



Universidad Nacional de la Patagonia San Juan Bosco

Facultad de Ciencias Naturales

Informe de Seminario para optar por el título de Licenciada en
Ciencias Biológicas

**“Estudio Molecular del Efecto del
Aumento de la Radiación Ultravioleta
Sobre el Picoplancton Procariótico”**

Alumna: Andrea Yamila Calvo

Directora: Dra. Julieta M. Manrique

Co-director: Dr. Leandro R. Jones

Jurados

Dra. Ana E. Ruiz (Profesora Asesora)

Dr. E. Rogelio Marguet

Dr. E. Walter Helbling

ADDENDA

El título de este Seminario a partir de la revisión por parte del jurado debería ser: “Estudio molecular del efecto de la radiación ultravioleta sobre el piconanoplancton”.

ABREVIATURAS

A = adenina

ADN = ácido desoxirribonucleico

ARN = ácido ribonucleico

ATP = adenosin trifosfato

BLAST = Basic Local Alignment Search Tool

BSA = bovine serum albumin (albúmina de suero bovino)

C = citocina

c.s.p. = cantidad suficiente para

CPD = cyclobutane pyrimidine dimmer (dímero ciclobutano pirimidina)

CTAB = cetyltrimethylammonium bromide

ddNTP = didesoxinucleótido trifosfato

dNTP = desoxinucleótido trifosfato

DTT = ditioneitol

E = este

EDTA = ácido etilen diamino tetracético

G = guanina

IPTG = isopropil tio-galactósido

kb = kilobases

LB = Luria-Bertani

NCBI = Nacional Center for Biotechnology Information

°C = grados Celsius

OI = oligonucleótidos iniciadores

OTU = unidad operacional de formación

PAR = photosynthetic active radiation

pb = pares de bases

PCR = reacción en cadena de la polimerasa

PP = fotoproducto

PVC = policloruro de vinilo

r.p.m. = revoluciones por minuto

rADN = ácido desoxirribonucleico ribosomal

rARN = ácido ribonucleico ribosomal

RDP = Ribomal Database Project

RFLP = restriction fragment length polymorphism (polimorfismo de longitud de fragmentos de restricción)

RUV = radiación ultravioleta

S = sur

T = timidina

U = unidades

X-gal = bromo-cloro-indolyl-galactopiranósido

βME = beta mercaptoetanol

RESUMEN

Durante muchos años, el cultivo de microorganismos constituyó la única herramienta disponible para obtener información acerca de la composición microbiana de los ambientes naturales. Sin embargo, debido al desarrollo de técnicas modernas de análisis molecular, es posible realizar estudios de los organismos sin necesidad de cultivarlos. De este modo, se ha demostrado que los microorganismos constituyen una fracción mayoritaria de las biotas, y que posiblemente cumplan funciones ecológicas que afecten a una gran proporción del resto de los organismos.

La radiación ultravioleta (RUV) comprende el espectro de radiación solar que va entre 200 y 400 nm de longitud de onda (RUV-A, RUV-B y RUV-C). Cuando esta radiación llega a la atmósfera terrestre, una porción (RUV-C) queda retenida en las capas superiores de la misma, llegando mayormente a la superficie de la Tierra la RUV-A (315-400 nm) y la RUV-B (280-315 nm). Se ha demostrado que este tipo de radiación afecta, en muchos casos, de manera negativa a los diferentes organismos, causando la RUV-B lesiones, por ejemplo, a nivel del ADN.

En este trabajo, a partir de muestras de agua obtenidas en una zona aledaña al estuario del Río Chubut, se estudió el efecto de la radiación ultravioleta sobre la fracción piconanoplanctónica del plancton mediante técnicas genético-moleculares. Para esto la muestra se fraccionó en cuatro sub-muestras una de ellas fue utilizada como control (T0) y las restantes fueron expuestas a diferentes tipos de radiación solar durante un periodo de diez días. Se implementaron 3 condiciones de radiación: a) tratamiento PAB, las sub-muestras recibieron toda la radiación solar; b) tratamiento PA, las sub-muestras fueron cubiertas con un material opaco a la RUV-B, recibiendo así RUV-A y PAR; y c) tratamiento P, las sub-muestras fueron cubiertas con un material opaco a la RUV, por lo cual recibieron sólo PAR. Al momento de iniciar el experimento (T0), y al finalizar el tiempo de exposición, las fracciones provenientes de cada tratamiento, fueron filtradas con el objeto de aislar el componente piconanoplanctónico (0,22 - 5 µm). Posteriormente se realizaron extracciones de ADN de los filtros donde quedaron retenidos los organismos de entre 0,22 y 5 µm, de T0 y de cada tratamiento. Luego de la extracción se amplificó el gen ribosomal 16S y se construyeron bibliotecas génicas de dicho gen, las cuales fueron analizadas mediante RFLP y secuenciación. Se estudiaron 38 clones de T0, 44 de la

muestra del tratamiento P, 43 de la muestra del tratamiento PA, y 43 de la muestra que recibió todo el espectro de radiación solar (PAB).

Al comienzo del experimento (T0) se observaron secuencias de *α -Proteobacteria* y *Prasinophyceae* que estuvieron ausentes luego de los 10 días de tratamiento. En contraposición, luego de la exposición a la radiación solar se detectaron secuencias correspondientes a *Bacteroidetes* y un grupo de bacterias desconocido, que no se observaron en T0. La composición taxonómica de las muestras P y PA fue similar. La fracción que recibió todo el espectro de radiación solar (PAB) presentó grupos que no fueron observados en los otros dos tratamientos, incluyendo miembros de *Sphingobacteriales* y bacterias no clasificadas. Por otro lado, esta fracción presentó más secuencias del género *Nereida*, y el orden *Flavobacteriales* estuvo sub-representado en comparación con las alícuotas de los tratamientos P y PA. Estos resultados sugieren que las condiciones de exposición a la radiación solar favorecieron el desarrollo de algunos grupos de microorganismos y/o perjudicaron el de otros.

En consecuencia, los resultados presentados en este trabajo de Seminario permiten concluir que: i) el efecto de la radiación ultravioleta recibida por la población piconanoplanctónica de la zona del estuario del Río Chubut modificó la composición taxonómica de la misma; ii) las técnicas moleculares preexistentes utilizadas en este trabajo demostraron ser útiles para estudiar los efectos de la radiación UV sobre la composición taxonómica del piconanoplancton.

1. INTRODUCCIÓN

1.1. Microbiología de los sistemas naturales: el problema de los microbios no-cultivables

El estudio de los microorganismos ha experimentado grandes transformaciones desde sus comienzos. Desde el invento del microscopio realizado por Antonie van Leeuwenhoek, la observación y el cultivo de microorganismos constituía la única herramienta disponible para obtener información acerca de la composición microbiana de cualquier ambiente. Sin embargo, hoy sabemos que sólo entre el 1 y 15% de los microorganismos presentes en los sistemas naturales pueden ser cultivados en condiciones de laboratorio (Singh *et al.*, 2009).

Hasta mediados de 1980 hubo un gran desarrollo de estudios a nivel fisiológico y genético, pero sólo de aquellos microorganismos que podían cultivarse en condiciones de laboratorio. Sin embargo, los caracteres bioquímicos y los caracteres morfológicos no siempre resultan útiles para la identificación taxonómica de microorganismos. Asimismo, diversas observaciones indicaron que el cultivo no reflejaba la diversidad de microorganismos presentes en un determinado ecosistema (Amann *et al.*, 1995). Es por esto que la comunidad científica comenzó a notar que las técnicas clásicas no eran suficientes para describir una comunidad procariótica. En particular, las bacterias acuáticas son muy difíciles de aislar mediante cultivo, por lo cual los roles biogeoquímicos que ellas cumplen dentro de los ecosistemas comenzaron estudiándose mediante técnicas indirectas, como por ejemplo, la epifluorescencia directa (Hobbie *et al.*, 1977; Kemp & Aller, 2004). Los resultados obtenidos por medio de dichas técnicas, lograron que la comunidad científica comenzara a centrar su atención en las bacterias como componentes fundamentales de todos los sistemas naturales.

En el año 1985, Lane y colaboradores (Lane *et al.*, 1985) realizaron un trabajo experimental que amplió el paradigma de la microbiología: llevaron a cabo un análisis directo sobre secuencias de genes de rARN 16S, con el fin de determinar las relaciones filogenéticas de los microorganismos en estudio, sin mediar cultivo de los mismos. De este modo, con el advenimiento de los métodos de amplificación de ácidos nucleicos y las

técnicas modernas de análisis de datos moleculares, fue posible identificar microorganismos prescindiendo de su cultivo. Estos métodos presentan las ventajas de no ser limitantes en cuanto a los grupos que potencialmente pueden detectarse (Amann *et al.*, 1995; Blackwood *et al.*, 2005), y de permitir la detección de microorganismos no cultivables (Bintrim *et al.*, 1997). Los métodos moleculares han dado lugar a mejoras en la comprensión del componente procariótico de la diversidad presente en los ecosistemas (Suzuki *et al.*, 1997; Cotner & Biddanda, 2002; Henriques *et al.*, 2004; Van der Gucht *et al.*, 2005; Kirchman *et al.*, 2010;). Además, la información obtenida de las secuencias de ADN proporciona la base para el análisis estadístico de comunidades, de forma tal que es posible inferir algunos procesos capaces de gobernar la composición y función de las comunidades microbianas (Woese & Fox, 1977; Martin, 2002; Lewis & Lewis, 2005).

1.2. Metagenómica

Una de las principales herramientas para el estudio de la fisiología y la genética de los organismos es la metagenómica, la cual consiste en el estudio de los genomas presentes en una población de microorganismos (Handelsman, 2004). El estudio de la estructura y dinámica de las comunidades mediante metagenómica, se basa en determinar cantidades masivas de secuencias correspondientes a genes presentes en una gran proporción de los seres vivos, como por ejemplo los genes ribosomales (Woese & Fox, 1977). La ventaja de este enfoque radica en su inespecificidad, ya que estos métodos permiten un muestreo aleatorio de secuencias a partir del ADN de la muestra en estudio. Por otro lado, contar con el conocimiento previo de secuencias homólogas, disponibles en bases de datos, permite estudiar los grupos presentes en una comunidad desde el punto de vista taxonómico, realizar estudios comparativos en espacio y tiempo, y utilizar métodos históricos basados en el análisis filogenético de las secuencias obtenidas (Martin, 2002; Lewis & Lewis, 2005; Culley *et al.*, 2006; McHardy & Rigoutsos, 2007).

Los análisis metagenómicos comienzan por el aislamiento de ácidos nucleicos (i.e. ADN o ARN) de la comunidad que se desea estudiar. A partir de esto, pueden realizarse dos acciones: amplificar genes específicos o construir bibliotecas inespecíficas (Figura 1.1, Tabla 1.1). Si se decide realizar la amplificación de un gen específico, se puede trabajar directamente sobre éste mediante pirosecuenciación (Margulies *et al.*,

2005), o por clonado de los amplicones en un vector determinado y posterior análisis de los clones generados mediante secuenciación tradicional (Sanger *et al.*, 1977). Las bibliotecas inespecíficas permiten detectar la presencia de genes involucrados en la expresión de distintas funciones metabólicas. La construcción de una biblioteca inespecífica se puede realizar mediante secuenciación tradicional (método de Sanger), pirosecuenciación, o clonado y estudio de los clones mediante ensayos bioquímicos. Éstos consisten en relevar aquellos clones que expresan la función en estudio. La desventaja de estos ensayos es que no todos los genes pueden expresarse de manera correcta en el hospedador (i.e. la bacteria en la cual se realizó la clonación), por lo que el porcentaje de clones que expresan actividad es bajo (Henne *et al.*, 2000; Rondon *et al.*, 2000).

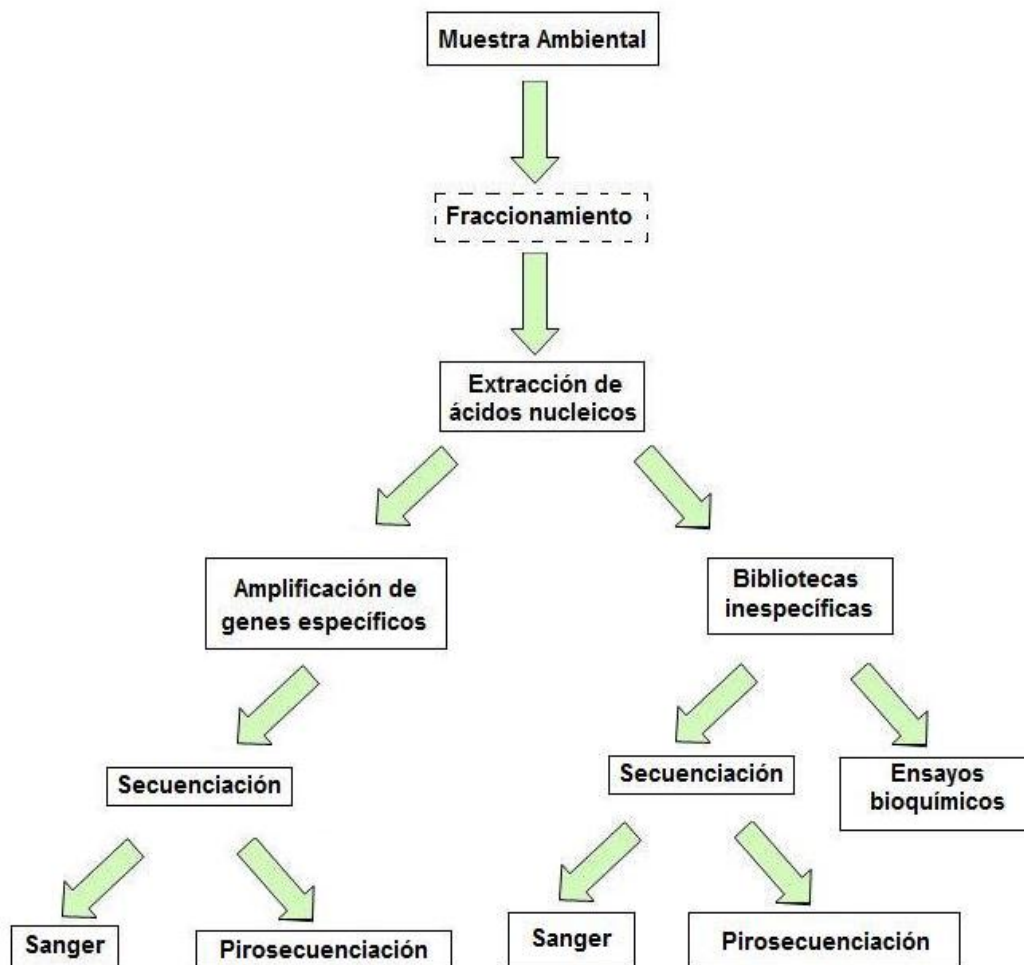


Figura 1.1: Diferentes estrategias utilizadas en el estudio de metagenomas. El paso de fraccionamiento es optativo, por lo que está representado en línea punteada.

Tabla 1.1: Descripción de las técnicas utilizadas en los análisis metagenómicos.

		DESCRIPCIÓN
Extracción y purificación de ácidos nucleicos		Implica la obtención de ácidos nucleicos de manera aislada del resto de los componentes celulares y el material particulado presente en la muestra.
PCR (Polymerase Chain Reaction)		Facilita la obtención de un gran número de copias de un fragmento de ADN o ARN específico.
Clonado	Ligación	El fragmento amplificado mediante PCR se inserta en un vector determinado.
	Transformación	Se inserta el material ligado dentro de una bacteria.
Secuenciación		Permite obtener la secuencia de nucleótidos de un fragmento determinado de ADN o ARN.
	Método de Sanger	La secuenciación se lleva a cabo utilizando desoxinucleótidos trifosfato (dNTP's) y didesoxinucleótidos trifosfato (ddNTP's). Al final de las reacciones, se obtienen cuatro familias distintas de cadenas de polinucleótidos sintetizadas, una para cada ddNTP (i.e. ddATP, ddTTP, ddCTP y ddGTP).
	Pirosecuenciación	Posibilita la secuenciación de millones de bases en pocas horas, debido a que se utiliza un sistema de secuenciación en paralelo.
Ensayos bioquímicos		Mediante la expresión de actividades proteicas o funciones específicas, se logran identificar genes involucrados en la expresión de una función determinada.

1.3. El gen 16S: un marcador molecular universal

Los organismos eucariotas y procariotas poseen en sus células estructuras encargadas de la síntesis proteica: los ribosomas. En los organismos procariotas, estos ribosomas están formados por dos subunidades (Figura 1.2), la subunidad mayor (50S) y la subunidad menor (30S). La subunidad mayor está conformada por el rARN ribosomal 5S y el rARN ribosomal 23S y aproximadamente 34 proteínas ribosomales, mientras que la subunidad menor está conformada por el rARN 16S y aproximadamente 21 proteínas ribosomales.

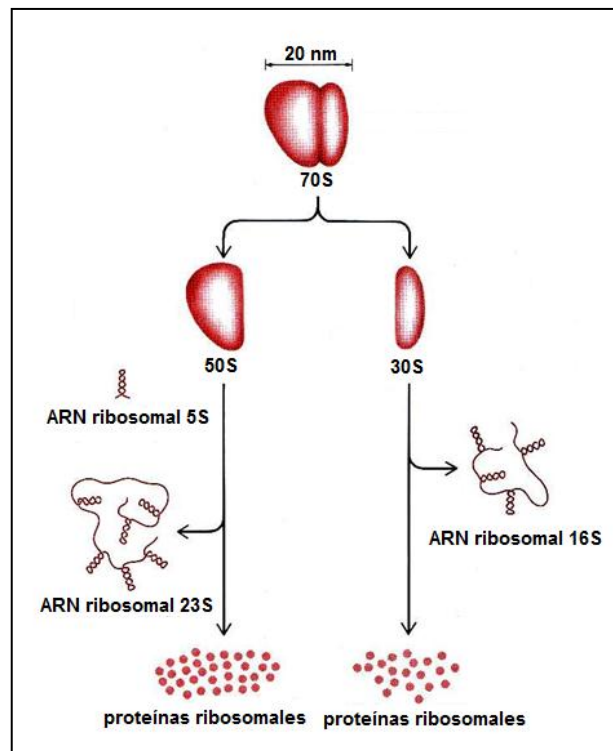


Figura 1.2: Esquema de un ribosoma procariota (Tomado y modificado de <http://www.uic.edu/classes/phys/phys461/phys450/ANJUM04/>)

Las subunidades menores y mayores tienen una estructura general que es similar dentro de los tres dominios biológicos (Bacteria, Archaea, Eukarya), presentando, además, diferencias características asociadas a cada uno de ellos.

Las secuencias de rARN ribosomal desempeñan un papel central tanto en el estudio de la evolución, como en la ecología microbiana. La estructura primaria de los

rARN ha experimentado un cambio evolutivo constante en algunas regiones, mientras que en otras regiones de la estructura primaria, así como las estructuras secundaria y terciaria, se mantienen relativamente constantes, con lo cual las funciones moleculares no se ven alteradas. La estructura secundaria de los rARN consiste en el plegamiento de la secuencia, lo que forma estructuras denominadas tallos y bucles (Figura 1.3). Las secuencias de algunos bucles están conservadas en todas las especies cercanas de bacterias, debido a que cumplen funciones esenciales, mientras que las partes estructurales son principalmente variantes y específicas de una o más clases (Wang & Qian, 2009). Es por esto que estos plegamientos desempeñan un papel fundamental dentro de la estructura secundaria, como también en estructuras de orden superior (i.e. terciaria).

Gracias a estas características, es posible realizar análisis comparativos de estas moléculas de manera muy efectiva. Además, es posible inferir las estructuras de estos ARNs (Gutell *et al.* 1994). Así, los genes rARN 16S son útiles para determinar relaciones filogenéticas, evaluar la diversidad presente en un ambiente determinado, y para detectar y cuantificar poblaciones específicas (Acinas *et al.*, 2004). Los genes rARN 16S combinan varias propiedades que los hacen especialmente adecuados para aplicaciones tan diversas. Primero, el hecho de que estén universalmente distribuidos permite realizar estudios filogenéticos y taxonómicos entre grupos muy divergentes (Wang & Qian, 2009). En segundo lugar, por ser parte de un núcleo de genes informativos, están débilmente afectados por transferencia horizontal de genes, por lo que sus relaciones proporcionan un marco sólido para evaluar cambios evolutivos en los linajes (Acinas *et al.*, 2004).

El rARN 16S se secuenció completamente por primera vez en el año 1978 por el grupo de Brosius (Brosius *et al.*, 1978). Desde entonces, y hasta septiembre del año 2008, se han descrito alrededor de 33082 secuencias de rARN 16S del dominio Archaea, y 643916 secuencias del dominio Bacteria (Cole *et al.*, 2009), y las cifras siguen en aumento.

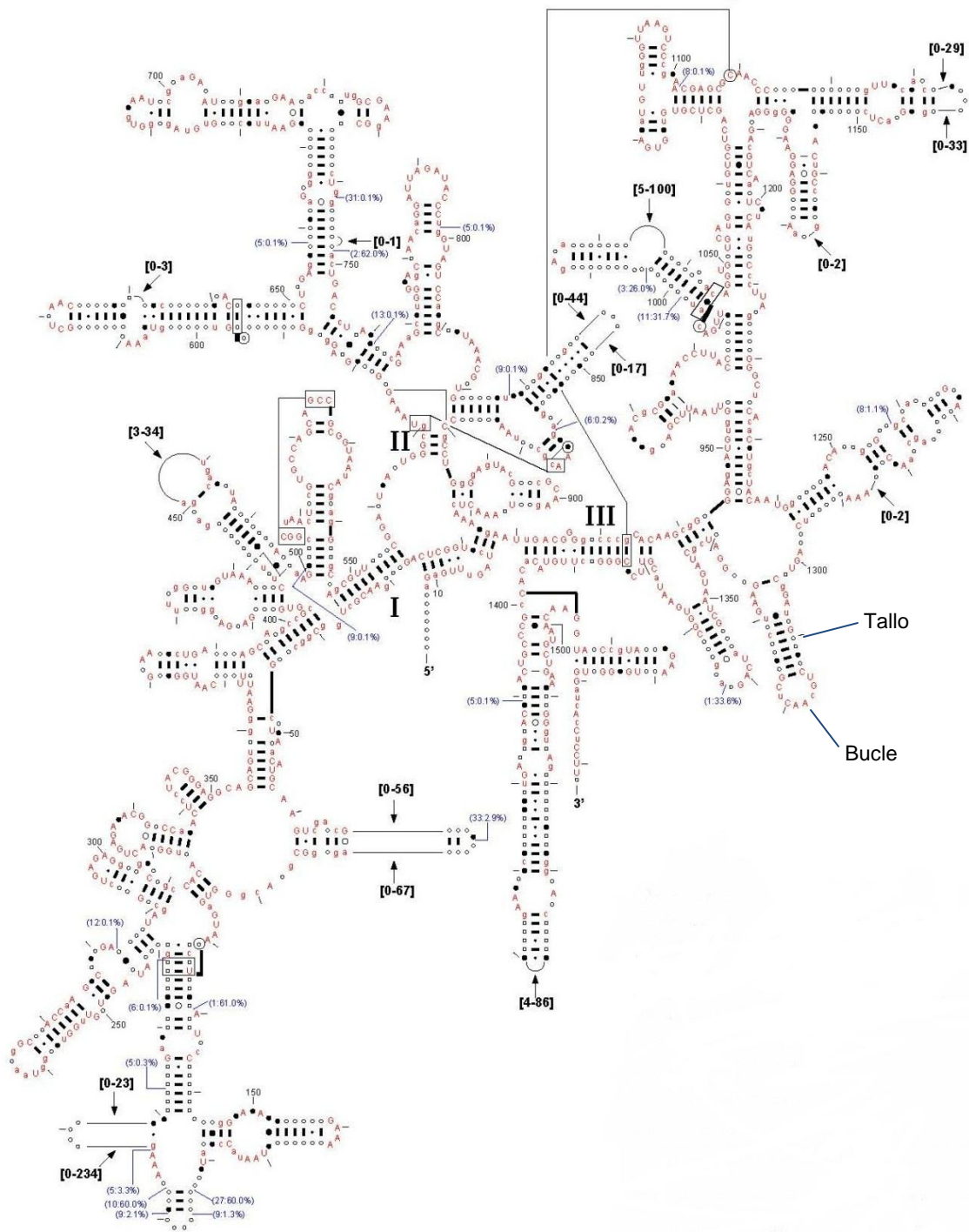


Figura 1.3: Estructura del rARN de *Escherichia coli*. Se detallan las interacciones secundarias (líneas cortas) e interacciones terciarias (líneas largas). Las bases en mayúscula corresponden a posiciones conservadas en más del 98% de las especies; las que están en minúscula corresponden a posiciones conservadas en el 90-98% de las especies. Las posiciones indicadas con un punto negro (●) corresponden a aquellas posiciones que presentan un 80-90% de conservación, mientras que las indicadas con puntos grises (●) corresponden a posiciones conservadas en el 90% de las especies. Se indica a modo de ejemplo, un tallo y un bucle en la estructura del gen (Extraído y modificado de la página de la Universidad de Texas, <http://www.rna.icbm.utexas.edu>.)

1.4. Efecto de la radiación solar ultravioleta sobre los sistemas naturales

La biosfera está comprendida principalmente por ecosistemas acuáticos, que producen más del 50 % de la producción primaria total de la Tierra (Häder *et al.*, 2007; Zepp *et al.*, 2007). Los organismos autótrofos de estos ecosistemas constituyen la base de las redes tróficas, ya que proveen de energía a los siguientes niveles. Estos organismos se ven afectados de manera negativa frente al aumento de la radiación ultravioleta-B (RUV-B, 280-315 nm) causado por una reducción en los niveles de ozono estratosférico (Madronich, 1993). Este gas actúa como un filtro, minimizando el paso de radiación de corta longitud (e.g. RUV-B) y permitiendo el paso de radiación de longitudes de onda mayores. Las causas principales de esta disminución se deben a la acción antropogénica, por uso de compuestos que contienen agentes contaminantes, como los clorofluorocarbonos (CFC's) y clorocarbonos (CC's; Molina & Rowland, 1974).

De acuerdo a su longitud de onda, el espectro de RUV solar puede ser dividido en tres categorías (Helbling *et al.*, 2008; Nichols & Katiyar, 2010):

- RUV-C: onda corta, entre 200 y 280 nm. Es absorbida en su mayoría por el oxígeno y ozono estratosférico.
- RUV-B: onda media, entre 280 y 315 nm, constituye aproximadamente el 5% del total de radiación solar UV.
- RUV-A: onda larga, entre 315 y 400 nm, comprende entre el 90 y 95% de la radiación solar UV total (Figura 1.4).

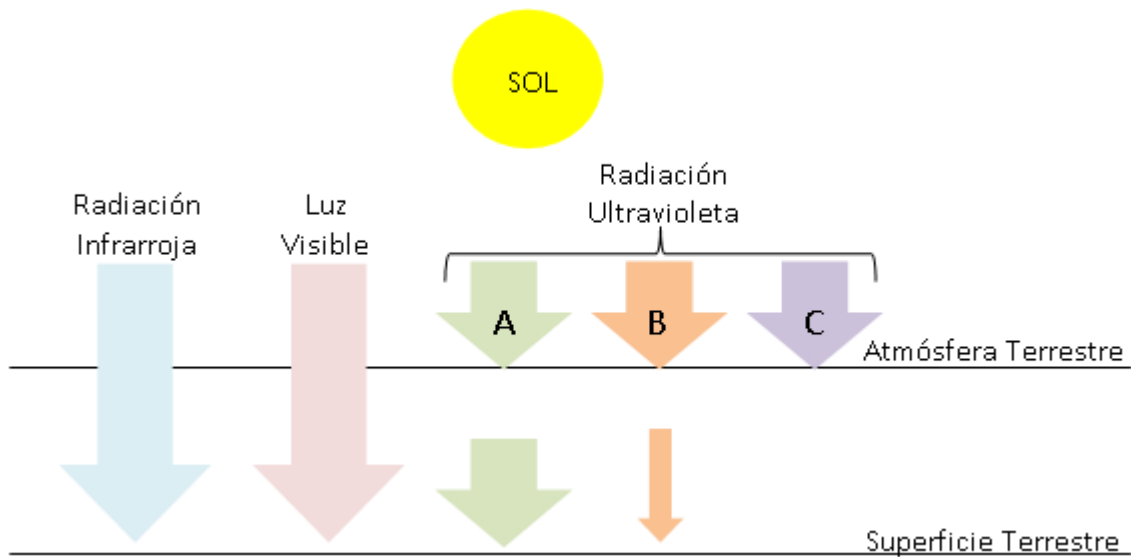


Figura 1.4: Esquema de la radiación solar que llega a la Tierra.

Los efectos negativos producidos por la RUV han sido descritos para diversos organismos (Reef *et al.*, 2009; King *et al.*, 2010; Nichols & Katiyar, 2010). Específicamente en organismos acuáticos, los efectos nocivos son varios, e incluyen, entre otros, el incremento en las tasas de mortalidad y la inhibición de las tasas de crecimiento (Villafañe *et al.*, 2001; Gonçalvez *et al.*, 2002;).

Entre las lesiones más importantes producidas por la RUV-B sobre el ADN, es la formación de ciclobutano-pirimidina (CPD's, de sus siglas en inglés), y la formación de los fotoproductos 6-4 (6-4 PP's, Figura 1.5; Jeffrey *et al.*, 1996; Yoon *et al.*, 2010). Los CPD's son lesiones internas en la cadena de ADN que se forman debido a la excitación que produce la RUV-B sobre dos pirimidinas adyacentes de la molécula de ADN. Esto lleva a la ruptura del doble enlace de los carbonos (C) 5 y 6 de ambas bases, con la consecuente formación de uniones entre los C 5 y los C 6 de las bases contiguas (Figura 1.5). Los 6-4 PP se forman debido a la ruptura del doble enlace del C 6 de una de las bases, y la del C 4 de la otra base, llevando a la formación de un enlace entre estos C (Figura 1.5). Los CPD's y lo PP's inhiben el funcionamiento de las ADN polimerasas (Sinha & Häder, 2002), por lo que, si estas lesiones en el ADN no son adecuadamente reparadas, pueden causar interferencia en la transcripción y replicación del ADN, lo que causaría mutaciones e incluso la muerte del organismo. Si bien los CPD's son más abundantes que los PP's, estos últimos son reparados de manera más rápida (Lima-Bessa & Menck, 2005), debido

a que producen una mayor distorsión en la doble hélice del ADN y son más evidentes para los sistemas de fotoreparación.

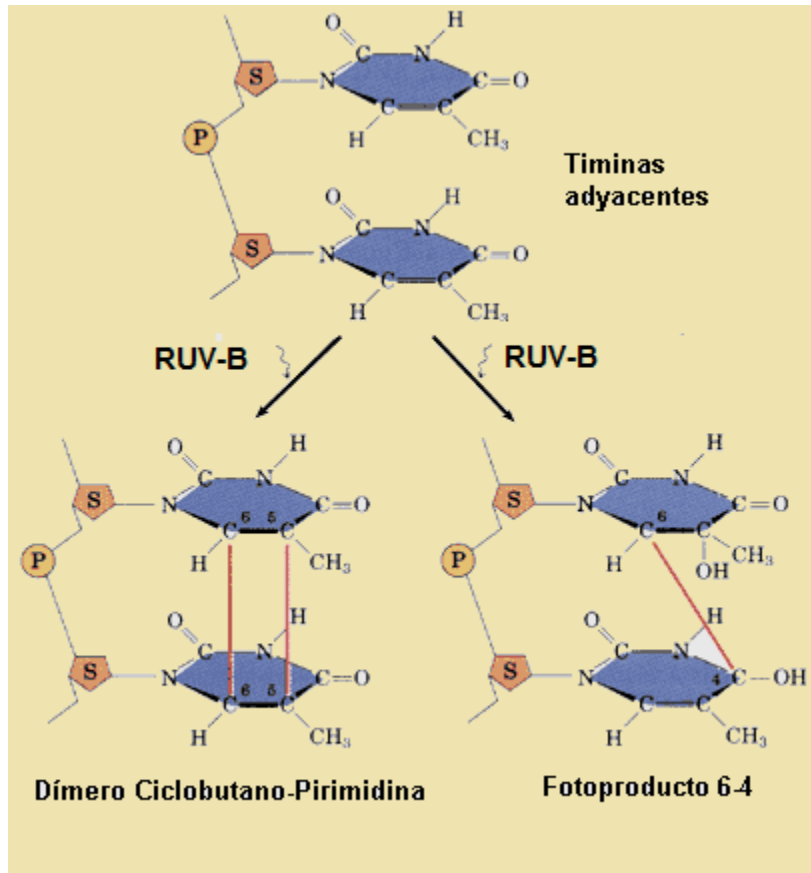


Figura 1.5: Formación de los CPD y los fotoproductos 6-4. Las líneas rojas indican la formación de uniones entre carbonos de pirimidinas adyacentes (en este caso, timinas) luego de la incidencia de la radiación ultravioleta sobre la molécula de ADN. De acuerdo al tipo de unión, se pueden formar CPD o 6-4 PP (Extraído y modificado de http://www.medicalecology.org/atmosphere/a_app_strat.htm).

A diferencia de la radiación UV-B, la UV-A no produce daño directamente sobre las moléculas de ADN, ya que sus longitudes de onda no son absorbidas por éstas; sin embargo puede generar productos de fotorreacciones que causarían daño en el ADN de manera indirecta (Sinha & Häder, 2002). Además, esta radiación causa daño indirecto sobre otras moléculas, como lípidos y proteínas (Fernández Zenoff *et al.*, 2006). Por otro lado, las longitudes de onda correspondientes a la radiación UV-A y a PAR (400-700 nm) activan el mecanismo de fotoreparación enzimática (PER, de sus siglas en inglés),

mediante la expresión de la enzima fotoliasa, encargada de reparar el daño causado por la radiación UV-B en el ADN (Kaiser & Herndl, 1997).

1.5. Biología de los sistemas acuáticos




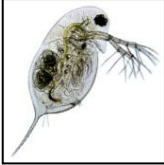

Los organismos que habitan en sistemas acuáticos, tanto marinos como continentales, se diferencian por el modo de vida, entre otras cosas. De acuerdo a esto, es posible clasificar a los organismos como (Dajoz, 2001):

- Neuston: refiere a los organismos que viven en la interface agua-aire.
- Plancton: abarca a los organismos que viven “suspendidos” en la columna de agua.
- Necton: comprende a los organismos que nadan activamente, por lo que estarían incluidos organismos de filiación animal.
- Bentos: incluye a los organismos que viven en relación con el sustrato.

Dentro de los organismos planctónicos, existen distintas clasificaciones de acuerdo a diferentes criterios. Siguiendo criterios taxonómicos y fisiológicos se encuentra (Callieri & Stockner, 2002; Tabla 1.2):

- Bacterioplancton: incluye a los organismos heterótrofos procariontes de los dominios Bacteria y Archaea.
- Fitoplancton: comprende a los organismos autótrofos del plancton, lo que incluye cianobacterias y microalgas.
- Zooplancton: abarca a los organismos eucariotas heterótrofos, como por ejemplo, larvas de moluscos, rotíferos y estados juveniles de peces (alevines), entre otros.

Tabla 1.2: Clasificación de los organismos acuáticos según criterios taxonómicos y fisiológicos.



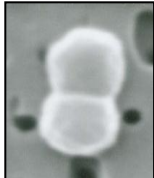


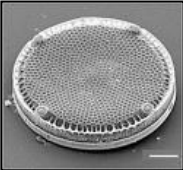
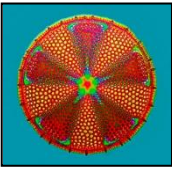


	ORGANISMOS	
Bacterioplancton	 <p>a)</p>	
Fitoplancton	 <p>b)</p>	 <p>c)</p>
Zooplancton	 <p>d)</p>	 <p>e)</p>

Tomado de: a) http://www.icm.csic.es/bio/outmol_s.htm; b) <http://hubpages.com/hub/Spirulina-The-Worlds-Healthiest-Food>; c) <http://www.la-farga.org/~biosfera/Album/organismos01/original/diatomea.html>; d) <http://puertoallarta.olx.com.mx/daphnia-pulex-pulga-de-aqua-alimento-vivo-peces-alevines-iiid-134820375>; e) <http://supremaorden.blogspot.com/2010/10/zooplancton-el-nuevo-y-el-conocido.html>.

En base al tamaño de los microorganismos que componen el plancton, éste puede clasificarse en (Häder *et al.*, 2007; Tabla 1.3):

- Femtoplancton: el término hace referencia a organismos acuáticos que miden entre 0,02 y 0,2 μm , como por ejemplo los virus y algunas bacterias.
- Picoplancton: incluye a organismos que miden entre 0,2 y 2 μm , como bacterias y microalgas.
- Nanoplancton: comprende a organismos que miden entre 2 y 20 μm , como por ejemplo, microalgas y protistas.
- Microplancton: abarca organismos que miden entre 20 y 200 μm , como por ejemplo algunos dinoflagelados y foraminíferos.
- Macroplancton: incluye a organismos de entre 200 y 2000 μm , como medusas, larvas y alevines.

Tabla 1.3: Clasificación del plancton según su tamaño.

	TAMAÑO / EJEMPLO	
Femtoplanton	0,02 a 0,2 μm	 Fago Synechococcus
Picoplancton	0,2 a 2 μm	<div style="display: flex; justify-content: space-around;"> <div style="text-align: center;">  <i>Dunaliella sp.</i> </div> <div style="text-align: center;">  Picocianobacteria </div> <div style="text-align: center;">  <i>Ostreococcus sp.</i> </div> </div>
Nanoplancton	2 a 20 μm	 <i>Gephyrocapsa oceanica</i>
Microplancton	20 a 200 μm	<div style="display: flex; justify-content: space-around;"> <div style="text-align: center;">  <i>Eupodiscus radiatus</i> </div> <div style="text-align: center;">  <i>Actinopterychus heliopelta</i> </div> </div>
Macroplancton	200 a 2000 μm	<div style="display: flex; justify-content: space-around;"> <div style="text-align: center;">  <i>Cyclops sp.</i> </div> <div style="text-align: center;">  Larva náyade </div> </div>

1.6. Rol de los procariontes en los ecosistemas acuáticos

Los componentes procarióticos de los ecosistemas cumplen un papel fundamental, ya que participan activamente en los procesos biogeoquímicos, como por ejemplo, la fijación del nitrógeno realizado por algunas bacterias. Dentro de los ecosistemas acuáticos, estos organismos forman una fracción muy importante de la biomasa total en los sistemas planctónicos, a pesar del pequeño tamaño que presentan (Cotner & Biddanda, 2002).

Son estas características (tamaño, abundancia), sumadas a la fácil dispersión que presentan, lo que ha llevado a pensar que el bacterioplancton no refleja un ensamblaje estructurado en comunidades locales, sino más bien, una distribución cosmopolita (Fenchel & Finlay, 2004). Sin embargo, estudios más exhaustivos han sugerido que existe un alto grado de endemismo en las comunidades de bacterioplancton, aunque los grupos taxonómicos principales están presentes en todas las comunidades (Figura 1.6; Pommier *et al.*, 2007).

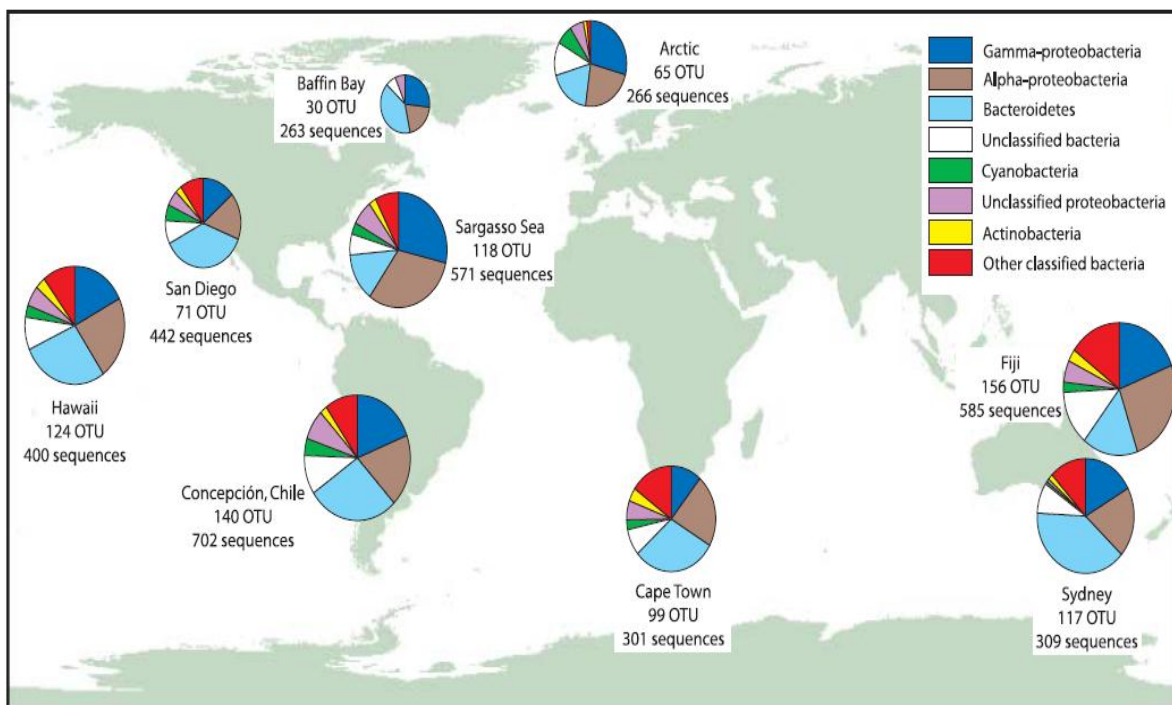


Figura 1.6: Distribución de taxones presentes en diferentes comunidades de bacterioplancton (Tomado de Pommier *et al.*, 2007).

Entre los grupos dominantes de las comunidades de bacterioplancton se encuentran: Alfa-proteobacteria, Gama-proteobacteria y Bacteroidetes (Henriques *et al.*, 2004; Bernhard *et al.*, 2005; Moeseneder *et al.*, 2005; Brown *et al.*, 2009). Las diferentes especies de bacterias marinas presentan distinta sensibilidad a la radiación UV (Winter *et al.*, 2001), lo cual es ocasionado posiblemente por diferencias en actividades metabólicas. La incorporación de Timidina en el ADN y la incorporación de leucina en las proteínas se ven disminuidas luego de la exposición a la RUV, llevando a diferencias en la división celular y en la producción de biomasa en distintas bacterias marinas (Arrieta *et al.*, 2000). Así, el grado de sensibilidad a la RUV puede actuar como un controlador de la composición y estructura de las poblaciones naturales, y de este modo, gobernar la dinámica de las redes tróficas (Llabrés & Agustí, 2006).

1.7. El cambio global y un nuevo enfoque para el estudio del picoplancton

El cambio global (especialmente debidas a las actividades antrópicas) ha despertado el interés y la preocupación de la comunidad científica y política internacional. El aumento de temperatura debido al incremento en la emisión de gases atmosféricos (e.g., CO₂, CH₄) y, como se mencionó anteriormente, el incremento en la RUV-B debido al adelgazamiento de la capa de ozono, pueden tener importantes consecuencias que afectan el desarrollo y funcionamiento de los ecosistemas. Particularmente, se han determinado cambios en la fenología y distribución de especies marinas, que se han asociado con aumentos en la temperatura del agua, como así también otros cambios inducidos por el clima tales como en la salinidad, niveles de oxígeno y circulación. Por ejemplo, el plancton del Atlántico Norte se ha movido 10 grados en latitud hacia el polo en un periodo de cuatro décadas (Rosenzweig *et al.*, 2007).

Es por esto que el efecto de los procesos de cambio global sobre la biodiversidad podría tener consecuencias importantes sobre las redes tróficas, al condicionar la abundancia y distribución de las especies. Siendo el picoplancton marino una parte fundamental de las redes tróficas, surge la necesidad de buscar nuevos métodos que permitan estudiar el efecto de la radiación sobre la población picoplanctónica marina. Estos datos permitirán desarrollar modelos predictivos para evaluar las consecuencias de posibles cambios climáticos futuros. En este trabajo de Seminario se aplicaron por

primera vez técnicas metagenómicas que, como se describe en las secciones siguientes, permitieron estudiar en detalle las fluctuaciones en la composición taxonómica del picoplancton bajo diferentes condiciones de radiación.

2. OBJETIVOS

El presente trabajo se enmarca dentro del objetivo general de estudiar el efecto de la radiación solar sobre el plancton marino. En particular, el objetivo de este trabajo fue evaluar el efecto de distintas longitudes de onda de radiación ultravioleta y PAR sobre el piconanoplancton en una zona del estuario del Río Chubut.

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. Diseño experimental

La Figura 3.1 muestra un esquema del diseño experimental utilizado en este trabajo. Se tomó una muestra de agua de mar, en una zona cercana a la desembocadura del Río Chubut. Dicha muestra se fraccionó en cuatro sub-muestras. Una de ellas, a la que se denominó Tiempo 0 (T0), se procesó en forma directa para evaluar las especies naturales presente en la zona del estuario del Río Chubut. Para evaluar los efectos de la RUV, las tres fracciones restantes se expusieron a diferentes condiciones de radiación solar durante 10 días en contenedores de 25 l de capacidad, como se detalla en la sección 3.3.

Luego de la exposición, se tomaron muestras de cada uno de los tres tratamientos y éstas se filtraron en forma secuencial a través de filtros con varios diámetros de poro para separar las diferentes fracciones del plancton según su tamaño (en el punto 3.3 se describe el procedimiento en forma detallada). Una vez separadas, se procedió a generar bibliotecas génicas del gen 16S a partir del ADN purificado de la fracción de nano y pico plancton retenida en los filtros de menor tamaño de poro (5-0,22 μm). Las cuatro bibliotecas génicas generadas (a partir de las tres muestras de los tratamientos y una muestra de T0) se analizaron mediante enzimas de restricción y secuenciación.

Las secuencias obtenidas se compararon con bases de datos con el objeto de estudiar la composición taxonómica de las mismas. Las poblaciones identificadas para cada una de las bibliotecas se compararon para evaluar el efecto de los diferentes tratamientos realizados sobre la diversidad microbiana.

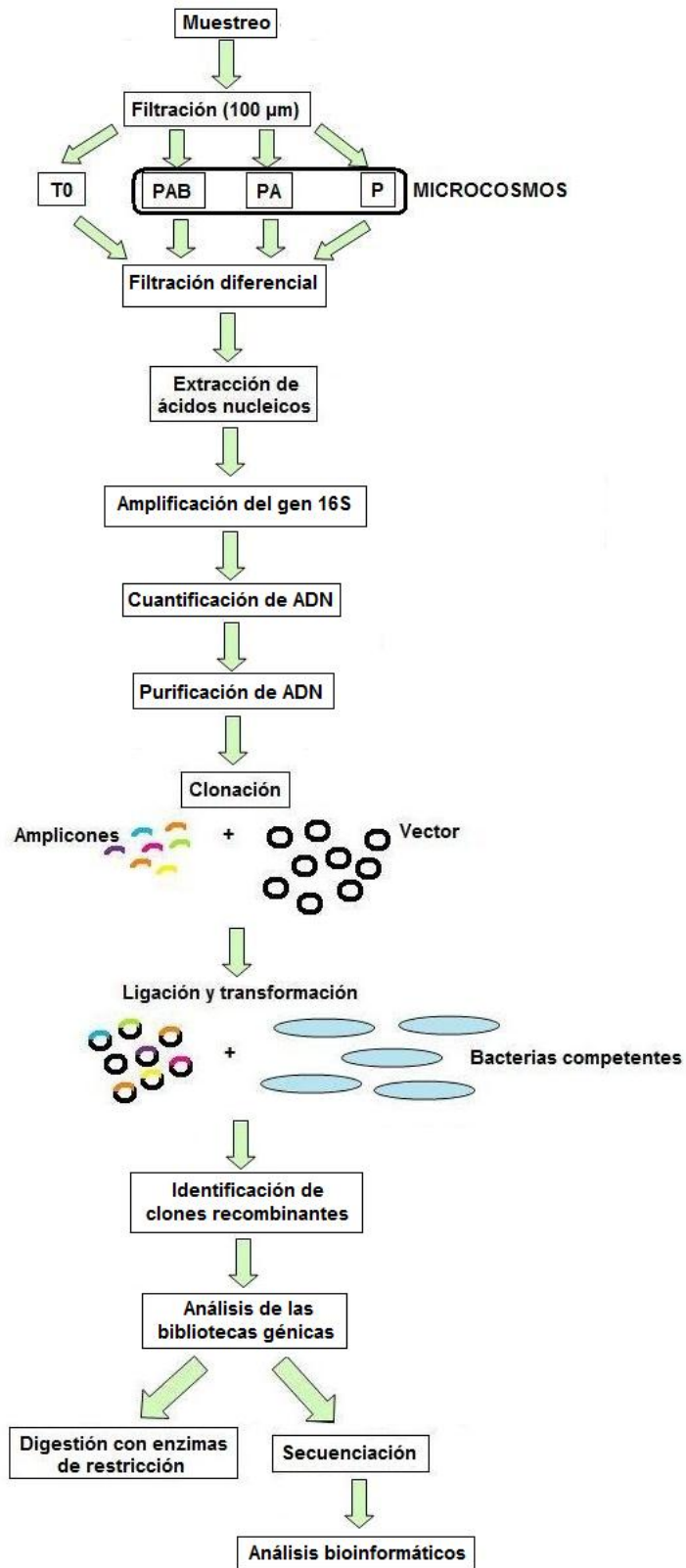


Figura 3.1: Diseño experimental desarrollado para estudiar el efecto de la radiación solar UV sobre la diversidad microbiana en sistemas de microcosmos.

3.2. Muestreo

La muestra de la región del estuario del Río Chubut se obtuvo en el mes de Febrero del año 2010. En esta época del año se registran altos valores de radiaciones solar por lo que las especies se encuentran más expuestas al factor evaluado (Villafañe *et al.*, 2004). El muestreo se realizó desde un bote neumático en la localización 43° 21' 9" S; 65° 1' 5" O (Figura 3.2). La muestra tomada de la superficie se colocó en bidones de 60 litros y se trasladó inmediatamente al laboratorio de la Estación de Fotobiología Playa Unión ubicada a 10 minutos del sitio de muestreo.



Figura 3.2: Localización de la zona de estudio elegida, que corresponde a la desembocadura del Río Chubut. Se detalla la ubicación de la ciudad de Rawson.

3.3. Tratamientos y procesamiento de la muestra

La muestra de agua tomada del mar se filtró inicialmente a través de un filtro con malla de 100 μm de poro (Nitex[®]). Esta filtración tuvo como propósito eliminar de la muestra la fracción de zooplancton $>100 \mu\text{m}$, a fin de evitar la predación sobre el plancton. Como se menciona en el punto 3.1, la muestra de agua de mar se fraccionó en cuatro sub-muestras. Dos litros de una de ellas se filtraron de manera diferencial inmediatamente, tal como se detalla más adelante. Las tres sub-muestras restantes se expusieron, durante un periodo de 10 días, a diferentes tipos de radiación solar (Figura 3.3). Una de ellas (PAB) se colocó en un container transparente a la radiación solar (i.e. expuesta a 280-700 nm de longitud de onda). A la segunda (PA) se le aplicó un material opaco a la radiación solar UV-B (container transparente a la RUV cubierto con Mylar-D; expuesta a 320-700 nm). Por último, la tercera (P) se cubrió con un material que evita el paso de la radiación solar UV-A y UV-B (container transparente a la RUV cubierto con UV Opak, Digefra; expuesta a 400-700 nm).

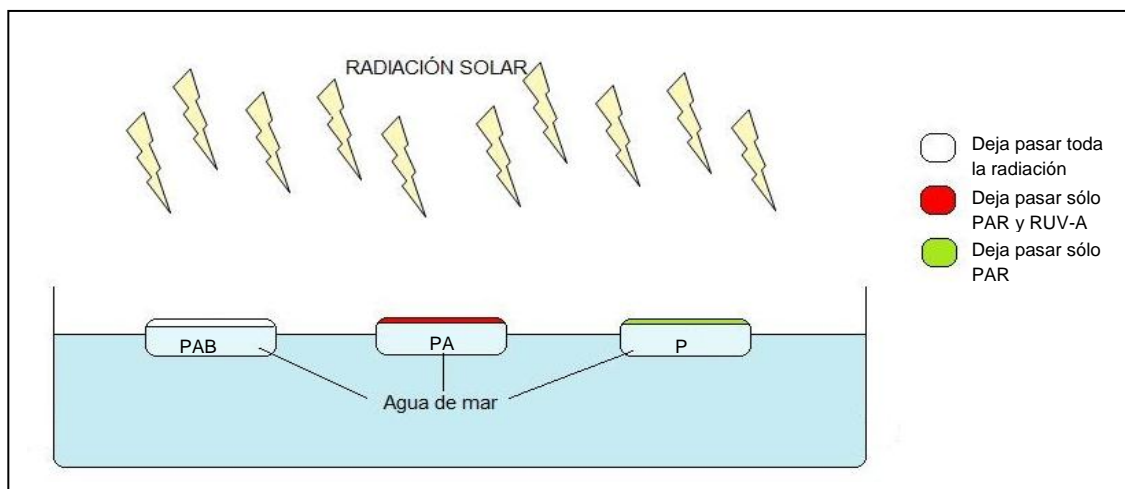


Figura 3.3: Esquema de los tratamientos de radiación. Los microcosmos fueron cubiertos con material transparente (PAB), material opaco a la radiación solar UVB (PA) y material opaco a las radiaciones solares UVA y UVB (P).

Luego de transcurrido el periodo de incubación de 10 días, una alícuota de 500 ml de agua de cada fracción se sometió a una filtración diferencial. Ésta implicó someter a la fracción a sucesivas filtraciones por vacío con filtros de 47 mm de diámetro (MSI Westboro) con tamaños de poro de 20, 10, 5 y 0,22 μm , comenzando por el filtro de mayor tamaño y siguiendo en orden decreciente de poro. Este procedimiento permitió separar las diferentes poblaciones planctónicas de las muestras según su tamaño. De esta forma la fracción de pico y nano plancton (0,2 a 5 μm), dentro de la cual se encuentra el bacterioplancton, quedó retenida en el filtro de 0,22 μm . Dos litros de la fracción correspondiente a T0 se filtraron del mismo modo al inicio del experimento. Los filtros se guardaron a -80 °C hasta el momento de ser procesados.

Estos experimentos se diseñaron con el objeto de observar la biodiversidad de las distintas fracciones planctónicas presentes en la zona de estudio. Dado que la fracción retenida en el filtro de 0,22 μm no puede ser determinada mediante microscopía, se utilizaron técnicas genético-moleculares para llevar a cabo los análisis sobre esta fracción. En este trabajo sólo se mostrarán los datos obtenidos mediante estas últimas técnicas.

3.4. Extracción y purificación de ácidos nucleicos a partir de los filtros

La extracción de los ácidos nucleicos retenidos en los filtros de 0,22 μm , se llevó a cabo mediante el método de Doyle y Doyle (1987), con ciertas modificaciones según se detalla a continuación. Los filtros se incubaron durante 30 minutos a 60°C en 720 μl de una solución de extracción conteniendo Bromuro de Cetil Trimetil Amonio (CTAB, 2% p/v), cloruro de sodio (1,4 M), beta mercaptoetanol (0,2% v/v), ácido etilen diamino tetracético (20mM) y Tris/HCl (100mM pH 8,0). Posteriormente se agregó 1 volumen de solución cloroformo: isoamílico (24:1) y se centrifugó a 14500 r.p.m en microcentrífuga (miniSpin Plus, Eppendorf) durante 15 minutos. La fase acuosa, conteniendo los ácidos nucleicos, se recuperó y se le añadió 1 volumen de alcohol isopropílico. Esta mezcla se incubó durante 1 hora a 4°C y luego se centrifugó a máxima velocidad (14500 r.p.m.) en microcentrífuga durante 30 minutos. El pellet obtenido se lavó con etanol (70% v/v), se secó y se resuspendió en agua ultra pura libre de DNAsa (Invitrogen). La cantidad y

calidad del ADN purificado de los filtros se evaluó mediante electroforesis en geles de agarosa 0,8% (p/v) como se detalla en el punto 3.6.

3.5. Amplificación del gen ribosomal 16S.

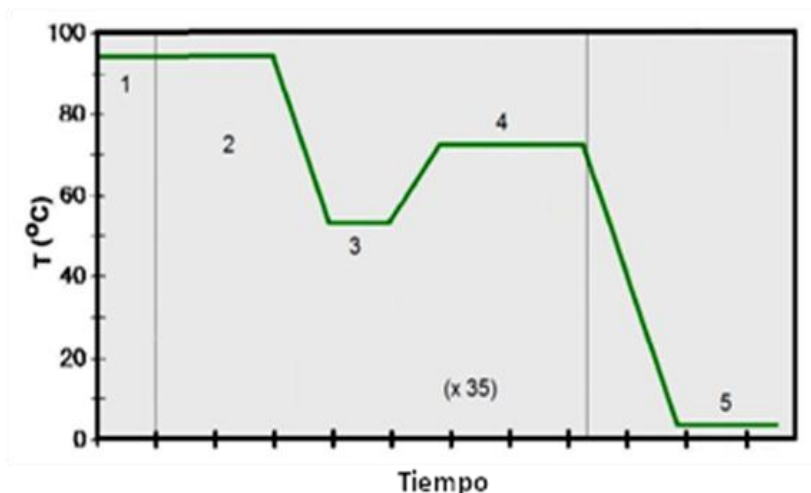
Las reacciones de amplificación se llevaron a cabo utilizando un par de oligonucleótidos iniciadores (de ahora en adelante *primers*) denominados AF-27 y HR-1492 (Tabla 3.1).

Tabla 3.1: Primers utilizados en la amplificación del gen 16S (Weinbauer *et al.*, 2002).

Primer	Posición ^a	Secuencia
AF-27	8-27	5'-AGAGTTTGATCMTGGCTCAG-3'
HR-1492	1513-1492	5'-TACGGYTACCTTGTTACGACTT-3'

^a la numeración corresponde a posiciones del gen 16S de *E. coli* (GI:296142109).

Para cada reacción se utilizó como molde 1 µl de la correspondiente suspensión de ADN. La mezcla de reacción contuvo, además, 1 U de enzima AccuPrime™ *Taq* DNA Polymerase High Fidelity (Invitrogen), 5 µl de AccuPrime™ Buffer II 10X [600 mM Tris-SO₄ pH 8,9, 180 mM (NH₄)₂SO₄, 20 mM MgSO₄, 2 mM dGTP, 2 mM dATP, 2 mM dTTP, 2 mM dCTP, 10% glicerol; Invitrogen], 5 µl de cada uno de los primers (20 µM) y agua ultra pura (c.s.p. 50 µl). Las condiciones de ciclado fueron las siguientes: 1 minuto de desnaturalización a 94 °C seguido de 35 ciclos de 30'' de desnaturalización a 94 °C, 10'' de hibridación a 53,9 °C y 1' 40'' de elongación a 68 °C. Luego de los 35 ciclos las muestras se mantuvieron a 4 °C (Figura 3.4). Los productos obtenidos se analizaron mediante electroforesis en geles de agarosa 2%, como se detalla en la sección 3.6. La cuantificación de ADN se realizó como se detalla en la sección 3.7. Todas las reacciones de amplificación se realizaron en un termociclador *BioRad My Cycler* (BioRad).



ciclo	°C	Tiempo
1	94	1'
2	94	30''
3	53,9	10''
4	68	1'40''
5	4	∞

Figura 3.4: Condiciones de ciclado utilizadas para la amplificación del gen 16S. En el gráfico detalla el primer ciclo desnaturizante a 94 °C (1), y los 35 ciclos de desnaturización (94 °C, 2), hibridación de los primers (53,9 °C, 3) y extensión (68 °C, 4). Luego del último ciclo, las muestras se mantuvieron a 4 °C (5).

La temperatura de anillado se ajustó tal como se describe en la sección Anexo 3 (Página 65). Dicho ajuste resulta de gran importancia en las reacciones de amplificación, ya que la falta de optimización termina resultando en problemas, como la baja cantidad o no detección del producto esperado, la presencia de bandas inespecíficas o fondo inespecífico debido a la presencia de fragmentos de diferente tamaño, formación de “dímeros de primers” que compiten con la unión del primer a la secuencia molde, entre otras.

3.6. Electroforesis en geles de agarosa

La concentración de agarosa en los geles fue de 0,8, 1,5 o 2% p/v, dependiendo del tamaño de ADN a ser analizado. Como solución reguladora y electrolito se utilizó TAE 1X (0,04 M Tris-acetato, 0,001M EDTA; pH 8). Los ácidos nucleicos se tiñeron mediante la incorporación del colorante SYBR[®] Green (Invitrogen) en el buffer de corrida y en los geles de agarosa, según las indicaciones del fabricante. Como solución de siembra se utilizó una solución TAE 1X a la que se le adicionó glicerol (50% v/v) para permitir la entrada correcta de la muestra al pocillo del gel, y el colorante Orange G, el cual se

agregó con una espátula hasta alcanzar una coloración anaranjada translúcida. Los geles se sometieron a electroforesis durante 60 minutos a 70 voltios en una cuba electroforética horizontal con camas de 12x6 cm de lado (BioAmerica). Posteriormente se visualizaron mediante un transiluminador de radiación ultravioleta (Elettrofor).

3.7. Cuantificación de ADN

La cuantificación del ADN purificado, como así también de los fragmentos amplificados, se realizó mediante el programa ImageJ (<http://rsbweb.nih.gov/ij/>; Abramoff *et al.*, 2004). Este programa permite cuantificar el ADN comparando la intensidad de las bandas presentes en geles de agarosa. El ADN que se deseaba cuantificar se corrió en un gel de agarosa junto a un marcador de peso molecular (High DNA Mass Ladder, Invitrogen), para el cual se conocen los tamaños y cantidades de ADN de cada una de sus bandas. Una vez corrido el gel se obtuvieron imágenes fotográficas del mismo, las cuales se utilizaron para el análisis densitométrico. Este programa calcula la intensidad relativa de cada una de las bandas, incluido el marcador de peso molecular. De este modo, al conocer la cantidad de ADN de las bandas del marcador de peso molecular, es posible determinar la cantidad de ADN presente en cada muestra.

3.8. Purificación de ADN a partir de geles de agarosa preparativos

La extracción de ADN a partir de geles de agarosa se realizó mediante el método de Tautz y Renz (Tautz & Renz, 1983). El método consiste en, primero, separar los fragmentos de ADN mediante electroforesis en gel de agarosa. Una vez separados los fragmentos, la porción de agarosa conteniendo el fragmento de interés se corta del gel y se incuba en una solución de acetato de sodio 0,3 M (pH 7,0) durante 30 minutos, en oscuridad, a temperatura ambiente. Posteriormente, el fragmento de agarosa se coloca en un tubo de 500 µl que presenta un orificio en el fondo cubierto con lana de vidrio siliconizada, o bien en columnas comerciales que en el fondo contienen fibra de vidrio de baja unión al ADN. Luego el fragmento se congela a -80 °C durante 10 minutos, se

introduce el tubo dentro de otro tubo de 1,5 ml y se centrifuga durante 5 minutos a 14100g en microcentrífuga. La agarosa queda retenida en la fibra de vidrio mientras que la solución de ADN es recuperada en el segundo tubo de 1,5 ml. El ADN es luego precipitado con 2 volúmenes de etanol absoluto a -20°C durante toda la noche. El ADN se sedimenta por centrifugación durante 20 minutos a 14500 r.p.m en microcentrífuga, y finalmente es resuspendido en agua ultrapura.

3.9. Clonado molecular

La Figura 3.5 muestra un esquema del procedimiento del clonado molecular utilizado. El mismo consta de tres etapas que se detallan a continuación.

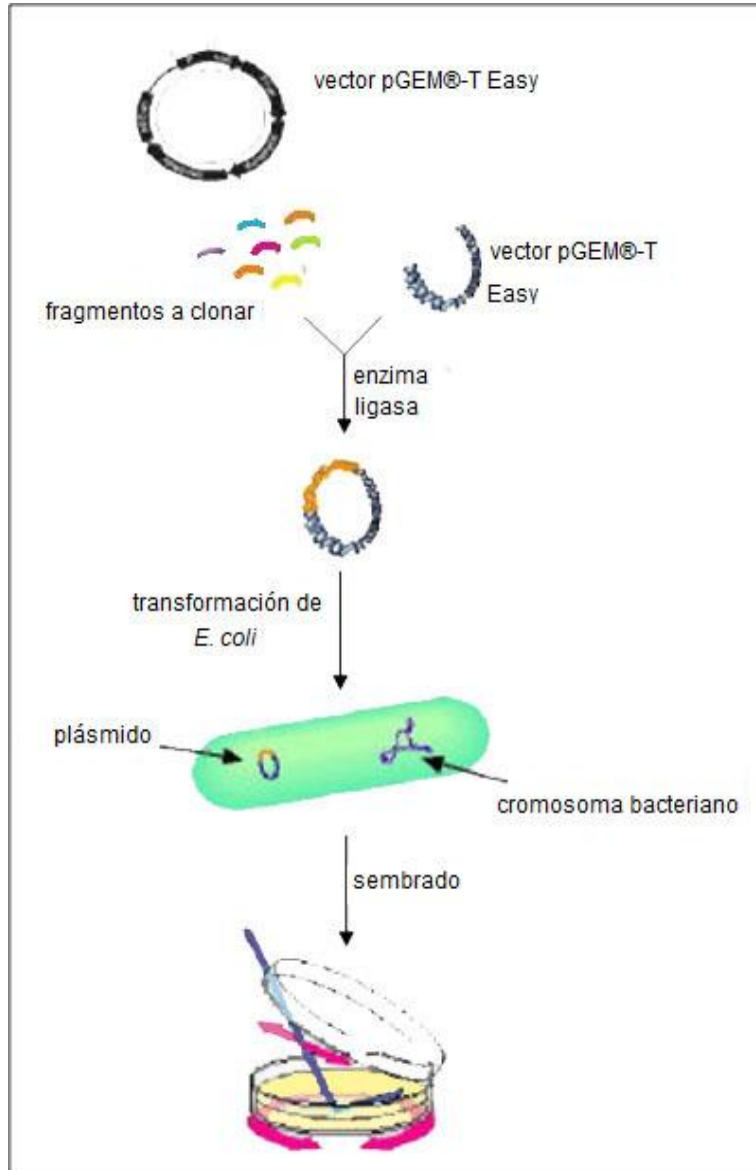


Figura 3.5: Esquema del procedimiento de clonado.

3.9.1. Ligación

Los amplicones purificados según lo descrito en el punto 3.8 se ligaron en el vector pGEM[®]-T Easy (Promega). Este vector posee una timidina en cada extremo 3', lo que evita la re-circularización del vector y además provee extremos compatibles con los amplicones, debido a que muchas ADN polimerasas agregan adeninas en los extremos 5' del amplicón (Protocols & Applications Guide, Promega; Figura 3.6).

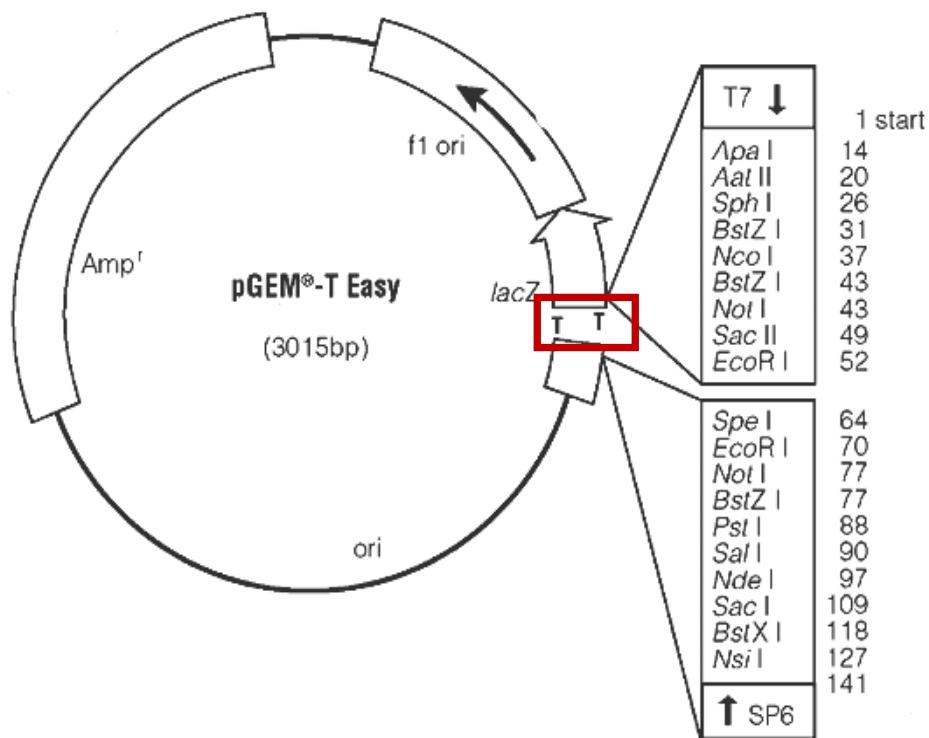


Figura 3.6: Mapa del vector pGEM®-T Easy. Se detalla el sitio de inserción, o “polilinker”, que se encuentra flanqueado por timidinas 3' terminales (T) que facilitan el clonado de los fragmentos de PCR. Como puede observarse, la región de clonado múltiple interrumpe el gen *lacZ*, que codifica para la enzima β-galactosidasa. También se detalla el gen *Amp^r* que codifica un gen que contiene resistencia a ampicilina, y la región correspondiente a los promotores T7 y Sp6 que flanquean el sitio de clonado múltiple.

Las reacciones de ligación se realizaron utilizando tres relaciones molares inserto:vector (1:1, 2:1 y 3:1). Para esto, se calculó la cantidad necesaria de inserto mediante la siguiente fórmula:

$$\text{ng de inserto} = \frac{\text{ng de vector} \times \text{largo del inserto (kb)}}{\text{largo del vector (kb)}} \times \text{relación molar inserto:vector}$$

Para cada reacción de ligación se utilizaron 3 U de la enzima *T4 DNA ligasa* (Promega), 5 µl del buffer recomendado por el fabricante [300mM Tris-HCl (pH 7,8), 100mM MgCl₂, 100mM DTT y 10mM ATP], 0,4 µl de ATP 10 mM y agua ultra pura (c.s.p)

10 μ l). En cada reacción se utilizaron 50 ng de vector y la cantidad de inserto calculada mediante la fórmula anterior para cada relación molar. Las reacciones se llevaron a cabo a 4°C durante toda la noche, según las recomendaciones del fabricante.

3.9.2. Transformación

Se descongelaron 50 μ l de una suspensión de bacterias competentes de la cepa *Escherichia coli* (*E.coli*) One Shot® TOP 10 (Invitrogen, ver Anexo 2, página 63) a temperatura ambiente y se mantuvieron en hielo. Posteriormente se agregaron las bacterias a 5 μ l de mezcla de cada ligación (sección 3.9.1) y se incubó en hielo durante 30 minutos. Luego de este periodo se llevó a cabo un “shock térmico”, consistente en incubar la mezcla a 42°C durante 30 segundos y luego durante 2 minutos en hielo. Para su recuperación, las bacterias se incubaron con 200 μ l de medio de crecimiento de Luria-Bertani (LB, 1% triptona; 0,5% extracto de levaduras; 1% NaCl) durante 60 minutos a 37°C. Estas mezclas de transformación se plaquearon en medio LB-1,5% agar conteniendo 50 μ g/ml de ampicilina e incubadas durante toda la noche a 37 °C, para permitir el crecimiento de las colonias (Figura 3.5).

Para la selección de las bacterias transformantes que incorporaron versiones del vector que contienen el inserto de interés, se utilizó el método “blue/white screening”, que consiste en agregar IPTG (Isopropil tio-galactósido) y X-gal al medio. El IPTG es un inductor artificial del gen *lacZ*, el cual se encuentra interrumpido por el sitio de clonado múltiple del vector (Figura 3.7). El sistema actúa de forma tal que el IPTG se une al represor del gen y permite que se una la polimerasa, sintetizando galactosidasa. El X-gal es un galactósido que, al ser metabolizado por la galactosidasa, produce un precipitado de color azul. De este modo, si se inserta ADN foráneo en el vector no se produce galactosidasa funcional, por lo que las colonias correspondientes resultan blancas, mientras que las que no poseen el inserto son azules.

Cada una de las colonias obtenidas proviene de una bacteria que ha captado una molécula de plásmido conteniendo una única molécula del gen 16S (inserto) y, por lo tanto, representa un clon de la biblioteca.

Las colonias blancas se repicaron en forma de estrías sobre placas con medio LB-1,5% agar conteniendo 50 µg/ml de ampicilina. Las placas se incubaron durante toda la noche a 37 °C.

3.10. Identificación de clones recombinantes

3.10.1. Purificación parcial de ADN plasmídico

La purificación de ADN plasmídico se realizó utilizando el método de *turboprep* (Woodford & Usdin, 1991; Jones *et al.*, 2002), mediante la cual se tomó con un mondadientes esterilizado una pequeña porción de una estría y se homogeneizó mediante vórtex en 200 µl de agua ultra pura libre de ADNasas y ARNasas (Invitrogen). Posteriormente la suspensión se calentó en un baño de agua hirviendo durante 90 segundos, para desorganizar la estructura celular de las bacterias y así liberar los ácidos nucleicos. La preparación se centrifugó en microcentrífuga durante 15 segundos para sedimentar los restos celulares. El sobrenadante obtenido por cada una de las estrías se utilizó como molde para llevar a cabo las reacciones de PCR.

3.10.2. Amplificación mediante PCR

La mezcla de reacción consistió en 1,25 U de la enzima Go Taq™ DNA Polymerase (Promega), 10 µl del buffer provisto por el fabricante, Colorless Buffer Go Taq 5X [1,5 mM MgCl₂, pH 8,5; (Promega)], 1 µl de dNTP's (10 µM cada uno; Invitrogen), los primers Sp6 y T7¹ (20 µM cada uno; Tabla 3.2), 1µl del homogenado de bacterias descrito en el punto anterior, y agua ultra pura (c.s.p. 50 µl).

Las condiciones de ciclado para esta reacción de PCR fueron las siguientes: 1 minuto de desnaturalización a 95 °C seguido de 35 ciclos de 30" de desnaturalización a 95 °C, 30" de hibridación a 53,9 °C y 1' 40" de elongación a 72 °C. Luego de los 35 ciclos, se realizaron 5' de elongación a 72 °C y luego las muestras se mantuvieron a 4 °C.

¹ Para realizar estas reacciones de amplificación se utilizó el par de primers T7 y Sp6, ya que el sitio de clonado múltiple del vector pGEM[®]-T Easy está flanqueado por los promotores T7 y Sp6. Además, si se utilizara el par de primer AF-27 y HR-1492 no sólo se amplificaría la copia del gen 16S presente en el vector, sino que también se amplificarían las copias de dicho gen que se encuentran en la bacteria hospedadora.

Los amplicones obtenidos se analizaron mediante electroforesis en geles de agarosa 2% como se describe en la sección 3.6.

Tabla 3.2: Secuencias correspondientes a los primers que flanquean el sitio de inserción en el vector pGEM[®]-T Easy (Figura 3.7)

Primer	Secuencia
T7	5'-TAATACGACTCACTATAGGG -3'
Sp6	5'-GATTTAGGTGACACTATAG-3'

3.11. Análisis de las bibliotecas génicas

3.11.1. Análisis mediante digestión con enzimas de restricción

Digestión con *Hind*III (Promega): cada una de las reacciones de digestión se realizó utilizando 4 U de enzima, 2 µl de buffer E 10X (6 mM Tris-HCl, 6 mM MgCl₂, 100 mM NaCl, 1 mM DTT, pH 7,5), 0,2 µl de BSA 100X, 1 µl del producto de PCR obtenido como se detalla en el punto 3.10 y agua ultra pura (c.s.p. 20 µl).

Digestión con *Eco*RI (Promega): cada una de las reacciones de digestión se realizó utilizando 4,8 U de enzima, 2 µl de buffer H 10X (90 mM Tris-HCl, 10 mM MgCl₂, 50 mM NaCl, pH 7,5), 0,2 µl de BSA 100X, 1 µl producto de PCR obtenido como se detalla en el punto 3.10 y agua ultra pura (c.s.p. 20 µl).

Cada reacción de restricción se llevó a cabo en un baño seco (Digital Dry Bath D1100, Labnet, Inc.) a 37°C durante 2 horas. Posteriormente, los productos digeridos se resolvieron electroforéticamente en geles de agarosa al 2% y visualizados mediante UV / SYBR[®] Green como se describe en la sección 3.6.

Genotipo combinado. Para consignar el genotipo final de cada clon se combinaron los datos obtenidos con cada enzima por separado. Para cada enzima se asignó, consecutivamente a partir de 1, un número identificador a los patrones de restricción. Luego los dos números obtenidos para cada clon se combinaron resultando, de este modo, el genotipo final. La Figura 3.7 muestra, a modo de ejemplo, cómo se procedió a la identificación de algunos genotipos. Se observa, por ejemplo, que el clon **b** presenta

mediante la digestión con *EcoRI*, el patrón 1, mientras que el genotipo asignado al mismo clon mediante *HindIII* fue 2. Por lo tanto, el genotipo combinado para el clon **b** fue 12. Así mismo, el clon **c** presenta genotipo 1 tanto con *EcoRI* como con *HindIII*, por lo que el genotipo combinado fue 11.

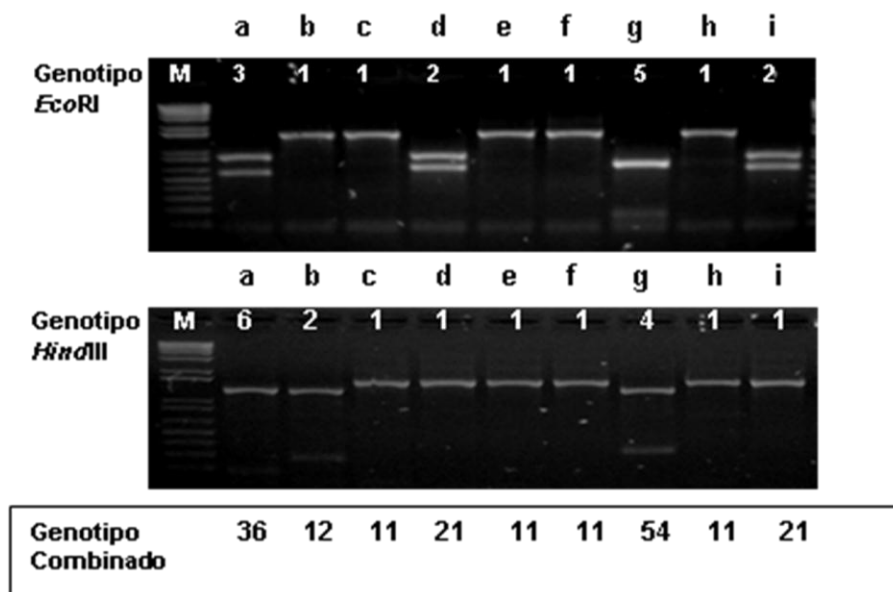


Figura 3.7: Electroforesis en gel de agarosa 2% que muestra el resultado de la digestión de 10 clones con las enzimas *EcoRI* (a) y *HindIII* (b). La asignación de los patrones se encuentra especificada en la parte superior de cada gel, mientras que el genotipo resultante de la combinación se detalla en el recuadro inferior (genotipo combinado).

3.11.2. Análisis mediante secuenciación

La secuenciación se llevó a cabo por el servicio MacroGen Inc. (World meridian Venture Center 10F, #60-24, Gasan-dong, Geumcheon-gu, Korea). Las reacciones de secuenciación se realizaron utilizando los primers AF27 y HR1492, obteniendo así dos secuencias parciales del gen, las cuales posteriormente se editaron y ensamblaron. La edición de las secuencias se realizó mediante el programa BioEdit v7.0.5, el cual posee un visor de cromatogramas que permite evaluar la calidad de las lecturas de acuerdo a la altura y equidistancia entre los picos así como a la presencia de “background”. De este

modo, se eliminaron, de cada secuencia parcial, las regiones donde el cromatograma mostraba baja calidad (Figura 3.8).



Figura 3.8: Visualización de cromatogramas mediante el programa BioEdit. Los cromatogramas que se observan corresponden a la secuencia parcial del clon 2 del tratamiento con PAB, obtenida mediante el primer AF-27. Se observan las diferencias de calidad en la señal de lectura: a) sector 5' de la secuencia donde los picos son bajos y se observa una proporción importante de background; b) porción intermedia de la lectura, de buena calidad. Los números en la parte superior de cada panel corresponden a las posiciones nucleotídicas.

Luego, las secuencias parciales de cada clon, se ensamblaron utilizando el programa Mafft-Win v6 (Kato *et al.*, 2002). Este programa no utiliza interfaz gráfica, sino que se ejecuta a través de líneas de comando. Mafft-Win permite alinear secuencias de manera más rápida y más precisa que otros programas similares (Kato *et al.*, 2002). De este modo se obtuvo una secuencia casi completa del gen para cada uno de los clones.

3.11.2.1. Análisis bioinformáticos

El análisis taxonómico de las secuencias se realizó mediante BLAST (Basic Local Alignment Search Tool, Atschul *et al.* 1990) y el clasificador naïve (Wang *et al.* 2007) de la base de datos RDP (Ribosomal Database Project, Schloss & Handelsman, 2004; Cole *et al.* 2005; <http://rdp.cme.msu.edu/>).

El programa BLAST toma una secuencia provista por el usuario, la cual se denomina secuencia problema o “query”, y explora una base de datos en busca de secuencias similares. En este trabajo se utilizó la implementación de BLAST provista por National Center for Biotechnology Information (NCBI, USA <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>). Como base de datos de referencia se utilizaron secuencias no redundantes de la base de datos Gen Bank.

La colección de secuencias de genes ribosomales RDP contiene un sub-set de secuencias que se encuentran en GenBank, las cuales han sido curadas teniendo en cuenta su calidad y ubicación taxonómica (Schloss & Handelsman, 2004). Además, cada una de ellas está alineada en base a la estructura secundaria del gen ribosomal 16S. La nomenclatura de las secuencias utilizadas por RDP corresponde a la propuesta en *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology* (Garrity *et al.*, 2004).

4. RESULTADOS

4.1. Impacto de la radiación en las distintas fracciones del plancton

Con el objeto de evaluar el efecto de la radiación en cada una de las poblaciones presentes en la muestra, se estimó la biomasa de cada una mediante la determinación de la cantidad de ADN retenida en cada uno de los filtros. El ADN obtenido para cada filtro se sometió a electroforesis en geles de agarosa 0,8% (Figura 4.1). La inspección visual de los geles indicó que en la población de T0 y a las expuestas sólo a UVA-PAR o sólo PAR (T0, PA y P, respectivamente; Figura 4.1), hubo en general una mayor cantidad de ADN que en las calles correspondientes a las muestras que recibieron más radiación (PAB, calles 5, 6, 7, 8).

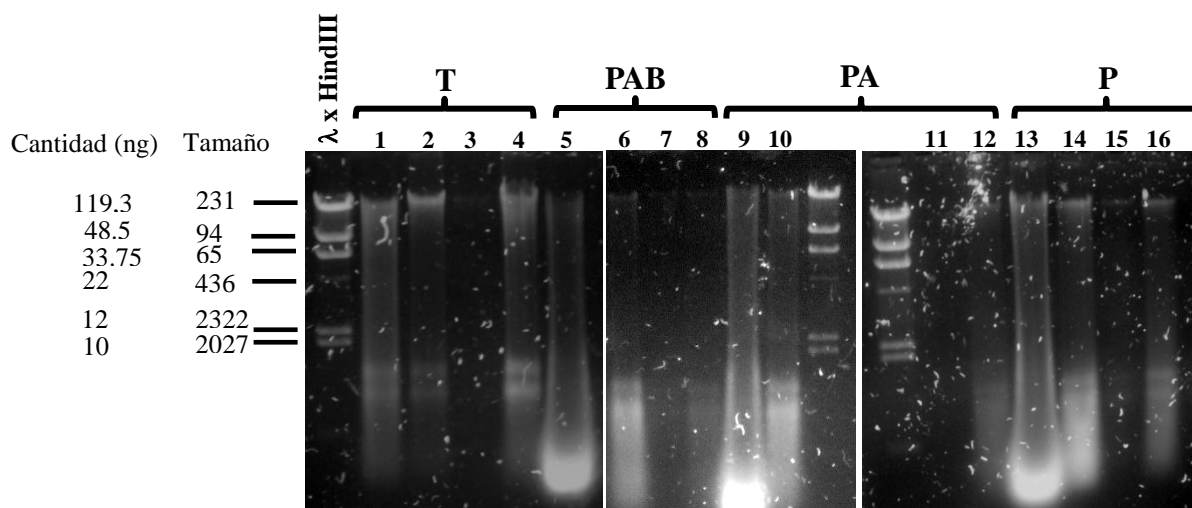


Figura 4.1. Electroforesis en gel de agarosa (0,8%) del ADN obtenido de las diferentes fracciones planctónicas retenidas en los filtros de distinto tamaño de poro. Las calles **1,5,9** y **13** corresponden a los filtros de 20 μm , las calles **2,6,10** y **14** a los filtros de 10 μm , las calles **3,7,11** y **15** a los filtros de 5 μm y las calles **4, 8, 12** y **16** a los filtros de 0,22 μm . En cada uno de los geles se incluyó un marcador de peso molecular (ADN del fago λ cortado por la enzima de restricción *HindIII*) presentando una cantidad conocida de ADN para cada una de las bandas que lo conforman. Se indica, a la izquierda, el tamaño y la cantidad de ADN correspondiente a cada banda del marcador de peso molecular. **T**: calles correspondientes a los filtros sin tratamiento de radiación; **PAB**: calles correspondientes a los filtros tratados con RUVA-B y PAR; **PA**: calles correspondientes a los filtros tratados con radiación UV-A y PAR; **P**: calles correspondientes a los filtros tratados con radiación PAR.

El resultado de la cuantificación por densitometría se detalla en la Tabla 4.1 y la Figura 4.2. En el microcosmos del tratamiento PAB la cantidad de ADN total luego de los 10 días de tratamiento fue menor comparada con los demás microcosmos. Se puede observar que en la fracción de entre 0,22 y 5 μm del tratamiento con PA hubo más cantidad de ADN que en T0 y los restantes tratamientos. La fracción correspondiente a organismos mayores que 10 μm presentó menor cantidad de ADN. En todos los microcosmos, así como en T0, la fracción que presentó menor cantidad de ADN fue la que se encuentra entre los 5 y los 10 μm , que es la correspondiente a nanoplancton.

Tabla 4.1: Cuantificación del ADN correspondiente a las poblaciones retenidas en los diferentes filtros luego de los 3 tratamientos (PAB, PA, P) y al comienzo del experimento (T0).

Tamaño de la población	T0	PAB	PA	P
	ADN (ng/ml de muestra filtrada)			
>20 μm	0,24	0,26	0,82	0,90
20-10 μm	0,19	0,06	0,46	0,71
10-5 μm	0,01	ND ¹	ND	0,05
5-0,22 μm	0,28	ND	0,54	0,09
ADN total	0,71	0,31	1,82	1,75

¹ND: no detectable

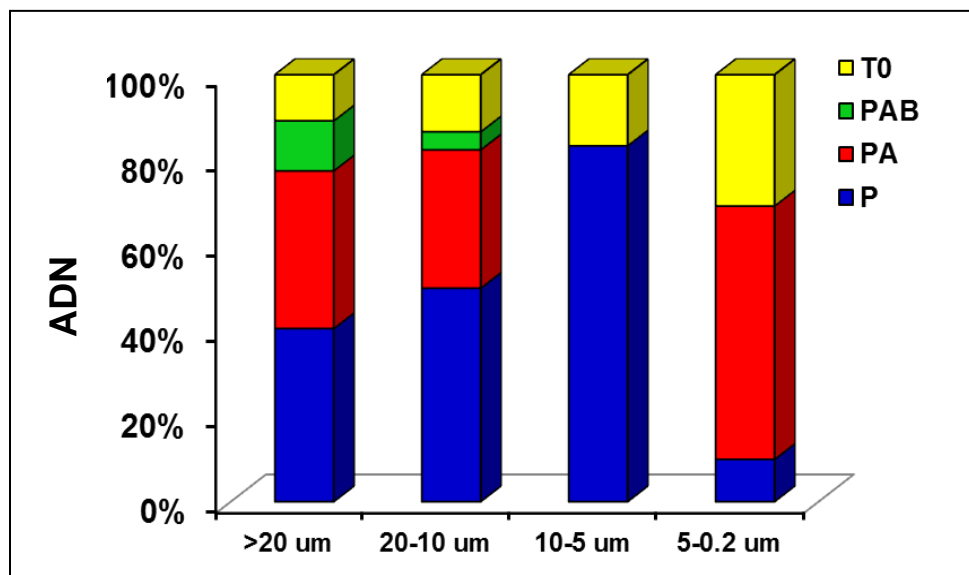


Figura 4.2. Distribución del ADN de las distintas fracciones celulares (> 20 μm ; 20-10 μm ; 10-5 μm ; 5-0,22 μm) presentes en la muestra no tratada (T0) y en las muestras correspondientes a los diferentes tratamientos (PAB, PA y P).

4.2. Obtención de las bibliotecas génicas del gen 16S de las poblaciones picoplanctónicas

4.2.1. Amplificación del gen 16S a partir del ADN recuperado de las poblaciones

Con el objeto de amplificar el gen 16S de la población procariótica (0,22-5 μm) de la muestra T0 y las resultantes luego de 10 días de tratamiento con radiación, se llevaron a cabo reacciones de PCR utilizando como molde el ADN recuperado de los filtros de 0,22 μm y los primers AF-27 y HR-1492 (sección 3.5, página 27). El análisis de los productos obtenidos en gel de agarosa 2% indicó en todos los casos la presencia de bandas del tamaño esperado (Figura 4.3).

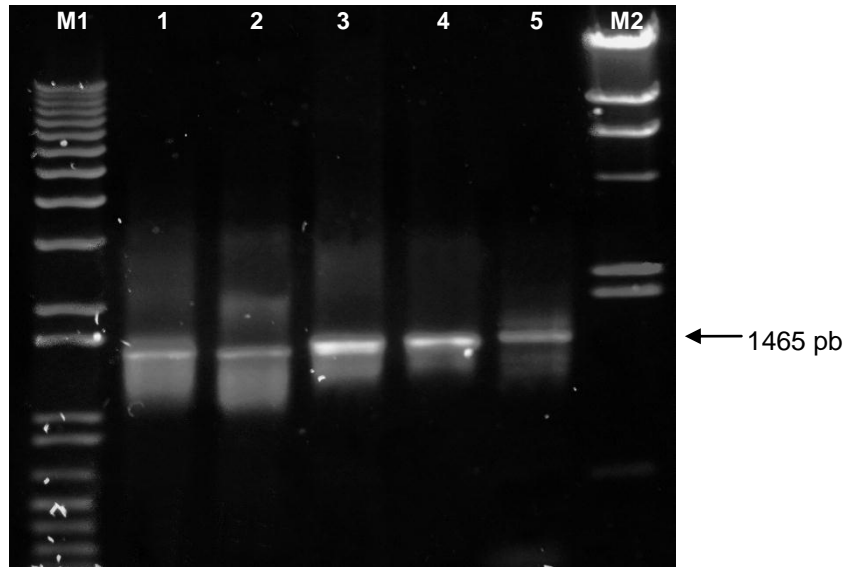


Figura 4.3: Electroforesis en gel de agarosa 2% de los fragmentos obtenidos por PCR utilizando como molde el ADN purificado de los filtros de 0,22 μm que contenían la fracción picoplanctónica tanto de la muestra natural (T0, calle 1) como de las provenientes de los tratamientos, PA, PAB y P (calles 2, 3, 4 respectivamente). La calle 5 corresponde a un control positivo (ADN genómico de *E. coli*). Las calles indicadas como M1 y M2 corresponden al marcador de peso molecular 1 kb plus y a ADN del fago λ cortado por la enzima de restricción *HindIII*, respectivamente (250 ng cada uno).

4.2.2. Construcción de bibliotecas génicas

Los fragmentos obtenidos mediante PCR según lo descrito en la sección anterior fueron purificados a partir de geles de agarosa preparativos. Estos amplicones fueron ligados en plásmidos y el producto obtenido fue clonado en *E. coli*. En todos los casos el protocolo ajustado para el clonado permitió obtener grandes cantidades (500-1000) de colonias recombinantes. El uso del método “blue/white screening” (sección 3.9.3, página 32), por otro lado, permitió determinar, con relativa sencillez, cuáles de esas colonias portaban plásmidos recombinantes.

La Figura 4.4 muestra, a manera de ejemplo, uno de los resultados de la transformación de los amplicones del tratamiento T0 para la relación molar inserto:vector 2:1.

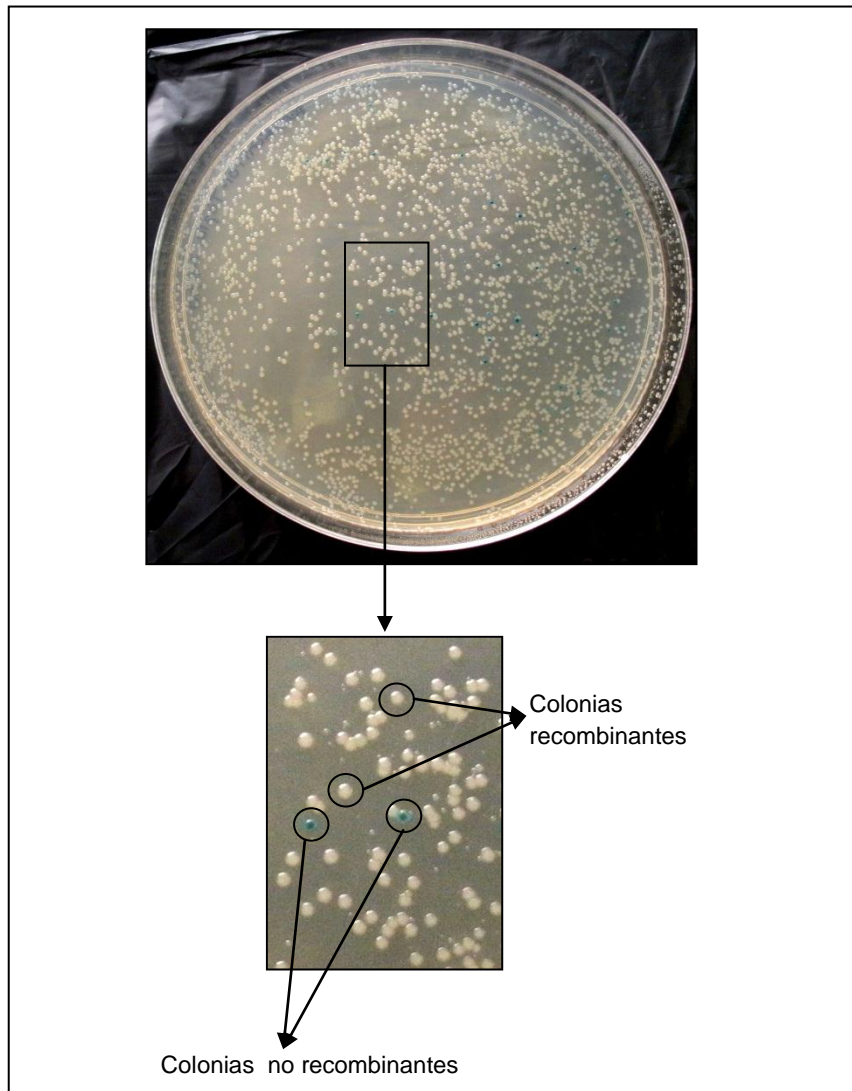


Figura 4.4: Colonias recombinantes obtenidas a partir de la ligación conteniendo el amplicón del gen 16S correspondiente a T0. Las colonias recombinantes presentan color blanco, mientras que las no recombinantes poseen color celeste.

4.2.3. Caracterización de los plásmidos recombinantes mediante PCR

Si bien las colonias blancas portan plásmidos recombinantes, fue necesario corroborar que las mismas poseían inserto y que dicho inserto tenía el tamaño esperado de aproximadamente 1500 pb. Para ello se realizaron reacciones de PCR utilizando un par de primers que reconocen las secuencias correspondientes a los promotores Sp6 y T7 que flanquean el sitio de clonado múltiple (ver Figura 3.6 de Materiales y Métodos, página 31).

Del total de colonias resultantes, se tomaron al azar 160 colonias blancas por cada uno de los tratamientos (i.e. 640 clones en total), las cuales fueron repicadas en forma de estría, como se detalla en el punto 3.9.3 de Materiales y Métodos. A partir de estas estrías se realizó una extracción plasmídica mediante *turboprep* (ver punto 3.10.1, página 33). Utilizando estos plásmidos como molde, se realizaron reacciones de PCR hasta identificar un mínimo de 35 clones con el inserto deseado, por tratamiento. Se estudiaron 195 clones: 55 clones del T0, 45 clones del tratamiento con P, 46 clones del tratamiento con PA y 49 clones con el tratamiento PAB.

En la Figura 4.5 se muestran algunos ejemplos de los resultados obtenidos en los análisis por electroforesis en geles de agarosa 2%. En algunas colonias recombinantes se observó la presencia de fragmentos más pequeños (≈ 500 pb), que podrían corresponder a deleciones del inserto. Estas últimas fueron descartadas en análisis posteriores.

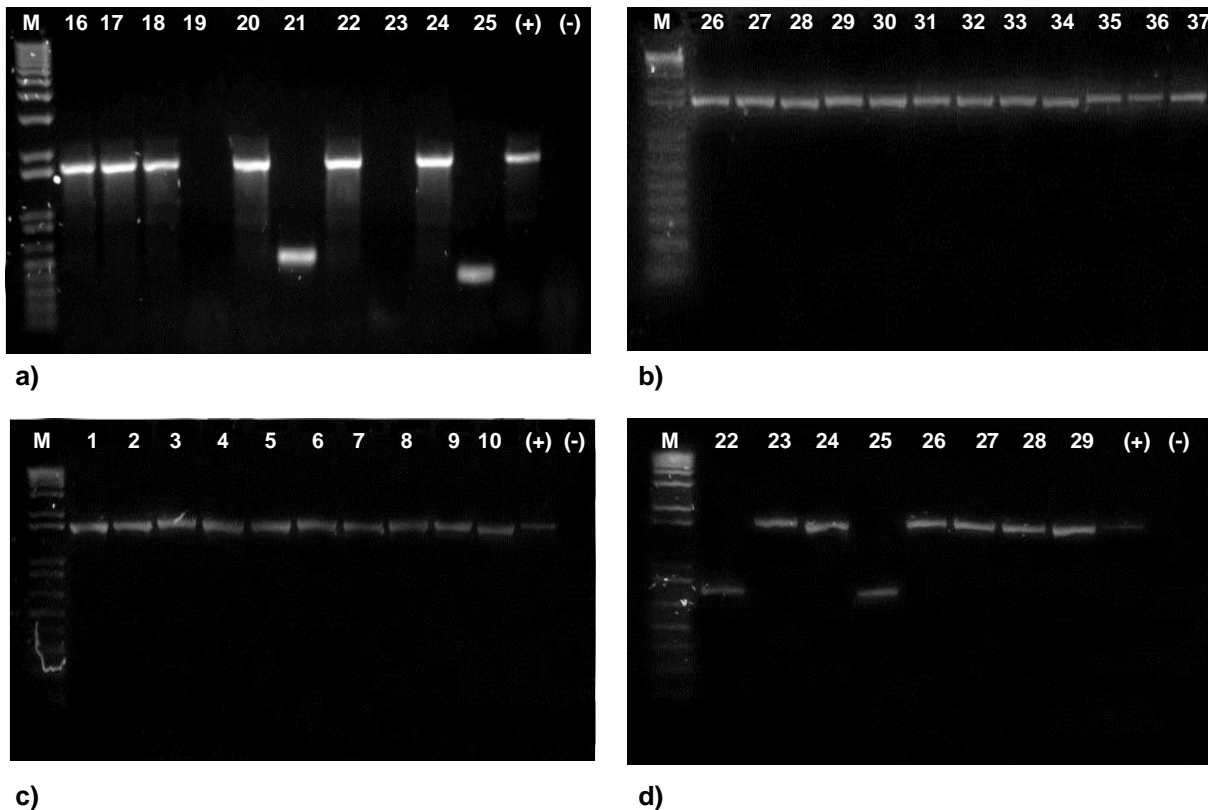


Figura 4.5: Electroforesis en geles de agarosa 2 % de fragmentos amplificados por PCR de algunos de los clones correspondientes a las 4 bibliotecas estudiadas. a) T0, calles 16-25: clones 16 a 25. b) P, calles 26-37: clones 26 a 37. c) PA, calles 1-10: clones 1 a 10. d) PAB, calles 22-29: clones 22 a 29. M: marcador de peso molecular (1 kb plus, 250 ng); (+): control positivo (ADN genómico de *E. coli*); (-): control negativo.

En la biblioteca correspondiente a T0 se estudiaron 38 clones con el inserto de interés, 44 en P y 43 para las bibliotecas correspondientes a PA y PAB (Tabla 4.2). Estos clones fueron analizados mediante enzimas de restricción y secuenciación como se describe en las secciones siguientes.

Tabla 4.2: Número de clones analizados por tratamiento.

TRATAMIENTO	clones analizados
T0	38
P	44
PA	43
PAB	43

4.3. Efecto de las distintas porciones de radiación sobre el picoplancton procariótico

4.3.1. Análisis mediante enzimas de restricción

Cada uno de los clones de las bibliotecas génicas de cada uno de los tratamientos que presentaban el inserto de interés (Tabla 4.2), fueron sometidos a digestión con enzimas de restricción para determinar y comparar los patrones de bandas obtenidos en cada caso. Una alícuota de los amplicones obtenidos según lo descrito en el punto anterior se trató por separado con dos enzimas, *EcoRI* y *HindIII*, haciendo un total de 336 reacciones de digestión. Los productos obtenidos fueron analizados mediante electroforesis en geles de agarosa 2%, manteniendo las condiciones de corrida constantes para cada caso. A los patrones obtenidos se les asignó un número identificador.

Los análisis realizados mediante la enzima *EcoRI* indicaron la presencia de 9 patrones de restricción o genotipos (Tabla 4.3). Ochenta clones presentaron genotipo 1:

23 clones de T0, 25 de P, 22 de PA y 10 del tratamiento con PAB. Sesenta y cinco clones presentaron genotipo 2: 6 clones de T0, 11 clones del tratamiento con P, 17 de PA y 17 de PAB. Cinco clones presentaron genotipo 6: 2 clones fueron del tratamiento con P y 3 de PA. En T0 1 clon presentó genotipo 3, 2 clones presentaron genotipo 4, 1 clon presentó genotipo 5, 2 clones presentaron genotipo 7, y los genotipos 8 y 9 fueron observados en un clon cada uno.

Tabla 4.3: Frecuencia de los 9 genotipos *EcoRI* en las bibliotecas construidas para T0 y cada uno de los tratamientos (P, PA, PAB).

TRATAMIENTO	GENOTIPO <i>EcoRI</i>									ND*
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	
T0	23	6	1	2	1		2	1	1	1
P	25	11				2				6
PA	22	17				3				1
PAB	10	31								2

* ND: no determinado

Los RFLP's realizados con la enzima *HindIII*, revelaron la presencia de 13 genotipos (Tabla 4.4). Cincuenta y siete clones presentaron genotipo 1, de los cuales 20 provinieron de T0, 11 de P, 7 de PA y 19 de PAB. Treinta y seis clones presentaron genotipo 8: 7 clones provenientes del tratamiento con P, 13 de PA y 16 de PAB. Dieciocho clones presentaron genotipo 7: 1 clon de T0, 6 clones del tratamiento con P y 11 de PA. El genotipo 2 se observó en 14 clones: 10 clones provinieron de T0, 2 del tratamiento con P, 1 clon de PA y 1 de PAB. Catorce clones presentaron genotipo 9, de los cuales 6 pertenecían al tratamiento con P y 8 a PA. El genotipo 6 fue observado en 1 clon de T0 y en 6 clones de P. Seis clones presentaron genotipo 6: 2 de PA y 4 de PAB. El genotipo 1 estuvo presente en 1 clon del tratamiento con PAB. Los genotipos 3, 4, 5, 10 y 11 fueron observados en un clon cada uno, todos pertenecientes a T0.

Tabla 4.4: Frecuencia de los 13 genotipos *Hind*III en las bibliotecas construidas para T0 y cada uno de los tratamientos (P, PA, PAB).

TRATAMIENTO	GENOTIPO <i>Hind</i> III													ND*
	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	
T0		20	10	1	1	1	1	1			1	1		1
P		11	2				6	6	7	6				6
PA	2	7	1					11	13	8				1
PAB	4	19	1						16				1	2

* ND: no determinado

Luego de determinar los patrones de cada clon con cada enzima por separado, se le asignó a cada uno un genotipo final, resultante de la combinación de los patrones individuales (ver Figura 3.7 de la sección Materiales y Métodos, página 35). Se observaron 24 genotipos combinados (Tabla 4.5). El genotipo 21 fue observado en 39 clones: 4 clones provenientes de T0, 11 de P, 6 de PA y 18 de PAB. Veinticinco clones presentaron genotipo 28: 11 clones eran de T0 y 14 clones del tratamiento con PAB. Dieciséis clones presentaron genotipo 17: 6 clones provenientes de P y 10 de PA. El genotipo 11 se observó en 15 clones: 13 clones pertenecientes a T0, 1 clon era de PA y 1 clon de PAB. Catorce clones presentaron genotipo 19: 6 clones provenían de P y 8 de PA. El genotipo 12 se observó en 10 clones de T0 y en 1 clon del tratamiento con PAB. Diez clones presentaron genotipo 18: 7 clones pertenecientes al tratamiento con P, 1 clon perteneciente a PA y 2 clones a PAB. Seis clones presentaron genotipo 10: 2 clones provenientes del tratamiento con PA y 4 clones de PAB. El genotipo 16 fue observado en 5 clones del tratamiento con P. El genotipo 62 se observó en 2 clones que provenían del tratamiento con P y en 1 clon de PA. Los genotipos 23, 27, 36, 41, 45, 54, 71, 81, 711 y 910 se observaron sólo en T0, en 1 clon cada uno. El genotipo 61 se presentó en 1 clon del tratamiento con P. Los genotipos 67 y 68 fueron observados sólo en el tratamiento con PA, en 1 clon cada uno. Por último, el genotipo 112 estuvo presente en 1 clon del tratamiento con PAB.

Tabla 4.5: Frecuencia de los 24 genotipos resultantes de combinar los patrones obtenidos por digestión con las enzimas *EcoRI* y *HindIII*, en los cuatro tratamientos.

TRATAMIENTO	GENOTIPO COMBINADO																							ND*			
	10	11	12	16	17	18	19	21	23	27	28	36	41	45	54	61	62	67	68	71	81	112	711		910		
T0		13	10					4	1	1		1	1	1	1					1	1		1	1		1	
P				5	6	7	6	11								1	2										6
PA	2	1			10	1	8	6			11						1	1	1								1
PAB	4	1	1			2		18			14											1					2

* ND: no determinado

La distribución de los diferentes patrones observados entre los distintos tratamientos se muestra en la Figura 4.6.

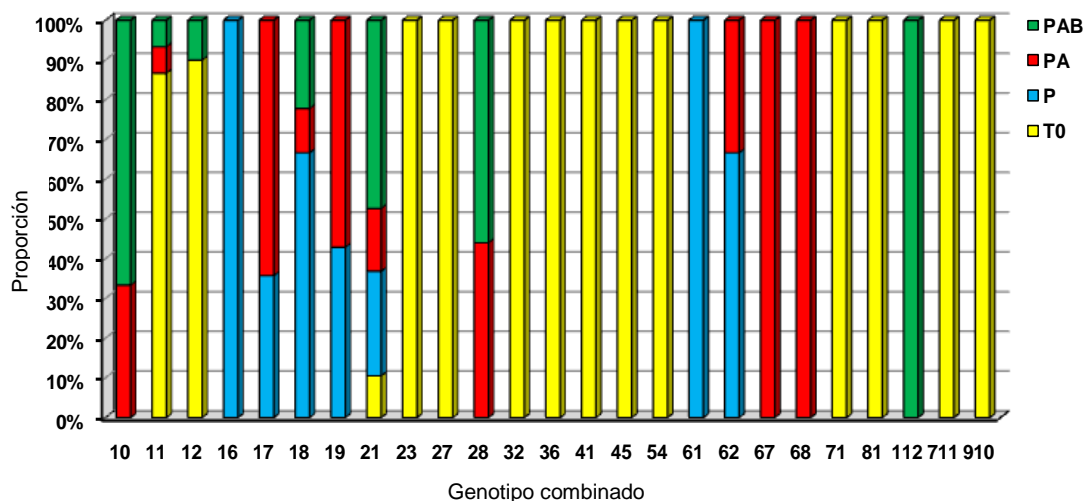


Figura 4.6: Porcentaje de cada genotipo presente en cada una de las bibliotecas generadas a partir de las muestras en el tiempo inicial (T0) y luego de los tres tratamientos con radiación en los experimentos de microcosmos (PAB, PA y P).

Los genotipos de mayor incidencia en la muestra natural (genotipos 11 y 12) fueron poco frecuentes o estuvieron ausentes en las bibliotecas de las muestras que fueron sometidas a los tratamientos con radiación (PAB, PA, P). Asimismo, los genotipos 23, 27, 36, 41, 45, 54, 71, 81, 711 y 910, si bien se encontraron en baja frecuencia, fueron observados sólo en la biblioteca de la muestra T0. El genotipo 21 (39 clones con dicho genotipo de un total de 158), estuvo presente en todas las bibliotecas. Sin embargo, del total de amplicones que exhibieron genotipo 21, un 46 % correspondió al tratamiento con PAB, mientras que el resto se encontró dividido en las tres bibliotecas restantes: 28, 16 y 10 % en P, PA y T0 respectivamente (Figura 4.6). Otro de los genotipos más frecuente presente en las muestras tratadas con radiación UV (PA y PAB) fue el 28, que representó el 34% y el 27% de las bibliotecas de PAB y PA respectivamente, mientras que no se encontró en la muestra sin tratar y a la proveniente del tratamiento con radiación visible (P). Aunque presente en menor frecuencia, este efecto también se observó para el genotipo 10.

4.3.2. Análisis mediante secuenciación

Ciento sesenta y siete clones seleccionados al azar de las 4 bibliotecas génicas fueron secuenciados y posteriormente sus secuencias fueron analizadas mediante el clasificador naïve (Wang *et al.* 2007) de la base de datos de secuencias ribosomales RDP (Schloss & Handelsman, 2004; Cole *et al.* 2005). El resultado de este análisis se muestra en la Tabla 4.6. Las secuencias de siete clones correspondieron a Bacterias no clasificadas: 2 clones de T0, 1 clon del tratamiento con PA y 4 clones de PAB. Sesenta y dos clones en total representaron al filum *Bacteroidetes*: 1 clon del tratamiento PA fue identificado a nivel de filum, 3 clones de PAB se identificaron a nivel del orden *Sphingobacteriales* (*Sphingobacteria*, *Bacteroidetes*), 1 clon de PAB se identificó dentro de la familia *Flammeovirgaceae* (*Sphingobacteriales*); 30 clones de P y 18 clones de PA fueron identificados a nivel del orden *Flavobacteriales* (*Flavobacteria*, *Bacteroidetes*); 2 clones de P y 1 clon de PA se identificaron como familia *Cryomorphaceae* (*Flavobacteriales*); 2 clones de PA y 2 clones de PAB se identificaron como género *Owenweeksia* (*Cryomorphaceae*); 2 clones de PA fueron identificados dentro del género *Polaribacter* (*Flavobacteriaceae*, *Flavobacteriales*).

El filum *Firmicutes* estuvo representado por 1 clon perteneciente a T0, identificado dentro del género *Tumebacillus* (*Bacillaceae*, *Bacillales*, *Bacilli*).

El filum *Proteobacteria* estuvo representado por 86 clones: 1 clon de T0 fue identificado a nivel de filum, 3 clones de T0 y 1 clon de PAB fueron identificados a nivel de la clase α -*proteobacteria*; 4 clones de T0, 10 de P, 1 clon de PA y 4 clones de PAB se identificaron a nivel de la familia *Rhodobacteraceae* (*Rhodobacterales*, α -*proteobacteria*); 2 clones del tratamiento P, 14 clones de PA y 24 clones de PAB representaron al género *Nereida* (*Rhodobacteraceae*); 6 clones de T0, 1 clon de PA y 3 clones de PAB fueron identificados dentro del género *Thalassobacter* (*Rhodobacteraceae*); 2 clones de T0 y 1 clon de PA se identificaron a nivel de la familia *Rhodospirillaceae* (*Rhodospirillales*, α -*proteobacteria*); 1 clon de PA se identificó dentro del género *Thalassobaculum* (*Rhodospirillaceae*); 7 clones de T0 representaron al generó *Pelagibacter* (SAR11, *Rickettsiales*, α -*proteobacteria*).

Dentro de T0 hubo 11 clones identificados como cloroplastos de Chlorophyta (Eucaria). Análisis realizados mediante comparaciones con varios grupos de Chlorophyta

indicaron que estas secuencias corresponden a la clase Prasinophyceae, la cual abarca organismos unicelulares muy pequeños ($\approx 0,8 \mu\text{m}$).

Tabla 4.6: Clasificación de las secuencias presentes en T0 y en los microcosmos tratados con P, PA y PAB, según la determinación realizada mediante el clasificador naïve RDP.

TAXONES						n° de secuencias			
Dominio	Filum	Clase	Orden	Familia	Género	T0	P	PA	PAB
<i>Bacteria</i>						2		1	4
	<i>Bacteroidetes</i>							1	
		<i>Sphingobacteria</i>							
			<i>Sphingobacteriales</i>						3
				<i>Flammeovirgaceae</i>					1
		<i>Flavobacteria</i>							
			<i>Flavobacteriales</i>				30	18	
				<i>Cryomorphaceae</i>			2	1	
					<i>Owenweeksia</i>			2	2
				<i>Flavobacteriaceae</i>					
					<i>Polaribacter</i>			2	
	<i>Firmicutes</i>								
		<i>Bacilli</i>							
			<i>Bacillales</i>						
				<i>Bacillaceae</i>					
					<i>Tumebacillus</i>	1			
	<i>Proteobacteria</i>					1			
		<i>α-proteobacteria</i>				3			1
			<i>Rhodobacterales</i>						
				<i>Rhodobacteraceae</i>		4	10	1	4
					<i>Nereida</i>		2	14	24
					<i>Thalassobacter</i>	6		1	3
			<i>Rhodospirillales</i>						
				<i>Rhodospirillaceae</i>		3		1	
					<i>Thalassobaculum</i>			1	
			<i>Rickettsiales</i>						
				<i>SAR 11</i>					
					<i>Pelagibacter</i>	7			
<i>Eucaria</i>									
	<i>Chlorophyta (cloroplastos)</i>					11			

Los 167 clones también fueron analizados mediante comparación con secuencias de la base de datos del NCBI utilizando el programa BLAST (Atschul *et al.*, 1990), puesto que este programa es ampliamente utilizado para realizar estudios taxonómicos. Luego de este análisis se observó que había un total de 17 taxones representados (Tabla 4.7). El dominio Bacteria estuvo representado por 39 clones: 2 clones correspondientes a T0, 25 a PA y 12 a PAB. 2 clones de T0 fueron identificados a nivel del filum *Actinobacteria*. Cuarenta clones representaron al filum *Bacteroidetes*: 31 clones de P y 2 clones de PA se identificaron a nivel de filum; 1 clon de PAB fue identificado a nivel de la familia *Cytophagaceae* (*Cytophagales*, *Cytophagia*, *Bacteroidetes*) y 3 clones del mismo tratamiento correspondieron al género *Cytophaga* (*Cytophagaceae*); 1 clon de PA se identificó a nivel de la clase *Flavobacteria*, 2 clones de PA se identificaron a nivel de especie, uno como *Coccinistipes vermicola* (*Coccinistipes*, *Flavobacteraceae*, *Flavobacteriales*, *Flavobacteria*) y otro como *Polaribacter irgensii* (*Polaribacter*).

El filum *Firmicutes* estuvo representado por 1 clon de T0 identificado en el orden *Bacillales* (*Bacilli*, *Firmicutes*).

Setenta y cuatro clones representaron al filum *Proteobacteria*: 1 clon de T0 fue identificado a nivel de filum; 12 clones de T0, 2 de PA y 1 clon de PAB se identificaron a nivel de la clase *α -proteobacteria*; 6 clones de T0, 10 de P y 1 clon de PAB fueron identificados como familia *Rhodobacteraceae*; 2 clones de P, 12 PA y 22 de PAB se identificaron como especie *Nereida ignava* (*Nereida*); 2 clones de PAB fueron identificados como especie *Thalassobacter stenotrophicus* (*Thalassobacter*); 3 clones de T0 fueron identificados a nivel de género, 1 clon como género *Candidatus Odysella* (*Rickettsiales*) y los otros 20 clones como género *Pelagibacter*.

Once clones de T0 fueron identificados como cloroplastos de la clase *Prasinophyceae* (*Chlorophyta*, *Eucaria*).

Tabla 4.7: Clasificación de las secuencias presentes en T0 y en los microcosmos tratados con P, PA y PAB, según análisis realizados mediante BLAST.

TAXONES							n° de secuencias			
Dominio	Filum	Clase	Orden	Familia	Género	Especie	T0	P	PA	PAB
<i>Bacteria</i>							2		25	12
<i>Actinobacteria</i>							2			
<i>Bacteroidetes</i>								31	2	
<i>Cytophagia</i>										
<i>Cytophagales</i>										
<i>Cytophagaceae</i>										1
<i>Cytophaga</i>										3
<i>Flavobacteria</i>								1		
<i>Flavobacteriales</i>										
<i>Flavobacteraceae</i>										
<i>Coccinistipes</i>										
<i>Coccinistipes vermicola</i>									1	
<i>Polaribacter</i>										
<i>Polaribacter irgensii</i>									1	
<i>Firmicutes</i>										
<i>Bacilli</i>										
<i>Bacillales</i>							1			
<i>Proteobacteria</i>							1			
<i>α-proteobacteria</i>							12		2	1
<i>Rhodobacterales</i>										
<i>Rhodobacteraceae</i>							6	10		1
<i>Nereida</i>										
<i>Nereida ignava</i>								2	12	22
<i>Thalassobacter</i>										
<i>Thalassobacter stenotrophicus</i>										2
<i>Rickettsiales</i>										
<i>Candidatus Odysella</i>							1			
<i>Sar 11</i>										
<i>Pelagibacter</i>							2			
<i>Eucaria</i>										
Prasinophyceae (cloroplastos)							11			

Con los resultados obtenidos mediante los análisis con el clasificador naïve de RDP y con BLAST, se construyó una tabla incluyendo sólo las categorías taxonómicas que correspondieron en ambos análisis (Tabla 4.8).

Según esta nueva tabla, 4 clones de T0, 25 de PA y 12 de PAB fueron identificadas a nivel de Dominio (Bacteria). Cuarenta clones se identificaron dentro del filum *Bacteroidetes*, donde 31 clones provenientes del tratamiento con P, 2 de PA y 4 de PAB se identificaron a nivel de filum, 1 clon de P y 1 clon de PA fueron identificados dentro del orden *Flavobacteriales*, y 1 clon proveniente del tratamiento con PA correspondió al género *Polaribacter*. Un clon de T0 se identificó dentro del orden *Bacillales*.

Se identificaron 74 clones pertenecientes al filum *Proteobacteria*: 1 clon de T0 se identificó a nivel de filum, 13 clones de T0, 2 de PA y 1 de PAB se identificaron a nivel de la clase *α-proteobacteria*, 6 clones de T0, 10 de P y 1 de PAB fueron identificados a nivel de la familia *Rhodobacteraceae*, 2 clones de P, 12 de PA y 22 de PAB representaron al género *Nereida*, 2 clones de PAB representaron al género *Thalassobacter*, y 2 clones de T0 se identificaron dentro del género *Pelagibacter*.

Once clones de T0 fueron identificados como cloroplastos de Chlorophyta.

Tabla 4.8: Clasificación de las secuencias provenientes de T0, P, PA y PAB según los resultados comunes a los análisis realizados mediante el clasificador naïve de la base de datos RDP y BLAST.

TAXONES						n° de secuencias			
Dominio	Filum	Clase	Orden	Familia	Género	T0	P	PA	PAB
<i>Bacteria</i>						4		25	12
<i>Bacteroidetes</i>							31	2	4
<i>Flavobacteria</i>									
<i>Flavobacteriales</i>							1	1	
<i>Flavobacteriaceae</i>									
<i>Polaribacter</i>								1	
<i>Firmicutes</i>									
<i>Bacilli</i>									
<i>Bacillales</i>						1			
<i>Proteobacteria</i>						1			
<i>α-proteobacteria</i>						13		2	1
<i>Rhodobacterales</i>									
<i>Rhodobacteraceae</i>						6	10		1
<i>Nereida</i>							2	12	22
<i>Thalassobacter</i>									2
<i>Rickettsiales</i>									
<i>SAR 11</i>									
<i>Pelagibacter</i>						2			
<i>Eucaria</i>									
<i>Chlorophyta (cloroplastos)</i>						11			

5. DISCUSIÓN

Aportes a la metodología de estudio del efecto de la RUV. En el presente trabajo se emplearon experimentos de incubación a largo plazo con RUV en conjunto con técnicas metagenómicas para estudiar el efecto de esta radiación sobre las fracciones más pequeñas de la comunidad planctónica de la zona del estuario del Río Chubut. El estudio de los efectos que causan variables específicas, como la radiación ultravioleta, sobre la composición de poblaciones naturales en sistemas simulados, constituye un gran desafío debido a las diversas variables a controlar como así también a la presencia de factores inherentes a la incubación, que no son eludibles. Sin embargo, el diseño experimental utilizado (Figura 3.1, página 23) permite evaluar en forma más precisa la sensibilidad de la flora bacteriana a la radiación ultravioleta ya que permite independizarnos de las condiciones climatológicas y experimentar bajo condiciones más “controladas” cercanas al laboratorio. El estudio realizado constituye un trabajo que no se había llevado a cabo hasta el momento para la zona de estudio propuesta, y permitió obtener información sobre diversos microorganismos picoplanctónicos procariontes (Bacteria) y eucariotes (Chlorophyta), de los cuales no se contaba anteriormente. Los datos presentados en el presente trabajo demuestran la importancia y utilidad de las técnicas moleculares para el progreso y profundización del conocimiento sobre efecto de la RUV en los microorganismos piconanoplanctónicos.

Efecto de la RUV sobre la concentración de ADN planctónico. Si bien se cuenta con pocas observaciones para evaluar la significancia de los resultados obtenidos, es importante destacar que en el microcosmos sometido al tratamiento PAB la cantidad total de ADN luego de los diez días de tratamiento fue menor con respecto a T0 y a los restantes tratamientos (Tabla 4.1, página 40). Esto se debe al hecho de haber recibido radiación de menor longitud de onda, lo que indicaría que la radiación UV-B podría provocar cambios en las comunidades planctónicas. Si bien estudios previos indican que las fracciones de menor tamaño se verían más perjudicadas por la radiación debido a su mayor relación superficie/volumen (García-Pichel, 1994), los resultados aquí presentados indicaron que los organismos entre 0,22 y 5 µm experimentan un mayor crecimiento en el caso del tratamiento con PA. Esto se contrapone a lo observado para las células mayores

que 10 μm , en las cuales la cantidad de ADN recuperado fue inversamente proporcional a la longitud de onda recibida (Tabla 4.1, página 40). Estos datos sugieren que la fracción correspondiente a células con un tamaño de entre 0,22 y 5 μm crecería de manera más eficiente en ausencia de RUV-B y en presencia de radiación UV-A y PAR, en comparación con las fracciones mayores.

Efecto de la RUV sobre el picoplancton

Análisis mediante PCR-RFLP. Al comienzo de la experiencia (T0) se observó la presencia de un mayor número de genotipos que en las muestras luego de ser tratadas con P, PA y PAB. En forma análoga, los genotipos 10, 16, 17, 18, 19, 28, 61, 61, 62, 67, 68 y 112 surgieron luego de aplicar los tratamientos con P, PA y PAB. Estas observaciones sugieren que algunos microorganismos presentes al inicio del experimento estaban en una proporción muy baja para ser detectada, pero que las condiciones experimentales favorecieron el enriquecimiento en representantes de ciertos genotipos, permitiendo que éstos sean detectados luego de los tratamientos. Del mismo modo, estas condiciones serían perniciosas para otros organismos de la flora microbiana estudiada, ya que si bien fueron detectados en baja proporción en T0, no se manifestaron en ninguna de las poblaciones tratadas.

Es importante destacar que se observaron variaciones importantes, no sólo en la presencia sino también en la frecuencia con la que los diferentes genotipos se encontraron representados luego de que las muestras recibieran distintas intensidades de RUV (Tabla 4.5 y Figura 4.6, páginas 48 y 49, respectivamente). En este sentido un 74% de los clones del microcosmos sometido a RUV-B pertenecían a sólo dos genotipos (21 y 28). Del mismo modo, los genotipos 16, 17, 19, 61, 62, 67 y 68 fueron detectados sólo en los microcosmos que recibieron P y PA. Esto sugiere que algunos microorganismos podrían verse afectados negativamente por los efectos de la RUV-B. Si bien en los microcosmos tratados con PAB aparecieron dos genotipos que estuvieron ausentes en los otros tratamientos, la frecuencia de los mismos fue muy baja como para realizar especulaciones al respecto.

Análisis de la composición taxonómica mediante secuenciación. El análisis de filiación taxonómica de 167 clones de las poblaciones picoplanctónicas indicó la presencia de organismos pertenecientes a varios taxones (Tabla 4.6, página 51).

La filiación taxonómica de cada clon se llevó a cabo aplicando dos programas que utilizan algoritmos y base de datos diferente, el clasificador naïve de RDP a través del servicio web proporcionado por RDP II (Cole *et al.*, 2005) y el programa BLAST (Atschul *et al.* 1990) proporcionado por NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>). Si bien la comparación de los análisis realizados indicó que la filiación taxonómica fue similar con ambos programas, mediante el clasificador naïve fue posible corroborar la filiación taxonómica de clones que, mediante BLAST habían sido identificados sólo a nivel de Dominio. De este modo pudieron confirmarse los cambios observados en la composición taxonómica bajo los diferentes tratamientos con RUV.

Los resultados obtenidos de los análisis con RDP y BLAST, indicaron que el único taxón que estuvo presente en las cuatro poblaciones estudiadas fue la familia *Rhodobacteraceae*, encontrándose predominantemente en la muestra sometida bajo el tratamiento PAB. Además, el 94% de los clones identificados como genotipo 21 mediante los análisis de restricción resultaron pertenecientes a la familia *Rhodobacteraceae* luego de la secuenciación de los mismos. Esta observación concuerda con resultados obtenidos por Peressutti y colaboradores que indican, que este grupo se encuentra presente en la flora correspondiente a la zona del estuario del Río de la Plata y aguas de la región de Mar del Plata (Estación de estudios ambientales EPEA, Peressutti *et al.*, 2010).

La comparación de los resultados obtenidos entre T0 y los tres microcosmos, indicó que al inicio del experimento (T0) la población natural se encontraba dominada por representantes de α -*Proteobacteria*. Otros grupos de investigación han encontrado que este grupo se manifiesta como dominante en comunidades picoplanctónicas de zonas estuarinas como la estudiada en el presente trabajo (Henriques *et al.*, 2004; Bernhard *et al.*, 2005), al igual que en aguas de mar de la costa de distintas regiones (Pommier *et al.*, 2007; Kirchman *et al.*, 2010). Más aún, un trabajo llevado a cabo en la región sub-Antártica del Mar Argentino muestra que las α -*Proteobacterias* constituyen unos de los grupos más importantes de la comunidad procariota marina (Prabakaran *et al.*, 2006).

Los géneros *Pelagibacter* (*Proteobacteria*) y *Tumebacillus* (*Firmicutes*), aunque en baja proporción, también se observaron únicamente en la muestra inicial. Este resultado implicaría que los tratamientos con RUV y/o las condiciones experimentales a los cuales

son sometidos desfavorecen su desarrollo, resultando completamente ausentes en las bibliotecas de las muestras tratadas.

En población T0 se observó que un 29% de las secuencias analizadas correspondieron a cloroplastos del filum Chlorophyta (Eucaria). Análisis realizados mediante BLAST, indicaron que dichas secuencias corresponden a organismos del género *Ostreococcus* (Mamiellales, Prasinophyceae, Chlorophyta), quienes presentan un tamaño aproximado de 0,8 μm , por lo cual quedan retenidos en el filtro de 0,22 μm . Estos organismos, se encuentran entre los eucariotas de vida libre más pequeños conocidos (Courtis *et al.*, 1998; Derelle *et al.*, 2006). Sin embargo, no se observaron secuencias de Prasinophyceae en ninguno de los microcosmos, lo que podría indicar su sensibilidad a los tratamientos impuestos, provocando que la proporción de estos organismos sea tan baja en las poblaciones tratadas, que no pueda detectarse.

En las tres poblaciones expuestas a RUV se observaron representantes del filum *Bacteroidetes*, los cuales no fueron detectados en el T0. Trabajos previos han demostrado que este filum es dominante en diversas comunidades picoplanctónicas en zonas de estuarios y de lagos (Henriques *et al.*, 2004; Van der Gucht *et al.*, 2005; Pommier *et al.*, 2007; Peressutti *et al.*, 2010). El mismo también ha sido encontrado en gran proporción en la región sub-Antártica del Mar Argentino (Prabakaran *et al.*, 2006). Sin embargo en nuestro trabajo, no se pudo detectar este filum en la muestra natural no tratada (T0) sino que se observaron luego de los 10 días de tratamiento. Esto sugeriría que, si bien se encontraban presentes en la muestra original, su proporción era baja pero las condiciones de incubación beneficiaron su crecimiento y es por ello que no sólo son detectadas únicamente en los tres microcosmos sino que predominan en el tratado sólo con P (ausencia de radiación UV).

El género *Nereida* (*Proteobacteria*) también se observó sólo en las poblaciones que estuvieron bajo los tratamientos P, PA y PAB, siendo predominante en la población del tratamiento PAB. Como se ha mencionado anteriormente, este grupo se vio favorecido respecto de los demás integrantes de la población por las condiciones inherentes a los experimentos. Sin embargo el predominio de este género en la población expuesta a la RUV-B podría indicar su mayor resistencia a los efectos nocivos de esta radiación en conjunto con la disminución de microorganismos competidores, que sí serían afectados por la RUV-B. Una posibilidad, es que los microorganismos pertenecientes al género *Nereida* podrían contar con mecanismos más eficientes de reparación del ADN

favoreciendo su desarrollo en el microcosmos expuesto a RUV-B. Esta hipótesis debería ser estudiada en profundidad. Una segunda opción es que el género se adapte mejor a condiciones de estrés que el resto de los integrantes de la población. En este sentido, el estudio realizado por Dang y colaboradores (Dang *et al.*, 2008) indica que los miembros del grupo *Rhodobacterales*, dentro del cual está incluido el género *Nereida*, son capaces de responder favorablemente a condiciones de estrés, constituyendo un grupo colonizador primario primordial de superficies en ambientes marinos, lo que se ajusta con los resultados observados.

En la población expuesta al tratamiento con P se observó una menor diversidad taxonómica, ya que hubo sólo 4 taxones con un predominio del orden *Flavobacteriales* (73%). Esto podría ser atribuido a la ausencia de radiación UV-A, ya que es esta radiación la que induce mayormente la reparación foto-enzimática mediante la expresión de la enzima fotoliasa, responsable de la reparación del daño en el ADN (Kaiser & Herndl, 1997).

En conjunto, las fluctuaciones en la presencia/ausencia y proporciones de los diferentes taxones presentes en las distintas poblaciones estudiadas indicarían que las distintas longitudes de onda a las que fueron expuestos los tratamientos P, PA y PAB ejercen un efecto importante en la composición taxonómica de la comunidad planctónica natural del estuario de Río Chubut. Sin embargo, hay que tener en cuenta que otros factores, como la ausencia de organismos predadores (i.e. zooplancton, eliminado por filtración antes de la incubación de las sub-muestras) y las condiciones propias de incubación (Piquet *et al.*, 2008, 2010), también podrían estar influyendo en las variaciones observadas.

6. CONCLUSIONES

Los resultados presentados en este trabajo indican que el efecto de la radiación ultravioleta recibida por la población piconanoplanctónica de la zona del estuario del Río Chubut modificó la composición taxonómica de la misma.

Por otro lado, las técnicas moleculares preexistentes utilizadas en este trabajo demostraron ser útiles para estudiar los efectos de la radiación UV sobre la composición taxonómica del piconanoplancton.

7. BIBLIOGRAFÍA

Abramoff M. D., Magelhaes P. J. & Ram S. J. 2004. *Image Processing with ImageJ*. Biophotonics International 11: 36-42.

Acinas S. G., Marcelino L. A., Klepac-Ceraj V. & Polz M. F. 2004. *Divergence and Redundancy of 16S rRNA Sequences in Genomes with Multiple rrn Operons*. Journal of Bacteriology 186: 2629-2635.

Altschul S. F., Gish W., Miller W., Myers E. W. & Lipman D. J. 1990. *Basic Local Alignment Search Tool*. Journal of Molecular Biology 215: 403-410.

Amann R. I., Ludwig W. & Schleifer K. H. 1995. *Phylogenetic Identification and in situ Detection of Individual Microbial Cells without Cultivation*. Microbiology and Molecular Biology Reviews 59: 143-169.

Arrieta J. M., Weinbauer M. G. & Herndl G. J. 2000. *Interspecific Variability in Sensitivity to UV Radiation and Subsequent Recovery in Selected Isolates of Marine Bacteria*. Applied and Environmental Microbiology 66:1468-1473.

Bernhard A. E., Colbert D., McManus J. & Field K. G. 2005. *Microbial Community Dynamics Based on 16S rRNA Gene Profiles in a Pacific Northwest Estuary and its Tributaries*. FEMS Microbiology Ecology 52: 115-128.

Bintrim S. B., Donohue T. J., Handelsman J., Roberts G. P. & Goodman R. M. 1997. *Molecular Phylogeny of Archaea from Soil*. Proceedings of the National Academy of Science of the USA 94: 277-282.

Blackwood C. B., Oaks A. & Buyer J. S. 2005. *Phylum and Specific PCR Primers for General Microbial Community Analysis*. Applied and Environmental Microbiology 71: 6193-6198.

Brosius J., Palmer M. L., Kennedy P. J. & Noller H. F. 1978. *Complete Nucleotide Sequence of a 16S Ribosomal RNA Gene from Escherichia coli*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA 75: 4801-4805.

Brown M. V., Philip G. K., Bunge J. A., Smith M. C., Bissett A., Lauro F. M., Fuhrman J. A. & Donachie S. P. 2009. *Microbial Community Structure in the North Pacific Ocean*. The ISME Journal 3: 1374-136.

Callieri C. & Stockner J. G. 2002. *Freshwater Autotrophic Picoplankton: a Review*. Journal of Limnology 61: 1-14.

Cole J. R., Chai B., Farris R. J., Wang Q., Kulam S. A., McGarrell D. M., Garrity G. M. & Tiedje J. M. 2005. *The Ribosomal Database Project (RDP-II): Sequences and Tools for High-throughput rRNA Analysis*. Nucleic Acids Research 33: 294-296.

Cole J. R., Wang Q., Cardenas E., Fish J., Chai B., Farris R. J., Kulam-Syed-Mohideen A. S., McGarrell D. M., Marsh T., Garrity G. M. & Tiedje J. M. 2009. *The Ribosomal Database Project: Improved Alignments and New Tools for rRNA Analysis*. Nucleic Acids Research 37: 2141-2145.

Cotner J. B. & Biddanda B. A. 2002. *Small Players, Large Role: Microbial Influence on Biogeochemical Processes in Pelagic Aquatic Ecosystems*. Ecosystems 5: 105-121.

Courtis C., Perasso R., Chrétiennot-Dinet M-J., Gouy M., Guillou L. & Troussellier M. 1998. *Phylogenetic Analysis and Genome Size of *Ostreococcus tauri* (Chlorophyta, Prasinophyceae)*. Journal of Phycology 34: 844-849.

Culley A. I., Lang A. S. & Suttle C. A. 2006. *Metagenomic Analysis of Coastal RNA Virus Communities*. Science 312: 1795-1808

Dajoz, R. 2001. *Tratado de Ecología*. Mundi-Prensa Libros, Barcelona.

Dang H., Li T., Chen M. & Huang G. 2008. *Cross-Ocean Distribution of Rhodobacterales Bacteria as Primary Surface Colonizers in Temperate Coastal Marine Waters*. Applied and Environmental Microbiology 74: 52-60.

Derelle E., Ferraz C., Rombauts S., Rouzé P., Worden A. Z., Robbens S., Partensky F., Degroeve S., Echeynié S., Cooke R., Saeys Y., Wuyts J., Jabbari K., Bowler C., Penaud O., Piégu B., Ball S. G., Ral J-P., Bouget F-Y., Piganeau G., De Baets B., Picard A., Delseny M., Demaille J. & Van de Peer Y. 2006. *Genome Analysis of the Smallest Free-Living Eukaryote *Ostreococcus tauri* Unveils many Unique Features*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA 103: 11647-11652.

- Doyle J. J. & Doyle J. L. 1987. *A Rapid DNA Isolation Procedure for Small Quantities of Fresh Leaf Tissue*. *Phytochemical Bulletin* 19: 11-15.
- Fenchel T. & Finlay B. J. 2004. *The Ubiquity of Small Species: Patterns of Local and Global Diversity*. *Bioscience* 54: 777-784.
- Fernández Zenoff, V. Siñeriz F. & Farías M. E. 2006. Diverse Responses to UV-B Radiation and Repair Mechanisms of Bacteria Isolated from High-Altitude Aquatic Environments. *Applied Environmental Microbiology* 72: 7857-7863.
- Garcia-Pichel F. 1994. *A Model for Internal Self-Shading in Planktonic Organisms and its Implications for the Usefulness of Ultraviolet Sunscreens*. *Limnology and Oceanography* 39: 1704-1717.
- Garrity G. M., Bell J. A. & Liburn T. G. 2004. *Taxonomic Outline of Prokaryotes*. *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, 2nd edn. Release 5.0. Springer-Verlag, NY.
- Gonçalvez R. J., Villafañe V. E. & Helbling E. W. 2002. *Photorepair Activity and Protective Compounds in two Freshwater Zooplankton Species (Daphnia menucoensis and Metacyclops mendocinus) from Patagonia, Argentina*. *Photochemical and Photobiological Sciences* 1: 996-1000.
- Gutell R. R., Larsen N. & Woese C. R. 1994. *Lessons from an Evolving rRNA: 16S and 23S rRNA Structures from a Comparative Perspective*. *Microbiological Reviews* 58: 10-26.
- Häder D.-P., Kumar H. D., Smith R. C. & Worrest R. C. 2007. *Effects of Solar UV Radiation on Aquatic Ecosystems and Interactions with Climate Change*. *Photochemical and Photobiological Sciences* 6: 267-285.
- Handelsman J. 2004. *Metagenomics: Application of Genomics to Uncultured Microorganisms*. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 68: 669-685.
- Helbling E. W., Buma A. G. J., van de Poll W., Fernández Zenoff M. V. & Villafañe V. E. 2008. *UVR-Induced Photosynthetic Inhibition Dominates over DNA Damage in Marine Dinoflagellates Exposed to Fluctuating Solar Radiation Regimes*. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* 365: 96-102.

- Henne A., Schmitz R. A., Bömeke M., Gottschalk G. & Daniel R. 2000. *Screening of Environmental DNA Libraries for the Presence of Genes Conferring Lipolytic Activity on Escherichia coli*. Applied and Environmental Microbiology 66: 3113-3116.
- Henriques I. S., Almeida A., Cunha A. & Correia A. 2004. *Molecular Sequence Analysis of Prokaryotic Diversity in the Middle and Outer Sections of the Portuguese Estuary Ria de Aveiro*. FEMS Microbiology Ecology 49:269-279.
- Hobbie J. E., Daley R. J. & Jasper S. 1977. *Use of Nucleopore Filters for Counting Bacteria by Fluorescence Microscopy*. Applied and Environmental Microbiology 33: 1225-1228
- Jeffrey W. H., Pledger R. J., Aas P., Hager S., Coffin R. B., von Haven R. & Mitchell D. L. 1996. *Diel and Depth Profiles of DNA Photodamage in Bacterioplankton Exposed to Ambient Solar Ultraviolet Radiation*. Marine Ecology Progress Series 137: 283-291.
- Jones L. R., Zandomeni R. & Weber E. L. 2002. *Quasispecies in the 5' Untranslated Genomic Region of Bovine Viral Diarrhoea Virus from a Single Individual*. Journal of General Virology 83: 2126-2168.
- Kaiser E. & Herndl G. J. 1997. *Rapid Recovery of Marine Bacterioplankton Activity after Inhibition by UV Radiation in Coastal Waters*. Applied and Environmental Microbiology 62: 4026-4031.
- Katoh K., Misawa K., Kuma K. & Miyata T. 2002. *MAFFT: a Novel Method for Rapid Multiple Sequence Alignment Based on Fast Fourier Transform*. Nucleic Acids Research 30: 3059-3066.
- Kemp P. F. & Aller J. Y. 2004. *Bacterial Diversity in Aquatic and Other Environments: What 16S rDNA Libraries Can Tell Us*. FEMS Microbiology Ecology 47: 161-177.
- King B. J., Hoefel D., Wong P. E. & Monis P.T. 2010. *Solar Radiation Induces Non-Nuclear Perturbations and a False Start to Regulated Exocytosis in Cryptosporidium parvum*. PLoS One 5: e11773.
- Kirchman D. L., Cottrell M. T. & Lovejoy C. 2010. *The Structure of Bacterial Communities in the Western Arctic Ocean as Revealed by Pyrosequencing of 16S rRNA Genes*. Environmental Microbiology 12: 1132-1143.

Lane D. J., Pace B., Olsen G. J., Stahl D. A., Sogin M. L. & Pace N. R. 1985. *Rapid Determination of 16S Ribosomal RNA Sequences for Phylogenetic Analyses*. Proceedings of the National Academy of Science of the USA 82: 6955-6959.

Lewis L. A. & Lewis P. O. 2005. *Unearthing the Molecular Phylodiversity of Desert Soil Green Algae (Chlorophyta)*. Systematic Biology 54: 936-947.

Lima-Bessa K. M. & Menck C. F. M. 2005. *Skin Cancer: Lights on Genome Lesions*. Current Biology 15: 58-61.

Llabrés M. & Agustí S. 2006. *Picophytoplankton Cell Death Induced by UV Radiation: Evidence for Oceanic Atlantic Communities*. Limnology and Oceanography 51: 21-29.

Madronich, S. 1993. The Atmosphere and UV-B Radiation at Ground level. Environmental UV photobiology. A. R. Young, L. O. Björn, J. Moan and W. Nultsch. New York, Plenum Press: 1-39

Margulies M., Egholm M., Altman W. E., Attiya S., Bader J. S., Bemben L. A., Berka J., Braverman M. S., Chen Y. J., Chen Z., Dewell S. B., Du L., Fierro J. M., Gomes X. V., Godwin B. C., He W., Helgesen S., Ho C. H., Irzyk G. P., Jando S. C., Alenquer M. L., Jarvie T. P., Jirage K. B., Kim J. B., Knight J. R., Lanza J. R., Leamon J. H., Lefkowitz S. M., Lei M., Li J., Lohman K. L., Lu H., Makhijani V. B., McDade K. E., McKenna M. P., Myers E. W., Nickerson E., Nobile J. R., Plant R., Puc B. P., Ronan M. T., Roth G. T., Sarkis G. J., Simons J. F., Simpson J. W., Srinivasan M., Tartaro K. R., Tomasz A., Vogt K. A., Volkmer G. A., Wang S. H., Wang Y., Weiner M. P., Yu P. Begley R. F. & Rothberg J. M. 2005. *Genome Sequencing in Microfabricated High-density Picofiltre Reactors*. Nature 437: 376- 80

Martin A. P. 2002. *Phylogenetic Approaches for Describing and Comparing the Diversity of Microbial Communities*. Applied and Environmental Microbiology 68: 3673-3682.

McHardy A. C. & Rigoutsos I. 2007. *What's in the Mix: Phylogenetic Classification of Metagenome Sequence Sample*. Current Opinion in Microbiology 10: 499-503.

Moeseneder M. M., Arrieta J. M. & Herndl G. J. 2005. *A Comparison of DNA- and RNA-based Clone Libraries from the Same Marine Bacterioplankton Community*. FEMS Microbiology Ecology 51: 341-352.

Molina, M. J. & Rowland F. S. 1974. *Stratospheric Sink for Chlorofluoromethanes: Chlorine Atom-Catalysed Destruction of Ozone*. Nature 249: 810-812.

Nichols J. A. & Katiyar S. K. 2010. *Skin Photoprotection by Natural Polyphenols: Anti-inflammatory, Anti-oxidant and DNA Repair Mechanisms*. Archives of Dermatological Research. 302: 71.

Piquet, A. M.-T., Bolhuis H, Davidson A. T. & Buma A. G. J. 2010. *Seasonal Succession and UV Sensitivity of Marine Bacterioplankton at an Anctartic Coastal Site*. FEMS Microbiology Ecology 73: 68-82).

Piquet A. M.-T., Bolhuis H, Davidson A. T., Thomson P. G. & Buma A. G. J. 2008. *Diversity and Dynamics of Antarctic Marine Microbial Eukaryotes under Manipulated Environmental UV Radiation*. FEMS Microbiology Ecology 66: 352-366.

Peressutti S. R., Costaglila M., Artigas L. F. & Hozber C. 2010. *Estudio Comparativo de la Estructura del Bacterioplancton en Aguas del Mar Argentino Mediante el Método de Pirsecuenciación 454 tag*. Revista Argentina de Microbiología 45:288-297.

Pommier T., Canbäck B., Riemann L., Boström K. H., Simu K., Lundberg P., Tunlid A. & Hagström A. 2007. *Global Patterns of Diversity and Community Structure in Marine Bacterioplankton*. Molecular Ecology 16: 867-880.

Prabakaran S. R., Manorama R., Delille D. & Shivaji S. 2006. *Predominance of Roseobacter, Sulfitobacter, Glaciacola and Psychrobacter in Seawater Collected off Ushuaia, Argentina, Sub-Antarctica*. FEMS Microbiology Ecology 59: 342-355.

Reef R., Kaniewska P. & Hoegh-Guldberg O. 2009. *Coral Skeletons Defend against Ultraviolet Radiation*. PloS One 4: e7995.

Rondon M. R., August P. R., Betterman A. D., Brady S. F., Grossman T. H., Liles M. R., Loiacono K. A., Lynch B. A., MacNeil I. A., Minor C., Tiong C. L., Gilman M., Osburne M. S., Clardy J., Handelsman J. & Goodman R. M. 2000. *Cloning the Soil Metagenome: a Strategy for Accessing the Genetic and Functional Diversity of Uncultured Microorganisms*. Applied and Environmental Microbiology 66: 2541-2547.

Rosenzweig C., Casassa G., Karoly D. J. , Imeson A. , Liu C., Menzel A., Rawlins S., Root T. L., Seguin B. & Tryjanowski P. 2007. *Assessment of Observed Changes and*

Responses in Natural and Managed Systems. *Climate Change 2007: Impacts, Adaptation and Vulnerability. Contribution of Working Group II to the Fourth Assessment Report of the Intergovernmental Panel on Climate Change*, Parry M. L., Canzani O. F., Palutikof P. J., van der Linden and Hanson C. E., Eds., Cambridge University Press, Cambridge, UK, 79-131.

Sanger F., Nicklen S. & Coulson A. R. 1977. *DNA Sequencing with Chain-Terminating Inhibitors*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA* 74: 5463-5467.

Schloss P. D. & Handelsman J. 2004. *Status of Microbial Census*. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 68: 686-691.

Singh J., Behal A., Singla N., Joshi A., Birbian N., Singh S., Bali V. & Batra N. 2009. *Metagenomics: Concept, Methodology, Ecological Inference and Recent Advances*. *Biotechnology Journal* 4 480-494.

Sinha R. P. & Häder D.-P. 2002. *UV-Induced DNA Damage and Repair: A Review*. *Photochemical and Photobiological Sciences* 1: 225-236.

Suzuki M. T., Rappé M. S., Haimberger Z. W., Winfield H., Adair N., Ströbel J. & Giovannoni S. J. 1997. *Bacterial Diversity among Small-Subunit rRNA Gene Clones and Cellular Isolates from the Same Seawater Sample*. *Applied and Environmental Microbiology* 63: 983-989.

Tautz, D & Renz M. 1983. *An Optimized Freeze-Squeeze Method for the Recovery of DNA Fragments from Agarose Gels*. *Analytical Biochemistry* 132: 14-19.

Van der Gucht K., Vandekerckhove T., Vloemans N., Cousin S., Muylaert K., Sabbe K., Gillis M., Declerk S., De Meester L. & Vyverman W. 2005. *Characterization of Bacterial Communities in Four Freshwater Lakes Differing in Nutrient Load and Food Web Structure*. *FEMS Microbiology Ecology* 53: 205-220.

Villafañe V. E., Barbieri E. S. & Helbling E. W. 2004. *Annual Patterns of Ultraviolet Radiation Effects on Temperate Marine Phytoplankton off Patagonia, Argentina*. *Journal of Plankton Research* 26: 167-174.

Villafañe V. E., Helbling E. W. & Zagarese H. E. 2001. *Solar Ultraviolet Radiation and Its Impact on Aquatic Systems of Patagonia, South America*. *AMBIO* 30: 112-117.

- Wang Q., Garrity G. M., Tiedje J. M. & Cole J. R. 2007. *Naïve Bayesian Classifier for Rapid Assignment of rRNA Sequences into the New Bacterial Taxonomy*. Applied and Environmental Microbiology 73: 5261-5267.
- Wang Y. & Qian P.-Y. 2009. *Conservative Fragments in Bacterial 16S rRNA Genes and Primer Design for 16S Ribosomal DNA Amplicons in Metagenomic Studies*. PLoS One 4: e7401.
- Weinbauer M. G., Fritz I., Wenderoth D. F. & Höfle M. G. 2002. *Simultaneous Extraction from Bacterioplankton of Total RNA and DNA Suitable for Quantitative Structure and Function Analysis*. Applied and Environmental Microbiology 68: 1082-1087.
- Winter C., Moeseneder M. M. & Herndl G. J. 2001. *Impact of UV Radiation on Bacterioplankton Community Composition*. Applied and Environmental Microbiology 67: 665-672.
- Woese C. R. & Fox G. E. 1977. *Phylogenetic Structure of the Prokaryotic Domain: The Primary Kingdoms*. Proceedings of the National Academy of Science of the USA 74: 5088-5090.
- Woodford K. & Usdin K. 1991. *'Turbo prep' DNA: Ultraquick Preparation of Plasmid DNA from Single Colonies for DNA Sequencing*. Nucleic Acids Research 19: 6652.
- Yoon J.-H., Prakash L. & Prakash S. 2010. *Error-Free Replicative Bypass of (6-4) Photoproducts by DNA Polymerase ζ in Mouse and Human Cells*. Genes & Development 24: 123-128.
- Zepp R. G, Erickson III D. J., Paul N. D. & Sulzberger B. 2007. *Interactive Effects of Solar UV Radiation and Climate Change on Biogeochemical Cycling*. Photochemical and Photobiological Sciences 6: 286-300.

8. ANEXOS

8.1. Anexo 1: Soluciones

Solución de extracción con CTAB

CTAB 2% p/v

NaCl 1,4 M

β ME 0,2% v/v

EDTA 20 mM

Tris/HCl pH 8 100mM

TAE 1X (para 1L)

900 ml agua bidestilada

100 ml TAE 10X (0,04 M Tris-acetato, 0,001M EDTA; pH 8)

10 μ l colorante intercalante

Buffer de siembra

Glicerol 50% v/v

Orange G

Luria Bertani (LB)

Peptona 1% p/v

Extracto de Levadura 0,5% p/v

NaCl 1% p/v

pH 7,5

Placas LB-ampicilina

LB

Agar-agar 1,5% p/v

Ampicilina 0,05% v/v

Placas LB/ampicilina/IPTG/X-gal

Placa de LB-ampicilina

X-Gal 5% p/v

IPTG 20% p/v

RF1

ClK 100mM

Cl₂Mn.4H₂O 50mM

AcK 30mM, pH 7,5

Cl₂Ca.2H₂O 10mM

Glicerol 15%

RF2

MOPS 10mM pH 6,8

ClK 10mM

Cl₂Ca 7,5mM

Glicerol 15%

8.2. Anexo 2: Preparación de bacterias competentes

El clonado del ADN fue realizado en bacterias competentes de la cepa *Escherichia coli* (*E.coli*) One Shot[®] TOP 10 [*F*⁻ *mcrA* Δ (*mrr-hsdRMS-mcrBC*) ϕ 80/*lacZ* Δ M15 Δ *lacX74* *recA1* *araD139* Δ (*ara-leu*) 7697 *galJ* *galK* *rpsL* (Str^R) *endA1* *nupG* λ -] (Invitrogen).

A partir de una placa con colonias aisladas, se repicó una colonia en 10 ml de medio LB y se incubó con agitación (190-200 r.p.m.) a 37 °C durante 10 horas en un baño termostático (Dubnoff, Vicking). Luego se realizó una dilución 1/100 del cultivo en medio fresco y se incubó con agitación (190-200 r.p.m.) a 37 °C hasta alcanzar una DO₅₅₀ de 0,35-0,6. Este cultivo fue incubado en hielo durante 15 minutos y se centrifugó a 1000g durante 10 minutos (centrífuga Gelec 114D, rotor oscilante G 1615). Posteriormente las bacterias fueron resuspendidas en 10 ml de RF1 [CIK 100mM, Cl₂Mn 50mM, AcK 30mM (pH 7,5), Cl₂Ca 10mM, glicerol 15%], incubadas en hielo durante 15 minutos y centrifugadas a 1000g durante 10 minutos. Las bacterias así tratadas fueron resuspendidas en una solución de RF2 [MOPS 10 mM pH 6,8, CIK 10mM, Cl₂Ca 10mM, glicerol 15%], se incubaron en hielo durante 15 minutos y posteriormente congeladas a -80 °C.

8.3. Anexo 3: Ajustes de la reacción de amplificación

La optimización de la reacción de amplificación se llevó a cabo evaluando la temperatura óptima de hibridación de los primers AF-27 y HR-1492.

Extracción de ADN genómico bacteriano

Para llevar a cabo estas reacciones se utilizó como molde el ADN genómico de la cepa bacteriana *Escherichia coli* (*E.coli*) One Shot[®] TOP 10, obtenido como se describe a continuación. Entre 5 y 10 ml de medio de cultivo LB con *E. coli* fueron incubados durante toda la noche con agitación (190-200 r.p.m.) a 37 °C en un baño termostático (Dubnoff, Vicking). Posteriormente se centrifugaron 5 ml del cultivo durante 10 minutos a 1000g (centrífuga Gelec 114D, rotor oscilante G 1615) y el pellet obtenido se resuspendió en 200 µl de GTE [TE (1mM Tris; 0,1mM EDTA); glucosa 2M]. Se añadieron 300 µl de Na(OH) 0,2 N- SDS 1%, el cual fue preparado en el momento. La solución obtenida fue hervida durante 10 minutos, y centrifugada a máxima velocidad (14100g) durante 10 minutos con microcentrífuga (miniSpin Plus, Eppendorf). Al sobrenadante obtenido se le agregó RNAsa hasta llegar a una concentración final de 20 µg/ml, y se incubó durante 20 minutos a 37 °C en un baño seco (AccuBlock, Labnet). Posteriormente se añadió 1 volumen de cloroformo:alcohol isoamílico (24:1) y se recuperó la fase acuosa por centrifugación. Luego se realizó una segunda extracción donde se recuperaron 500 µl de la fase acuosa, a la cual se le añadió 1/10 volúmenes de AcNa 0,3 M, pH 7,5. Esta solución fue incubada durante 10 minutos a temperatura ambiente y centrifugada durante 5 minutos a máxima velocidad (14100g) en microcentrífuga. Se recuperó la fase acuosa y se precipitó con 1 volumen de isopropanol durante 30 minutos a 4 °C. El pellet obtenido se lavó con 750 µl de etanol (70% v/v), se secó a temperatura ambiente, y se resuspendió en 10 µl de agua ultra pura.

Optimización de la reacción de amplificación

Con el objeto de encontrar la temperatura óptima de hibridación, realizaron reacciones de amplificación en gradiente de temperatura, con cantidades variables de ADN molde: 57 ng, 5,7 ng y 0,57 ng. El análisis por electroforesis en geles de agarosa de los productos de PCR obtenidos (Figura 8.1) evidenció la presencia, en todos los casos, de una banda de peso molecular que corresponde al peso molecular esperado para la región del gen 16S amplificada (1465 pb). Cuando se utilizaron cantidades mayores de ADN molde, se observaron productos de amplificación aún en las temperaturas más altas de hibridación, mientras que para 0,57 ng el producto deja de ser visible a una temperatura de hibridación de 67,2 °C (Figura 8.1). Al utilizar 5,7 ng de ADN se observó la presencia de producto de amplificación en todas las temperaturas ensayadas. Sin embargo, se observó una caída drástica en la cantidad de producto a partir de 67,2 °C en comparación con las reacciones realizadas con 57 y 5,7 ng.

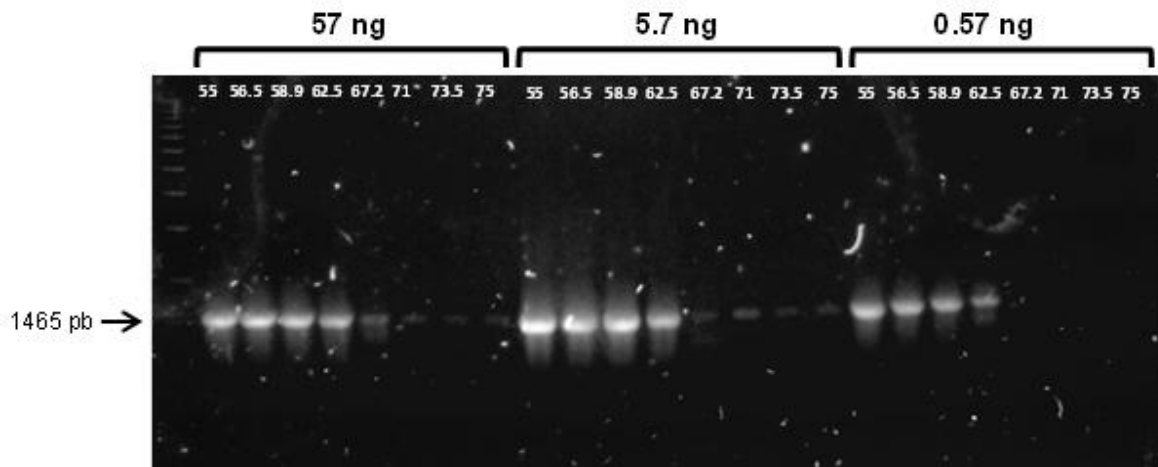


Figura 8.1: Electroforesis en gel de agarosa 2% de los productos obtenidos en las reacciones de amplificación en gradiente de temperatura con diferentes cantidades de ADN molde de *E. coli*. Los números en la parte superior de las calles indican las temperaturas de hibridación utilizadas en cada caso. M: marcador de peso molecular (1 kb plus). En la parte superior de los corchetes se detallan las cantidades del molde utilizado.

La mayor cantidad de producto de amplificación, con las tres cantidades de ADN ensayadas, se observó a una temperatura de hibridación de 55 °C, seguido por una leve disminución debida al aumento en la temperatura de hibridación. Este resultado sugiere que la temperatura óptima de hibridación estaría por debajo de 55 °C, por lo cual se

realizó un nuevo gradiente de temperatura, utilizando un rango de temperaturas de entre 50 y 70 °C (Figura 8.2).

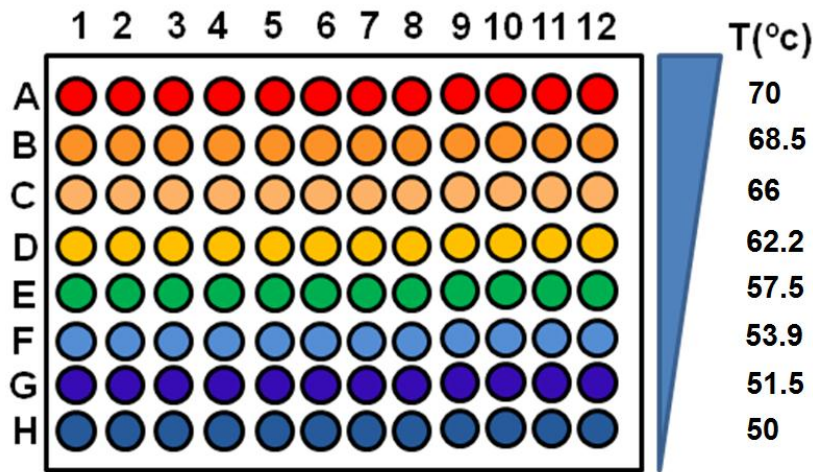


Figura 8.2: Esquema representativo de las condiciones experimentales utilizadas en uno de los experimentos de gradiente térmico. Se detalla la disposición de los pocillos del equipo utilizado para llevar a cabo las reacciones, y el gradiente de temperatura utilizado. Como puede observarse, cada fila de pocillos adopta una temperatura de hibridación diferente permitiendo evaluar hasta ocho temperaturas diferentes en forma simultánea.

Como se observa en la Figura 8.3, se obtuvo mayor cantidad de producto al utilizar temperaturas de hibridación de 51,5 y 53,9 °C. Por lo tanto se seleccionó la temperatura de 53,9 °C para todas las experiencias posteriores realizadas con los primers AF-27 y HR-1492.

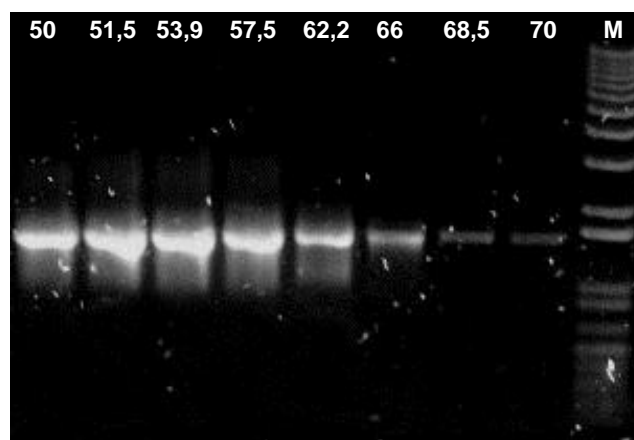


Figura 8.3: Electroforesis en gel de agarosa 2% de los productos amplificados por PCR en gradiente de temperatura. Las temperaturas de hibridación utilizadas se indican en la parte superior de cada calle. M: marcador de peso molecular 1 kb plus (250 ng).

Determinación de la sensibilidad de la reacción

Una vez evaluadas las condiciones óptimas de la reacción, se evaluó la sensibilidad de la misma, es decir, la mínima cantidad de ADN necesaria para realizar reacciones de amplificación óptimas. Con este objetivo, se realizaron reacciones de PCR utilizando cantidades decrecientes del molde comenzando con una cantidad de $5,729 \text{ E-1 ng}$ hasta una cantidad de $5,729 \text{ E-6 ng}$ de molde. Los resultados se muestran en la Figura 8.4. Estos análisis indicaron que se obtiene una buena cantidad de producto de amplificación incluso utilizando sólo $0,57 \text{ pg}$ de ADN molde.

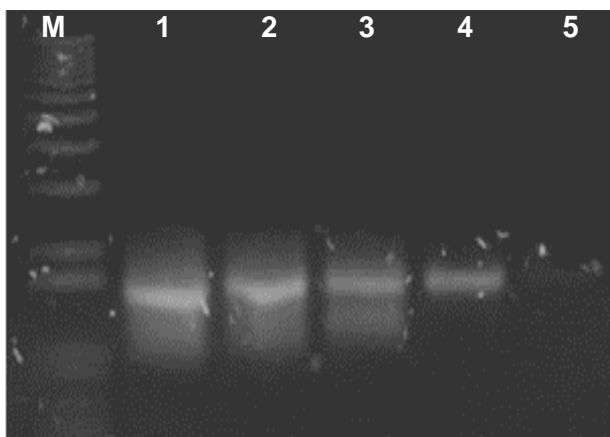


Figura 8.4: Electroforesis en gel de agarosa 2% utilizando cantidades decrecientes de molde. Calles 1-5: $5,7\text{E-1 ng}$; $5,7\text{E-2 ng}$; $5,7\text{E-3 ng}$; $5,7\text{E-4 ng}$ y $5,7\text{E-5 ng}$ respectivamente. M: marcador de peso molecular (250 ng).