi, G.; De Rossi, E. & Milano, A. (1989) Amino acid biosynthesis and its regulation in cyanobacteria. *Plant Science.* 63: 135-151.
- Rippka, R.; Deruelles, J.; Waterbury, J. B.; Herdman, M. & Stanier, R. Y. (1979) Generic assignments, strain histories and properties of pure cultures of cyanobacteria. *J. Gen. Microbiol.* 111: 1-61.
- Roger, P. A. (1995) Biological N₂ fixation its management in wetland rice fields cultivation. *Fertil. Res.* 42: 261-276.
- Roger, P. A. & Simpson, I. (1996) Effect of herbicide use on soil microbiology. En: *Herbicides in Asian rice: transition in weed management*. Naylor, R. (ed.) Palo Alto (California); Institute for International Studies, Stanford University and Manila (Phi); IRRI. Pp: 69-87.
- Roger, P. A. & Watanabe, I. (1986) Technologies for using biological nitrogen fixation in wetland rice: potentialities, current usage and limiting factors. *Fert. Res.* 9: 39-77.
- Scherer, S.; Stürzl, E. & Böger, P. (1982) Interaction of respiratory and photosynthetic electron transport in *Anabaena variabilis* Kütz. *Arch. Microbiol.* 132: 333-337.
- Schwarz, R. & Forchhammer, K. (2005) Acclimation of unicellular cyanobacteria to macronutrient deficiency: emergence of a complex network cellular responses. *J. Microbiol.* 151: 2503-2514.
- Sihvonen, L. M.; Lyra, C.; Fewer, D. P.; Rajaniemi-Wacklin, P.; Lehtimäki, J. M.; Wahisten, M. & Sivonen, K. (2007) Strains of the cyanobacterial genera *Calothrix* and *Rivularia* isolated from the Baltic Sea display cryptic diversity and are distantly related to *Gloeotrichia* and *Tolypothrix*. *FEMS Microbiol. Ecol.* 61: 74-84.
- Singh, J. S.; Pandey, V. C. & Singh, D. P. (2011) Efficient soil microorganism: A new dimension for sustainable agriculture and environmental development. *Agric. Ecosyst. Environ.* 140: 339-353.

- Sinha, R. P. & Hader, D. P. (1996) Photobiology and ecophysiology of rice field cyanobacteria. *Photochem. Photobiol.* 64: 887-896.
- Sinha, R. P.; Singh, N.; Kumar, A.; Kumar, H. D. & Häder, D.-P. (1997) Impacts of ultraviolet-B irradiation on nitrogen-fixing cyanobacteria on rice paddy fields. *J. Plant Physiol.* 150: 188-193.
- Song, T.; Mårtensson, L.; Eriksson, T.; Zheng, W. & Rasmussen, U. (2005) Biodiversity and seasonal variation of the cyanobacterial assemblage in a rice paddy field in Fujian, China. *FEMS Microbiol. Ecol.* 54: 131-140.
- Sorokin, C. (1973) Dry weight, packed cell volume and optical density. En: *Handbook of Phycological methods - Culture methods and Growth measurements*. Stein, J. R. (ed.). Cambridge University Press, U. K. Pp: 321-343.
- Srivastava, A. K.; Bhargava, P.; Kumar, A.; Rai, L. C. & Neilan, B. A. (2009) Molecular characterization and the effect of salinity on cyanobacterial diversity in the rice fields of Eastern Uttar Pradesh, India. *Sal. Syst.* 5: 4.
- Stacey, G.; Van Baalen, C. & Tabita, F. R. (1977) Isolation and characterization of a marine *Anabaena* sp. capable of rapid growth on molecular nitrogen. *Arch. Microbiol.* 114: 197-201.
- Stal, L. J. & Zehr, J. P. (2008) Cyanobacterial nitrogen fixation in the ocean: diversity, regulation, and ecology. En: *The Cyanobacteria. Molecular Biology, Genomics and Evolution*. Herrero, A. & Flores, E. (ed.) Caister Academic Press. Norfolk, UK. Pp: 423-446.
- Stanier, R. & Cohen-Bazire, G. (1977) Phototrophic prokaryotes: The cyanobacteria. *Ann. Rev. Microbiol.* 31: 225-274.
- Stomp, M.; Huisman, J.; de Jongh, F.; Veraart, A. J.; Gerla, D.; Rijkeboer, M.; Ibelings, B. W.; Wollenzien, U. I. A. & Stal, L. J. (2004) Adaptive divergence in pigment composition promotes phytoplankton biodiversity. *NPG.* 432: 104-107.
- Summers, M. L.; Wallis, J. G.; Campbell, E. L. & Meeks, J. C. (1995) Genetic evidence of a major role for Glucose-6-phosphate Dehydrogenase in nitrogen fixation and dark growth of the cyanobacterium *Nostoc* sp. strain ATCC 29133. *J. Bacteriol.* 177: 6184-6194.
- Tamura, K.; Dudley, J.; Nei, M. & Kumar, S. (2007) MEGA4: Molecular evolutionary genetics analysis (MEGA) software versión 4.0. *Mol. Biol. and Evol.* 24:1596-1599. (Publicación PDF en <http://www.kumarlab.net/publications>)
- Teneva, I.; Stoyanov, P.; Mladenov, R. & Dzhambazov, B. (2012) Molecular and phylogenetic characterization of two species of the genus *Nostoc* (Cyanobacteria) based on the *cpcB-IGS-cpcA* locus of the phycocyanin operon. *J. Biosci. Biotech.* 1: 9-19.
- Thajuddin, N. & Subramanian, G. (2005) Cyanobacterial biodiversity and potential applications in biotechnology. *Curr. Sci.* 89: 1-10.
- Tilak, K. V. B. R.; Pal, K. K. & Dey, R. (2010) Blue-green (Cyanobacterial) inoculants. En: *Microbes for Sustainable Agriculture*. I. K. International Publishing House Pvt. Ltd. New Delhi, India. Pp: 67-71.

- Tiwari, O. N. & Singh, H. T. (2005) Biodiversity of cyanobacteria in Loktak lake and rice fields of Manipur, India having acidic properties. *Proc. Natl. Acad. Sci. India B. Bio. Sci.* 75: 209-213.
- Tomitani, A.; Knoll, A. H.; Cavanaugh, C. M. & Ohno, T. (2006) The evolutionary diversification of cyanobacteria: Molecular-phylogenetic and paleontological perspectives. *PNAS.* 103: 5442-5447.
- Van den Hoek, C.; Mann, D. G. & Jahns, H. M. (1995) Chapter 2: Cyanophyta (= Cyanobacteria). En: *Algae. An introduction to phycology.* Cambridge University Press. Cambridge, UK. Pp: 16-30.
- Venkataraman, G. S. (1981) Blue-green algae: A possible remedy to nitrogen scarcity. *Curr. Sci.* 50: 253-256.
- Vézina, S. & Vincent, W. F. (1997) Arctic cyanobacteria and limnological properties of their environment: Blyot Island, Northwest Territories, Canada (73°N, 80°W). *Polar Biol.* 17: 523-534.
- Vidal, L.; Fabre, A.; Gabito, L.; Kruk, C.; Gravier, A.; Britos, A.; Pérez, M. del C.; Aubriot, L. & Bonilla, S. (2009) Parte III-Identificación. Cap. 10-Fichas de identificación de las especies. En: *Cianobacterias Planctónicas del Uruguay.* Bonilla, S. (ed.). 2^{da} ed. Programa Hidrológico Internacional de la Unesco. Montevideo, Uruguay. Pp: 45-76.
- Wacklin, P. (2006) Biodiversity and phylogeny of plantik Cyanobacteria in temperate freshwater lakes. Academic Dissertation in Microbiology, Helsinki, 2006.
- Wellburn, A. R. (1994). The spectral determination of chlorophyll a and b as well as total carotenoids using various solvents with spectrophotometry of different resolutions. *J. P. P.* 144: 307-313.
- Whitton, B. A. (2002) Phylum Cyanophyta (Cyanobacteria). En: *The Freshwater Algal Flora of the British Isles. An Identification Guide to Freshwater and Terrestrial Algae.* John, D. M.; Whitton, B. A. & Brook, A. J. (eds.) Cambridge University Press. Cambridge, U. K. Pp: 25-122.
- Whitton, B. A. (2000) Soils and rice-fields. En: *The Ecology of Cyanobacteria, their Diversity in Time and Space.* Whitton, B. A. & Potts, M. (eds.) Kluwer Ac. Pub. Dordrecht, Netherlands.
- Wilmotte, A. & Herdman, M. (2001) Phylogenetic relationships among the cyanobacteria based on 16S rRNA sequences. En: *Bergey's manual of systematic bacteriology.* Boone, D. R. & Castenholz, R. W. (eds). 2^{da} ed. Springer-Verlag. New York, USA. Pp: 487-493.
- Wilson, A.; Ajlani, G.; Verbavatz, J. M.; Vass, I.; Kerfeld, C. A. & Kirilovsky, D. (2006) A soluble carotenoid protein involved in phycobilisome-related energy dissipation in cyanobacteria. *Plant Cell.* 18: 992-1007.
- Wolk, C. P.; Ernst, A. & Elhai, J. (1994) Heterocyst metabolism and development. En: *The Molecular Biology of Cyanobacteria.* Bryant, D. A. (ed.) Kluwer Academic Publishers. Dordrecht, NL. Pp: 769-823.
- Xu, X.; Elhai, J. & Wolk, C. P. (2008) Transcriptional and developmental response by *Anabaena* to deprivation of fixed nitrogen. En: *The Cyanobacteria. Molecular Biology, Genomics and Evolution.* Herrero, A. & Flores, E. (ed.) Caister Academic Press. Norfolk, UK. Pp: 383-422.

Xu, H.; Vavlin, D. & Vermaas, W. (2001) Chlorophyll *b* can serve as the mayor pigment in functional photosystem II complexes of cyanobacteria. *Proc. Nat. Acad. Sci.* 98: 14168-14173.

Yanni, Y. G. (1996) Contribution of cyanobacterization to rice growth and performance under different field stand densities and levels of combined nitrogen. En: *Biological Nitrogen Fixation Associated with Rice Production*. Rahnan, M.; Kumar, A.; Van Hove, C.; Begum, Z. N. T.; Heulin, T. & Hartmann, A. (eds.) Kluwer Academic Publishers. Dordrecht, the Netherlands.

Zak, E.; Norling B.; Maitra, R.; Huang, F.; Andersson, B. & Pakrasi, H. B. (2001) The initial steps of biogenesis of cyanobacterial photosystems occur in plasma membranes. *Proc. Nat. Acad. Sci.* 98: 13443-13448.

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

Zubkov, M. V. (2009) Photoheterotrophy in marine prokaryotes. *J. Plankton Res.* 31: 933-938.

ANEXOS

ANEXOS

Anexo I: Medio de Cultivo BG₁₁₀.

Reactivo	Cantidad
K ₂ HPO ₄	3.00 g
MgSO ₄	7.00 g
CaCl ₂ .2H ₂ O	4.80 g
Na ₂ CO ₃	2.00 g
Ácido cítrico	1.40 g
Citrato férrico	1.74 g
H ₃ BO ₃	1.43 g
MnCl ₂	0.51 g
NaMoO ₄ .2H ₂ O	0.20 g
CuSO ₄	0.04 g
Hepes	0.69 g
NaCl	1.00 g
EDTA (20 mM)	150 µL
H ₂ O destilada	1.00 L

Anexo II: Equivalencias de bases degeneradas empleadas en los cebadores.

	A	C	G	T
Y		✓		✓
W	✓			✓

Anexo III: Secuencias del gen ARNr 16S de los diez aislamientos de cianobacterias con heterocisto estudiados.

Aislamiento	Secuencia
SU 1	ATGAACGCTGGCGGTATGCTTAACACATGCAAGTCGAACGGTCTCTTCGGAGATAGTGGCGGACGGGTGA GTAACGCGTGAGAATCTAGCTCCAGGTCGGGGACAACAGTTGGAAACGACTGCTAATACCGGATGAGCCG GAAGGTAAGGATTAATTGCCTGGAGATGAGCTCGCGTCTGATTAGCTAGTAGGTGTGGTAAGAGCGCAC CTAGGCGACGATCAGTAGCTGGTCTGAGAGGATGATCAGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCCAGACTC CTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATTTCCGCAATGGGCGAAAGCCTGACGGAGCAATACCGCGTGAGGG AGGAAGGCTCTTGGGTTGTAACCTCTTTTCTCAAGGAATAACAAAATGAAGGTACTTGAGGAATAAGCAT CGGCTAACTCCGTGCCAGCAGCCGCGTAATACGGAGGATGCAAGCGTTATCCGGAATGATTGGGCGTAA AGGGTCCGAGGTGGCCCTGTAAGTCTGCTGTCAAAGAGTGC GGCTTAACCGCATAAAGGCAGTGGAAC TACAGAGCTAGAGTGC GTTCGGGGCAGCAGGAATTCCTGGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAGATCAGGA AGAACACCGGTGGCGAAAGCGTGCTGCTAGGCCGTAAGTGCAGCTGAGGGACGAAAGCTAGGGGAGCG AATGGGATTAGATACCCAGTAGTCTAGCCGTAACGATGGATACTAGGCGTGGCTTGATC
SU 5	AGATGAACGCTGGCGGCATGCTTAACACATGCAAGTCGAACGGAATCTTCTGATTACTGGCGGACGGAT GAGTGACGCGTGAGAATCTATCTTCTGTCGGGGATAACTACCGGAAACGGTCGCTAGCACCGGATGTGC CGAACGGTGAAAGGCTTGCTGCCTGAATATGAACTCGCTCCTGATTAAGTGGTGTGGTAGGAGCGC GCCCAGGCGACCATCAATAGCTGGTCTGAGAGGATGATCGGCCACACTGGGACTGACACACAGCCCACAC TCCTACCGGAGGCAGGAGTGGGGAATTTCTCCTGGGCGAAAGCCTGACTGACCAATCCCTCGTGAGG GAGGAAGGCTCTTGGGTTGTAACCTCTTTTCTAAGGAAGAAAAATGACTGACCTGCCGAATGAACAT CCGCTAACTCCGTGCCAGCCACCGCGTAATACGGACGAAGCATGCGTTATCCGACTGATTGGTTCGTA AAGCGTCCGCCGTGGGGATGTATGCTGCTGTCTAAGAGTCTAGCTAACTAGATCAATGCAGTGGAAC CATAGCTAGAGTGC GTTCGGGGTGGAGGGAATTCCTGCTGTAGCGGTCAAATGCATGCAGATCAGGAAG AACACCACGCCGGAAGGCGCTCTACTAGGCTGGAAGTGCAGCTGAGGGACGGGAGCTAGGGGAGCGAA TGGGATTAGATACCACTAGTCTAGCCTAAAACGATGGATACTAGAC
SU 8	CTGCTCAGGATGAACGCTGGCGGTATGCTTAACACATGCAAGTCGAACGGTCTCTTCGGAGATA GTGGCGGACGGGTGAGTAACGCGTGAGAATCTAGCTTCAGGTCGGGGATAACTACTGGAACG GTGGCTAATACCGGATGTGCCGAAAGGTGAAAGGCTTGCTGCCTGAAGATGAGCTCGCGTCTG ATTAGCTAGTTGGTGTGGTAAGAGCGCACCAAGGCGTCGATCAGTAGCTGGTCTGAGAGGATG ATCAGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATTTT CCGCAATGGGCGAAAGCCTGACGGAGCAATACCGCGTGAGGGAGGAAGGCTCTTGGGTTGTAA ACCTCTTTTCTCAGGGAATAAGAAAGTGAAGGTACCTGAGGAATAAGCATCGGCTAACTCCGTG CCAGCAGCCGCGTAATACGGAGGATGCAAGCGTTATCCGGAATGATTGGGCGTAAAGCGTCC GCAGGTGGCGATGTAAGTCTGCTGTTAAAGAGCAAAGCTTAACCTTTGTAAGAGCAGTGGAAC ACATAGCTAGAGTACGTTCCGGGCAGAGGGAATTCCTGGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAGAT CAGGAAGAACACCGGTGGCGAAGGCGCTCTGCTAGGCCGTAAGTGCAGCTGAGGGACGAAAGC TAGGGGAGCGAATGGGATTAGATACCCAGTAGTCTAGCCGTAACGATGGATACTAGGCGTT GCGAGTATCAC
SU 10	TTTAGTGGCGGACGGGTGAGTAACGCGTGAGAATCTAGCTTCAGGTCGGGGATAACTACTGGA AACGGTGGCTAATACCGGATGTGCCGAAAGGTGAAAGGCTTGCTGCCTGAAGATGAGCTCGCG TCTGATTAGCTAGTTGGTGTGGTAAGAGCGCACCAAGGCGACGATCAGTAGCTGGTCTGAGAG GATGATCAGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCCAGACTCCTACGGGGAGGCAGCAGTGGGGA ATTTTCCGCAATGGGCGAAAGCCTGACGGAGCAATACCGCGTGAGGGAGGAAGGCTCTTGGGT TGTAACCTCTTTTCTCAAGGAAGAAAAATGACGGTACTTGAGGAATAAGCATCGGCTAACTCC GTGCCAGCAGCCGCGTAATACGGAGGATGCAAGCGTTATCCGGAATGATTGGGCGTAAAGCG TCCGAGGTGGCGATGTAAGTCTGCTGTTAAAGAGTCTAGCTTAAGTACTAGATAAAGCAGTGGA ACTACATAGCTAGAGTGC GTTCGGGGTAGAGGGAATTCCTGGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGA GATCAGGAAGAACACCGGTGGCGAAGGCGCTCTACTAGGCCGCAACTGACACTGAGGGACGAA AGCTAGGGGAGCGAATGGGATTAGATACCCAGTAGTCTAGCCGTAACGATGGATACTAGG CGTTGCCG
SU 11	GAACGCTGGCGGTATGCTTAACACATGCAAGTCGAACGGAATCTTAGGATTCAGTGGCGGACGGGTGAGT AACGCGTGAGAATCTAGCTTAGGTCGGGGACAACCACTGGAACGGTGGCTAATACCGGATGTGCCG AAGGTAAGGCTTGCTGCCTAGAGATGAGCTCGCGTCTGATTAGCTAGTTGGTGTGGTAAGAGCGCAC

	<p>AAGGCGACGATCAGTAGCTGGTCTGAGAGGATGATCAGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCAGACTCC TACGGGAGGCAGCAGTGGGAATTTCCGCAATGGGCGAAAGCCTGACGGAGCAATACCGCGTGAGGGA GGAAGGCTCTTGGGTTGTAACCTCTTTTCTCAAGGAATAAATCAATGAAGGTAAGTACTGAGGAATAAGCATC GGCTAACTCCGTGCCAGCAGCCGCGTAATACGGAGGATGCAAGCGTTATCCGGAATGATTGGGCGTAAA GGGTCCGAGGTGGCATTGAAAGTCTGCTGTTAAAGAGTGAGGCTTAACCTCATAAAAGCAGTGGAACT ACAAAGCTAGAGTGCCTCGGGTAGCAGGAATTCCTGGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAGATCAGGAA GAACACCGGTGGCGAAAGCGTGCTACTAGGCCGTAAGTACTGACACTGAGGGACGAAAGCTAGGGGAGCGAA TGGGATTAGATACCCAGTAGTCCTAGCCGTAACGATGGATACTAGGCCGTGGCTTG</p>
<p>SU 16</p>	<p>TCAGGATGAACGCTGGCGGTATGCTTAACACATGCAAGTCGAACGGTCTCTTCGGAGATAGTGGCGGACG GGTGAGTAACGCGTGAGAATCTAGCTTCAGGTGGGGACAACCACTGGAAACGGTGGCTAATACCGGAT GTGCCGAGAGGTAAGAGGCTTGCTGCCTGAAGATGAGCTCGCGTCTGATTAGCTAGTAGGTGTGGTAAGA GCGCACCTAGGCGACGATCAGTAGCTGGTCTGAGAGGATGATCAGCCACACTGGGACTGAGACACGGCC CAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATTTCCGCAATGGGCGAAAGCCTGACGGAGCAATACCGC GTGAGGGAGGAAGGCTCTTGGGTTGTAACCTCTTTTCTCAGGGAAGAAAAAATGACGGTACCTGAGGA ATAAGCATCGGCTAACTCCGTGCCAGCAGCCGCGTAATACGGAGGATGCAAGCGTTATCCGGAATGATT GGGCGTAAAGCGTCCGAGGTGGCAATGTAAGTCTGCTGTTAAAGAGTGAGGCTCAACCTCATAAGAGCA GTGGAAGTACATAGCTAGAGTGCCTCGGGCAAAGGGAATTCCTGGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGA GATCAGGAAGAACACCGGTGGCGAAAGCGCTTGTAGGCCGCAACTGACACTGAGGGACGAAAGCTAG GGGAGCGAATGGGATTAGATACCCAGTAGTCCTAGCCGTAACGATGGATACTAGGCCGTGGCTTGATC GACCCGA</p>
<p>SU 37</p>	<p>ATGAACGCTGGCGGTATGCTTAACACATGCAAGTCGAACGGGGTACTTTCCGGTACCTAGTGACGGACGG GTGAGTAACGCGTGAGAATCTGCCTCAGGTTCGGGACAACAGTTGGAAACGGTCTAATACCGGATGT GCCGAGAGGTGAAAGCTTTAGTGCCTGAAAATGAGCTCGCGTCTGATTAGCTAGTTGGAGTGGTAAAGGC ACACCAAGGCAACGATCAGTAGCTGGACTGAAAGGATGGCCAGTCACACTGGGACTGACACACGGCCAC ACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATTTCCGCAATGGGCGAAAGCCTGACGGAGCAATACCGCGTG AGGGAGGAAGGCTTTGGGTTGTAACCTCTTTTATTGAGGAAGAAGTTCTGACGGTACCCAATGAATCA GCATCGGCTAACTCCGTGCCAGCAGCCGCGTAATACGGAGGATGCAAGCGTTATCCGGAATATTGGGC GTAAAGGGTCCGAGGTGGTCATTCAAGTCTGCTGTTAAAGCATGGAGCTAACTCCATATCGGCAGTGG AAACTGAGTACTAGAGTTCGGTAGGGGTACGGGAATCCCAGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGATATTG GGAAGAACACCGGCGGCGAAAGCGCTGACTGGGCTGAGACTGACACTGAGGGACGAAAGCTAAGGGA GCGAAAGGGATTAGATACCCCTGTAGTCCTAGCTGTAACGATGGATACTAGGTGTTGCGCGTATC</p>
<p>SU 40</p>	<p>AGGATGAACGCTGGCGGTATGCTTAACACATGCAAGTCGAACGGTGTCTTCGGACACAGTGGCGGACGG GTGAGTAACGCGTGAGAATCTGGCTCAGGTCTGGGACAACCACTGGAAACGGTGGCTAATACCGGATGT GCCGAAAGGTGAAAGGCTTGCTGCCTGAAGATGAGCTCGCGTCTGATTAGCTAGTAGGTGGGGTAAAAG CCTACCTAGGCGACGATCAGTAGCTGGTCTGAGAGGATGATCAGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCCA GACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATTTCCGCAATGGGCGAAAGCCTGACGGAGCAATACCGCGT GAGGGAGGAAGGCTCTTGGGTCGTAACCTCTTTTCTCAGGGAAGAACACAATGACGGTACCTGAGGAAT CAGCATCGGCTAACTCCGTGCCAGCAGCCGCGTAATACGGAGGATGCAAGCGTTATCCGGAATGATTGG GCGTAAAGCGTCCGAGGTGGCTATGTAAGTCTGCTGTTAAAGAGTGAGGCTCAACCTCATAAGAGCAGT GGAAACTACATGGCTAGAGTGCCTCGGGCAGAGGGAATTCCTGGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAGA TCAGGAAGAACACCGGTGGCGAAAGCGCTGCTAGGCCGCAACTGACACTCATGGACGAAAGCTAGGG GAGCGAATGGGATTAGATACCCAGTAGTCCTAGCCGTAACGATGGATACTAGGCCGTGGCTTGATC</p>
<p>SU 45</p>	<p>ACGCTGGCGGTATGCTTAACACATGCAAGTCGAACGGGCACTTTCCGGTGTAGTGGCGGACGGGTGAGT AACGCGTGAGAATCTAGCTCTAGGTCTGGGACAACCACTGGAAACGATGGCTAATACTGGATGTGCCGAG AGGTGAAAGGCTTGCTGCCTAGAGATGAGCTTGCCTCAGATTAGCTAGTAGGTGTGGTAAGAGCGCACCT AGGCGACGATCTGTAGCTGGTCTGAGAGGACGATCAGCCACACTGGAAGTACTGAGACACGGTCCAGACTCCT ACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATTTCCGCAATGGGCGAAAGCCTGACGGAGCAATACCGCGTGAGGGA GGAAGGCTCTTGGGTTGTAACCTCTTTTCTCAAGGAAGATAATGACGGTACTTGGGAATAAGCATCGGC TAACTCCGTGCCAGCAGCCGCGTAATACGGAGGATGCAAGCGTTATCCGGAATGATTGGGCGTAAAGCG TCCGAGGTGGTTTTGAAAGTCTGTTGTTAAAGCGTGAGGCTAACCTCATAAGGGCAATGGAACTACGA GACTAGAGTACGTTCCGGGCAAGGGGAATCCCAGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAGATTGGGAAGAAC ACCGGTGGCGAAAGCGCTTGTAGGCCGTAAGTACTGACACTGAGGGACGAAAGCTAGGGGAGCGAATGGG ATTAGATACCCAGTAGTCCTAGCCGTAACGATGGATACTAGGCCGTGGCTTGCT</p>
<p>SU 54</p>	<p>ATCTTAGGATTCAGTGGCGGACGGGTGAGTAACGCGTGAGAATCTAGCTCTAGGTCCGGGACA ACCACTGGAAACGGTGGCTAATACCGGATGTGCCGGAAGGTAAGAGGCTTGCTGCCTAGAGAT GAGCTCGCGTCTGATTAGCTAGTTGGTGTGGTAAGAGCGCACCAAGGCGACGATCAGTAGCTG</p>

GTCTGAGAGGATGATCAGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCCAGACTCCTACGGGAGGCAGC AGTGGGGAATTTCCGCAATGGGCGAAAGCCTGACGGAGCAATACCGCGTGAGGGAGGAAGG CTCTGGGTTGTAAACCTCTTTCTCAAGGAATAAATCAATGAAGGTACTTGAGGAATAAGCATC GGCTAACTCCGTGCCAGCAGCCGCGTAATACGGAGGATGCAAGCGTTATCCGGAATGATTGG GCGTAAAGGGTCCGCAGGTGGCATTGAAAGTCTGCTGTTAAAGAGTGAGGCTTAACCTCATAAA AGCAGTGAAACTACATAGCTAGAGTGCCTCGGGGTAGCAGGAATTCCTGGTGTAGCGGTGA AATGCGTAGAGATCAGGAAGAACACCGGTGGCGAAAGCGTGCTACTAGGCCGTAACCTGACACT GAGGGACGAAAGCTAGGGGAGCGAATGGGATTAGATACCCCAGTAGTCCTAGCCGTAAACGAT GGATACTAGGCCGTGGCTTGTATCGACC

Anexo IV: Secuencias del gen *hetR* de los diez aislamientos de cianobacterias con heterocisto estudiados.

Aislamiento	Secuencia
SU 1	AACAGGGACAAAACCTGANAATGACAGGTCANTTGCACCACCTGGAGCCAAAAAGGGTCAAATTATCGT GGAAGAAGTCAGACAAGCTCTGACAGAAGGTAAGTTGCTAAAAATGCTGGGTTCTCAGGAACCCAGCTAT TTAATTCAGCTGCCGTACGTCTGGATGGAAAAATACCCTTGGCAACCAGGGCGATCCCGCGTGCCAGGAA CCAGTCTGACAAGTGAAGAGAAAAAAACAAATTGAGCAAAAATTACCTAGTAACTTGCAGACGCGCAATT AGTGAGTTCGTTTGAATTTCTCGAACTAATTGAATTTCTGCACAAGCGATCGCAAGAAGTCTCCCGCTGA GCATCAAATGCCCTTGAGTGAAGCCTTAGCAGAACACATCAAGCGCCGCTACTTTATTCAGGTACGGTGA CAAGAATTGATCACCTTGGGGAATGCCCTTCTATGCGTAACTCGTCTTTTTACGCACCAGCAGACGATC AAGAACGTACCTATATCATGCTAGAAGATACAGCTCGGTATTTTCGGATGATGAGAACTGGGCAGAAAA ACGACCAAATTCATGCGTGCTTTAGAAGAACTGGATGTTCTCCAGAGAA
SU 5	GCAGCTAAGTGTGCAATTTATATGACCTATCTCGAACAGGGACAAAACCTGAGAATGACAGGTCATTTGCA CCACCTGGAGCCAAAAAGGGTCAAATTATCGTGGAAGAAGTCAGACAAGCTCTGACAGAAGGTAAGTTG CTAAAAATGCTGGGTTCTCAGGAACCCAGCTATTTAATTCAGCTGCCGTACGTCTGGATGGAAAAATACCC TTGGCAACCAGGGCGATCCCGCGTGCCAGGAACCAAGTCTGACAAGTGAAGAGAAAAAAACAAATTGAGCA AAAATTACCTAGTAACTTGCAGACGCGCAATTAGTGAGTTCGTTTGAATTTCTCGAACTAATTGAATTTCT GCACAAGCGATCGCAAGAAGTCTCCCGCTGAGCATCAAATGCCCTTGAAGTGAAGCCTTAGCAGAACAC ATCAAGCGCCGCTACTTTATTCAGGTACGGTGACAAGAATTGATCACCTTGGGGAATGCCCTTCTATGC GCTAACTCGTCTTTTTACGCACCAGCAGACGATCAAGAACGTACCTATATCATGCTAGAAGATACAGCTCG GTATTTTCGGATGATGAGAACTGGGCAGAAAAACGACCAAATTCATGCGTGCTTTAGAAGAACTGGA
SU 8	TAGTGCCATGCGTACGAGTGGACACAGGCATGGAGCATTCTTAGATGCAGCCGCCACGGCAGCTAAGTGT GCAATTTATATGACCTATCTCGAACAGGGACAAAACCTGAGAATGACAGGTCATTTGCACCACCTGGAGCC AAAACGAGTCAAGATTATTGTTGAAGAAGTCAGACAAGCCTAACGGAAGGCAAGCTGCTGAAAATGCTG GGTTCTCAAGAACCAGCTATTTAATTCACTGCCTTACGTTTGGATGGAGAAAATTTCTTGGCAACCAGGG CGATCCCGTGTTCTGGGACTAGTTTGACGAGTGAAGAAAAAGACAAATTGAGCAGAAGCTACCTGGAA ATTTACCAGACGCGCAATTGGTTAGCTTTTTGAGTTTCTGGAAGTGAATTTCTGCACAAGCGATCGC AAGAAGTCTCCACCTGAGCATCAAATGCCCTTGAAGTGAAGTCTCGCAGAACACATCAAGCGTCGGCTG CTTTATTCAGGTACAGTAACTAGAATTGATTGCTTGGGGAATGCCCTTCTATGCACTGACTCGTCTTTCT ATGCACCAGCCGACGATCAAGAACGTACCTATATCATGCTAGAAGATACGGCGCGGTATTTTCGGATGATG AGAAACTGGGCAGAGAAAACGACCAAATCCATGCGTGCTTTAGAAGAACTAGATATTTCCCCAGAAAAGT GGGATCAAGCAATGGAGGAACCTGATGAAGTTATCCGTAATTGGGC
SU 10	AGTGCCATGCGGACGAGTGGGCACAGGCATGGAGCATTCTTAGATGCAGCAGCTACGGCAGCTAAGTGT GCAATTTATATGACCTATCTCGAACAGGGACAAAACCTGAGAATGACAGGTCATTTGCACCACCTGGAGCC AAAAAGGGTCAAATTATCGTGGAAGAAGTCAGACAAGCTCTGACAGAAGGTAAGTTGCTAAAAATGCTG GGTTCTCAGGAACCCAGCTATTTAATTCAGCTGCCGTACGTCTGGATGGAAAAATACCCTTGGCAACCAGG GCGATCCCGCGTGCCAGGAACCAAGTCTGACAAGTGAAGAGAAAAAAACAAATTGAGCAAAAATTACCTAGT AACTTGCCAGACGCGCAATTAGTGAGTTCGTTTGAATTTCTCGAACTAATTGAATTTCTGCACAAGCGATCG CAAGAAGTCTCCCGCTGAGCATCAAATGCCCTTGAAGTGAAGCCTTAGCAGAACACATCAAGCGCCGCT ACTTTATTCAGGTACGGTGACAAGAATTGATTACCTTGGGGAATGCCCTTCTATGCGCTAACTCGTCTTT TTACGCACCAGCAGACGATCAAGAACGTACCTATATCATGCTAGAAGATACAGCTCGGTATTTTCGGATGA TGAGAAACTGGGCAGAAAAACGACCAAATCCATGCGTGCTTTAGAAGAACTGGATGTTCTCCAGAGAA GTGGGATCAAGCAATGGAGGAACCTGATGAAGTTATCCGCGCTTGGGCA
SU 11	GCCATGCGGACAAGTGGGCATAGACATGGCGCATTCTTAGATGCAGCAGCTACCGCCGCTAAGTGTGCGA TTTATATGACTTATCTAGAGCAAGGTCAAATCTACGGATGACAGGCCATTTGCATCATCTAGAGCCGAAA CGAGTCAAAATTATCGTTGAGGAAGTCAGACAGGCTTAAATGGAAGGCAAACCTGTTAAAGATGTTGGGTA CACAAGAACCCTGATCTGATTCAGTTCCCTATGTTTGGATGGAGAAGTTTCTTGGCACCCCTGGTAGAT CCAGAATTCCTGGGACTAGTTTAAACCAGCGAAGAAAAAGAAACAAATTGAGCAGAAATTACCCAGTAATTTA CCCGATGCTCAGTTAGTCACATCATTTGAGTTTGTGAGCTAATTGAATTTCTCCATAAGAGATCGCAAGAA GACCTGCCACCAGAACATCAAATGCCCTTGAAGTGAAGCCTTAGGAGAGCATATCAAACGTGCTGCTCTA CTCAGGCACGGTGACACGAATCGATTACCTTGGGGAATGCCTTTTACGCCCTGACTCGTCCCTTTATGC TCCAGCTGACGACCAAGAGCGTACCTACATCATGGTAGAAGATACTGCCGCTATTTTCGGATGATGAAAG ATTGGGCAGAAAAGAACCGAAGCGTATGCGTGCTTTAGAGGAATTAGATATTTCCGCCCGAAAGATGGGA

	AGAAGCCATGCAGGAATTAGATGAAATCATCCGAGCTTGGGCAGAT
SU 16	TGCCATGCGGACGAGTGGGCACAGGCATGGGGCGTTTCTAGATGCAGCCGCGACCGCAGCAAAATGTGC AATTTACATGACTTATCTCGAGCAGGGACAAAACCTGCGGATGACAGGACATTTGCATCACCTCGAACCA AACGAGTCAAGGCAATTGTGGAAGAAGTTAGACAAGCGCTAACAGAGGGTAAATTGCTAAAGATGCTCGG TTCGCAAGAACCACGCTATCTAATTCAGTTGCCTTATGTCTGGATGGAGAAATACCCCTGGCAACCAGGAC GTTCAAGAATTCCTGGCACTAGTTAACGAGCGAAGAAAAGCGGCAAATTGAGCAGAACTGCCCGATAA CCTGCCTGACGCTCAACTAATTAGTTCTTTTGAATTTCTGGAAGTATTGAGTTTCTTATAAGCGCTCGCAA GAAGACCTGCCGGCACAACACCAAATGTTATTGAGTGAAGCCTTGGCAGAGCATATCAAGCGTCGGTTAC TTTATTCTGGTACAGTAACGCGAATTGACTCGCCTGGGGTATGCCTTTTATGCGCTAACCCGTCGGTTTTA TGCGCCTGCGGATGACCAAGAGCGTACTTATATCATGGTGAAGATACTGCTCGGTACTTCCGGATGATGC GCGACTGGGCAGAACGTCGAATTGGAGCGATGCGTGTGGGAAAGAACTTGATATCCACCAGAACGATT GAAGCAAGCTATGGAAGAATTAGATGAGGTTATCCGTGCTTGGGCTGAT
SU 37	CATGCGGACCAGTGGGCACAGGCATGGGGCATTTTTAGATGCAGCGCTACGGCAGCCAAATGTGCAATT TACATGACCTATCTAGAGCAAGGGCAAAACCTGCGAATGACTGGTCACTTACACCACTTGGAGCCGAAGC GGGTCAAATCATTGTTGAGGAAGTCAGACAAGCCCTGACTGAAGGTAAATTGCTGAAAATGCTGGGTTT TCAAGAGCCTCGCTATTTGATTCAAGTTGCCTTATGTCTGGATGGAAAAATTTCTTGGCGGCCTGAAAAATC CCGATTCTGGTACAAGTCTGACAACCGAGGAAAAGAAAACAAATCGAGCATAAATTACCGAGTAATTTGC CCGATGCTCAGTTAATTACCTCTTTTGAATTTCTTGAATTAATTGAATTTTGCACAAGCGATCGCAGGAGG AAATGCCACCCGAACACCAAATGCCTCTGAGTGAAGCTTTAGCGGAGCATATCAAGCGCCGTTTACTCTAC TCTGGCACGGTGACACGCATTGATTCCCTGGGGAATGCCATTCTATGCCCTACCCGTCCTTTCTATGCG CCTGCGGACGACCAAGAGCGCACCTACATTATGGTTGAAGATACTGCCCGGATTTTTCGCTAATGAAAGA TTGGGCAGAAAAGCGACAAAACGCGATGCGAGCTTTGGAAGAGCTTGATATCCGCCAGAACGCTTAGAG CAGGCTCTAGAAGAGTTGGATGAAGTTATCCGTACTTGGGCAGAT
SU 40	GCCGCGGCAACAGCAGCAAAGTGTGCAATTTACATGACCTATCTGGAACAGGGACAAAACCTGCGAATGA CTGGGCATTTGCACCACCTGGAGCCGAAACGGGTAAAGATTATTGTAGAAGAAGTCAGGCAGGCGCTAAC AGAAGGCAAGCTGCTGAAGATGCTAGGCTCTCAAGAACCTCGCTATCTGATTCAATTGCCTTATATCTGGTT AGAAAAGTTTCTTGGCAACCAGGGCGATCGCGCTTCTGGAACAGTCTGACAAGTGACGAAAAAAGG CAAATAGAGCAGAACTGCCGACTAATCTTCTGATGCTCAGTTAGTTACCTCTTTGAGTTTCTGGATTTG ATTGAGTTTCTGCACAAGCGATCGCAAGAGGACTTGCACCCGAACACCAAATGCCCTAAGTGAAGCCTT GGGGGAACACATCAAGCGTCTGATCTATTAGGCACAGTGNACGCATTGATTCTCCCTGGGGAAATG CCTTTCTATGCTCTGACTCGTCCTTTCTATGCCCGACCGACGACCAAGAGCGCACTTACATCATGGTGGAA GANACTGCTCGCTACTTCCNAATGATGAAAAACTGGGCAGAACGACGACCAAACCTCCATGCGCTTGTGG AAGAACTTGATATCCAAGCAG
SU 45	GCAGCGGCTACAGCAGCCAAATGTGCAATTTACATGACCTATCTAGAGCAAGGGCAAAAACCTGCGAATGA CTGGTCATTTACACCACTTAGAACCGAAACGGGTCAAATCATTGTTGAGGAAGTCAGACAAGCCCTGACT GAAGGTAAATTGCTGAAAAATGCTGGGTTCTCAGGAACCTCGCTATTTAATTCAATTGCCTTATGTCTGGATG GAAAAATTTCTTGGCGGCCTGGGAAATCACGATTCCCGGTACAAGTCTGACAACCGAGGAAAAGAAAC AAATCGAGCATAAATTACCGAGTAATCTCCCGATGCTCAGTTAATTACCTCTTTTGAATTTCTGAGCTAAT TGAATTTTTGCACAAGCGATCGCAGGAGGAAATGCCCCCGAACACCAAATGCCCTTGAAGTGAAGCTTAG CGGAGCATATCAAGCGCCGCTGCTGTACTCTGGTACGGTGACACGCATTGACTCTCCTTGGGGAATGCCG TTCTACGCACTCACCCGTCCTTTCTATGCGCCGGCTGACGACCAAGAGCGCACCTATATCATGGTGAAGAT ACCGCCCGGATTTCCGCTTGATGAAAGATNGGGCAGAAAAGCGACCAAATCTATGCGAGCTTTAGAAG AGCTTGAT
SU 54	GCAGCCGCGACAGCANCCAAATGTGCGATCTACATGACTTATTTGGAACAGGGGCAAAAACCTGCGAATGA CAGGACATTTGCATCACCTGGAACCAAAACGAGTTAAGGCAATCGTTGAGGAAGTTCGACAAGCGCTAAC CGAAGGTAAGCTGTTAAAAATGCTGGGTTCTCAAGAACCTCGTTATTTGATTCAACTACCTTATGTATGGAT GGAGAAGTATCCTTGGCAACCAGGACGTTCTCGAATTCCCGGAACTAGCTTAACCAGCGAAGAAAAACGA CAAATTGAGCAAAAGTTACCGCCTAATCTACCTGATGCTCACCTTGTAGTTCTTTGAATTTCTGGAATTGA TTGAATTCCTCATAAGCGATCGCAAGAAGATCTCCCGCCGAACATCGGATGGGTTTGAAGGAACTTTA GCAGAGCACATCAAACGCCGCTTTTGTATGCAGGANAGTACACGTGTTGATTCTCCCTGGGGAATGCC CTTCTATGCTTTAACCCGTCATTTTATGCTCCAGCTGACGAGCAAGAACGTACCTACATTATGGTGAAGA TACCGCCCGGATTTCCGAATGATGCGGGANTGGGCAGAACGCAAAACCAAAGCAATGCGGANTTAGAA NAGTTAGATATTCCTCAGATC