

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE MADRID
FACULTAD DE CIENCIAS
DEPARTAMENTO DE BIOLOGÍA

**CARACTERIZACIÓN MORFOLÓGICA, GENÉTICA Y
FISIOLÓGICA DE CIANOBACTERIAS DOMINANTES
EN SISTEMAS FLUVIALES**



TESIS DOCTORAL
Esther Berrendero Gómez
Madrid, 2008

Memoria presentada para optar al Grado de Doctor de Ciencias

Madrid a 1 de Marzo de 2008

Fdo. Esther Berrendero Gómez
Licenciada en Bioquímica

DIRECTORA

Fdo. Dra. Pilar Mateo Ortega
Profesora Titular
Dpto. Biología
Universidad Autónoma de Madrid

Este trabajo ha sido realizado en el Departamento de Biología de la Universidad Autónoma de Madrid, bajo la dirección de la doctora Pilar Mateo Ortega (Profesora Titular. UAM). Para ello se contó con una beca de formación del profesorado universitario del Ministerio de Educación y Ciencia (FPU-MEC)

Gracias a toda la gente a la que quiero y me quiere
Por regalarme amor, cariño, respeto, critica, consejos y apoyo
Por calmar mi ansiedad y controlar mis nervios
Por entender como soy y aclarar mis dudas.

En especial a:

Mi familia,

el eterno apoyo

ABREVIATURAS Y ACRÓNIMOS

AA – medio Allen y Arnon

ADN – ácido desoxirribonucleico

ARNr – ácido ribonucleico ribosómico

Bis-*p*NPP – bis (*para*-nitrofenil) fosfato

BLAST – acrónimo del inglés Basic Local Alignment and Search Tool

BSA – albúmina de suero bovino del inglés “bovine serum albumine”

BTP – bis tris propano

Chl a – clorofila a

CI – Cromatografía iónica.

cpcBA-IGS - espacio intergénico y las regions flanqueantes del operon de la ficocianina del inglés “the phycocyanin intergenic spacer and flanking regions”

CTAB - N-Cetil-N,N,N-Trimetilamonio bromuro

DGGE – electroforesis en geles desnaturalizantes por gradiente químico del inglés
Desnaturing gradient gel electrophoresis

dNTPs – desoxinucleótidos trifostatos

EDTA - ácido etileno diamino tetra acético, acrónimo del inglés ethylene diamine
tetra acetic acid

g - gramo

h - hora

HEPES - N-(2-Hidroxietyl) piperazina- N' -(2-ácido etanosulfónico)

kb – kilo bases

K_M – constante de Michaelis-Menten

l - litro

LB – iniciales de las palabras inglesas Lysogeny broth (caldo lisogénico)

min - minuto

mg - miligramo

ml - mililitro

μ g - microgramo

μ l - microlitro

ML – maximum likelihood

Abreviaturas y Acrónimos

MP – maximum parsimony

MU – 4 – metil umbeliferona

MUP – 4 – metil umbeliferil fosfato

NCBI – acrónimo del inglés National Center for Biotechnology Information

NID – nitrógeno inorgánico disuelto

NJ – neighbor-joining

nmol - nanomoles

PAR – radicación activa fotosintética

PCR - reacción en cadena de la polimerasa, del inglés polymerase chain reaction

PDEase - fosfodiesterasa

PMEase - fosfomonoesterasa

pNP - *para*-nitrofenol

pNPP - *para*-nitrofenil fosfato.

POS – fósforo orgánico soluble

PRS - fósforo reactivo soluble

PTF - fósforo reactivo total filtrado

RFLPs - polimorfismo de los fragmentos de restricción del ADN, del inglés restriction fragment length polymorphisms

rpm - revoluciones por minuto

S - Sustrato

SIDI - Servicio Interdepartamental de Investigación.

T^a agua – temperatura del agua

T^a amb – temperatura ambiente

TAE – tris acético tampon

TEMED – N,N,N',N' - tetrametiletilenediamina

TGGE - electroforesis en geles desnaturalizantes por gradiente térmico del inglés temperature gradient gel electrophoresis

Tt – tiempo de transformación del sustrato o “turn over”

V – velocidad

V_{max} – velocidad máxima

ÍNDICE

| | |
|--|----|
| INTRODUCCIÓN | 1 |
| I. CIANOBACTERIAS. CARACTERÍSTICAS GENERALES | 1 |
| I.1. Ecología. Distribución de las cianobacterias | 2 |
| I.2. Organización celular | 4 |
| I.2.1. Células vegetativas | 4 |
| I.2.2. Células especializadas | 6 |
| II. DIVERSIDAD MORFOLÓGICA. CLASIFICACIÓN TAXONÓMICA | 7 |
| II.1. Orden Oscillatoriales. Subsección III | 13 |
| II.1.1. Clasificación taxonómica | 15 |
| II.2. Orden Nostocales. Subsección IV | 17 |
| II.2.1. Clasificación taxonómica | 18 |
| II.2.2. Género <i>Nostoc</i> | 21 |
| II.2.3. Género <i>Calothrix</i> | 21 |
| II.2.4. Género <i>Rivularia</i> | 22 |
| II.2.5. Género <i>Tolypothrix</i> | 22 |
| III. DIVERSIDAD GENÉTICA. INCORPORACIÓN DE MÉTODOS MOLECULARES EN LA IDENTIFICACIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE CIANOBACTERIAS | 23 |
| III. 1. Métodos moleculares empleados para la caracterización de cianobacterias | 24 |
| III.1.1. Operon de la ficocianina (<i>cpcBA-IGS</i>)..... | 25 |
| III.1.2. Subunidad del ARN ribosómico 16S (ARNr 16S)..... | 27 |
| III.1.3. Técnicas de perfiles genéticos o “finger printing”..... | 28 |
| IV. DIVERSIDAD FISIOLÓGICA | 30 |
| IV.1. Metabolismo de las cianobacterias | 30 |
| IV.1.1. Actividad fosfatasa | 31 |
| IV.1.1.1. Enzimas fosfatasas. Localización..... | 34 |
| IV.1.1.2. Factores que influyen en la síntesis y degradación de la enzima fosfatasa..... | 35 |
| IV.1.1.3. Factores ambientales que regulan la actividad fosfatasa..... | 37 |
| IV.1.1.4. Medida de la actividad fosfatasa..... | 39 |

| | |
|---|-----------|
| IV.1.1.5. Ventajas adaptativas relacionadas con el metabolismo del P y la actividad fosfatasa. | 40 |
| Formación del pelo | 40 |
| Polifosfatos | 41 |
| IV.1.2. Fijación de N ₂ | 42 |
| IV.1.2.1. Estructura del complejo enzimático nitrogenasa.. | 43 |
| IV.1.2.2. Estrategias adoptadas por los diferentes organismos para la fijación del nitrógeno..... | 44 |
| IV.1.2.3. Mecanismo de fijación del nitrógeno y asimilación. | 46 |
| ANTECEDENTES Y OBJETIVOS DEL TRABAJO..... | 48 |
| DESCRIPCIÓN DEL MEDIO | 50 |
| I. Río Alberche. | 51 |
| II. Río Alhárabe. | 52 |
| III. Río Amir. | 53 |
| IV. Río Blanco. | 54 |
| V. Río Endrinales. | 55 |
| VI. Río Guadarrama..... | 55 |
| VII. Río Matarraña..... | 57 |
| VIII. Arroyo Mediano | 58 |
| IX. Arroyo Tejada Y Arroyo Cereal | 59 |
| X. Arroyo Red | 60 |
| XI. Río Muga. | 61 |
| XI.1. Descripción del punto de muestreo | 62 |
| XI.2. Características físico-químicas del agua | 66 |
| MATERIALES Y MÉTODOS..... | 70 |
| I. MATERIAL BIOLÓGICO..... | 70 |
| II. TÉCNICAS DE CULTIVO DE CIANOBACTERIAS. | 72 |
| II.1. Medios de cultivo | 72 |
| II.2. Condiciones de cultivo y siembra | 73 |
| III. TÉCNICAS DE AISLAMIENTO DE CIANOBACTERIAS..... | 74 |
| III.1. Aislamientos de cianobacterias del epilíton | 74 |
| III.2. Aislamientos de cepas a partir de colonias de <i>Rivularia</i>..... | 75 |
| IV. TÉCNICAS UTILIZADAS PARA LA CARACTERIZACIÓN MORFOLÓGICA DE CIANOBACTERIAS..... | 76 |

| | |
|---|-----------|
| V. TÉCNICAS EMPLEADAS EN LA CARACTERIZACIÓN GENÉTICA DE CIANOBACTERIAS | 77 |
| V.1. Extracción de ADN genómico de cianobacterias | 77 |
| V.2. Determinación de la región intergénica del operón de la ficocianina mediante PCR..... | 78 |
| V.2.1. Amplificación de la región <i>cpcBA</i> -IGS..... | 78 |
| V.2.2. Clonación de los fragmentos amplificados de la región <i>cpcBA</i> -IGS | 80 |
| Medios de cultivo empelados para <i>E. coli</i> | 80 |
| Preparación de bacterias competentes..... | 81 |
| Transformación | 81 |
| V.2.3. Aislamiento de ADN plasmídico y análisis de restricción. | 82 |
| V.2.4. Secuenciación..... | 83 |
| V.3 Estudio de la región <i>cpcBA</i>-IGS mediante polimorfismo de los fragmentos de restricción del ADN (RFLPs)..... | 84 |
| V.4 Análisis de la región <i>cpcBA</i>-IGS por medio de electroforesis en geles desnaturalizantes por gradiente térmico (TGGE) | 84 |
| V.4.1 Amplificación de la región intergénica <i>cpcBA</i> -IGS..... | 84 |
| V.4.2 Utilización de TGGE con los amplicones de <i>cpcBA</i> -IGS | 84 |
| V.4.3. Recuperación de los alelos de los geles de poliacrilamida. | 86 |
| V.5. Determinación del gen ARNr 16S en cianobacterias mediante PCR... 86 | 86 |
| V.5.1. Amplificación del gen que codifica para el ARNr 16S. | 87 |
| V.5.2. Clonación de los fragmentos amplificados del gen ARNr 16S. | 88 |
| V.6. Estudios de biodiversidad de cianobacterias mediante el análisis del ADNr 16S empleando TGGE..... | 89 |
| V.6.1. Amplificación del gen que codifica para el 16S rRNA | 89 |
| V.6.2. Utilización de TGGE en la separación de los amplicones del gen 16S rRNA. | 89 |
| V.6.3. Recuperación de los alelos de los geles de poliacrilamida. | 90 |
| V.7. Procesamiento y análisis filogenético de las secuencias obtenidas | 90 |
| VI.TÉCNICAS EMPLEADAS PARA LA EXPERIMENTACIÓN FISIOLÓGICA <i>in situ</i> | 91 |
| VI.1. Río seleccionado para los ensayos <i>in situ</i>..... | 91 |
| VI.1.1. Determinaciones fisico-químicas del agua. | 92 |
| VI.1.2. Recogia de muestras. | 92 |

| | |
|--|------------|
| VI.2. Ensayos de actividad fosfatasa | 95 |
| VI.2.1 Preparación de las muestras biológicas y del material. | 95 |
| VI.2.2. Preparación de los reactivos químicos..... | 95 |
| Sustratos. | 95 |
| Solución de parada. | 96 |
| VI.2.3. Medio de ensayo | 96 |
| VI.2.4. Determinación de la actividad fosfatasa. | 97 |
| VI.2.5. Ensayos de actividad fosfatasa. | 97 |
| VI.2.6. Determinación del contenido en clorofilas a. | 99 |
| VI.2.7. Ensayos de actividad fosfatasa realizados en el laboratorio..... | 99 |
| Test de temperatura. | 100 |
| Ensayos de actividad fosfatasa a lo largo del tiempo. | 100 |
| Ensayos de luz vs oscuridad. | 100 |
| Cinética enzimática. | 100 |
| Ensayos de actividad fosfatasa extracelular. | 101 |
| VI.3. Determinación de la fijación de N₂ | 101 |
| VI.3.1. Método experimental. | 101 |
| VI.3.2. Análisis cromatográfico de las muestras. | 102 |
| VI.3.3. Tipos de ensayos de fijación de N ₂ realizados..... | 103 |
| VI.4. Análisis estadístico de los datos obtenidos | 103 |
| RESULTADOS | 104 |
| I. CARACTERIZACIÓN MORFOLÓGICA DE LAS CIANOBACTERIA .104 | |
| I.1. Caracterización de cianobacterias con tricomas atenuados: morfotipos | |
| <i>Rivularia, Calothrix y Tolypothrix</i> | 104 |
| I.1.1. Caracterización de muestras de campo..... | 104 |
| I.1.1.1. Análisis macroscópico y microscópico de muestras naturales de | |
| <i>Rivularia</i> | 104 |
| I.1.1.2. Análisis microscópico de muestras naturales de <i>Calothrix</i> | 109 |
| I.1.1.3. Análisis macroscópico y microscópico de muestras naturales de | |
| <i>Tolypothrix</i> | 109 |
| I.1.2. Caracterización de cepas aisladas..... | 111 |
| I.1.2.1. Cianobacterias con tricomas atenuados aisladas de ríos calizos con | |
| dominancia de <i>Rivularia</i> | 111 |
| I.1.2.1.1. Cianobacterias tipo Rivulariaceae. | 111 |
| I.1.2.1.2. Cianobacterias tipo <i>Tolypothrix</i> | 114 |

| | |
|---|-----|
| I.1.2.2. Cianobacterias con tricomas atenuados aisladas de ríos silíceos o calizos sin <i>Rivularia</i> | 115 |
| I.1.3. Influencia del medio de cultivo en el crecimiento y características morfológicas de las cianobacterias. | 122 |
| I.2. Caracterización de muestras de campo de <i>Nostoc</i>. | 126 |
| I.3. Caracterización de tapetes microbianos. | 127 |
| II. CARACTERIZACIÓN GENÉTICA DE LAS CIANOBACTERIAS Y ANÁLISIS FILOGENÉTICO. | 130 |
| II.1. Caracterización genética de cianobacterias con tricomas atenuados: morfotipos <i>Rivularia</i>, <i>Calothrix</i> y <i>Tolypothrix</i>. | 130 |
| II.1.1. Empleo de la secuencia <i>cpcBA</i> -IGS en la caracterización de muestras naturales de <i>Rivularia</i> y cepas aisladas tipo Rivulariaceae de ríos calizos con dominancia de <i>Rivularia</i> | 130 |
| II.1.1.1. Análisis de la secuencia <i>cpcBA</i> -IGS por PCR y posterior secuenciación..... | 130 |
| II.1.1.2. Análisis de la secuencia <i>cpcBA</i> -IGS amplificada mediante RFLP | 133 |
| II.1.1.3. Análisis mediante TGGE de la región <i>cpcBA</i> -IGS amplificada. | 135 |
| II.1.1.4. Análisis filogenético de las secuencias obtenidas..... | 136 |
| II.1.2. Empleo de los genes que codifican para el ARNr 16S en la caracterización de muestras naturales de <i>Rivularia</i> y cepas aisladas tipo Rivulariaceae de ríos calizos con dominancia de <i>Rivularia</i> | 140 |
| II.1.2.1. Análisis de la secuencia de ADNr 16S por PCR y posterior secuenciación..... | 140 |
| II.1.2.2. Análisis filogenético de las secuencias obtenidas..... | 142 |
| II.1.3. Empleo de la secuencia <i>cpcBA</i> -IGS en la caracterización de <i>Calothrix</i> y <i>Tolypothrix</i> | 144 |
| II.1.3.1. Análisis de la secuencia <i>cpcBA</i> -IGS por PCR y posterior secuenciación..... | 144 |
| II.1.3.2. Análisis mediante TGGE de la región <i>cpcBA</i> -IGS amplificada. | 146 |
| II.1.3.3. Análisis filogenético de las secuencias obtenidas..... | 149 |
| II.1.4. Empleo de los genes que codifican para el ARNr 16S en la caracterización de <i>Calothrix</i> y <i>Tolypothrix</i> | 152 |

| | |
|---|-----|
| II.2. Caracterización genética de cianobacterias pertenecientes al género | |
| <i>Nostoc</i> | 154 |
| II.2.1. Empleo de la secuencia <i>cpcBA</i> -IGS en la identificación de muestras naturales de <i>Nostoc</i> | 154 |
| II.2.2. Empleo del gen ARNr 16S en la identificación de muestras naturales de <i>Nostoc</i> | 158 |
| II.3. Caracterización genética de tapetes microbianos | 161 |
| II.3.1. Empleo de la secuencia <i>cpcBA</i> -IGS en la caracterización de diferentes tapetes microbianos | 161 |
| II.3.2. Empleo del gen ARNr 16S en la caracterización de de diferentes tapetes microbianos | 164 |
| III. ESTUDIO FISIOLÓGICO DE LAS CIANOBACTERIAS DOMINANTES EN EL RÍO MUGA | 167 |
| III.1. Estudio de la actividad fosfatasa en cianobacterias dominantes del río Muga | 167 |
| III.1.1. Evolución de la actividad fosfatasa a lo largo del tiempo | 167 |
| III.1.2. Estudio de la actividad fosfatasa <i>in situ</i> | 169 |
| III.1.3. Respuesta de la actividad fosfatasa ante diferentes concentraciones de sustrato: Cinética enzimática | 171 |
| III.1.4. Determinación de la actividad fosfatasa extracelular | 175 |
| III.1.5. Efecto de la luz vs oscuridad en la actividad fosfatasa | 175 |
| III.1.6. Influencia de la temperatura en la actividad fosfatasa | 176 |
| III.2. Estudio de la capacidad de fijación de N₂ de las cianobacterias dominantes del río Muga | 178 |
| DISCUSIÓN | 182 |
| I. Análisis de muestras naturales de <i>Rivularia</i> y aislados tipo Rivulariaceae de diferentes ríos calizos con dominancia de <i>Rivularia</i>. | 183 |
| II. Análisis de cianobacterias pertenecientes a los géneros <i>Calothrix</i> y <i>Tolypothrix</i>. | 191 |
| III. Análisis de muestras naturales y aislados de <i>Nostoc</i> | 197 |
| IV. Análisis de tapetes microbianos del río Muga. | 202 |
| V. Estudio de la actividad fosfatasa y nitrogenásica en las cianobacterias dominantes del río Muga. | 206 |
| CONCLUSIONES | 214 |
| BIBLIOGRAFÍA | 216 |
| ANEXO | I |

INTRODUCCIÓN

I. CIANOBACTERIAS. CARACTERÍSTICAS GENERALES.

Las cianobacterias constituyen un grupo muy diverso de organismos procarióticos fotoautófos pertenecientes al dominio *Bacteria*, que sintetizan clorofila *a* y ficobilinas y, son capaces de realizar algunos procesos de vital importancia como la fotosíntesis oxigénica (Whitton, 1992). A pesar de tener características fotosintéticas similares a las algas eucariotas y plantas superiores, su organización estructural y bioquímica se corresponde con el de bacterias gram-negativas (Stanier y Cohen-Bazire, 1977).

Se trata de un grupo presente en la Tierra desde el comienzo del Precámbrico, hace unos 3500 millones de años. Fueron posiblemente los principales productores primarios y los responsables de la oxigenación inicial de la atmósfera terrestre, debido a la utilización de agua en el proceso de fotosíntesis (Stewart, 1978; Knoll, 1985).

Las cianobacterias presentan una gran distribución ecológica, abarcando un amplio rango de hábitats, desde sistemas acuáticos hasta terrestres, e incluso ambientes extremos como desiertos áridos (Boyer y col., 2002; García-Pichel y col., 2003) y fuentes termales (Norris y col., 2002; Steunou y col., 2006). Presentan una gran importancia como colonizadores de tierras áridas, pero quizás lo más destacado, es la capacidad que tienen algunas cianobacterias de fijar nitrógeno atmosférico (N_2) en condiciones aerobias, lo que les confiere un especial interés con fines agrícolas, pudiendo ser utilizadas como biofertilizantes, especialmente en cultivos de arroz (Fernández-Valiente y col., 2000; Mandal y col., 1999; Ladha y Reddy, 2003).

Las cianobacterias exhiben una gran variedad de formas, desde unicelulares como cocos y bacilos, hasta filamentosas que pueden llegar a presentar ramificaciones multicelulares. En la naturaleza, estos organismos tienden a agruparse, formando en muchos casos colonias características y, otras veces, aparecen asociados con otros microorganismos constituyendo tapetes microbianos. Las cianobacterias también pueden formar asociaciones simbióticas con una amplia variedad de plantas (Rasmussen y Svenning, 2001), así como con hongos y animales invertebrados

(Wilkinson y Fay, 1979) en ambientes terrestres, desempeñando un papel importante en el funcionamiento del ecosistema y en el ciclo de los nutrientes.

En determinadas ocasiones, algunas cianobacterias planctónicas forman afloramientos masivos, que pueden ser visibles a simple vista, cuando aparecen en densas concentraciones cerca de la superficie (Hense y Beckmann, 2006). Los estudios llevados a cabo en ambientes de agua dulce, como lagos, embalses y ríos (Falconer, 2001; Dasey y col., 2005; Aboal y col., 2005; Carrasco y col., 2006) así como en ambientes marinos (Bolch y col., 1999; Laamanen y col., 2001), han mostrado que algunas de estas especies pueden ser tóxicas debido a la producción y liberación de diferentes metabolitos, denominados toxinas, que causan efectos adversos en los organismos (Kaebernick y Neilan, 2001; Quesada y col., 2006).

I.1. Ecología. Distribución de las cianobacterias.

Las cianobacterias son un grupo de organismos muy antiguo, que han sido capaces de adquirir una gran variedad de estrategias a lo largo de la evolución, para poder adaptarse a los cambios que se producen en su ambiente físico (Dvornyk y Nevo, 2003). Gracias a esta capacidad de adaptación, han logrado colonizar prácticamente cualquier hábitat en la Tierra. Así, forman parte de ecosistemas terrestres y acuáticos, tanto de agua dulce como marinos, donde se encuentran poblaciones planctónicas, bentónicas, e intertidales (Fay, 1983), e incluso pueden vivir en ambientes extremos.

La adaptación a ambientes con poca luz y concentraciones bajas de nutrientes, supone un factor importante que ha conllevado a que hoy en día, las cianobacterias dominen tanto la biomasa como la producción en los océanos oligotróficos del mundo. Por lo general, las cianobacterias planctónicas marinas son poco abundantes, sin embargo, pueden formar densas poblaciones bénticas en los fondos marinos, constituyendo tapetes microbianos junto con otros organismos, especialmente en las zonas intertidales costeras (Whitton y Potts, 1982) y como fitobiontes de algunos líquenes costeros (Fay, 1983).

Sin embargo, en medios dulceacuícolas (lagos, ríos, arroyos, fuentes, etc.) es donde se localiza una gran variedad de cianobacterias. Las formas picoplanctónicas están ampliamente distribuidas en todo tipo de lagos y embalses y, se ha observado que bajo ciertas condiciones nutricionales y físico-químicas, pueden aparecer afloramientos masivos de cianobacterias en la superficie, contribuyendo a diversos problemas de contaminación de los mismos (Sánchez y col., 2002; Atkins y col.,

2001). También presentan algunas limitaciones en lo que se refiere al pH del medio en el que se desarrollan. Así, no son capaces de crecer en condiciones de pH inferiores a 4 (Whitton, 1992), teniendo preferencia por las aguas neutras a alcalinas. La gran mayoría de las cianobacterias filamentosas suelen estar formando parte del bentos sobre todo tipo de sustratos (Perona y col., 1998; Aboal y col., 2002; O'Sullivan y col., 2002), presentando vainas que protegen los tricomas y les permite adherirse a las diferentes superficies, adaptándose de este modo a ambientes muy heterogéneos en la mayor parte de los casos (Margalef, 1983).

Las cianobacterias son también importantes en muchos ambientes terrestres, siempre que exista algún recurso de agua aunque éste sea intermitente (Hoffmann, 1988a). Se han encontrado en desiertos debido a que son capaces de aguantar largos periodos de sequía (Friedman, 1980), gracias a las adaptaciones desarrolladas frente a la desecación, como la formación de vainas, muy común por ejemplo en las especies del género *Nostoc* (Dodds y col., 1995) frente a la salinidad, al acumular compuestos osmoprotectores cuando la salinidad aumenta, siendo expulsados una vez que disminuye la concentración (Reed y col., 1986). Además, las cianobacterias juegan normalmente un papel importante en el mantenimiento de la estabilidad de la superficie del suelo, con el desarrollo de estructuras biológicas formadas por la asociación de diferentes microorganismos en zonas semidesérticas, denominadas costras biológicas del suelo o "*biological soil crust*" (García-Pichel y col., 2003) y en la fertilidad de los suelos utilizados para el cultivo en regiones áridas.

La alta tolerancia a la radiación ultravioleta B y C y la capacidad de soportar temperaturas extremas que presentan algunas cianobacterias, son factores muy importantes para colonizar ambientes extremos, permitiéndoles ser la población dominante en hábitats tan inhóspitos como cráteres volcánicos, fuentes termales como en Yellowstone National Park en Wisconsin, Estados Unidos (Castenholz, 1969), lagos alpinos o polares como Lago Victoria en Antártida (Warwick y Quesada, 1994; Fernández-Valiente, y col., 2007) y ambientes hipersalinos (López-Cortés y col., 2001; Yannarell y col., 2006). Un ejemplo de adaptación a condiciones extremas, es la presencia de pigmentos en las vainas de cianobacterias filamentosas de ambientes naturales, donde la irradiancia solar es alta, como es el caso de scytonemina. Este pigmento es formado por las células en presencia de luz ultravioleta y su función es la de protección. La presencia de este pigmento se ha encontrado en las vainas de

cianobacterias filamentosas como algunas especies de *Calothrix* de aguas termales (García-Pichel y Castenholz, 1991; Dillon y Castenholz, 2003).

Se han descrito cianobacterias euendolíticas o “*microboring*”, capaces de penetrar activamente en un sustrato (Golubic y col., 1981), ya sean vetas de un sustrato rocoso carbonatado (Pentecost y Whitton, 2000; Dupraz y col., 2004), invertebrados con concha (Kaehler, 1999) o sustratos coralinos (Le Campion-Alsumard y col., 1995). Los avances en la identificación, distribución y hábitat de estas cianobacterias han sido destacados (Campbell, 1983; Golubic y col., 1984, 2000), especialmente con la incorporación de técnicas moleculares a estos estudios (Chacón y col., 2006), sin embargo, el mecanismo empleado para disolver el carbonato y las ventajas evolutivas de cada comportamiento están todavía sin resolver (García-Pichel, 2006).

Por último, las cianobacterias han sido empleadas en algunas ocasiones, como organismos indicadores para estimar la calidad o estado del medio acuático de una forma continua en el tiempo, al tener estos organismos una capacidad integradora de respuesta, frente a los posibles cambios que se pueden dar en su medio ambiente (Perona y col., 1998; Whitton, 1999). Existen diversos trabajos a cerca de la diversidad de las comunidades cianobacterianas de sistemas fluviales (Perona y col., 2003; Serrano y col., 2003) y, su relación con la calidad del agua (Fernández-Piñas y col., 1991; Perona y col., 1999; Douterelo y col., 2004), en los se ha probado la existencia de una reducción de la diversidad en respuesta a procesos de contaminación. Recientemente, se han empleado técnicas moleculares para estudiar la diversidad genética de las poblaciones naturales, con el fin de monitorizar los cambios de las poblaciones en diferentes puntos de muestreo (Rodríguez y col., 2007), cuyos resultados muestran una reducción de la diversidad de cianobacterias, en relación con procesos de eutrofización en el río Guadarrama (Comunidad de Madrid).

I.2. Organización celular.

Básicamente la organización celular de las cianobacterias es común a todas ellas, a pesar de la diversidad morfológica existente entre los diferentes grupos.

I.2.1. Células vegetativas

Las células vegetativas constituyen el tipo celular básico de todas las cianobacterias, cuya disposición general aparece esquematizada en la **figura 1**. Poseen una membrana plasmática rica en sistemas enzimáticos, rodeada a su vez por

una pared celular característica de las bacterias gram negativas, interrumpida por pequeños poros (Castenholz, 1989a). En numerosos tipos de cianobacterias, las células vegetativas poseen una envuelta exterior a la membrana externa denominada vaina mucilaginosa o cápsula, constituida por polisacáridos producidos dentro de las células y excretados por ellas, que suponen principalmente una ventaja adaptativa contra la desecación (Walsby, 1974) y contribuyen a la formación de agregados (Drews y Weckesser, 1982).

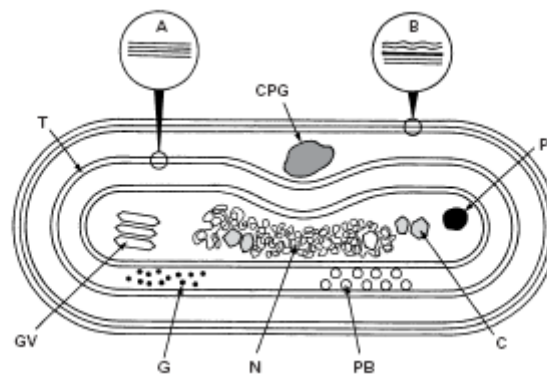


Figura 1. Esquema de la sección de una célula vegetativa de cianobacteria. Abreviaturas: A.- Detalle del tilacoide mostrando las membranas tilacoidales; B.- Detalle de la envoltura celular mostrando la membrana extrema, la capa de peptidoglicano y la membrana citoplasmática; C.- carboxisoma; CPG.- granulo de cianoficina; T.- tilacoide; P.- granulo de polifosfato; N.- región nucleoplásmica; G.- gránulos de glucógeno; PB.- ficobilisoma; GV.- vesícula de gas. (tomada de Adams y Duggan, 1999).

Generalmente presentan ADN circular de tipo bacteriano no unido a histonas situado en el centro del citoplasma (Makino y Tsuzaki, 1971). En algunas especies se conoce la presencia de intrones dentro del genoma bacteriano (Xu y col., 1990) así como de plásmidos (Thiel, 1994). Dispersos por el citoplasma se localizan los ribosomas de tipo bacteriano (70S) (Rodríguez-López y Vázquez, 1968) y una serie de gránulos, que generalmente contienen sustancias de reserva, cuya abundancia depende de las condiciones en que se encuentren las especies. Estos gránulos pueden ser polifosfatos (reserva de fósforo) (Healey, 1982), de cianoficina (reserva de compuestos nitrogenados) (Simon, 1987), de glucógeno y de poli- β -hidroxibutirato (reserva de carbono) (Shively, 1988; Castenholz, 2001). También podemos encontrar otras estructuras denominadas carboxisomas o cuerpos poliédricos, que acumulan ribulosa 1,5 bisfosfato carboxilasa (Smith, 1982; Orús y col., 1995) y vesículas de gas, que son importantes pues permiten el desplazamiento en la columna de agua de las cianobacterias (Walsby, 1975; Hayes, 1988).

En la periferia del citoplasma, se localizan las membranas tilacoidales que contienen los pigmentos fotosintéticos y, las cadenas de transporte de electrones fotosintética y respiratoria (Gantt, 1994). El aparato fotosintético de las cianobacterias emplea el agua como donador de electrones para la obtención de poder reductor. Esta compuesto por dos fotosistemas (PSI y PSII) y por una cadena de transporte electrónico similar a la de organismos eucariotas (Stewart, 1980; Schmetterer, 1994).

Los pigmentos fotosintéticos que poseen las cianobacterias son: clorofila a, componente del fotosistema I y principal colector de energía; carotenoides, con función protectora contra la oxidación de los pigmentos (Stanier y col., 1971) y, ficobiliproteínas, presentes sólo en cianobacterias y algunas algas (Cohen-Bazire y Bryant, 1982). Las ficobiliproteínas pueden ser ficocianina y aloficocianina presentes en todas las cianobacterias, así como ficoeritrina y ficoeritrocianina con menor frecuencia. Son muy eficientes en la captación de energía, formando parte del sistema antena en unos complejos multimoleculares denominados ficobilisomas, cediéndola mayoritariamente al fotosistema II (Sidler, 1994). Además, son la porción nitrogenada de la célula con mayor capacidad de movilización, variando su proporción en función de la fuente de nitrógeno que exista en el medio (Allen y Smith, 1969).

I.2.2. Células especializadas

A partir de las células vegetativas, algunas cianobacterias son capaces de diferenciar diferentes tipos de células especializadas, proporcionándoles una gran ayuda en la adaptación a los distintos hábitats en los que se encuentran. De entre ellas destacamos los heterocistos, acinetos y hormogonios.

Los heterocistos son células especializadas en donde tiene lugar la fijación del N₂ en condiciones aerobias, gracias a la enzima nitrogenasa que aparece en su interior (Wolk y col., 1994). La diferenciación de los heterocitos a partir de células vegetativas es irreversible y se produce generalmente en condiciones de deficiencia de fuente nitrogenada (Whitton, 1992). Poseen una envoltura muy gruesa para impedir la difusión del O₂ que inhibe a la enzima (Cardemil y Wolk, 1981), así como unos gránulos polares en el sitio de unión con las células vegetativas denominados gránulos de cianoficina. La forma, número y colocación de este tipo de células en el tricoma, es un carácter taxonómico empleado en el sistema de clasificación tradicional (Komárek y Anagnostidis, 1989).

Los acinetos o formas celulares esporuladas se diferencian de las células vegetativas, cuando las condiciones ambientales son desfavorables. Generalmente se inducen en condiciones limitantes de fósforo, pero si esto no sucede, la diferenciación se puede producir al limitar la luz o la presencia de carbohidratos como fuente de energía (Nichols y Adams, 1982). Cuando las condiciones vuelven a ser favorables, tienen la capacidad de germinación para producir nuevos filamentos (Rother y Fay, 1977). Se puede formar un sólo acineto o bien varios dispuestos en serie a lo largo del tricoma (Whitton, 1987).

Los hormogonios son otra forma de especialización celular, que por lo general, se diferencian en cianobacterias filamentosas a partir de la muerte de una o más células intercalares denominadas necridios (Economou-Amilli y col., 1984), o bien por la separación entre dos células contiguas, pero en ambos casos la formación de los hormogonios depende de las condiciones del medio (Wood y col., 1986). La función principal es la de reproducción (Fay, 1983) y, pueden tener movilidad (Whitton, 1992). Los hormogonios pueden ser también unicelulares, en cuyo caso se denominan gonidios (Geitler, 1932).

II. DIVERSIDAD MORFOLÓGICA. CLASIFICACIÓN TAXONÓMICA.

Las cianobacterias son un grupo de procariotas desde el punto de vista morfológico muy diverso. Por mucho tiempo, fue considerada por los botánicos (y es considerada todavía por algunos) como una de las principales divisiones de las algas, incluida en la división Cyanophyta o algas verde-azuladas (Compère, 2005). Este sistema tradicional de clasificación, representa un gran volumen de trabajo que se ha ido acumulado a lo largo de los años, desde la introducción del sistema de nomenclatura binomial por Linnaeus en 1750. Con los trabajos de Bornet y Flahault (1886) y Gomont (1892a, b) se escribieron los primeros manuales exhaustivos para la determinación de especies filamentosas cianobacterianas. En los años treinta, Geitler (1932) llevó a cabo una revisión taxonómica exhaustiva, actualizada y empleada ampliamente. Posteriormente, aparecieron los trabajos de Elenkin (1936-1949), Desikachary (1959), Starmach (1966) y Bourrelly (1970a, b) entre otros. En la actualidad, se han realizado diferentes revisiones por Anagnostidis y Komárek (1988 y 1990) y Komárek y Anagnostidis (1989, 1999 y 2005), proponiéndose el nuevo

término cianoprocariota, en la que además de las referencias históricas, se han incluido nuevas especies e introducido cambios importantes en la nomenclatura de algunos géneros, especialmente en las formas filamentosas sin heterocistos como *Oscillatoria*. Además proporciona una información valiosa sobre la distribución y ecología de las cianobacterias.

Según la tradición botánica, las cianobacterias se han distinguido en base a sus propiedades morfológicas, que incluyen principalmente la formación de la colonia, la morfología celular y envolturas extracelulares, pigmentación, reproducción y, en menor medida, en base a sus propiedades fisiológicas y bioquímicas. Este sistema de clasificación, gobernado por el Código Internacional de Nomenclatura Botánica (Greuter y col., 2000), requiere como referencia taxonómica muestras fijadas y preservadas, como muestras de herbarios (Palinska y col., 2006). Se han publicado y aceptado alrededor de 2000 especies de cianobacterias bajo este código. Todas ellas, quedan englobadas en los 4 órdenes siguientes (**tabla 1**):

***Orden Chroococales:** Incluye a todas las unicelulares y se agrupan en función de los tipos de células, las envueltas y el tipo de reproducción (Komárek y Anagnostidis, 1999).

***Orden Oscillatoriales:** Incluye aquellas con organización en filamentos, generalmente se reproducen por fragmentación del tricoma formando hormogonios y, carecen de heterocistos y acinetos. Algunas pueden presentar una vaina recubriendo los tricomas (Komárek y Anagnostidis, 2005).

***Orden Nostocales:** Agrupa aquellas filamentosas provistas de heterocistos y acinetos. Se agrupan en función de la morfología de las colonias, los filamentos, así como por la diferenciación y posición de los heterocistos, y la diferenciación de acinetos (Komárek y Anagnostidis, 1989).

***Orden Stigonematales:** Formada por filamentosas con un talo morfológicamente complicado. Su diferenciación se realiza principalmente en función de la estructura de los filamentos, tipo de ramificación, posición de los heterocistos y procesos reproductivos (Anagnostidis y Komárek, 1990).

En la década de los setenta con el reconocimiento de las características bacterianas de este grupo, surgió un nuevo sistema de clasificación, basado en los criterios establecidos por el Código Internacional Bacteriológico de Nomenclatura (Lapage y

Tabla 1: Resumen de la taxonomía botánica de la nueva aproximación de las cianofitas según Komárek y Anagnostidis (1989, 1999, 2005); Anagnostidis y Komárek (1990).

| ORDEN | FAMILIA | ALGUNOS GÉNEROS | |
|-----------------------|---------------------|------------------------|------------------------|
| CHROOCOCALES | Synechococcaceae | <i>Cyanothece</i> | <i>Aphanothece</i> |
| | Merismope | <i>Merismopedia</i> | <i>Synechocystis</i> |
| | | <i>Aphanocapsa</i> | |
| | Mycrocystaceae | <i>Eucapsis</i> | |
| | Chroococcaceae | <i>Chroococcus</i> | |
| | Entophysalidaceae | <i>Siphononema</i> | <i>Entophysalis</i> |
| | Hydrococcaceae | <i>Hydrococcus</i> | |
| | Chamaesiphonaceae | <i>Chamaesiphon</i> | <i>Chamaecalyx</i> |
| | Dermocarpellaceae | <i>Cyanocystis</i> | <i>Stanieria</i> |
| | Xenococcaceae | <i>Xenococcus</i> | <i>Chroococciopsis</i> |
| <i>Chroococcidium</i> | | | |
| Hyellaceae | <i>Hyella</i> | <i>Pleurocapsa</i> | |
| OSCILLATORIALES | Borziaceae | <i>Borzia</i> | <i>Komvophoron</i> |
| | Pseudanabaenaceae | <i>Pseudanabaena</i> | <i>Leptolyngbya</i> |
| | | <i>Limnothrix</i> | |
| | Schizotrichaceae | <i>Schizotrich</i> | |
| | Phormidiaceae | <i>Phormidium</i> | <i>Trichodesmium</i> |
| | | <i>Arthrospira</i> | <i>Microcoleus</i> |
| | Oscillatoriaceae | <i>Oscillatoria</i> | <i>Plectonema</i> |
| <i>Lyngbya</i> | | <i>Homeothrix</i> | |
| Gomontiellaceae | <i>Katagnymene</i> | <i>Gomontiella</i> | |
| NOSTOCALES | Scytonemataceae | <i>Scytonema</i> | <i>Scytonemetopsis</i> |
| | Microchaetaceae | <i>Microchaete</i> | <i>Tolypothrix</i> |
| | | <i>Petalonema</i> | <i>Hassallia</i> |
| | Rivulariaceae | <i>Calothrix</i> | <i>Rivularia</i> |
| | | <i>Gloetrichia</i> | |
| | Nostocaceae | <i>Cilindrospermum</i> | <i>Nodularia</i> |
| <i>Anabaena</i> | | <i>Nostoc</i> | |
| STIGONEMATALES | Chlorogloeopsaceae | <i>Chlorogloeopsis</i> | |
| | Capsosiraceae | <i>Capsoria</i> | <i>Desmosiphon</i> |
| | Stigonemataceae | <i>Pulvinularia</i> | <i>Stigonema</i> |
| | Fischerellaceae | <i>Fischerella</i> | <i>Doliocatella</i> |
| | Bourzinemataceae | <i>Borzinema</i> | <i>Seguenzaea</i> |
| | Loriellaceae | <i>Geitleria</i> | <i>Loriella</i> |
| | Nostochopsaceae | <i>Nostochopsis</i> | <i>Mastigocoleus</i> |
| Mastigocladaceae | <i>Bachytrichia</i> | <i>Mastigocladus</i> | |

Introducción

col., 1992). Las primeras aproximaciones fueron realizadas por Stainer y Cohen-Bazire (1977), seguidos por Waterbury y Stainer (1977) y Rippka y col. (1979) entre otros, siendo estos últimos, los que diseñaron las primeras claves para determinar cianobacterias en cultivo.

A diferencia del sistema tradicional, el sistema bacteriológico está basado en algunas características morfológicas, fisiológicas, citológicas y bioquímicas de cultivos axénicos de especies aisladas, como la composición de pigmentos, análisis de ácidos grasos, crecimiento heterotrófico, actividad nitrogenásica, composición nucleotídica del ADN y longitud del genoma (Wilmotte, 1994a). Además requiere como referencia taxonómica básica muestra viva, que sea cultivada en una de las colecciones de cianobacterias oficiales existentes en el mundo. A partir de las diferencias en la organización celular y en el modo de reproducción, las cianobacterias se agruparon en 5 secciones (Rippka y col., 1979; **tabla 2**).

Tabla 2. Resumen de la taxonomía de las cianobacterias según el Código Bacteriológico de Nomenclatura (Rippka y col., 1979).

| SECCIÓN I | | | |
|--|--|--|---|
| Unicelulares | división por fisión binaria | <i>Glerobacter</i> <i>Gleothece</i> <i>Synechococcus</i> | <i>Gloeocapsa</i> <i>Synechocystis</i> |
| | división por gemación | <i>Chamaesiphon</i> | |
| SECCIÓN II | | | |
| Unicelulares con reproducción por fisión múltiple | división por fisión múltiple | <i>Dermocarpa</i> | <i>Xenococcus</i> |
| | división por fisión múltiple y binaria | <i>Dermocapella</i> <i>Mysosarcina</i> | <i>Chroococidiopsis</i> Grupo <i>Pleurocapsa</i> |
| SECCIÓN III | | | |
| Filamentos sin heterocistos y división en un solo plano | tricoma helicoidal | | <i>Spirulina</i> |
| | tricomas rectos | <i>Oscillatoria</i> Grupo LPP A | <i>Pseudanabaena</i> Grupo LPP B |
| SECCIÓN IV | | | |
| Filamentos con heterocistos y división en un plano | sin hormogonios | <i>Anabaena</i> <i>Nodularia</i> | <i>Cylindrospermum</i> |
| | con hormogonios | <i>Nostoc</i> <i>Scytonema</i> | <i>Calothrix</i> |
| SECCIÓN V | | | |
| Filamentos con heterocistos, división en más de un plano | | <i>Chlorogloeopsis</i> | <i>Fischerella</i> |

***Sección I:** Formada por cianobacterias unicelulares que se dividen por fisión binaria o gemación. Las células pueden ser esféricas, cilíndricas u ovals y, pueden encontrarse aisladas o formando agregados (ejemplo: *Synechococcus*).

***Sección II:** Formada por cianobacterias unicelulares que se dividen por fisión múltiple, dando lugar a células reproductivas esféricas de menor tamaño, denominadas baeocitos (ejemplo: *Chamaesiphon*).

***Sección III:** Incluye a las cianobacterias filamentosas sin heterocistos que se dividen en un solo plano. La reproducción se realiza por fragmentación de los filamentos y, a veces por la formación de hormogonios o mediante la germinación de acinetos (ejemplo: *Phormidium*).

***Sección IV:** Agrupa a las cianobacterias filamentosas provistas de heterocistos que se dividen en un solo plano. La reproducción se realiza por fragmentación del tricoma, formación de hormogonios o germinación de acinetos (ejemplo: *Nostoc*).

***Sección V:** Agrupa a las cianobacterias filamentosas provistas de heterocistos, con división de células en más de un plano, dando lugar a filamentos ramificados. La reproducción se lleva a cabo igual que en las cianobacterias de las dos secciones anteriores (ejemplo: *Mastigocladus*).

Posteriormente, Castenholz y Waterbury en la primera edición del *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology* (Boone y Castenholz, 1989), realizaron una rigurosa revisión de algunos de los géneros más importantes, basándose en las características morfológicas (célula, tricoma y colonia), ultraestructurales, fisiológicas y ecológicas, así como en el análisis del porcentaje de G+C del genoma e hibridación ADN-ADN. Mediante esta aproximación, fueron reconocidos cinco órdenes bastantes similares a los reconocidos por el sistema tradicional. Además, se comprobó que numerosos organismos que en el pasado fueron considerados estrechamente relacionados desde el punto de vista filogenético, ahora no lo son.

En la actualidad, los esquemas publicados por Rippka y col. (1979) y en el *Bergey's Manual* (Boone y Castenholz, 1989) se han revisado en la nueva versión de este manual (Boone y Castenholz, 2001), utilizando para ello las interpretaciones filogenéticas basadas en las secuencias del gen que codifica para el ARN ribosómico de 16S (ARNr 16S). En esta última edición, se incluye información recopilada tanto de fuentes bacteriológicas como fisiológicas, que han permitido distinguir 5

subsecciones (I-V), equivalentes a los órdenes establecidos en la literatura botánica. Este sistema de clasificación se muestra resumido en la tabla siguiente:

Tabla 3. Clasificación de cianobacterias según *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology* (Boone y Castenholz, 2001). Los nombres en paréntesis se corresponden con los nombres de los taxones según el sistema botánico.

| CLASE | Subsección | Parte | Géneros |
|-----------------------|--------------------------|--|---|
| CIANOBACTERIA | I (Chroococcales) | I | <i>Chamaesiphon, Chroococcus, Cyanobacterium, Cyanobium, Cyanothece, Dactylocopsis, Gloeobacter, Gloecapsa, Gloeotheca, Microcystis, Prochlorococcus, Prochloron, Synechococcus, Synechocystis</i> |
| | II (Pleurocapsales) | I | <i>Cyanocystis, Dermocarpella, Stanieria, Xenococcus</i> |
| | | II | <i>Chroococciopsis, Myxosarcina, Pleurocapsa</i> |
| | III (Oscillatoriales) | I | <i>Arthrospira, Borzia, Crinalium, Geitlerinema, Halospirulina, Leptolyngbya, Limnothrix, Lyngbya, Microcoleus, Oscillatoria, Planktothrix, Prochlorothrix, Pseudanabaena, Spirulina, Starria, Symploca, Trichodesmium, Tychonema</i> |
| | IV (Nostocales) | I | <i>Anabaena, Anabaenopsis, Aphanizomenon, Cyanospira, Cyndrospermopsis, Cyndrospermum, Nodularia, Nostoc, Scytonema</i> |
| II | | <i>Calothrix, Rivularia, Gloeotrichia, Tolypothrix, Microchaete</i> | |
| V (Stigonematales) | I | <i>Chlorogloeopsis, Fischerella, Geitleria, Iyengariella, Nostochopsis, Mastigocladopsis, Westiella, Stigonema, Doliocatella</i> | |

El término “polifásico” empleado en el campo de la taxonomía fue introducido como respuesta al intento de integración de la información genotípica, fenotípica y filogenética (Vandamme y col., 1996). Con el paso del tiempo, ha resultado ser una herramienta valiosa para los bacteriólogos y, particularmente para los cianobacteriólogos, en los estudios de diversidad cianobacteriana en diferentes ecosistemas (Lehtimaki y col., 2000; Taton y col., 2003; Casamatta y col., 2005; Willame y col., 2006; Yeager y col., 2007).

La aplicación de técnicas moleculares como secuenciación génica, ultraestructura (disposición de los tilacoides en el interior celular; Komárek y Kaštovský, 2003) y caracterización ecofisiológica (vesículas de gas, adaptaciones a condiciones específicas, pelos en los organismos filamentosos; Whitton, 1987; Lundgren y col., 2001; Komárek, 2003), ha permitido obtener numerosos e importantes datos taxonómicos en las últimas décadas. La gran disponibilidad de información ha hecho

surgir la necesidad de adaptar el sistema de clasificación cianobacteriano actual, incorporando todos los datos disponibles hasta el momento. En este sentido, Hoffmann y col. (2005) han propuesto un nuevo sistema de clasificación para los organismos cianoprocarióticos, que refleja mejor las relaciones evolutivas de estos organismos (ver **tabla 4**). Sin embargo, es evidente que ciertos órdenes y familias continúan siendo problemáticos y requieren más revisiones, por eso la clasificación debe ser cambiada, corregida y re-evaluada continuamente.

A continuación, se desarrollan con más detalle las características de los taxones, que han sido objeto de estudio en la presente memoria.

II.1. Orden Oscillatoriales. Subsección III.

Los miembros del orden Oscillatoriales se caracterizan por ser cianobacterias filamentosas sin heterocistos y acinetos, cuyas células sufren división en un solo plano (Castenholz y col., 2001). Tradicionalmente, se han distinguido del resto de cianobacterias en base a la presencia o ausencia de vaina, apariencia del filamento, falsas ramificaciones y por el contenido de pigmentos celulares. A nivel de especie, los principales criterios taxonómicos empleados son el tamaño de la célula, las constricciones de los tabiques transversales, inclusiones celulares (granulación) y la forma de la célula (especialmente el de las células terminales de los tricomas) (Komárek y Anagnostidis, 2005).

La mayoría de las cianobacterias de este grupo, presentan tricomas con ambos lados paralelos, aunque algunas veces, se estrechan hacia los extremos. La célula terminal puede diferir en la forma con respecto a las células adyacentes, pudiendo haber una modificación adicional en el exterior de la célula terminal, a modo de caperuza, membrana espesa o caliptra (Castenholz y col., 2001; Whitton, 2002). En algunos casos, los tricomas terminan en un pelo multicelular, como en la mayoría de las especies de *Homoeothrix* (Whitton, 2002). Pueden formar hormogonios estructuralmente similares a los tricomas vegetativos y, algunos miembros producen falsas ramificaciones (Rippka y col., 1979; Anagnostidis y Komárek, 1988). Todos los géneros y, probablemente todas las especies, son capaces de moverse bajo algunas condiciones. Muchas formas planctónicas contienen vacuolas de gas, que pueden aparecer a lo largo del tricoma o localizarse cerca de los tabiques de separación.

Tabla 4. Nuevo sistema de clasificación cianobacteriano propuesto por Hoffmann y col, 2005. Sólo los géneros respaldados por marcadores moleculares y ultraestructurales están incluidos en la categoría de géneros. Para los taxones en paréntesis no están validadas todavía sus descripciones.

| | Orden | Familia | Géneros |
|---------------------------------------|--|--|---|
| G* | (Gloeobacterales) | Gloeobacteraceae | <i>Gloeobacter</i> |
| Synechococophycidae | (Synechococcales) cocoides | Synechococcaceae cocoides | <i>Aphanothece</i> (tipo celular pequeño), <i>Cyanobium</i> , <i>Prochlorococcus</i> , <i>Synechococcus</i> |
| | | Merismopediaceae cocoides | <i>Aphanocapsa</i> , <i>Synechocystis</i> (células pequeñas) |
| | | Chamaesiphonaceae cocoides/heteropolar | (<i>Chamaesiphon</i> subg. <i>Euchamaesiphon</i>) |
| | | (Acaryochloridaceae) cocoides | <i>Acaryochloris</i> |
| | (Pseudanabaenales) filamentosa | Pseudanabaenaceae filamentosa | <i>Geitlerinema</i> , <i>Halomicronema</i> , <i>Limnothrix</i> , <i>Leptolyngbya</i> , <i>Prochlorothrix</i> , <i>Pseudanabaena</i> |
| | | Schizotrichaceae filamentosa | <i>Schizothrix</i> |
| Oscillatoriothycidae | Chroococcales cocoides/filamentosa | (Cyanobacteriaceae) cocoides | <i>Aphanothece stagnina</i> (tipo celular alargado), <i>Cyanobacterium</i> , <i>Cyanothece</i> , “ <i>Euhalothece</i> ”, <i>Myxobaktron</i> |
| | | Microcystaceae cocoides | <i>Microcystis</i> |
| | | Gomphosphaeriaceae cocoides | <i>Snowella</i> , <i>Woronichinia</i> |
| | | Prochloraceae cocoides | <i>Prochloron</i> |
| | | Chroococcaeaceae cocoides | <i>Chroococcus</i> |
| | | Entophysalidaceae polarizada | <i>Entophysalis</i> , <i>Cyanoarbor</i> |
| | | Stichosiphonaceae polarizada | <i>Chamaecalyx</i> , (<i>Chamaesiphon</i> subg. <i>Godlewskia</i>) |
| | | Dermocarpellaceae polarizada | <i>Cyanocystis</i> , <i>Dermocarpella</i> , <i>Stanieria</i> |
| | | Xenococcaceae polarizada | <i>Chroococciopsis</i> , <i>Myxosarcina</i> , <i>Xenococcus</i> |
| | | Hydrococcaceae polarizada | <i>Hyella</i> , <i>Pleurocapsa</i> |
| | | (Spirulinaceae) filamentosa | (<i>Holospirulina</i> , <i>Spirulina</i>) |
| | | Oscillatoriales filamentosa | Borziaceae necridios - |
| | Phormidaceae necridios + | | <i>Arthrospira</i> , <i>Microcoleus</i> , <i>Phormidium</i> , <i>Planktothrix</i> , <i>Symploca</i> , <i>Trichodesmium</i> , <i>Tychonema</i> |
| | Ammatoideaceae | | <i>Ammatoidea</i> |
| | Oscillatoriaceae necridios + | | <i>Blennothrix</i> , <i>Hormoscilla</i> , <i>Lyngbya</i> , <i>Oscillatoria</i> |
| Gomontiellaceae necridios + | <i>Crinalium</i> , <i>Starria</i> | | |

* Gloeobacterophycidae

Tabla 4. (Continuación).

| | | | |
|------------------|--------------------------------|--|--|
| Nostochophycidae | Nostocales con heterocistos | Scytenemataceae isopolar, falsas ramificaciones | <i>Scytonema</i> |
| | | Symphynemataceae ramificaciones verdaderas | <i>Symphyonema</i> , “Y-Stigonematales” |
| | | Borzinemataceae | <i>Borzinema</i> |
| | | Rivulariaceae heteropolares, pelos | <i>Calothrix, Gloetrichia, Rivularia</i> |
| | | Microchaetaceae heteropolares | <i>Microchaete, Spirirestis, Tolypothrix</i> |
| | | Nostocaceae isopolar, sin ramificaciones | <i>Anabaena</i> -planctónica, <i>Anabaena</i> -bentónica, <i>Anabaenopsis</i> , <i>Aphanizomenon</i> , <i>Cylindrospermopsis</i> , <i>Cylindrospermum</i> , <i>Nodularia</i> , <i>Nostoc</i> , <i>Trichormus</i> |
| | | Chlorogloeopsidaceae ramificaciones verdaderas simples | <i>Chlorogloeopsis</i> |
| | | Hapalosiphonaceae ramificaciones verdaderas | <i>Fischerella, Mastigocladus</i> , “T-Stigonematales” |
| | | Loriellaceae | <i>Loriella</i> |
| | | Stigonemataceae ramificaciones verdaderas, multiseriadas | <i>Stigonema</i> |

Las cianobacterias del orden Oscillatoriales aparecen en una gran diversidad de hábitats, desde sistemas acuáticos hasta terrestres; pudiendo ser especies planctónicas o bentónicas y, formar parte del perifiton, de costras biológicas terrestres o tapetes microbianos. En diversos estudios realizados (Sheath y Müller, 1997; Mcknight y col., 1999; Vincent, 2000; Casamatta y col., 2005; Taton y col., 2003, 2006a y b) se han mostrado que los tapetes microbianos de lagos y charcas de la Antártida y del Ártico, generalmente están dominados por cianobacterias pertenecientes a este orden.

II.1.1. Clasificación taxonómica.

El Manual de Maurice Gomont, Monographie des Oscillatoriées (Gomont, 1882a, b), fue el primer manual exhaustivo para la clasificación taxonómica de las Oscillatoriales. Posteriormente, Geitler (1932) realizó distinciones genéricas en este grupo, basadas principalmente en las propiedades de la vaina y la formación de la colonia. La separación de varios de estos géneros ha preocupado a los taxonomistas durante bastante tiempo (Elenkin, 1936-1949; Desikachary, 1959; Starmach, 1966), debido a que los caracteres empleados para distinguirlos, normalmente están

influenciados por las condiciones ambientales. Ante este hecho, algunos taxonomistas optaron por la reducción drástica del número de géneros y especies (Drouet, 1968, 1981; Bourrelly 1970a, 1970b, 1985) o bien por la búsqueda de otros criterios que permitieran su clasificación (Anagnostidis y Komárek, 1985, 1988).

Con el reconocimiento de las características bacterianas de las cianobacterias, Rippka y col., (1979) introdujeron un nuevo sistema de asignación de géneros. Así, dentro de las Oscillatoriales (ver **tabla 2**), se distinguieron los géneros tradicionales *Spirulina*, *Oscillatoria* y *Pseudanabaena*, además del grupo LPP (para los géneros *Lyngbya*, *Phormidium* y *Plectonema*), que a su vez se subdividió en LPP-A y LPP-B. El subgrupo LPP-A comprendía aquellas LPPs con tricomas de más de 3 µm de ancho y con células discoidales, mientras que el subgrupo LPP-B, incluiría tricomas de menos de 3 µm y con células cilíndricas o isodiamétricas. En las dos ediciones del *Bergey's Manual* (Castenholz y Waterbury, 1989; Castenholz y col., 2001) con ligeras modificaciones y, con la incorporación de algunas descripciones genéricas derivadas de los estudios de muestras naturales. La diferencia principal entre dichas ediciones, fue el reconocimiento en la última versión, (Castenholz y col., 2001) del género *Leptolyngbya* Anagnostidis y Komárek 1988, *Geitlerinema* Anagnostidis 1989 y *Microcoleus* Desmazières 1823 para algunos miembros previamente asignados al grupo LPP-B (Rippka y col., 1979).

En los últimos años, Anagnostidis y Komárek (1988) y Komárek y Anagnostidis (2005) han realizado una revisión importante del orden Oscillatoriales, con la introducción de nuevos criterios taxonómicos, como proporciones celulares y patrones de división, existencia de aerotopos, movilidad y manera de distribución de los tricomas. El resultado fue la transferencia de un gran número de especies, desde los cuatro géneros establecidos por Geitler (1932) a 18 nuevas entidades genéricas definidas, que se distribuyeron entre las familias Borziaceae, Pseudanabaenaceae, Schizotrichaceae, Phormidiaceae, Oscillatoriaceae y Gomontiellaceae (ver **tabla 1**). En particular, estos autores definieron el género *Phormidium* (Anagnostidis y Komárek, 1988), como aquellas especies que presentan los tilacoides orientados radialmente en las secciones transversales de las células. Además, distinguieron el grupo *Geitlerinema* como subgénero de *Phormidium* y el género *Leptolyngbya* (grupo LPP-B, según Rippka y col., 1979) (Anagnostidis y Komárek, 1988).

La familia botánica Schizotrichaceae fue definida por Elenkin (1934). Se caracteriza por la disposición de varios tricomas paralelos (de hasta 3 µm de ancho)

dentro de una misma vaina más o menos ancha (Bourrelly, 1970b), carecen de aerotopos (vesículas de gas) y los tilacoides están localizados cerca de la pared celular (Komárek y Anagnostidis, 2005). En la última revisión del orden Oscillatoriales (Komárek y Anagnostidis, 2005), esta familia se subdividió en los géneros *Trichocoleus* y *Schizothrix*. El género *Schizothrix* es un género heterogéneo, que desde las primeras revisiones, se ha dividido en varios subgéneros o secciones (Gomont, 1892a, b; Geitler, 1932; Bourrelly, 1970, etc.). Sus miembros presentan vainas normalmente gruesas, anchas y lameladas que engloban a uno, varios o a muchos tricomas rectos o ligeramente ondulados, algunas veces con falsas ramificaciones (Komárek y Anagnostidis, 2005; Whitton, 2005). Las especies que forman colonias, aparecen asociadas a ambientes acuáticos o zonas húmedas durante largos periodos de tiempo, sin permanecer sumergidas a no ser que estén calcificadas. Sin embargo, las especies formadoras de tapetes, normalmente crecen sumergidas permanentemente, estando sujetas a periodos alternativos de estar muy húmedas o incluso sumergidas, con periodos donde están casi o completamente secas (Whitton, 2002).

A pesar de las numerosas revisiones realizadas, se han agrupado juntos algunos organismos muy similares que de lo contrario se clasificarían dentro de géneros diferentes, así como, se han separado especies que probablemente estarían estrechamente relacionadas, o incluso, se han clasificado las mismas especies en géneros diferentes, siendo necesario revisiones drásticas en el futuro.

II.2. Orden Nostocales. Subsección IV.

Las especies del orden Nostocales se caracterizan por ser cianobacterias filamentosas que se dividen en un solo plano y, presentan la capacidad de formar heterocistos terminales o intercalados a lo largo del tricoma (Castenholz y col., 2001). Varios géneros se caracterizan por una atenuación de los filamentos (Komárek y Anagnostidis, 1989; Whitton, 1989) y, el desarrollo de un pelo en el extremo apical del tricoma en condiciones especiales, formado por células estrechas, alargadas, altamente vacuoladas y carentes prácticamente de citoplasma (Sinclair y Whitton, 1977). Algunos géneros muestran falsas ramificaciones (Desikachary, 1959) y, ciertos géneros producen acinetos adyacentes o próximos a los heterocistos, que aparecen de forma solitaria o bien varios dispuestos en serie (Whitton, 1987).

Las especies de Nostocales pueden formar hormogonios (Whitton, 1987; Castenholz, 1989b), cuya función principal es la reproducción (Fay, 1983). Se distinguen del tricoma parental por la capacidad de movimiento (Whitton, 1992), reducción de la longitud del tricoma y por presentar células más pequeñas. Los hormogonios también pueden diferir en la forma y/o pueden contener vesículas de gas, pero no exhiben heterocistos.

Estas cianobacterias se encuentran en una gran diversidad de hábitats, gracias a su capacidad para fijar el nitrógeno atmosférico bajo condiciones aerobias. Pueden ser epífitas o epilíticas en ambientes de agua dulce y marina, así como planctónicas, constituyendo uno de los principales componentes de los afloramientos masivos en embalses o lagos tropicales o templados (Whitton, 1987). Muchos representantes son capaces de sobrevivir a temperaturas frías y condiciones severas de desecación (Castenholz, 1989b). Además, algunos géneros establecen asociaciones simbióticas, siendo casi todos ellos representantes de *Nostoc* (Wilkinson y Fay, 1979; Rasmussen y Svenning, 2001; Svenning y col., 2005).

II.2.1. Clasificación taxonómica.

Las cianobacterias con heterocistos (Nostocales o subsección IV y Stigonematales o subsección V) forman un grupo genético coherente, diferente de los representantes sin heterocistos (Oscillatoriales o subsección III) (Wilmotte, 1994a; Turner y col., 1999; Honda y col., 1999; Wilmotte y Herdman, 2001; Rajaniemi y col., 2005). Sin embargo, dentro de este grupo, varios representantes aparecen entremezclados (Lyra y col., 1997 y 2001; Gugger y Hoffman, 2004).

Según el sistema tradicional, el orden Nostocales se encuentra formado por 4 familias: Scytonemataceae, Microchaetaceae, Nostocaceae y Rivulariaceae (Komárek y Anagnostidis, 1989), en base a la polaridad, presencia o no de falsas ramificaciones y origen, forma de los extremos y, desarrollo de hormogonios, entre otras características. Sin embargo, Castenholz (1989b) dividió el orden en 3 grupos, reconocidos como familias en la primera edición del *Bergey's Manual*: la familia Nostocaceae, con tricomas formados por células vegetativas más o menos del mismo diámetro y sin falsas ramificaciones, la familia Scytonemataceae con el desarrollo de falsas ramificaciones y, la familia Rivulariaceae caracterizada por tricomas atenuados con un heterocisto terminal, aunque algunas especies también tienen heterocistos intercalados.

Como los análisis filogenéticos no soportaron estas divisiones, habiendo géneros entremezclados, Rippka y col., (2001a) separó a los miembros de la Subdivisión IV en dos grupos (**tabla 3**), basándose en las diferencias morfológicas del tricoma. La primera se correspondía con Nostocaceae en la edición anterior del *Bergey's Manual* (Castenholz, 1989b) e incluyó además al género *Scytonema*, tradicionalmente asignado a Scytonemataceae (Geitler, 1932). Y la segunda parte, se subdividió en 5 géneros en base al grado de atenuación de los tricomas maduros y, otras características morfológicas y ecológicas. Esta subdivisión albergó a los géneros *Calothrix*, *Rivularia* y *Gloetrichia*, asignados a la familia botánica Rivulariaceae, e incluyó a dos géneros más, *Tolypothrix* y *Microchaete*, tradicionalmente tratados como miembros de las familias botánicas Scytonemataceae y Microchaetaceae, respectivamente (Geitler, 1932).

La familia botánica Nostocaceae comprende así a todos los géneros asignados a la Subsección IV.I de la última versión del *Bergey's Manual* (Rippka y col., 2001a), excepto el género *Scytonema*. Según, Komárek y Anagnostidis (1989) esta familia se subdividió en dos subfamilias, “Anabaenoideae” y “Nostocoideae”. La primera incluyó a todos los géneros en los que los acinetos se forman muy próximos o adyacentes a los heterocistos, mientras que la última subfamilia se limita a los miembros cuyos acinetos se desarrollan entre dos heterocistos de manera equidistante. Sin embargo, se ha demostrado por los estudios morfológicos y de hibridación ADN-ADN, que ambos tipos de patrones de acinetos pueden suceder en diferentes “especies” del mismo género (Stulp y Stam, 1982, 1984a). Además, diversos estudios polifásicos, que se han llevado a cabo para resolver las relaciones filogénicas dentro de un mismo género (Beltran y Neilan, 2000; Lehtimäki y col., 2000; Saker y Neilan, 2001; Moffitt y col., 2001) o entre varios géneros (Tamas y col., 2000; Wright y col., 2001; Lyra y col., 2001; Willame y col., 2006), han mostrado que las interrelaciones no están claras en el grupo de Nostocales y necesitan ser más estudiadas (Lyra y col., 1997; 2001).

La taxonomía de las Rivulariaceae ha sido muy discutida a lo largo de los años. Inicialmente, Geitler (1932) dividió a este grupo en 12 géneros, basándose principalmente en las características morfológicas y, en menor medida en las ecofisiológicas. Posteriormente, Komárek y Anagnostidis (1989) (ver **figura 2**), realizaron diferentes revisiones basándose en los conocimientos bioquímicos, ultraestructurales e incluso moleculares, además de los conocimientos morfológicos,

para formar géneros mucho más coherentes. De este modo, las Rivulariaceae quedaron constituidas por tan sólo 7 géneros: *Calothrix*, *Dichothrix*, *Gardnerul*, *Gloeotrichia*, *Isactis*, *Sacsonema* y *Rivularia*. Sin embargo, en la revisión realizada por Rippka y col. (1979), sólo fue reconocido el género *Calothrix*, en el que se incluyeron el resto de Rivulariaceae, siendo considerados formas transitorias que adoptan los tricomas cuando crecen rápidamente dentro de una vaina. En la anterior edición del *Bergey's Manual* (Castenholz y Waterbury, 1989), el género *Calothrix*, quedó dividido en los géneros *Calothrix* (sin acinetos y no requieren elevadas concentraciones de sodio, magnesio y calcio), *Rivularia* (sin acinetos y requieren concentraciones elevadas de sales) y *Gloeotrichia* (con acinetos subterminales y mayoritariamente de agua dulce). Posteriormente, en la última revisión de este manual (Boone y Castenholz, 2001), se incluyeron dentro esta subsección IV.II, los géneros *Tolypothrix* y *Microchaete*, pertenecientes a las familias botánicas Scytonemataceae y *Microchaetaceae* respectivamente (Geitler, 1932).

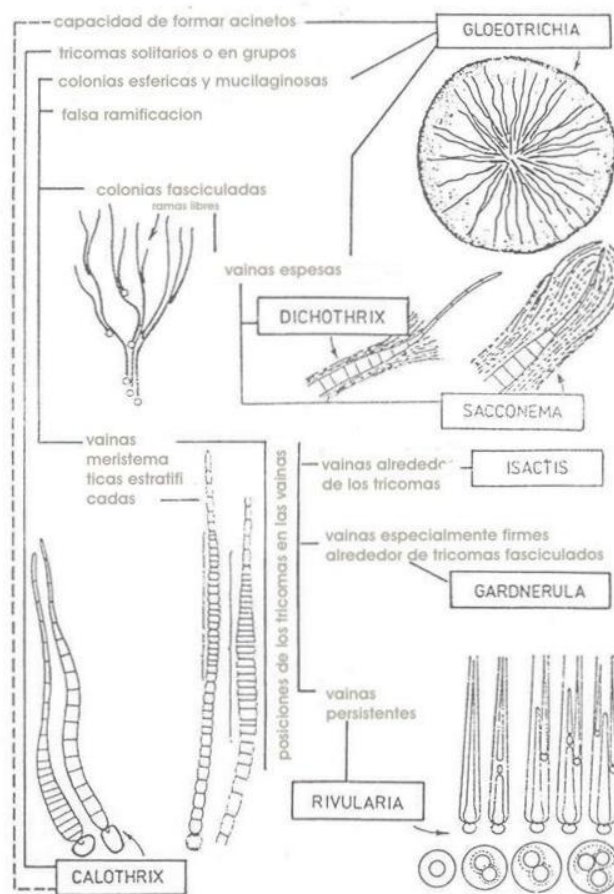


Figura 2. Características intergenéricas de las Rivulariaceae (Komarek y Anagnostidis, 1989).

II.2.2. Género *Nostoc*.

El género *Nostoc* comprende un grupo variable de cianobacterias con heterocistos, que se caracterizan por la formación de grandes colonias gelatinosas (Komárek y Anagnostidis, 1989). Son conocidos por poseer ciclos de vida complicados, como la formación de hormogonios móviles, que toman parte en la reproducción (Potts, 2000), en la dispersión de las especies en su hábitats natural (Tandeau de Marsac, 1994; Dodds y col., 1995), y en asociaciones simbióticas como agentes infectivos (Meeks y Elia 2002). En la mayoría de los casos, se desarrolla en el tricoma un solo heterocisto en ambos extremos e intercalados, más o menos a una distancia constante, mientras que los acinetos se presentan en largas cadenas (Herdman y col., 2001a). El tamaño y forma de la célula, el tipo de heterocistos y forma de las colonias macroscópicas, son usados normalmente como caracteres distintivos en la taxonomía tradicional (Komárek y Anagnostidis, 1989).

Son comunes en hábitats terrestres y acuáticos (Dodds y col, 1995; Potts, 2000) donde juegan un papel muy significativo en sus ecosistemas. Gracias a la capacidad de fijar nitrógeno, pueden mejorar la calidad de los suelos pobres en nutrientes, e incluso, incrementar la productividad de los arrozales no fertilizados (Dodds y col., 1995; Potts, 2000), así como ayudar a la estabilización del suelo (De Philippis, 2000). Algunas especies forman asociaciones simbióticas con hongos (para formar líquenes), hepáticas, briófitos, cicadas, helechos y una angiosperma, *Gunnera* (Potts 2000).

II.2.3. Género *Calothrix*.

El género *Calothrix* se caracteriza por presentar tricomas atenuados dispuestos de forma paralela entre sí y perpendiculares a la superficie, o bien entremezclados, formando colonias, aunque también pueden ser filamentos solitarios (Komárek y Anagnostidis, 1989). Normalmente los tricomas suelen terminar en un pelo multicelular, desarrollado en respuesta a la limitación de fósforo y, a veces, también de hierro (Whitton, 2002). Tienen un heterocisto basal y, en algunas especies se pueden observar además heterocistos intercalados. Ocasionalmente pueden presentar falsas ramificaciones (Rippka y col., 2001b). Los hormogonios se forman en los extremos apicales de los tricomas bajo condiciones ricas en fósforo y, a veces, pueden tener vacuolas de gas (Whitton, 1989). Se han descrito sólo unas pocas especies de *Calothrix* capaces de desarrollar acinetos (Geitler, 1932) y, en diversos estudios se ha

mostrado que pueden establecer asociaciones simbióticas con varios organismos eucariotas (Janson y col., 1993; West y Adams, 1997; Snoeijs y Murasi, 2004).

Los miembros de este género tienen una distribución global muy extendida, encontrándose en una gran variedad de ambientes marinos, de agua dulce y terrestres, como acantilados (Whitton, 1987), tapetes cianobacterianos antárticos (Fumanti y col., 1995), arrozales (Huang y Chow, 1992), arrecifes tropicales (Flecker y Taylor, 2004) y fuentes termales (Dillon y Castenholz, 2003).

II.2.4. Género *Rivularia*.

El género *Rivularia* comprende a cianobacterias capaces de formar colonias hemiesféricas o subesféricas, que contienen un gran número de filamentos agrupados radial o paralelamente, con sus heterocistos orientados al sustrato (Komárek y Anagnostidis, 1989). Cada filamento contiene un tricoma atenuado, que termina normalmente en un largo pelo multicelular (Sinclair y Whitton, 1977). Generalmente presentan un heterocisto basal, aunque algunas especies pueden tener heterocistos intercalados. No desarrollan acinetos y algunas veces son evidentes falsas ramificaciones (Whitton, 2002). Las vainas se extienden más allá del tricoma y normalmente se deshilachan en el extremo apical. Son capaces de formar hormogonios, que son liberados de las partes apicales del tricoma como resultado del enriquecimiento de fosfato (Whitton, 1987). Las colonias de algunas de las especies pueden persistir durante varios años, generalmente calcificadas. La formación de las colonias normalmente sucede por la agregación de los hormogonios liberados, de manera que una colonia en particular, no es necesariamente homogénea desde el punto de vista genético (Sinclair y Whitton, 1977). La existencia de *Rivularia* se encuentra favorecida por ambientes en donde se combinan periodos cortos e intermitentes de niveles altos y bajos de fosfato en el agua (Whitton, 2002), creciendo casi siempre en ríos de aguas calizas (Livingstone y Whitton, 1984).

II.2.5. Género *Tolypothrix*.

El género *Tolypothrix* se caracteriza por presentar tricomas maduros con un grado de atenuación bajo (Herdman y col., 2001b). Los filamentos presentan frecuentemente falsas ramificaciones, tratándose por lo general, de ramas laterales solitarias formadas normalmente en la base de los heterocistos (Geitler, 1932). La vaina es firme, delgada o gruesa e incolora, aunque frecuentemente pueden adquirir un color desde amarillo a

marrón intenso (Whitton, 2002). Son capaces de desarrollar hormogonios bajo condiciones de crecimiento especialmente favorables y, no se ha descrito la formación de acinetos (Rippka y Herdman, 1992). Los rasgos clave para separar a estas especies, según la taxonomía tradicional, son el hábitat, la anchura de los tricomas y aspectos de la ramificación y la vaina (Komárek y Anagnostidis, 1989). Todas las especies de *Tolypothrix* se han descrito en ambientes de agua dulce o terrestre (Holmes y Whitton, 1981; Yeager y col., 2007).

III. DIVERSIDAD GENÉTICA. INCORPORACIÓN DE MÉTODOS MOLECULARES A LA IDENTIFICACIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE CIANOBACTERIAS.

Aunque los análisis morfológicos han sido bastante detallados (Komárek y Anagnostidis, 1989, 1999 y 2005; Anagnostidis y Komárek, 1985 y 1990), ha habido problemas, en la mayoría de las ocasiones, a la hora de identificar los cultivos aislados empleados por los investigadores, para obtener un mejor conocimiento sobre la fisiología, genética y ecología cianobacteriana. Esto ha venido dado, por la pérdida de algunas características morfológicas importantes, como por ejemplo, la presencia de vesículas de gas (Lehtimäki y col., 2000), la forma de la colonia (Gugger y col., 2002b) o el tamaño de la célula (Otsuka y col. 2000), durante el cultivo prolongado de las cianobacterias en el laboratorio. Por esta razón, y con el reconocimiento de las características bacterianas de estos organismos, se planteó un nuevo sistema de clasificación basado en las características morfológicas, fisiológicas, citológicas y bioquímicas de cultivos axénicos de especies aisladas (Rippka y col., 1979; Wilmotte y col., 1994a).

Komárek y Anagnostidis (1989) han estimado que más del 50% de las cepas de las colecciones de cultivos existentes están mal identificadas. Por eso, se hacen necesarias nuevas revisiones de la taxonomía, que incluyan la formación de géneros más coherentes desde el punto de vista filogenético, utilizando para ello los conocimientos bioquímicos (Kim y col., 2006a), ultraestructurales (Komárek y Kaštovský, 2003) y especialmente, los moleculares de los que se disponen hasta el momento (Taton y col., 2006). De este modo, la incorporación de los análisis moleculares al estudio de comunidades de cianobacterias surge como una herramienta

complementaria a las técnicas tradicionales de clasificación de estos organismos, para abordar la problemática de la variabilidad morfológica que presentan ciertos taxones, desde un punto de vista, que de otra forma no hubiera sido posible (Wilmotte y col., 1994; García-Pichel y col., 2003).

Actualmente, diferentes grupos de investigación están llevando a cabo estudios sistemáticos en los que se examina la variación genética entre cianobacterias, con el fin de discriminar entre distintos taxones y establecer relaciones filogenéticas (Neilan y col., 1995; Gkelis y col., 2005; Rajaniemi y col., 2005; Teneva y col., 2005), tanto de cianobacterias de vida libre (Wilmotte, 1994b; Nelissen, 1996; Lu y col., 1997; Lentimäki y col., 2000; Lyra y col., 2005; Casamatta y col., 2005; Gentile y col., 2006) como cianobacterias en simbiosis (West y Adams, 1997; Rasmussen y Svenning, 2001; Svenning y col., 2005; Foster y col., 2006), de cualquier hábitat.

III.1. Métodos moleculares empleados para la caracterización de cianobacterias.

Para estudiar la variabilidad de las poblaciones y la diversidad genómica de las especies, se están utilizando una amplia variedad de métodos moleculares que han fijado principalmente como objetivo el empleo de genes funcionales, genes informativos filogenéticamente o genes que han demostrado ser marcadores útiles de la presencia de microorganismos en las muestras. De todos ellos destacan:

- Hibridaciones ADN-ARN y ADN-ADN (Keswani y Whitman, 2001), análisis del porcentaje de G+C de los genomas y comparación del tamaño del genoma (Lachance, 1981; Wilmotte, 1994b; Rippka, 1979).

- La técnica de PCR (reacción en cadena de la polimerasa), que permite de una forma simple y rápida la amplificación de regiones específicas del ADN presente en diferentes muestras biológicas, para su posterior análisis y comparación de secuencias. Estas regiones sirven como marcadores moleculares específicos, para identificar especies y resolver las relaciones filogenéticas entre cianobacterias estrechamente relacionadas. El marcador taxonómico más conocido y utilizado es el gen ARNr 16S al estar presente en todos los organismos vivos (Barker y col., 2000a, b; Tillet y col., 2001; Lyra y col., 2001; Margheri y col., 2003; Lyra y col., 2005; Willame y col., 2006). Aunque también se están empleando otros marcadores como: el espacio transcrito interno entre el ARNr 16S y 23S (ITS1) (Laamanen y col., 2001, 2002; Taton y col., 2006b), ARNt (Leu) intron (Costa y col., 2002; Rudi y col., 2002)

y regiones V6 a V8 del gen ARNr 16S (Rudi y col., 1997), espacio intergénico del operón de la ficocianina (*cpcBA-IGS*) (Robertson y col., 2001; Janson y Granéli, 2002), dinitrogenasa reductasa (*nifH*) (Dyble y col., 2002; Yannarell y col., 2006), D-ribulosa 1,5 bifosfato carboxilasa/oxigenasa subunidad L (*rbcL*) y proteína X similar a una chaperonina (*rbcX*) (Rudi y col., 1998; Gugger y col., 2002a; Tomitani y col., 2006), subunidad B de ARN polimerasa dependiente ADN (*rpoB*) (Palenik y Swift, 1996; Wilson y col., 2000), proteasa tipo serina implicada en la diferenciación del heterocisto (*hetR*) (Schiefer y col., 2002; Lundgren y col., 2005; Tomitani y col., 2006) y el gen que codifica para la proteína A de las vacuolas de gas (*gvpA*) (Beard y col., 1999; Hayes y col., 2002; Lyra y col., 2005).

- Las técnicas de perfiles genéticos o de “*finger printing*”, nos proporcionan un patrón o perfil de la diversidad de la comunidad, basándose en la separación física de especies únicas de ácidos nucleicos obtenidas mediante amplificación directa de los ácidos nucleicos del ambiente. Entre las técnicas más utilizadas, cabe destacar las siguientes: polimorfismo en cadena de hebra simple (SSCP) (Orita y col., 1989), análisis de restricción del ADN ribosomal amplificado (ARDRA) (Margheri y col., 2003), polimorfismo del tamaño de los fragmentos amplificados (AFLP) (Dvornyk y Nevo 2003), ADN polimórfico amplificado al azar (RAPD-PCR) (Teaumroong y col., 2002; Casamatta y col., 2003), polimorfismo del tamaño de los fragmentos de restricción (RFLP) (Rasmussen y Svenning, 2001; Widmer y col., 2006) y electroforesis en geles desnaturalizantes por gradiente de temperatura o químico (TGGE y DGGE) (Muyzer, 1999; Zeidner y Béja, 2004).

A continuación se explicarán con más detalle los métodos utilizados en la presente memoria.

III.1.1. Operon de la ficocianina (*cpcBA-IGS*).

El aparato fotosintético en las cianobacterias, al igual que en rodófitas y criptofitas, está formado por un centro de reacción asociado a un complejo antena, denominado ficobilisoma anclado en la membrana fotosintética, que se encarga de transmitir la energía de excitación fundamentalmente a los centros de reacción del fotosistema II (Mazel y col., 1988). Las proteínas mayoritarias de este complejo son las biliproteínas o pigmentos accesorios, que incluyen a la ficocianina (PC), aloficocianina (AP) y ficoeritrina, que a veces es sustituida por ficoeritrocianina en ciertas cianobacterias (Bryant, 1991; Glazer y col., 1983).

La ficocianina es el pigmento accesorio específico que proporciona a las cianobacterias su color verde azulado característico. Estas proteínas se encuentran muy conservadas en cianofitas, rodófitas y criptofitas (de Lorimer y col., 1984), y en la mayoría de los casos, los genes que las codifican se encuentran organizados en operones (Bryant, 1991).

El operon de la ficocianina ha sido caracterizado en las siguientes cianobacterias: *Synechocystis* PCC6803 y PCC6714 (Kaneko y col., 1996; Nakajima y col., 2002), en *Nostoc* sp. PCC7120 (Kaneko y col., 2001) y en *Arthrospira platensis* FACHB341 (Liu y col., 2005). En general, presenta 5 regiones de lectura abierta (ORFs), separados por espacios intergénicos no codificantes (IGS) que pueden ser altamente variables. Contiene los genes que codifican para las 2 subunidades biliproteicas, designadas β (*cpcB*) y α (*cpcA*), 3 polipéptidos que estabilizan las uniones (“linker”) denominadas *cpcC* y *cpcD* en *Nostoc* sp. PCC7120 (Kaneko y col., 2001) y *cpcH* en *A. platensis* FACHB341 (Liu y col., 2005) y, una liasa (*cpcE*), como se muestra en la siguiente **figura 3**.

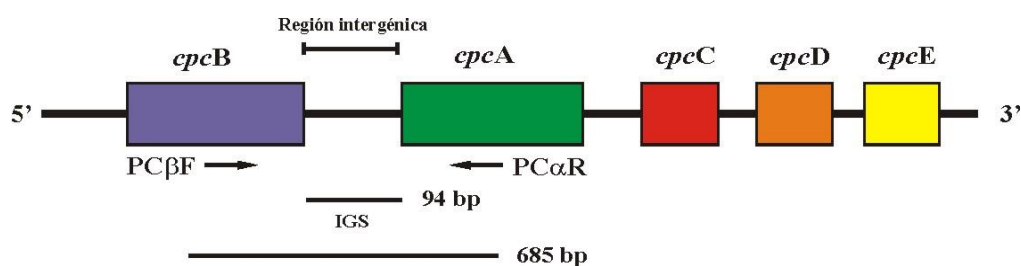


Figura 3. Esquema de la organización génica del operon de la ficocianina. Se muestra el esquema completo, pero no está dibujado a escala. Las líneas negras corresponden a las secuencias no codificantes (IGS); las regiones de lectura abierta (subunidades de la ficocianina o PC) se representan con forma de cajas. De *Nostoc* sp. PCC7120 (Belknap y Hazelkorn, 1987) la longitud del producto *cpcBA*-IGS amplificado por PCR es de 685 bp, con una IGS de 94 bp. Las flechas indican las posiciones relativas de los cebadores PC β F y PC α R en regiones altamente conservadas de las subunidades β y α del operon. Abreviaturas: IGS.- espacio intergénico no codificante (modificación del esquema de Neilan y col., 1995).

Diferentes estudios han mostrado que la región IGS junto con las regiones flanqueadas (*cpcBA*-IGS), puede ser empleada para identificar diferentes cepas cianobacterianas morfológicamente iguales (Neilan y col., 1995; Bolch y col., 1999; Dyble y col., 2002; Teneva y col., 2005), debido a que tiene potencialmente una gran variabilidad de secuencia dependiendo de la cepa cianobacteria, mientras que el ARNr 16S, se encuentra más conservado.

III.1.2. Subunidad del ARN ribosómico 16S (ARNr 16S).

Los genes que codifican para los ARN ribosómicos, distribuidos universalmente, presentan un elevado grado de conservación y pueden acumular variabilidades en mayor o menor medida en diferentes regiones de la molécula (Lane y col., 1985). El gen *rrs*, que codifica para la subunidad pequeña de ARN ribosomal (ADNr 16S) ha sido extensamente empleado en estudios filogenéticos bacterianos (Woese, 1987). Este gen junto con los genes *rrl* y *rrf* que codifican para los ARN ribosómicos 23S y 5S respectivamente, se encuentran organizados en un operon (**figura 4**), presente normalmente en múltiples copias en el genoma cianobacteriano (Iteman y col., 2000; Boyer y col., 2001).

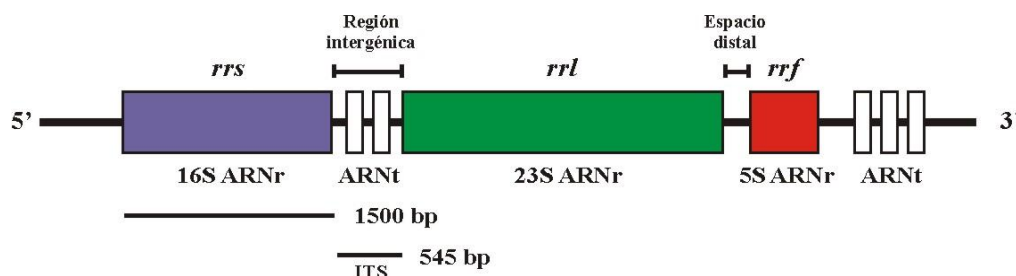


Figura 4. Esquema de la organización génica del operon de los ARN ribosómicos. Se trata de un esquema completo no dibujado a escala. Las líneas negras indican las secuencias no codificantes; las regiones de lectura abierta (de los distintos ARNr y ARNt) se representan con forma de cajas. Abreviaturas: ARNr.- ácido ribonucleico ribosómico. ITS.- espacio interno transcrito, ARNt.- ácido ribonucleico de tranferencia (extraído de Sturion, 2004)

Se han identificado dos operones en *Synechococcus* sp. PCC7002 (Chen y Widger, 1993), *Synechococcus* sp. PCC6301 (Tomioka y col., 1981; Williamson y Doolittle, 1983), *Synechocystis* sp. (Kaneko y col., 1996) y en *Calothrix parietina* (Boyer y col., 2001), 3 operones en *Scytonema hyalinum* (Boyer y col., 2001) y 4 en *Nostoc* sp. PCC7120 (Ligon y col., 1991). Al mismo tiempo, se han descrito en algunos taxones cianobacterianos la presencia de un único operon. Los múltiples operones que aparecen en estos organismos pueden ser copias idénticas (Scheldeman y col., 1999), o bien completamente diferentes en longitud y secuencia debido a las variaciones producidas en las regiones intergénicas (Iteman y col., 2000).

La región ITS que separa las secuencias del 16S y 23S en el operon de los ARNr puede variar considerablemente en cuanto a secuencia, longitud, estructura secundaria y presencia/ausencia de genes que codifican para ARNt entre los múltiples operones

que pueden estar presentes en una sola cepa. Pudiendo ser muy útil para discriminar entre especies de un mismo género o cepas de una misma especie (Boyer y col., 2001). Entre las cianobacterias, el patrón de composición más común es la presencia de los genes que codifican para el ARNt^{Ile} y ARNt^{Ala}, previamente descrito en los miembros del género *Anabaena* (Lu, 1999), *Arthrospira* (Nelissen y col., 1994), *Nostoc* (Lu, 1999; Itean y col., 2000), *Synechococcus* (Tomioaka y Sugiera, 1984) y *Trichodesmium* (Wilmotte y col., 1994b), así como *Calothrix*, *Coelodesmium*, *Scytonema* y *Tolypothrix* (Boyer y col., 2001). Pero también estas regiones pueden perderse como en *Nostoc* (Itean y col., 2000), *Nodularia* (Hayes y Barker, 1997), *Calothrix* y *Scytonema* (Boyer y col., 2001) o bien presentar sólo el gen para ARNt^{Ile}, registrado sólo en los géneros *Microcystis* (Otsuka y col., 1999), *Spirulina* (Nelissen y col., 1994) y *Synechocystis* (Kaneko y col., 1996).

Durante la última década, los investigadores han empleado una gran variedad de técnicas moleculares para responder cuestiones sobre evolución (Antón y col., 1998; Ishida y col., 2001), filogenia (Boyer y col., 2002; Janse y col., 2004a; Svenning y col., 2005), y diversidad de poblaciones (Otsuka y col., 1999; Thacker y Paul, 2004). En estos estudios, el análisis del gen ARNr 16S ha jugado un papel muy importante, constituyendo uno de los marcadores taxonómicos más útiles para detectar la presencia de microorganismos, especialmente en muestras naturales. Pero varios investigadores (Giovannoni y col., 1988; Wilmotte y col., 1992; Nelissen y col., 1996; Turner, 1997), también han empleado el gen que codifica para el ARNr 16S, para proporcionar una nueva percepción a las relaciones filogenéticas de los géneros cianobacterianos dentro los ordenes propuestos por Komárek y Anagnostidis (1989).

III.1.3. Técnicas de perfiles genéticos o “finger printing”.

A principios de los años noventa, comienza la aplicación de los métodos moleculares en los estudios ecológicos, especialmente los basados en el estudio de los genes después de la amplificación por PCR, para conseguir un mejor conocimiento sobre las comunidades microbianas del ambiente, independientemente del cultivo de cepas aisladas. De este modo, se han conseguido identificar microorganismos que no pueden ser cultivados con las técnicas de cultivo empleadas hasta ahora. Se estima que sólo el 1% de los microorganismos de la naturaleza han sido identificados y cultivados (Amann y col., 1995).

La electroforesis en geles desnaturizantes por gradiente térmico o TGGE, es una técnica molecular empleada para evaluar la diversidad genética de las comunidades microbianas (Eichner y col., 1999; Mugnai y col., 2003; Brümer y col., 2003; Rodríguez y col., 2007). Este método (ver **figura 5**) permite la separación de pequeños fragmentos (de un tamaño máximo de 500 bp) de la misma longitud pero de secuencia diferente, según su conformación (Nollau y Wagener, 1997), determinada principalmente por las estructuras secundarias y terciarias de la molécula, que pueden modificarse por influencias externas como temperatura, concentración de sales, pH, etc. De hecho, puede ser separados fragmentos con la sustitución de una sola base mediante esta técnica (Myers y col., 1985). Generalmente, para evitar la completa desnaturización de los fragmentos de doble cadena, se añade un fragmento rico en GC (de 23 a 50 nucleótidos) en el extremo 5' del fragmento de ADN amplificado (Myers y col., 1985; Lyautey y col., 2005).

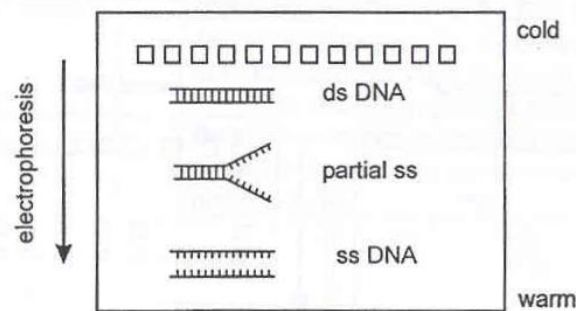


Figura 5. Esquema que muestra el comportamiento de una molécula de ADN durante una electroforesis en geles desnaturizantes por gradiente térmico. Extraído del Manual para TGGE Maxi System de Biometra.

Los diferentes alelos de las muestras amplificadas por PCR mediante cebadores específicos y, separados posteriormente por TGGE, dan lugar a un patrón de bandas característico de la comunidad estudiada (ver **figura 6**). Los números, posiciones e intensidades de las bandas obtenidas, pueden ser utilizados para determinar la diversidad de muestras naturales (Muyzer, 1999; Brümmmer y col., 2003; Lyautey y col., 2005), seguir el comportamiento de una comunidad en el tiempo y compararlos con los obtenidos para otras muestras de ambientes diferentes (Borneman y Triplett, 1997). La extracción de cada una de las bandas y su re-amplificación por PCR, permiten además secuenciar e identificar a cada uno de los miembros de la comunidad.

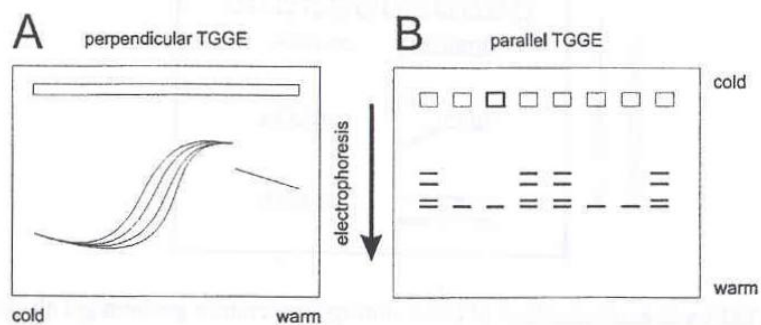


Figura 5. Diagrama del comportamiento de varias especies de ADN durante A: TGGE perpendicular B: TGGE paralela. Extraído del Manual para TGGE Maxi System de Biometra.

IV. DIVERSIDAD FISIOLÓGICA.

IV.1. Metabolismo de las cianobacterias.

Dependiendo de la fuente de carbono que utilicen las cianobacterias, se distinguen los siguientes tipos de metabolismo: fotoautotrofismo, cuando se emplea el carbono inorgánico (CO_2 o HCO_3^-) en la fotosíntesis oxigénica, para llevar a cabo los procesos biosintéticos; fotoheterotrofismo, cuando la fotosíntesis sólo proporciona energía en forma de ATP y, necesitan compuestos orgánicos como fuente de carbono y, quimioheterotrofismo, cuando las cianobacterias son capaces de crecer en oscuridad, utilizando una fuente de carbono orgánica como fuente de carbono y de energía (Smith, 1982). Un pequeño número de cianobacterias son también capaces de realizar la fotosíntesis anoxigénica, en la cual, el H_2S proporciona el poder reductor (Schmidt, 1988).

Mediante el ciclo reductivo de las pentosas fosfato, las cianobacterias acumulan glucógeno en presencia de luz, constituyendo la principal reserva de carbono de estos organismos. Posteriormente el glucógeno puede ser utilizado en oscuridad mediante la respiración como fuente principal de energía, en el ciclo oxidativo de las pentosas fosfato (Pelroy y Bassham, 1972). De este modo, el ciclo de las pentosas supone un mecanismo de concentración de CO_2 en el que interviene la enzima Rubisco (Badger y Price, 1990), que mejora la eficiencia de la fotosíntesis en la fijación de carbono inorgánico (Miller y col., 1990).

Las cianobacterias son capaces de utilizar varias formas de nitrógeno para su crecimiento (NO_3^- , NH_4^+), aunque tienen preferencia por el amonio (Guerrero y Lara,

1987). Independientemente de su origen, el nitrógeno es incorporado a la materia orgánica en forma de amonio (Stewart, 1980; Flores y Herrero, 1994). Algunas cianobacterias, son capaces de reducir biológicamente el N₂ atmosférico mediante la acción de la enzima nitrogenasa, localizada generalmente en los heterocistos (Bothe, 1982). Existen también otras cianobacterias capaces de fijar N₂ atmosférico mediante la separación temporal y/o espacial de este proceso del de fotosíntesis (Mitsui y col., 1986; Bergman y col., 1997).

Las cianobacterias captan el fósforo inorgánico disponible en su ambiente en forma de ortofosfato, mediante uno o varios sistemas de transporte activo, pero cuando la concentración es alta, el fósforo puede entrar en el interior de la célula por transporte pasivo, incorporándose después a las distintas rutas metabólicas (Healey, 1982). Además las cianobacterias son capaces de utilizar fósforo orgánico gracias a la presencia de enzimas fosfatasa (Grossman y col., 1994).

IV.1.1. Actividad fosfatasa.

El fósforo es requerido en la síntesis de ácidos nucleicos y fosfolípidos de membrana, así como en la transferencia de energía a través de nucleótidos tri- y bifosforilados. Se trata de una molécula de señalización citosólica y es uno de los nutrientes requeridos a altos niveles para el crecimiento celular. De este modo, el fósforo es esencial para la vida, siendo normalmente el elemento más limitante para la producción biológica. La mayoría de los organismos fotótrofos, si no todos, pueden utilizar el fósforo inorgánico disuelto (biólogicamente disponible como ortofosfato) de su ambiente, sin embargo la capacidad para utilizar el fósforo orgánico es más restrictiva (Whitton y col., 2005). Cuando las reservas de fósforo son lo suficientemente escasas como para convertirse en limitante, los organismos pueden adoptar diferentes estrategias con el fin de superar estas condiciones. Entre las estrategias adoptadas encontramos el empleo del fósforo inorgánico de una manera más eficiente (Wagner y Falker, 2001) y la utilización del fósforo orgánico presente en el ambiente. La mayoría de los estudios realizados se han centrado en la utilización del fósforo orgánico soluble en cianobacterias, algas y briófitos, pero también hay trabajos en donde se han descrito cianobacterias capaces de utilizar el fósforo orgánico insoluble (Whitton y col., 1991).

Muchos organismos acuáticos pueden hidrolizar moléculas de alto peso molecular a moléculas de bajo peso molecular, permitiendo que los compuestos orgánicos estén

disponibles para ser consumidos (Burn, 1983), gracias a la presencia de numerosas enzimas extracelulares, como por ejemplo los enzimas fosfatasas. Las fosfatasas son enzimas con la capacidad de hidrolizar ésteres fosfóricos, liberando ortofosfato que incrementa la disponibilidad del fosfato en el ambiente próximo y un residuo orgánico (Whitton y Hernández, 2000). La parte orgánica liberada de los compuestos fosfatados es captada normalmente por los propios organismos, pero también, puede servir como sustrato adicional para suplir las necesidades (C, N) de las bacterias heterótrofas. En estudios previos, se ha demostrado que las fosfatasas son altamente específicas para los enlaces éster de fosfato, pero no muestran especificidad para los residuos orgánicos (Perry, 1972).

Numerosos estudios muestran que la actividad fosfatasa es potenciada, cuando los organismos están bajo condiciones limitantes de fósforo y, disminuye cuando el fósforo se encuentra fácilmente disponible. Así, en un estudio realizado por Mateo y col., (2006) se ha demostrado que *Calothrix elenkinii* tiene una mayor capacidad de almacenamiento de fósforo y mayor actividad fosfatasa que *Nostoc punctiforme*, teniendo una respuesta mayor cuando se cultivaba a bajas concentraciones de fósforo.

El empleo de las medidas de fosfato para valorar el estado del fósforo de poblaciones algales naturales se describió por primera vez por Fitzgerald y Nelson en 1966. Actualmente, las medidas de actividad fosfatasa se han empleado en estudios de monitorización para dar una indicación del estado de los nutrientes en los sistemas acuáticos, particularmente del fósforo de las comunidades y poblaciones naturales (Whitton y col., 2005).

La actividad fosfatasa ha sido descrita en diferentes organismos de hábitats muy diversos, englobando desde ambientes terrestres como los desiertos antárticos (Banerjee y Sharma, 2004) hasta ambientes acuáticos de agua dulce como ríos mediterráneos (Romaní y col., 1998; Romaní, 2000; Sabater y col., 2003) y alpinos (Rott y col., 2000) así como ecosistemas marinos (Hernández y col., 2002). La mayoría de los estudios con poblaciones naturales de fitoplancton se han realizado en lagos y embalses donde la actividad fosfomonoesterasa ha sido analizada en todos los grupos principales de microorganismos (Heath y Cooke, 1975; Chróst y Siuda, 2002).

Los ensayos de fosfatasa también han sido incluidos en numerosos estudios para caracterizar las particularidades de un río o arroyo. Diferentes autores sugieren que en cuencas donde el agua presenta niveles de fosfato ambiental altamente variables, es más probable encontrar comunidades dominadas por cianobacterias formadoras de

pelo, como se muestra en los arroyos de la región de Upper Teesdale, en el norte de Inglaterra (Livingstone y Whitton, 1984). En estos arroyos calizos se ha observado que los cambios morfológicos producidos en las colonias de *Rivularia* (especie dominante en estos ríos) de forma estacional, reflejan cambios estacionales en la proporción nitrógeno/fósforo y en la concentración de fósforo del agua (Whitton y col., 1998), a su vez reflejados en cambios estacionales de las características químicas del suelo (Turner y col., 2003b). De este modo, un mejor entendimiento de los requerimientos de fósforo de las especies dominantes de un arroyo nos permitiría, de un modo rápido, una caracterización de las mismas.

En los océanos, los trabajos de actividad fosfatasa se han centrado en el plancton y en algas bentónicas (Hoppe, 2003; Hernández y col., 2002). El nitrógeno ha sido considerado como el factor limitante de crecimiento de los fotótrofos en el mar, pero se han encontrado zonas como algunas del litoral (Huang y Hong, 1999; Hoppe, 2003) en donde el fósforo es claramente el principal nutriente limitante, aunque algunas veces las situaciones cambian según las estaciones del año (Paasche y Erga, 1988). También existe información sobre la limitación de nutrientes en las tres cianobacterias más importantes de los océanos: *Trichodesmium* (Stihl y col., 2001) y las cianobacterias del picoplancton *Prochlorococcus* y *Synechococcus*, dominantes de las aguas oceánicas oligotróficas y responsables de la mayor parte de la producción primaria de los océanos (Bertilsson y col., 2003; Heldal y col., 2003). En estudios realizados en el mar Báltico (Niemi, 1979; Degerholm y col., 2006), la disponibilidad del fósforo disuelto se ha considerado un factor importante que determina la distribución espacial y temporal de las cianobacterias diazotróficas *Nodularia* y *Aphanizomenon*. Los resultados obtenidos indicaron que *Nodularia* parece estar mejor adaptada a ambientes con bajos niveles de fósforo, mientras que *Aphanizomenon* puede beneficiarse más rápidamente de los altos niveles de fósforo disponible en las regiones más superficiales.

Además, la actividad fosfatasa se ha estudiado en comunidades de cianobacterias, algas (algunas veces liquenizadas) y algunos heterótrofos que aparecen dentro de las rocas de regiones desérticas. Banerjee y col. (2000b) sugieren que estos organismos pueden obtener la mayor parte del fósforo del interior de la roca mientras que el carbono y nitrógeno pueden recibirlo más de la atmósfera. De este modo, el ciclo del fósforo orgánico dentro de estas comunidades es probablemente un factor clave que

influye sobre la actividad metabólica y por tanto, sobre la tasa de crecimiento durante los periodos cortos en los cuales la humedad esta disponible.

IV.1.1.1. Enzimas fosfatasas. Localización.

Según la clasificación internacional de las enzimas, las fosfatasas se engloban dentro de la categoría de enzimas hidrolasas. Dependiendo del tipo de sustrato que utilicen, se distinguen fosfomonoesterasas (PMEasa), fosfodiesterasas (PDEasa) y fosfotriesterasas (PTEasa) con la capacidad de hidrolizar fosfomonoesteres, fosfodiesteres y fosfotriesteres, respectivamente. Al mismo tiempo, las fosfatasas se pueden diferenciar en fosfatasas ácidas (EC 3.1.3.2) con un pH óptimo de 4 a 6 y fosfatasas alcalinas (EC 3.1.3.1) con un pH óptimo entre 8,3 y 9,5 (Hoppe, 2003).

La mayoría de los estudios muestran que el uso de fosfato orgánico depende de la presencia de enzimas fosfatasas en la pared celular o en los alrededores, que conlleva la liberación de fosfato inorgánico al exterior de la membrana citoplasmática (Hernández y col., 1996a; Štrojsová y col., 2003) y posterior aceptación de gran cantidad de este fosfato inorgánico al interior celular. A veces, la hidrólisis puede ocurrir dentro de la membrana citoplasmática, como es el caso de la cianobacteria *Calothrix parietina* cuando es expuesta a β -glicerofosfato (Wood y col., 1986).

Las enzimas fosfatasas pueden ser liberadas por lisis celular al exterior de la célula, en donde pueden unirse a las vainas o al mucílago que rodea a las células vivas de otros organismos, pertenecientes a la misma especie o a especie distinta (Grainger y col., 1989). Por otra parte, las enzimas pueden mantenerse en solución unidas a partículas en suspensión como por ejemplo material húmico, o bien pueden permanecer en estado libre, quedando expuestas a una gran variedad de inhibidores o proteasas presentes en el agua que causan su degradación.

Los investigadores han empleado diferentes términos para describir la actividad fosfatasa producida en las diferentes localizaciones, utilizándose un mismo término de diferentes maneras. En este trabajo hemos empleado la terminología establecida por Whitton y col. (2005), en la que la actividad intracelular se define como la actividad observada dentro de la membrana citoplasmática, la externa a la membrana como la unida a la superficie si es retenida en un filtro y la actividad extracelular como la liberada por el organismo y que puede pasar a través del filtro.

Las cianobacterias pueden presentar fosfomonoesterasas extracelulares (Whitton y col., 1991) así como fosfomonoesterasas de superficie celular, localizadas

principalmente en el periplasma (Ihlenfeldt y Gibson, 1975), aunque al mismo tiempo pueden aparecer unidas a alguna capa mucilaginoso externa a la pared. Algunas veces los organismos multicelulares aumentan el área de distribución de los enzimas fosfatasa de superficie gracias a la formación de pelos multicelulares. En ninguno de los estudios realizados hasta el momento se ha podido detectar la presencia de fosfodiesterasas extracelulares, sin embargo algunas cianobacterias presentaron fosfodiesterasas de superficie (Whitton y col., 2005).

IV.1.1.2. Factores que influyen en la síntesis y degradación de la enzima fosfatasa.

Durante cortos periodos de tiempo de inanición, las cianobacterias son capaces de utilizar los gránulos de polifosfato almacenados para suplir las necesidades celulares de fósforo. Sin embargo, cuando se enfrentan a largos períodos de escasez, requieren la activación de varios genes para incrementar su capacidad de captación de fósforo inorgánico y obtención del fósforo de alguna fuente disponible, como los genes implicados en la utilización de fuentes alternativas de fósforo y los que codifican para el transportador específico de fósforo inorgánico de alta afinidad.

Las fosfatasa parecen ser enzimas inducibles catabólicamente, como la mayoría de las enzimas hidrolíticas de microorganismos acuáticos. Algunas de ellas, son sintetizadas y excretadas fuera de la membrana citoplasmática, en la mayor parte de los casos en respuesta a un requerimiento de fósforo (Grainger y col., 1989). En bacterias planctónicas, existen evidencias claras que indican que la concentración de fosfato ambiental tiene una gran influencia sobre las síntesis de fosfomonoesterasas. Sin embargo, en el fitoplacton de lagos es difícil determinar si la actividad fosfomonoestara, observada sólo cuando las concentraciones de fosfato son muy bajas en el ambiente (Chróst y Overbeck, 1987, Jansson y col., 1988), se produce por los efectos a corto plazo de la inhibición por fosfato o bien a los efectos a largo plazo ocasionados por la represión de la síntesis de fosfomonoesterasas o por la degradación de la enzima ya presente.

Experimentalmente, se ha mostrado que el fosfato interno influye sobre la actividad fosfatasa de cultivos axénicos de cianobacterias como *Calothrix parietina* (Grainger y col., 1989) y *Nostoc commune* (Whitton y col., 1990). En todos los ellos, se observa una relación inversa entre la concentración del fósforo interno y la

actividad fosfomonoesterasa, reflejada así mismo en cambios del contenido enzimático.

Un gran número de investigaciones se han llevado a cabo para establecer si existe un valor umbral de la concentración de fósforo por debajo del cual se desarrolla la actividad fosfatasa. Los resultados obtenidos han sido muy diversos, así la cepa *Trichodesmium* WH9601 muestra ligera actividad fosfomonoesterasa incluso bajo condiciones repletas de fósforo mientras que en otras especies, como en *Nostoc commune* UTEX 584 (Whitton y col., 1990) y en una cepa de *Calothrix* aislada de un arrozal (Islam y Whitton, 1992), las actividades fosfomonoesterasa y fosfodiesterasa no son detectables a concentraciones de fósforo interno altas, siendo sólo apreciables cuando la concentración de fósforo del cultivo decae. Con respecto a la actividad fosfodiesterasa, se ha visto en *Nostoc commune* UTEX 584 (Whitton y col., 1990), que al igual que las enzimas fosfomonoesterasas, se desarrolla en respuesta al aumento de la limitación de fósforo.

En estudios realizados con *Nostoc* y *Calothrix*, se ha observado la formación de gránulos de polifosfato intracelulares cuando la concentración de fósforo aumenta (Grainger y col., 1989; Whitton y col., 1990). Algunos autores propusieron una posible relación directa entre la formación de polifosfato y la represión de la síntesis de fosfatasa, sin embargo, Huber y Habel (1985) sugirieron que esta relación es indirecta y la actividad fosfatasa posiblemente estaría directamente relacionada con pequeños cambios en la concentración celular de fosfatasa.

Estudios realizados por Carlsson y Graneli (1993), mostraron que no solo la disponibilidad de los sustratos es importante para la generación de fosfatasa sino también su composición química. Estos autores detectaron un incremento de fosfatasa alcalinas en presencia de suplementos de ácido húmico, que incrementaron la disponibilidad de fuentes de nitrógeno y por consecuencia, se produjo un aumento de la necesidad de fósforo. Además se ha observado que los compuestos húmicos se unen a ortofosfato en lagos y, que una débil irradiación de luz ultravioleta a intensidades similares a las naturales liberaría el ortofosfato de los complejos formados con los compuestos orgánicos.

Hay alguna evidencia de que las enzimas fosfomonoesterasas pueden persistir en ausencia de actividad durante largos períodos. De hecho, se ha demostrado que muestras algales preservadas pueden retener actividad fosfomonoesterasa durante muchos meses después de su almacenamiento, mientras que muestras secas de

cianobacterias como *Nostoc commune* y *Calothrix parietina* mantienen buen parte de su actividad original después de ser secadas y rehumedecidas dos años más tarde (Whitton y col., 2005).

IV.1.1.3. Factores ambientales que regulan la actividad fosfatasa.

La actividad fosfatasa se encuentra influenciada por las condiciones ambientales. Uno de los factores estudiados ha sido la temperatura, cuyo efecto sobre la actividad enzimática se ha observado que es complejo, englobando el efecto en la estabilidad de la actividad fosfatasa, en la velocidad de ruptura del complejo y en la afinidad de la enzima por el sustrato (Hernández y col., 2002). Los estudios realizados han mostrado que los distintos procesos que tienen lugar en un organismo, no tienen por qué responder a la temperatura de la misma manera, como en *Anabaena oryzae*, donde la temperatura óptima para las actividades fosfomonoesterasa y fosfodiesterasa es de 35° C y 38°C respectivamente (Singh y col., 2006)

Con respecto al efecto de la luz sobre la actividad fosfatasa se ha visto en ensayos de corta duración que es muy variable. De este modo, encontramos organismos en los que no es detectado ningún cambio (al menos aparentemente con respecto a la condición habitual) como es el caso de la cianobacteria *Rivularia atra* (Yelloly y Whitton, 1996), hasta organismos en donde es observada una respuesta marcada que parece ser específica de especie. Este es el caso del alga verde *Selenastrum capricornutum* (Klotz, 1985) que presentaba mucha más actividad a bajas intensidades de luz que a altas intensidades. Por otra parte, existen varios estudios sobre la degradación fotoquímica de fosfatasas en poblaciones o comunidades bacterianas (Herndl y col., 1993), observándose que la irradiación ultravioleta en lagos puede degradar también a los complejos de fosfato orgánico del ambiente, potenciando quizás de este modo la disponibilidad del fosfato (Francko y Heath, 1982). Incluso en el caso de que no haya un efecto directo de la luz sobre la enzima, es probable que la luz aumente la captación de fosfato inorgánico dentro de la célula, eliminando el fosfato inorgánico de las inmediaciones de la enzima, reduciendo de este modo la posible inhibición por el sustrato. El pH del medio es otro de los factores que pueden influir en la actividad fosfatasa. Así, se pueden diferenciar fosfatasas alcalinas con un pH óptimo habitual entre 7,5 y 10 y, fosfatasas ácidas con un pH óptimo en el rango de 4.5 a 6 (Whitton y col., 2002).

Se han realizado numerosos estudios sobre la influencia de la salinidad en la actividad fosfatasa, observando que la medida de actividad fosfatasa es relativamente insensible a los pequeños cambios de los iones, excepto para el fosfato. Se han realizado también varios estudios sobre el aumento de actividad fosfomonoesterasa en respuesta a un incremento de calcio, magnesio, sodio y potasio. Por ejemplo en *Calothrix parietina* (Grainger y col., 1989) se ha observado que un incremento de 0.1 a 1mM del calcio del medio producía un aumento en la actividad fosfomonoesterasa extracelular mientras que la de superficie no variaba y de forma similar ocurre en *Anabaena oryzae* (Sigh y col., 2006). En estudios realizados con esta cianobacteria se ha visto que los iones metálicos como Zn^{2+} , Mn^{2+} , Cu^{2+} , Co^{2+} y Fe^{2+} , requeridos en trazas para varios procesos fisiológicos y bioquímicos, han mostrado poco o ningún efecto a bajas concentraciones (0,001-0,1 mM) mientras que a altas concentraciones se convierten en tóxicos, causando una significativa reducción de la actividad fosfatasa que puede conllevar a la inactivación enzimática (Sigh y col., 2006).

Otros compuestos que pueden influir en la actividad fosfatasa son los compuestos orgánicos disueltos, relativamente recalcitrantes como los ácidos húmicos y fúlvicos. Estos compuestos originados en su mayor parte por la descomposición de los tejidos de las plantas superiores, forman complejos con muchas enzimas extracelulares bacterianas y algales, particularmente fosfatasas (Wetzel, 1992), provocando la inactivación temporal de la enzima por inhibición no competitiva. Estos compuestos pueden ser transportados en forma disuelta o coloidal con los movimientos de agua y desplazada a otros sitios dentro del ecosistema. El complejo puede ser desacoplado por la lisis dependiente de luz ultravioleta, produciéndose entonces la regeneración de la actividad enzimática en localizaciones alejadas (Boavida y Wetzel, 1998). Los polifenoles asimismo afectan a la regeneración del fósforo, no sólo por la unión directa con la enzima sino que también por la formación de complejos con los metales requeridos por la enzima para el metabolismo (Serrano y Boon, 1991). Esta inactivación química y subsiguiente reactivación por energía lumínica podría tener amplias implicaciones en las tasas de regeneración y reciclado de nutrientes en ecosistemas acuáticos.

Varios autores han determinado que la actividad fosfatasa es inhibida competitivamente por uno de los productos de la hidrólisis, el fosfato inorgánico (Sakshaug y col., 1984, Chróst y Overbeck, 1987; Paasche y Erga, 1988). Tal inhibición ha sido estudiada con respecto a concentraciones crecientes de fosfato tanto

en muestras de agua como en especies individuales. Adicionalmente, las fosfatasa son reguladas por la relación N: P interno (Myklestad y Sakshaug, 1983) y pueden depender de la demanda de fósforo del organismo en cuestión (Paasche y Erga, 1988) y de las distintas condiciones ambientales que se dan en las diferentes estaciones del año (Huang y Hong, 1999). También se encontró que en ambientes marinos, la radiación UV-B puede inhibir a la enzima, potenciando la limitación de fósforo (Garde y Gustavson, 1999).

IV.1.1.4. Medida de la actividad fosfatasa.

La actividad fosfatasa de los organismos puede ser medida mediante técnicas estándar que emplean análogos de sustratos. Se han usado gran variedad de métodos para cuantificar la actividad fosfatasa, pero sólo unos pocos autores han llevado a cabo estudios en donde se comparan varios métodos al mismo tiempo, siendo de este modo difícil comparar los resultados obtenidos en los diferentes estudios realizados. La metodología empleada para la medida de la actividad fosfatasa ha sido discutida en diferentes revisiones por Petersson y Jansson (1978), Huber y Kidby (1984), Cembella y col. (1984) y Hoppe (1991). Todas ellas, están basadas en la incubación de muestras naturales con un sustrato artificial que mimetiza al sustrato natural al unirse al enzima para hidrolizarlo.

El método cuantitativo más frecuente emplea *p*-nitrofenil fosfato (*p*NPP) como sustrato de la enzima fosfomonoesterasa (PMEasa) y bis-*p*-nitrofenil fosfato (bis-*p*NPP) para la enzima fosfodiesterasa (PDEasa). La hidrólisis orgánica de ambos sustratos produce la liberación de *p*-nitrofenol (*p*NP), que puede ser medido espectrofotométricamente a una longitud de onda de 405 nm. La actividad fosfomonoesterasa también puede ser determinada fluorométricamente usando 4 – metilumbeliferil fosfato (MUP), siendo un método desarrollado por primera vez por Hoppe (1983) en ambientes marinos. La validez del empleo del sustrato artificial MUP en aguas naturales fue demostrada por Somville (1984) y Chróst (1990) y se ha empleado en ríos mediterráneos (Romaní y col., 1998; Sabater y col., 2003). Este sustrato es hidrolizado a 4-metilumbeliferona (MU), cuya fluorescencia es medida usando un fluorímetro, siendo las longitudes de excitación y emisión de 366 y 444 nm, respectivamente.

Otros posibles sustratos utilizados para medir la actividad fosfatasa aparecen enumerados por Hoppe (2003), de entre todos ellos destaca el sustrato soluble

ELF[®]97-fosfato (2 – (5'-cloro-2'-fosforiloxilfenil)-6-cloro-4-(3H)-quinazolinona), conocido además como ELFP. Este compuesto fue introducido por Huang y col., (1992) y actualmente es utilizado por ejemplo para detectar el potencial de actividad fosfatasa del fitoplacton en estudios en campo de la microflora marina (Nedema y col., 2003, Štrojsová y col., 2003) o para examinar la actividad fosfatasa *in situ* en tapetes de perifiton (Sharma y col., 2005). Se trata de un compuesto fluorescente verde que al hidrolizarse enzimáticamente se transforma en un compuesto insoluble denominado ELF-A (ELF- alcohol verde-amarillo) que precipita alrededor de las células activas. La fluorescencia puede ser detectada directamente mediante la observación visual al microscopio (longitudes de excitación y emisión son de 360 ± 40 nm y 530 ± 25 nm, respectivamente) o por citometría de flujo.

IV.1.1.5. Ventajas adaptativas relacionadas con el metabolismo del P y la actividad fosfatasa.

Formación del pelo

El desarrollo de pelos multicelulares tiene lugar durante procesos de diferenciación producidos bajo condiciones especiales en algunas cianobacterias, algas verdes y pardas. La formación de estas diferenciaciones morfológicas y fisiológicas en estos tres grupos de organismos distintos, sugiere una importante ventaja evolutiva estructural.

El pelo multicelular se desarrolla al final del extremo atenuado del filamento a partir de la diferenciación de células vegetativas. Está formado por células altamente vacuoladas, especialmente en cianobacterias, que progresivamente suelen ser más largas y estrechas. Normalmente, la parte distal del pelo no presentan color debido a la pérdida de muchos de los componentes celulares como la clorofila, y al menos en la cianobacteria *Calothrix*, de ADN. En la mayoría de los taxones, el pelo suele diferenciarse en un sólo extremo del filamento pero en algunos casos se desarrollan en los dos.

Las evidencias indican que uno de los papeles más importantes desempeñados por el pelo es la de proporcionar una gran superficie a la pared celular con alta actividad fosfatasa. En algunos casos, el pelo se desarrolla en organismos que han estado sujetos a una limitación de fósforo, constituyendo uno de los lugares más importantes en donde se produce actividad fosfatasa, aunque ocasionalmente puede ser el único como en *Calothrix vigeiri* (Mahasneh y col, 1990). Se ha demostrado

experimentalmente la formación de pelo en respuesta a limitaciones de otros elementos en algunos organismos, siendo más pequeños que los formados bajo condiciones limitantes de fósforo. Así, en algunas cianobacterias capaces de formar pelo en respuesta a la limitación de fósforo se ha observado además el desarrollo de pelos en respuesta a la limitación de hierro, pero en menor proporción (Douglas y col., 1986) y sin mostrar actividad fosfomonoesterasa.

El desarrollo de pelo multicelular en cianobacterias, frecuentemente se ha descrito en ambientes con niveles de fosfato ambiental altamente variables y, donde la limitación del fósforo se produce de forma intermitente y marcada (Pentecost y Whitton, 2000; John y col., 2002). Muchos de estos organismos forman colonias características, con los filamentos englobados en mucílago. Cuando la superficie donde se desarrolla la colonia es firme, los pelos pueden extenderse fuera del límite superficial de la colonia hacia el cuerpo de agua que le rodea, ayudando posiblemente a optimizar el uso de los pulsos transitorios de fosfato orgánico e inorgánico producidos en el ambiente (Livingstone y Whitton, 1984; Yelloly y Whitton, 1996). En algunos casos la presencia de pelo y alta actividad fosfatasa se produce de forma permanente durante buena parte del año, como en *Rivularia* (Whitton y col., 1998) mientras que en otros casos, como en poblaciones de *Stigeoclonium* se trata de una condición menos usual (Gibson y Whitton, 1987).

Polifosfatos

Los gránulos de polifosfato son utilizados por las cianobacterias y otros organismos como reservas intracelulares de fósforo. También pueden actuar como agentes quelantes, servir como amortiguadores de condiciones adversas (ambientes alcalinos, estrés oxidativo o calor), reguladores de la transcripción y como moléculas que permiten la supervivencia durante la fase estacionaria (Kornberg, 1994). Los polifosfatos generalmente están presentes en células que crecen exponencialmente, y pueden acumularse en células deficientes en nitrógeno y azufre (excepto en heterocistos) y ser degradados en células deficientes en hierro y carbono, así como en células deficientes en fósforo (Tang y col., 1995). Inicialmente se produce una masiva acumulación de gránulos de polifosfato, que posteriormente serán degradados cuando las células repletas de nutrientes recuperen el crecimiento exponencial. Se ha observado que la capacidad para acumular polifosfato a gran escala puede permitir a

la cianobacteria tener cierta ventaja a la hora de utilizar los pulsos de nutrientes disponibles en ambientes discontinuos y pobres en nutrientes. (Mateo y col., 2006).

Además de la pérdida de los gránulos de polifosfatos almacenados, la pérdida del fósforo disponible en las cianobacterias planctónicas puede dar lugar a una disminución del crecimiento celular y del contenido del fósforo celular. La baja disponibilidad del fósforo y bajas intensidades de luz también pueden suprimir la formación de heterocistos seguida, de una reducción en la actividad de fijación del N₂ (Healey, 1973; Layzer y col., 1985).

IV.1.2. Fijación de N₂.

Las cianobacterias, en general, pueden usar nitrato o amonio como única fuente de nitrógeno para el crecimiento, pero adicionalmente, muchas de ellas son capaces de fijar el nitrógeno atmosférico (N₂). Este elemento, antes de ser incorporado en las moléculas biológicas debe ser químicamente reducido a amonio, requiriendo para ello un aporte considerable de ATP (16 ATP para reducir una molécula de dinitrógeno) (Gallon, 1992). Este proceso es interpretado según la siguiente ecuación: $N_2 + 8 e^- + 10 H^+ \rightarrow 2 NH_4^+ + H_2$ y, está catalizado por un complejo enzimático multimérico denominado nitrogenasa. Esta enzima es irreversiblemente inhibida por oxígeno molecular y otras especies reactivas de oxígeno, obligando a las cianobacterias fijadoras a poner en marcha un amplio abanico de respuestas protectoras, encaminadas a contrarrestar los efectos inhibitorios del oxígeno en la enzima.

Las cianobacterias fijadoras de nitrógeno (diazotróficas) están presentes en una gran diversidad de hábitats, como organismos libres (Teaumroong y col., 2002) o bien en simbiosis con diversos tipos de plantas y hongos (Van Coppenolle y col., 1995; Gentili y col., 2005; Foster y Zehr, 2006). La fijación de nitrógeno ha sido estudiada en una variedad de ecosistemas, especialmente ambientes marinos (Zehr, y col., 2001; Omoregie y col., 2004) y en cultivos de arroz (Quesada y col., 1997, 1998; Fernández-Valiente y col., 1997, 2000; Jha y Prasad, 2005; Ariosa y col., 2006; Vargas y Novelo, 2007), adoptando múltiples aproximaciones para medir el potencial de fijación y caracterizar las poblaciones diazotróficas presentes en estos ambientes (Zehr y col., 2003). El potencial de fijación de nitrógeno también se ha determinado en cianobacterias de ambientes extremos como desiertos áridos (Veluci y col., 2006), fuentes termales (Setounou y col., 2006) y zonas polares (Fernández-Valiente y col.

2007), así como en numerosas cianobacterias marinas (Kumazawa y col., 2001; Lundgren y col., 2001; Staal y col., 2007).

IV.1.2.1. Estructura del complejo enzimático nitrogenasa.

La nitrogenasa parece ser un complejo enzimático altamente conservado, encontrado en diversos grupos de procariotas, desde el dominio Bacteria hasta Archaea. Sin embargo, no ha sido detectado en ningún organismo eucariota (Berman-Frank y col., 2003). Se encuentra formada por dos subunidades denominadas dinitrogenasa reductasa y dinitrogenasa.

La dinitrogenasa reductasa está formada por una proteína homodimérica (α_2) codificada por el gen *nifH* (Mevarech y col., 1980), de aproximadamente 70KDa, unida de forma coordinada a una molécula de Fe_4S_4 . Se trata de un centro redox activo similar a los encontrados en las proteínas transportadoras de electrones de bajo peso molecular, como las ferredoxinas (Howard y Rees, 2000) y, se encarga de transferir los electrones al segundo componente de la nitrogenasa (dependiente de ATP) y de unir a las distintas subunidades de esta enzima.

La dinitrogenasa esta formado por una proteína heterotetramétrica ($\alpha_2\beta_2$) de aproximadamente 250 KDa que presenta como cofactores metálicos el hierro y el molibdeno. Dos subunidades (α_2) están codificadas por el gen *nifD* (Lammers y Haselkorn, 1984) mientras que las otros dos (β_2) son codificadas por *nifK* (Mazur y Chui, 1982). Cada unidad contiene dos tipos de centros redox: el grupo P y el cofactor hierro molibdeno denominado FeMoco. El grupo P es un centro Fe_8S_7 que funciona como intermediario de la transferencia de electrones, aceptando electrones del centro Fe_4S_4 de la primera subunidad (asociado a la hidrólisis del ATP) y donándolos al centro FeMoco, en donde tiene lugar la reducción del sustrato (Howard y Rees, 2000).

Han sido descritas varias enzimas nitrogenasas alternativas, en las que el molibdeno es sustituido por vanadio (nitrogenasa dependiente de vanadio codificada por los genes *vnf*) o hierro (nitrogenasa dependiente de hierro codificada por los genes *anf*) (Eady, 1996), que se caracterizan por no ser específicas de N_2 , pudiendo reducir moléculas con dobles y triples enlaces (óxido nitroso, acetileno). Además, la eficiencia catalítica de estas enzimas es mucho más baja que la nitrogenasa con cofactores de hierro y molibdeno.

Algunas cianobacterias con heterocistos, como *A. variabilis* cepa ATCC 29413, conserva un segundo grupo génico *nif* (*nif2*), que es expresado bajo condiciones

microaerobias o anaerobias en las células vegetativas y, parece estar regulado principalmente por factores ambientales, diferencia de los genes *nif1* regulados por el desarrollo de los heterocistos (Thiel y col., 1995).

IV.1.2.2. Estrategias adoptadas por los diferentes organismos para la fijación del nitrógeno.

Durante el transcurso de la evolución, las cianobacterias han adaptado la maquinaria de fotosíntesis oxigénica y fijación de N₂, a los cambios en el estado de oxidación de los océanos y de la atmósfera. Estas estrategias han sido generalmente simplificadas en dos tipos de adaptaciones: separación espacial o temporal de la fotosíntesis y fijación de N₂, sin embargo, el patrón es más complejo (Colón-López y col., 1997; Chen y col., 1999; Berman-Frank y col., 2003).

Aunque la abundancia de ambientes anaerobios disminuyó con la oxigenación de la atmósfera, algunos organismos continuaron funcionando en ambientes bajos en oxígeno, como *Plectonema boryanum* (Rai y col., 1992). Bajo estas condiciones y con iluminación continua, se ha observado experimentalmente que esta cianobacteria fija dinitrógeno, mediante la separación temporal de la fotosíntesis oxigénica y fijación de nitrógeno (Misra, 1999), habiendo una regulación de la expresión génica bien organizada, con ciclos alternos de fotosíntesis y fijación de nitrógeno (Misra y Tuli, 2000). Otros ejemplos de especies fijadoras bajo condiciones anaerobias o microaerobias son *Phormidium* y algunas especies de *Pseudoanabaena* (Rippka y Waterbury, 1977).

Una separación temporal sin la necesidad de un ambiente microaerobio se ha observado en algunas cianobacterias sin heterocistos, incluyendo las filamentosas *Symploca* (Kumazawa y col., 2001) y *Lyngbya majuscula* (Lundgren y col., 2001), y las unicelulares *Gloeothece* y *Cyanothece* (López-Cortés y col., 1997; Gallon, 2001). Estos organismos presentan generalmente nitrogenasa en todas las células y realizan la fijación de nitrógeno durante la noche. Por ejemplo, *Cyanothece* sp. ATCC51142 fija nitrógeno durante el periodo de oscuridad cuando crecen bajo un ciclo de luz:oscuridad, o bajo una simulada fase oscura cuando crecen bajo condiciones de luz continua (Tucker y col., 2001). Este patrón es reflejado a nivel transcripcional, implicando un control circadiano (Colón-López y col., 1997, Schiefer, 2002). Por otra parte, se ha demostrado durante ciclos de 24 h una relación temporal entre las actividades de fijación de nitrógeno y respiración, las cuales se realizan

simultáneamente, en tanto que la fotosíntesis está separada temporalmente (Colón-López y col., 1997).

La protección contra el oxígeno en *Trichodesmium*, es un mecanismo complejo que implica una interacción entre la separación espacial y temporal de los procesos fotosintético, respiratorio y fijación de nitrógeno (Berman-Frank y col., 2001; Chen y col., 1999, Lin, 1998). En esta cianobacteria, un reloj circadiano controla la transcripción de nitrogenasa y la expresión de los genes fotosintéticos esenciales para la activación del fotosistema I y II (Chen y col., 1998), sufriendo estos genes una diferencia de fase temporal con la expresión de los genes *nifHDK* (genes estructurales de la enzima nitrogenasa) de aproximadamente 6 h (Chen y col., 1999). A diferencia de las cianobacterias con heterocistos, todas las células individuales modulan la producción de oxígeno y el consumo durante el fotoperiodo. Además, *Trichodesmium* es capaz de fijar nitrógeno durante el día, gracias a la compartimentalización de la enzima nitrogenasa en una parte de la célula (Lin, 1998). A pesar de ello, hay evidencias de que una parte importante de la enzima es inhibida por el O₂ en algún momento, debido a que los componentes fotosintéticos activos (como los complejos PSI y PSII, Rubisco, carboxisomas) están en todas las células, incluso en las zonas donde se localiza la nitrogenasa (Janson y col., 1994; Berman-Frank y col., 2001).

Las cianobacterias con heterocistos presentan una alta especialización. En estos organismos la nitrogenasa esta confinada en estas células especializadas denominadas heterocistos. El proceso de diferenciación del heterocisto ocurre en un lapso de 24 h posterior a la detección de la limitación de fuente nitrogenada, e involucra una variedad de cambios estructurales, bioquímicos y genéticos (Ernst y col., 1992), como por ejemplo, la presencia de una gruesa membrana que disminuye la difusión del O₂, una alta actividad del fotosistema I (PSI), ausencia del fotosistema II (PSII) e inactivación de la enzima Rubisco. De esta manera, no se genera O₂ durante el proceso luminoso y el O₂ residual es consumido durante la respiración celular. Bajo condiciones anaerobias algunas cianobacterias con heterocistos, como *Anabaena variabilis*, puede sintetizar una nitrogenasa dependiente de molibdeno diferente (Nif2) en las células vegetativas (Thiel y col., 1995; Thiel y Pratte, 2001; Schiefer y col., 2002). Nif2 es expresada poco antes del agotamiento del nitrógeno pero antes de la formación del heterocisto, y puede mantener la fijación de nitrógeno necesario para los filamentos, independientemente de la nitrogenasa Nif1 de los heterocistos (Thiel y

col., 1995; Thiel y Pratte, 2001). Nif2 también se puede encontrar en células vegetativas de especies sin heterocistos (Schiefer y col., 2002).

En todas las cianobacterias bajo condiciones de fijación biológica de nitrógeno, las actividades respiratorias son elevadas, constituyendo una estrategia esencial para proteger la enzima del O₂ atmosférico y fotosintético (Peschek y col., 1991).

IV.1.2.3. Mecanismo de fijación del nitrógeno y asimilación.

Se han llevado a cabo numerosos estudios para determinar los mecanismos involucrados en la fijación del nitrógeno atmosférico por cianobacterias. Donde mejor se ha estudiado ha sido en las cianobacterias formadoras de heterocistos (Thiel y col., 1995; Thiel y Pratte, 2001; Böhme, 1998), pero también se han realizado estudios en cianobacterias filamentosas sin heterocistos (Misra, 1999; Lundgren y col., 2001; Kumazawa y col., 2001) y unicelulares (López-Cortes y col., 1997; Huang y col., 1999). En general, los estudios han mostrado que la asimilación del nitrógeno es un proceso que requiere ATP como fuente de energía, ferredoxina reducida como equivalentes reducibles y esqueletos de carbono derivados del CO₂ durante la fase lumínica o del catabolismo de fuentes de carbono orgánico durante la oscuridad.

El proceso de fijación de nitrógeno comienza con la entrada al citoplasma del nitrógeno molecular por difusión a través de las membranas biológicas. Una vez en el interior, la nitrogenasa cataliza la reducción del N₂ a amonio, con la consiguiente reducción de protones para dar lugar a hidrógeno. Algunas cianobacterias, presentan actividad hidrogenasa que recicla parte de la energía perdida por la liberación de hidrógeno, en una reacción en la que se genera ATP y poder reductor, minimizando de este modo la pérdida de energía producida en la formación de H₂ por la nitrogenasa, a la vez que se consume O₂. Esta reacción requiere equivalentes proporcionados por la ferredoxina reducida y viene acompañada de la hidrólisis de ATP proporcionado por la fotosíntesis no cíclica, en la que intervienen los dos fotosistemas (PSI y PSII).

En todas las cianobacterias fijadoras, el amonio, tanto si es captado desde el exterior a través de la membrana externa como si es producido intracelularmente, es incorporado a los esqueletos de carbono principalmente a través del ciclo de la glutamina sintetasa-glutamato sintasa (Flores y Herrero, 1994). El esqueleto de carbono empleado para la incorporación del nitrógeno es el 2-oxoglutarato, proporcionado por la isocitrato NADP⁺ deshidrogenasa (Muro-Pastor y Florencio

1996). Como las cianobacterias carecen de la enzima 2-oxoglutarato deshidrogenasa, el 2-oxoglutarato se emplea principalmente para la biosíntesis de glutamato y compuestos derivados del glutamato (Herrero y col., 2001).

En cianobacterias formadoras de heterocistos (**figura 7**) se ha visto que tiene lugar importantes cambios estructurales, bioquímicos y genéticos durante la diferenciación de los heterocistos (Ernst y col., 1992), como por ejemplo el catabolismo de las ficobiliproteínas, formación de una gruesa membrana que disminuye la difusión del O₂, formación de poros en las paredes laterales que conectar al heterocisto con las células vegetativas adyacentes, pérdida de actividad del fotosistema II (PSII) e inactivación de la enzima Rubisco, que conllevan a no generar O₂ durante el proceso lumínico y, al consumo del O₂ residual durante la respiración celular (Thiel y col., 1995; Böhme, 1998; Adams y Duggan, 1999).

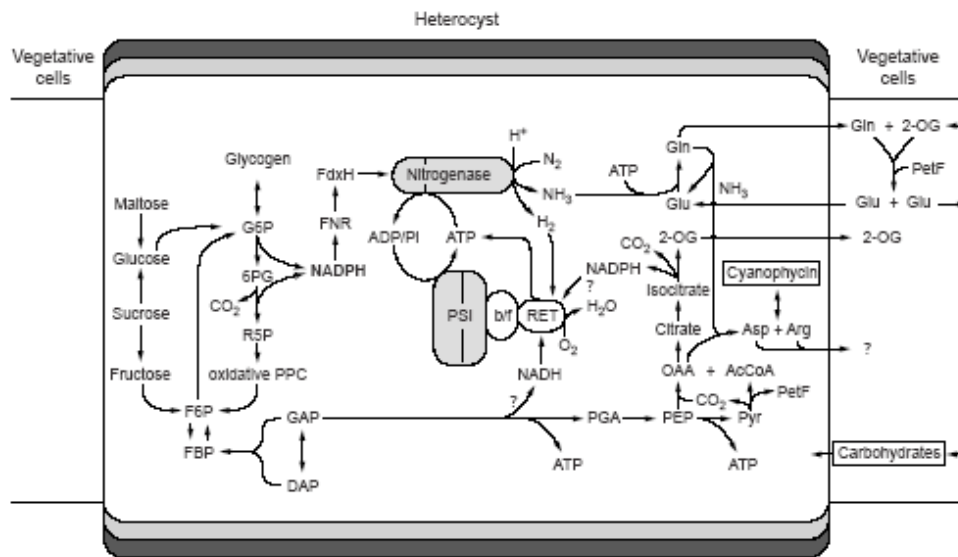


Figura 7. Metabolismo y fijación de nitrógeno en el heterocisto. Se muestra el esquema de un heterocisto con células vegetativas adyacentes. En este esquema la región porosa no está dibujada a escala. La pared celular y la membrana celular no están dibujadas por separado. Abreviaturas: AcCoA, acetil coenzima A; Arg, arginina; Asp, aspartato; b/f, complejo citocromo b₆f; DAP, dihidroxiacetona fosfato; F6P, fructosa 6-fosfato; FBP, fructosa-1,6-bifosfato; FdxH, ferredoxina específica de heterocisto; FMP, ferredoxin:NADP reductasa; GAP, gliceraldehido 3-fosfato; G6P, glucosa 6-fosfato; PetF, ferredoxina tipo célula vegetativa; Glu, glutamato; Gln, glutamina; OAA, oxaloacetato; 2-OG, 2-oxoglutarato; PEP, fosfoenolpiruvato; 6PG, 6-fosfogluconato; PGA, 3-fosfoglicerato; Pi, fosfato inorgánico; PPC; ciclo oxidativo de las pentosas fosfato; PSI, fotosistema I; Pyr, piruvato; R5P, ribosa 5-fosfato, REP, cadena respiratoria transportadora de electrones (extraído de Böhme, 1998).

ANTECEDENTES Y OBJETIVOS DEL TRABAJO

Las Cianobacterias presentan propiedades morfológicas, bioquímicas y fisiológicas muy diversas, que les permite colonizar y persistir en una amplia variedad de ambientes. Los estudios llevados a cabo en este grupo, se han basado tradicionalmente en una caracterización morfológica y en la obtención de cultivos monoclonales en los que se han desarrollado la correspondiente experimentación bioquímica y fisiológica. Sin embargo, ciertas características morfológicas de valor taxonómico pueden no ser expresadas en cultivo o haberse perdido debido a mutaciones (Lehtimäki y col., 2000; Gugger y col., 2002b), dificultando en gran medida su identificación (Kómarek, 1999; Palinska y col., 1996).

En este sentido, el avance en el desarrollo de distintas técnicas moleculares, ha permitido abordar esta problemática desde un punto de vista, que de otra forma no hubiera sido posible. Actualmente, diferentes grupos de investigación están llevando a cabo estudios sistemáticos en los que se examina la variación genética entre cepas de cianobacterias con el fin de discriminar entre distintos taxones y establecer relaciones filogenéticas (Otsuka y col., 1999; Robertson y col., 2001; Gugger y Hoffmann, 2004; Casamatta y col., 2005; Rajaniemi y col., 2005; Willame y col., 2006), combinando una caracterización genotípica y fenotípica.

Al igual que para otras bacterias, el gen que codifica para el ARNr 16S es el marcador molecular más utilizado para la determinación de especies cianobacterianas (Giovannoni et al., 1988; Ishida y col., 2001; Wilmotte y Herdman, 2001; Thacker y col., 2004; Svenning y col., 2005). Sin embargo, la resolución taxonómica ofrecida por este marcador es insuficiente para discriminar algunos organismos estrechamente relacionados (Fox y col., 1992), por eso surgieron otros tipos de marcadores, como el operon de la ficocianina, empleado para examinar la variabilidad y las relaciones filogenéticas entre cianobacterias de diferentes niveles:órdenes (Lu y col., 1997), géneros (Teneva y col., 2005) y especies (Janse y col., 2004; Padilla y col., 2005), que ha resultado ser un marcador genético bueno con gran especificidad para identificar y comparar cepas morfológicamente similares.

Por otra parte, se ha observado que la combinación de los factores genéticos con los ambientales determinan la variación fenotípica que nosotros encontramos en el

mundo natural (Dillon y Castenholz, 2003). Así, caracteres ecofisiológicos como vesículas de gas y formación de un pelo multicelular (Walsby, 1981; Whitton, 1987; Lundgren y col., 2001; Komárek, 2003) juegan un papel principal a la hora de delimitar las especies dentro de los géneros definidos genéticamente (Castenholz y Norris, 2005; Hoffmann y col., 2005). Por eso, cada vez son más numerosos los estudios taxonómicos en los que se incluye una caracterización ecofisiológica, para determinar las posibles respuestas que pueden adoptar las cianobacterias ante cambios en las condiciones ambientales u otros parámetros como la disponibilidad de nutrientes (Teaumroong y col., 2002; Ferris y col., 2003; Dasey y col., 2005).

De esta manera, el objetivo general de este estudio ha sido estudiar la diversidad morfológica, genética y fisiológica de cianobacterias dominantes en sistemas fluviales. La profundización en el conocimiento de las características de las cianobacterias en estos sistemas desde este triple abordaje constituirá, por una parte, una contribución a los estudios sobre taxonomía de este grupo y por otra, nos permitirá analizar los factores ambientales que influyen en la estructura y composición de las comunidades de cianobacterias del biofilm fluvial.

Para ello se han llevado a cabo los siguientes objetivos específicos:

- Caracterización morfológica de las poblaciones bentónicas en los ríos y de cepas aisladas en diferentes condiciones de cultivo, así como el estudio de la variabilidad entre ellas.

- Caracterización genética de las mismas, mediante el análisis y comparación de la secuencia de nucleótidos del espacio intergénico y las regiones flanqueantes del operón de la ficocianina así como el gen que codifica para el ARNr 16S de muestras naturales y cepas aisladas. Relacionar los morfotipos con los genotipos encontrados, así como analizar las relaciones filogenéticas de dichos genotipos.

- Caracterización ecofisiológica de cianobacterias en ríos mediterráneos oligotróficos a través de la determinación de distintos parámetros fisiológicos que expliquen su dominancia en dichos sistemas fluviales con bajas concentraciones de P y N, como la actividad fosfatasa y la fijación de N₂.

DESCRIPCIÓN DE LOS RÍOS ESTUDIADOS

Se han estudiado distintos tipos de cianobacterias, recogidas en diferentes ríos seleccionados por sus características hidrológicas. La localización de cada uno de estos ríos y/o arroyos se muestra en la **figura 8**.

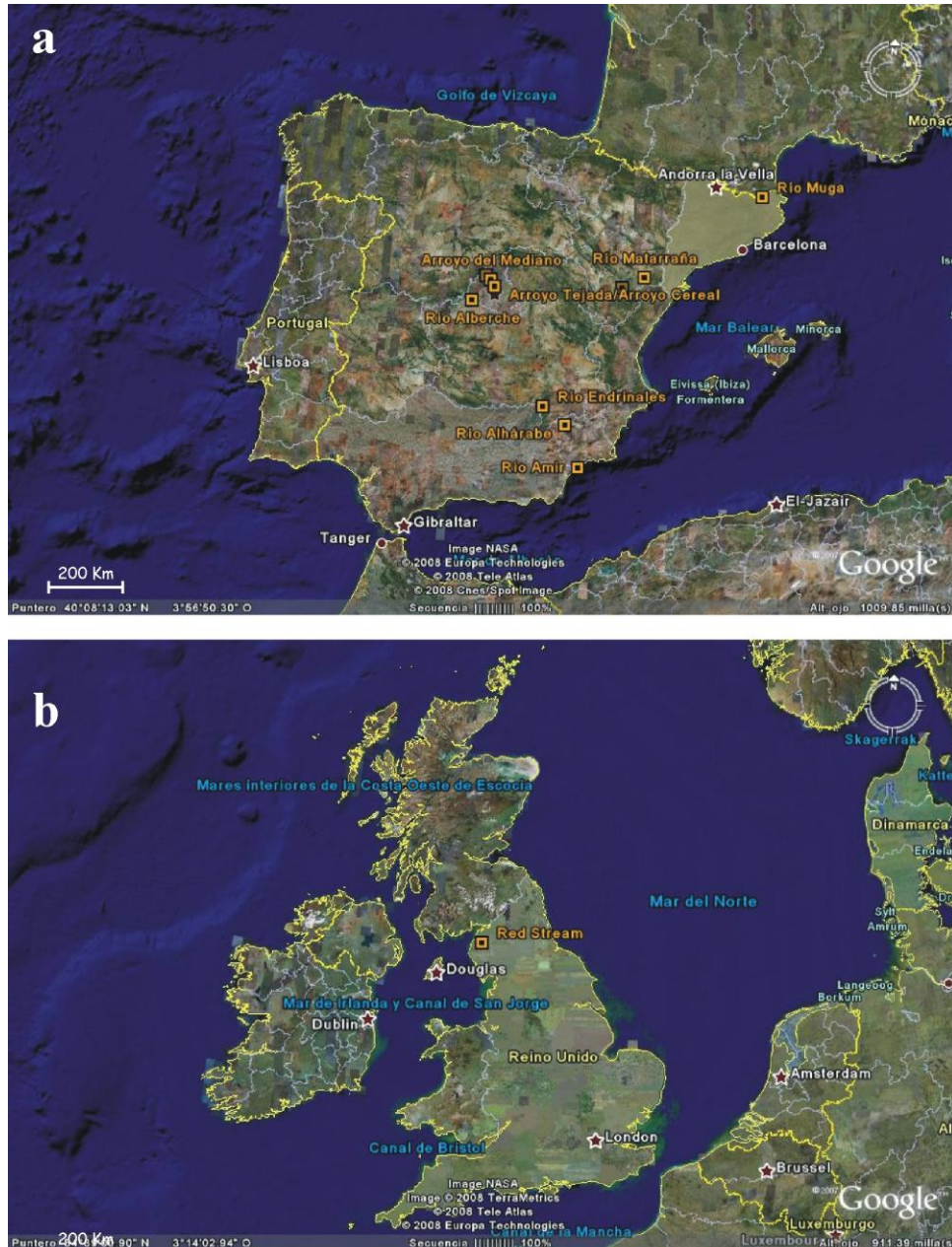


Figura 8. Localización geográfica de los ríos donde procedían las distintas cianobacterias empleadas en este estudio: a. Mapa de España; b. Mapa de las Islas Británicas. Escala 200 km.

A continuación, se expone una descripción general de cada uno de ellos, prestando mayor atención al río Muga, donde se han llevado a cabo un estudio en mayor profundidad, desarrollándose en este río debido la experimentación fisiológica *in situ*.

I. Río Alberche.

El río Alberche se localiza en el centro de la Península Ibérica (UTM 30 TUK 89–97, 52–65) y es uno de los principales afluentes del río Tajo (**figura 9**). Nace a 1808 m de altitud en la vertiente septentrional de la Sierra de Villafranca, entre los términos municipales de San Martín de la Vega del Alberche y Herguijuela (provincia de Ávila). Recorre 176,85 Km. sobre tierras graníticas hasta desembocar en el río Tajo por la margen derecha, aguas arriba de Talavera de la Reina (Toledo), a una cota de 365 m (Confederación Hidrográfica del Tajo, 1960; Ministerio de Agricultura, 1983). El clima es mediterráneo templado, caracterizado por veranos sin lluvia y otoños e inviernos húmedos, con valores de temperatura y precipitación media anuales de 12-14 °C y 500-750 mm, respectivamente (Perona y col., 1999). El sustrato geológico del río es principalmente silíceo, con aluviales cuaternarios en el tramo final de la cuenca (Perona y col., 1999). La arenisca es común en esta área y forma estratos con cuarzos y arcillas (Aramburu y col., 1982).

Sus aguas provienen principalmente del deshielo de la nieve, pero además recibe por su margen izquierda, la entrada de los ríos Cofio, Perales y Maqueda, así como numerosos arroyos tributarios. Debido al elevado desnivel que salvan las aguas que circulan por el río, se ha construido un gran conjunto hidroeléctrico, constituido por los embalses de Burguillo y Charco del Cura (Ávila), San Juan y Picadas (Madrid) y Cazalegas (Toledo). La descarga media anual de este río fue de 7,82 y 6.66 m³ s⁻¹ en 1991 y 1992, respectivamente (Perona y col., 1999).

El río Alberche es un río eutrofizado debido en parte por las descargas de aguas residuales urbanas, así como de actividades agrícolas, salvo en el tramo alto donde presenta una mineralización y una carga nutricional baja, acercándose a niveles de oligotrofia (Perona y col., 1999).

El aprovechamiento principal del agua es el agrícola (cultivo de cereales, patatas y frutales) y urbano, así como el hidroeléctrico, abasteciendo de agua a diferentes poblaciones, entre las que se incluyen a la urbe de Madrid (Confederación Hidrográfica del Tajo, 1960). Además de cultivos de regadío, existen superficies de labor con arbolado constituida por encinas y zonas de pastos, olivares y algunos

viñedos. La superficie no utilizada, está constituida generalmente por superficies arboladas con especies forestales de frondosas (chopo y álamo) y de coníferas (pino piñonero y resinero, enebro y encina) (Perona, 1995).

En este estudio, se ha utilizado la cepa *Calothrix elenkinii* Kosinskaja ALB3 UAM-225, aislada en un punto situado aguas abajo de la salida de agua de la central hidroeléctrica del embalse de Picadas (coordenadas UTM 30T UK94 4654 y una altitud de 400 m), caracterizada por niveles de nutrientes bajos; además de la cepa *N. punctiforme* Kützing ALB2 UAM-220, aislado en un punto que dista aproximadamente unos 100 m de la entrada del arroyo Perales, próximo a la localidad de Aldea del Fresno (coordenadas UTM 30T UK97 4639 y 460 m de altitud), que se caracteriza por cantidades de fosfato y nitrógeno inorgánico disuelto generalmente más altos (Perona y col., 2003).



Figura 9. Fotografía del río Alberche (cedida por la Dra. Elvira Perona).

II. Río Alharabe

El río Alhárabe (**figura 10**) nace a 1.440 metros de altura, en la ladera meridional de la sierra del Zacatín (Moratalla, Murcia), como resultado de varias fuentes y arroyos, entre las cuales se encuentra la Fuente del Prado (coordenadas geográficas 38°11'11"N 1°53'26"O). Vierte sus aguas a los ríos Benamor y Moratalla, cuyos caudales se incorporan al río Segura, 50 kilómetros más abajo en las inmediaciones del Santuario de la Esperanza. Recibe las aguas de los arroyos Zaén y Las Polladas y, a la altura de la aldea de Fotuyas, el Alhárabe se remansa en el embalse de La Risca, destinado a la contención de avenidas. La temperatura media fue de 15,7° C, con

mínimas en diciembre (10°C) y máximas en julio (21,4°C) durante 2000-2002 (Aboal y col., 2005). La precipitación anual para el mismo período fue de 521,2 mm, con diciembre siendo el mes más lluvioso (datos de la estación meteorológica de Benizar, Albacete, proporcionados por el Centro de Nacional Meteorología de España). El sustrato por el que circula es rocoso, con predominancia de grandes rocas y cantos rodados, aunque algunos tramos son de gravilla o arenosos. Los materiales geológicos son básicamente calizas y dolomitas.

El río Alhárabe es un arroyo calizo poco profundo, con aguas frías y puras, que presenta un régimen de flujo típicamente mediterráneo. Está situado en una zona de bosques de pinos y vegetación de ribera bien conservada, donde la agricultura, la ganadería y las asentamientos humanos tienen poca influencia (Aboal y col., 2005).



Figura 10. Fotografía del río Alhárabe a su paso por los Cenajos del Agua Cernida (Murcia).

III. Río Amir

El río Amir (**figura 11**) nace a 620 m de altitud (UTM 30SXG25) cerca del Campico de las Lirias (Murcia). Recorre unos 5,6 km hasta desembocar en el mar mediterráneo a la altura de la localidad de Águilas. Presenta un carácter estacional, quedando su curso parcial o totalmente seco la mayor parte del año; aunque en ocasiones, circulan por él verdaderas trombas de agua que producen "riadas", muy frecuentes en la región. El clima es mediterráneo con rasgos semiáridos, caracterizado por veranos largos y muy calurosos e inviernos cortos. La temperatura media anual es de 18°C y las precipitaciones son muy irregulares e inferiores a los 350 mm, típica de las zonas áridas, en donde las lluvias se concentran en pocos días (López-Bermúdez y

col., 1986). Los materiales geológicos son metamórficos (micaesquistos, cuarcitas), calizas y dolomitas y, en los lechos de los cauces predomina una granulometría gruesa constituida por cantos y grava (Moreno y col., 1995). Se trata de un río salobre, con concentraciones de nutrientes (nitratos y fosfatos) a veces altas (Moreno y col., 1995). La vegetación de ribera es escasa, provocando la total exposición del curso de agua a la luz. Esta dominada por un matorral xerófilo mediterráneo, cada vez más disminuida por la expansión de cultivos de regadío (Montaner, 1991).



Figura 11. Fotografía del cauce del río Amir (Diciembre 1998).

IV. Río Blanco

El río Blanco nace cerca del Cañón de los Arcos en la Sierra de Albarracín (Teruel), a partir de la Fuente del Berro a unos 1312 m de altitud (coordenadas geográficas 40°40'29.892"N 0°42'8.172"O). Vierte sus aguas por la margen izquierda al río Guadalaviar antes de llegar al pueblo de Albarracín, el cual desemboca finalmente en el mar Mediterráneo a la altura de Valencia. Debido a la altitud de la Sierra de Albarracín, el clima se clasifica como clima mediterráneo de montaña, con matices continentales, siendo su temperatura media anual de 11°C y la precipitación de 480 mm. Una gran parte del entorno de Albarracín comprende materiales del jurásico, básicamente formado por rocas calizas y dolomitas (Robles y col., 2002). El clima y la altitud han condicionado el desarrollo de una rica vegetación en la que

predomina la sabina albar, junto con diversas variedades de pino como el pino albar y el pino resinero y, de robles, encinas y acebos.



Figura 12. Detalle de colonias de *Rivularia* sobre las rocas del lecho del río Blanco (Abril 2002).

V. Río de los Endrinales

El río Endrinales pertenece a la Cuenca Hidrográfica del río Segura (**figura 13**). Nace en la Sierra de Alcaraz en la zona conocida como Sierra del Agua, en la provincia de Albacete (Las Espineras, río Endrinales, UTM 30SWH5367) a 1000 de altitud. Junto con el río Hoyas dan origen al río Madera, cuyas aguas se incorporan al río Mundo (afluente del río Segura) por la margen izquierda. La climatología se caracteriza por presentar temperaturas mínimas entre los 2 y 4 °C en enero, y máximas entre los 22 y 24 °C en julio, siendo su temperatura media anual la más baja de toda la provincia con 12,4 °C. El sustrato geológico por el que circulan las aguas es calizo. En cuanto a la vegetación, predomina el pinar y los pastizales, con algunos escasos y pequeños huertos en los estrechos valles.

VI. Río Guadarrama

El río Guadarrama nace en el Valle de la Fuenfría (**figura 14**), al pie de los Siete Picos (coordenadas 40°47'N 4°02'O). Recorre 145 km hasta abandonar la Comunidad de Madrid en Batres y finalmente vierte sus aguas en el Tajo por su margen derecha,



Figura 13. Fotografía del río Endrinales a su paso por Las Espineras (Albacete, Febrero 1998).



Figura 14. Fotografía del río Guadarrama en el término municipal de Galapagar a su paso por la zona recreativa “El Retamar” (Madrid, Mayo 2006).

aguas abajo de Toledo. La cabecera del río se encaja en materiales metamórficos, fundamentalmente gneíses y granitos característicos de esta zona de la Sierra de Guadarrama, después forma un valle cada vez más abierto a medida que se adentra en los materiales arcóscicos de la parte media del recorrido. Así, el río Guadarrama presenta un marcado carácter silíceo (Loza, 2004). El clima se corresponde con el clima mediterráneo con cierta continentalidad, caracterizado por temperaturas invernales duras y veranos muy calurosos. El régimen pluviométrico varía en función de la zona, desde los 856 mm anuales en Villalba hasta los 226 mm en su salida de la Comunidad de Madrid.

En general, se trata de un río poco regulado si se compara con otros ríos como el Lozoya. Según el Ministerio de Medio Ambiente, el río Guadarrama es un río de aguas eutrofizadas (Confederación Hidrográfica del Tajo, 1999), debiéndose la contaminación, fundamentalmente a las actividades humanas que se desarrollan en la cuenca. La vegetación, típicamente mediterránea, está compuesta en su mayor parte por encinares, que se combinan con el bosque de ribera formado por fresnos, sauces, chopos y olmos.

VII. Río Matarraña

El río Matarraña nace en El Parrizal (**figura 15**), paraje natural de Los Puertos de Beceite (Teruel), en la confluencia de dos barrancos, aunque sus fuentes y manantiales se encuentran en el corazón de los Puertos de Beceite a 1300 m. de altitud (coordenadas geográficas 40°52'23.34"N 0°11'13.308"O). Después de 97 Kms de recorrido, desemboca en la margen derecha del río Ebro cerca de Fayón. Recibe las aguas del Algás, Ulldemó, dels Estrets, Tastavins y Pena. En la cabecera del río está el embalse de Pena, situado en su afluente del mismo nombre. El clima es tipo mediterráneo, con una temperatura media de 13,6 °C y una precipitación anual de 480,6 mm (medido en 1998) (Aboal y col., 2002). Los Puertos de Beceite son un macizo montañoso de roca caliza, situado en la parte oriental del sistema Ibérico, que enlaza con la cordillera Prelitoral Catalana.

El río Matarraña es un río típico mediterráneo, con un caudal bastante irregular y escaso, con grandes crecidas en primavera y otoño y estiajes en verano. En la zona de Parrizal, donde se tomaron muestras, se caracteriza por la dominancia de cianobacterias y la ausencia de cualquier tipo de perturbación humana o contaminación, siendo la concentración de nutrientes relativamente baja (Aboal y col.,

2002). Presenta un bosque de ribera bien estructurado, especialmente en su tramo bajo, formado por sauces, álamos, fresnos y olmos. También se distinguen zonas con galerías arbustivas mixtas colonizando pedregales sueltos junto a pastizales higrófilos. Las zonas circundantes están cubiertas mayormente por bosques de pinos y matorrales esclerófilos mixtos. Puntualmente algunos encinares y sabinares entremezclados con zonas de cultivos, completan el conjunto.



Figura 15. Fotografía del río Matarraña en Parrizal (Febrero 1998).

VIII. Arroyo Mediano

El Arroyo Mediano es un arroyo de montaña (**figura 16**) situado en su totalidad en el Parque Regional de la Cuenca Alta del Manzanares (Comunidad de Madrid). Nace en un manantial a 1970 m de altitud (coordenadas geográficas 40°42'N 3°48'O), en la Sierra de Cuerda Larga (Sierra de Guadarrama) y, desemboca en el embalse de Manzanares el Real (894 m) tras 11 Kms. de recorrido. El clima se corresponde con el clima mediterráneo, caracterizado por presentar una alternancia estacional: veranos con temperaturas altas y tiempo seco e inviernos con un descenso suave de temperaturas, donde tienen lugar la mayor parte de las precipitaciones; aunque debido a la continentalidad, las temperaturas invernales se endurecen y los veranos son muy

calurosos. El lecho del arroyo es rocoso, formado por rocas y gravas, de materiales predominantemente silíceos (Serrano y col., 2003).

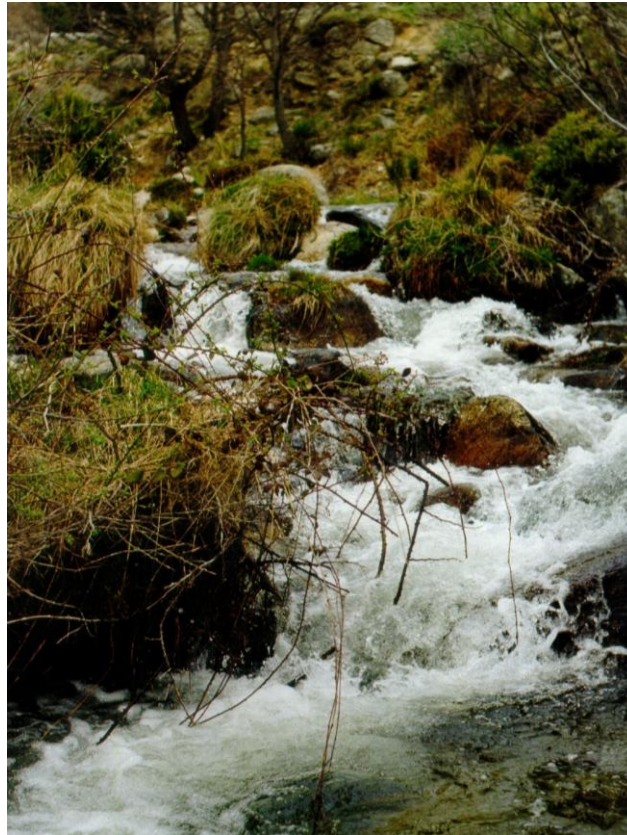


Figura 16. Fotografía de la cabecera del arroyo Mediano a unos 5 km de su nacimiento (Madrid, Febrero 1998).

El arroyo Mediano posee todas las características típicas de un sistema montañoso y de clima mediterráneo, con alternancia de rápidos y remansos y, un caudal afectado por el deshielo primaveral y el estiaje veraniego. La vegetación es bastante rica y se encuentra relativamente bien conservada. En la cabecera del arroyo encontramos abedules y pastizales de berceo, en la parte media pinares y repoblaciones de alerces y, finalmente, en la parte inferior del valle nos encontramos un bosque de enebro y encima y matorral de brezo, junto con fresnos y melojos. En cuanto a la vegetación de ribera se encuentra distribuida de forma discontinua a lo largo del cauce, estando constituida por sauces, majuelos, nogales, fresnos y zarzas (Serrano, 2000).

IX. Arroyo Tejada y Arroyo Cereal

El arroyo Tejada (**figura 17a**) nace aguas arriba de Colmenar Viejo, cerca del Cerro de San Pedro, a unos 950 m de altura, siendo esta población su principal núcleo de contaminación. Discurre paralelo al río Manzanares del que es uno de sus

afluentes, hasta confluir con él a la altura del embalse del Pardo. Recibe el agua de distintos arroyos como el Navarrosillo, del Buitre y de la Canaleja por su margen izquierda. El arroyo Tejada presenta un caudal bajo en primavera e invierno y prácticamente nulo durante la sequía estival. La climatología es de tipo mediterráneo continental templado fresco para la cabecera (temperatura media anual de 10-14 °C y precipitación anual 450-950 mm) mientras que para el resto del recorrido es mediterráneo templado con cierto grado de continentalidad (temperatura media anual de 10-16 °C y precipitación anual 400-800 mm) (Douterelo, 2000). En su cabecera encontramos rocas ácidas, cuando atraviesa Colmenar Viejo transcurre entre rocas metamórficas y finalmente rocas gnéisicas hasta llegar a Manzanares, de este modo, el arroyo presenta un carácter fundamentalmente silíceo (Douterelo, 2000).

La vegetación de la zona esta presidida por encinas *Quercus ilex* ssp. rotundifolia, faltando las especies más térmicas y típicas del Mediterráneo.



Figura 17. Fotografías de los arroyos (a) Tejada a su paso por Tres Cantos (Febrero, 2003) y (b) Cereal antes de verter sus aguas al arroyo Tejada (Tres Cantos, Febrero 2003).

El arroyo Cereal (**figura 17b**) es un pequeño arroyo que vierte sus aguas en el río Tejada cerca de Tres Cantos (coordenadas geográficas 40°34'48,3"N 3°42'6,5"O). El nivel del agua es mantenido prácticamente por los vertidos producidos por la empresa BP solar situada en esa localidad.

X. Arroyo Red

El arroyo Red, es un arroyo calizo relativamente pequeño situado en la Reserva Nacional Natural de Upper Teesdale, en el norte de Inglaterra (Gran Bretaña) (Livingstone y Whitton, 1984) (**figura 18**). Vierte sus aguas en el embalse de Cow

Green en la región de Widdybank Fell.. Las terrazas aluviales están constituidas por piedra caliza metamórfica (Turner y col., 2003). El clima es relativamente severo con precipitaciones relativamente altas, fuertes tormentas que producen un aumento rápido de la corriente del arroyo e inviernos severos que pueden conducir a la formación de una cubierta de hielo prologando (Pigott, 1978). Esta climatología permite el desarrollo de una flora ártica-alpina característica bastante rica (Livingstone y Whitton, 1984). Predominan los pastizales y plantas/hierbas como el tomillo, lino, margaritas, campánulas, pensamientos de montaña, juncos y musgos. En las áreas más secas las plantas dominantes son el brezo y el arándano.

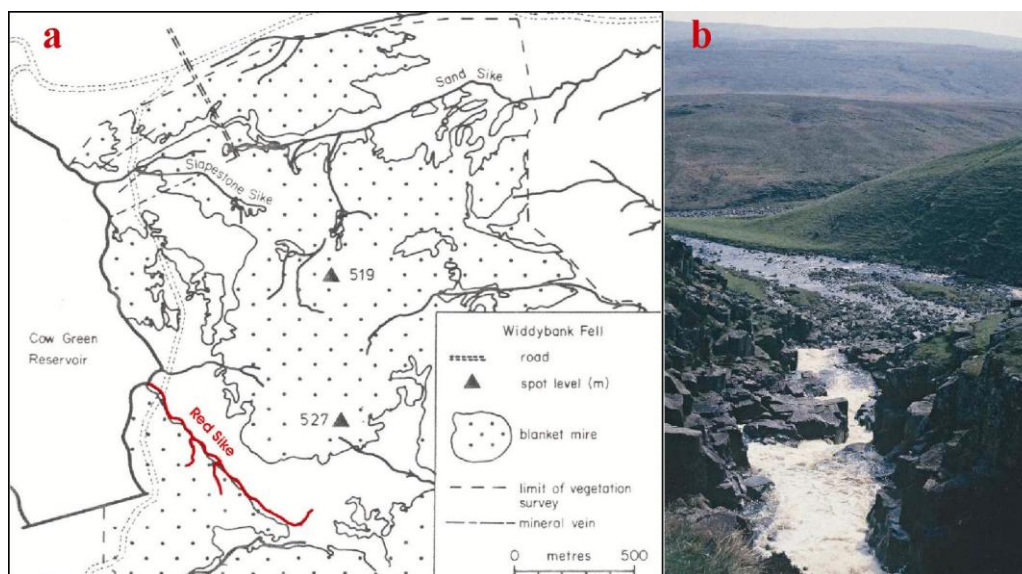


Figura 18. (a) Localización de arroyo Red en el Parque Nacional de Upper Teesdale (figura obtenida de Livingstone y Whitton, 1984) (b) Fotografía del Arroyo Red (obtenida de la página web de Durham County Council)

XI. Río Muga

El río Muga es un río pirenaico de la provincia de Girona (Cataluña). Nace bajo el plano de la Muga a 1186 m. de altitud, en el centro del Montnegre (1425 m.), en el límite entre el Vallespir y el Alt Empordá, constituyendo sus orillas durante unos 5,5 km el límite fronterizo franco-español. Recibe principalmente las aguas de la zona axial de los Pirineos (Roc de Frasua, Sierra de la Albera), cruza por profundos valles del subpireneo y surge por Pont de Molins en la amplia llanura del Alt Empordá, desembocando en el golfo de Rosas (mar Mediterráneo) después de 58 km de curso. Su caudal medio medido, según la Agencia Catalana del Agua es de $3,34 \text{ m}^3 \cdot \text{s}^{-1}$, básicamente de origen pluvial.

Las aguas del río Muga han sido embalsadas cerca de Boadella con la finalidad de laminar las frecuentes avenidas del río Muga, suministrar agua a la ciudad de Figueres y convertir en tierras de regadío 12270 ha. Este embalse junto con los numerosos acuíferos subterráneos existentes en esta cuenca, constituyen la principal fuente de abastecimiento básica de agua de la zona. Cerca de Peralada recibe al Llobregat d'Empordá, más caudaloso que el mismo, y después de Vilanova de la Muga, el Manol. El curso final del río Muga y del Fluvia (Alt Empordá) junto con el del Ter y el del Daró (Baix Empordá) generan un conjunto de marismas denominadas los Aiguamolls de l'Empordà, que constituyen la segunda zona húmeda más importante de Cataluña después del delta del Ebro, declarada *Paraje de Interés Natural* por el Parlamento de Cataluña en 1983. El aprovechamiento principal del agua es el agrícola (cultivos de regadío) y urbano, abasteciendo a municipios como Figueres y Roses, cuya demanda de agua durante la época estival aumentan considerablemente por el turismo. Sin embargo, el uso industrial es bajo, concentrándose en las poblaciones de Figueres, Vilasacra y Vilamalla (Ventura y col., 2000). Además, al pie del embalse de Boadella existe una central hidroeléctrica que suministra electricidad a la zona fronteriza de la Jonquera, Sant Climent Sescebes y a Figueres.

XI.1. Descripción del punto de muestreo.

El punto de muestreo está situado en el tramo alto del río Muga (**figura 19**), concretamente a 3 km del camping Bassegoda en el término municipal de Albanyà (UTM ED50 47 48 24 4684320; 310 m.a.s.l.). El río presenta una zona de captación de 9 km², con el punto más alto (Puig Escaleró) a 1165 m y aproximadamente una longitud de 10 km, habiendo un desnivel de 1 sobre 12. La zona presenta ondulaciones y está rodeada por las últimas estribaciones del Sistema Pirenaico. El sitio de muestro se encuentra inmediatamente después de un pequeño y profundo estrechamiento del Muga, en un área definida de 10 metros (**figura 20**). Esta área permanentemente sumergida tiene alrededor de 8 m de amplitud en la parte ancha, siendo cubierta por flujos de agua más altos. La mayor parte del área tiene una profundidad inferior a 20 cm y se encuentra bajo un flujo de agua bajo, aunque en algunas partes se llegan alcanzar los 50 cm de profundidad. Los sustratos están constituidos por rocas laminadas (10%), cantos rodados (20%), adoquines (60%) y guijarros (10%). Las terrazas aluviales están constituidas por roca expuesta o subyacente de caliza en forma de laminadas, cantos rodados o adoquines.

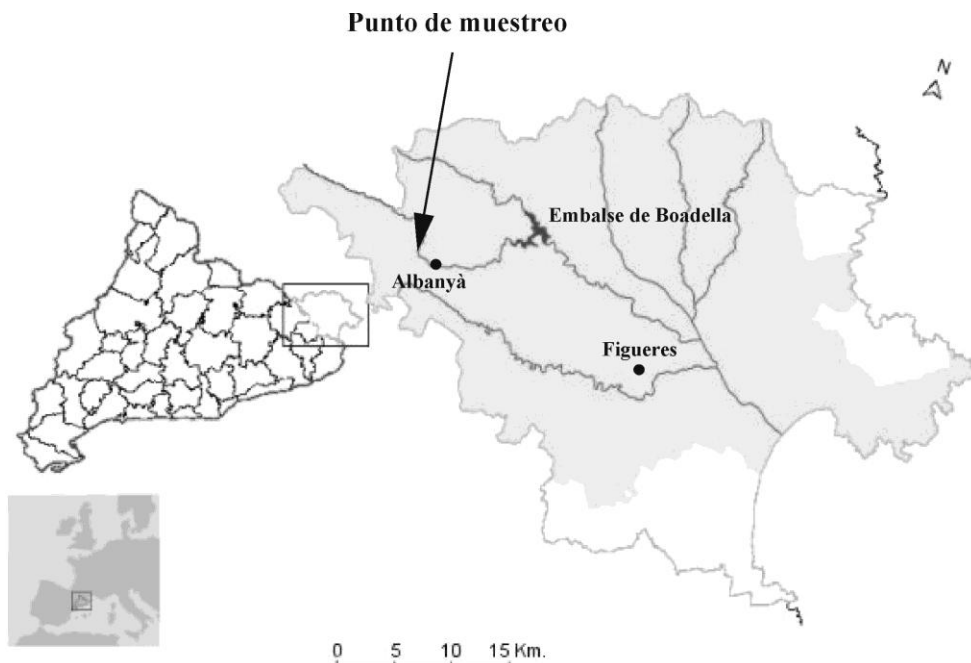


Figura 19. Cuenca del río Muga (Girona, Cataluña) en el que se muestra la situación geográfica de la estación de muestreo. Escala = 15 Km.

La región esta sujeta a veces a fuertes vientos de componente noreste a norte, denominada Tramontana, que algunas veces alcanza los 100 km h^{-1} (Font, 1983). Las características climatológicas de esta zona son muy similares a las observadas en la estación climatológica de Castellfollit de la Roca (**tabla 5**), situada a 326 m de altitud y a 17 km de distancia del sitio de muestro, aunque probablemente la precipitación es más alta y las temperaturas seguramente más bajas en la parte más alta de la cuenca. Alrededor del 90% de la cuenca tiene algún tipo de cobertura arborea mientras que el resto está formado principalmente por una superficie rocosa en la parte más alta, y areas más abiertas adjacentes al río. El bosque es una mezcla de especies de hoja caduca entre las que se encuentran *Alnus glutinosa* (alisos) seguida de *Salix eleagnus* (sauces) y de hoja perenne, como *Pinus halepensis* seguida de las especies (encinas) *Quercus faginea*, *Quercus ilex* y *Laurus nobilis*.

La comunidad epilítica, en el tramo estudiado, esta formada habitualmente por cianobacterias y varios grupos de microalgas: clorofíceas, y bacilariofíceas (diatomeas), junto a líquenes y musgos acuáticos. En el río Muga, alrededor del 10% de la superficie presenta una cobertura de fotótrofos que puede ser observada a simple vista, compuesta por tapetes de *Schizothrix*, colonias de *Rivularia*. También se observaron (menos del 0.1%) algas verdes filamentosas (en su mayor parte



Figura 20. Fotografías del río Muga a su paso por la estación de muestreo situada a 3 km de Albanyà. (c) Vista general del curso del río y (a-b, d-f) en mayor detalle las diferentes áreas en las que se dividió el tramo estudiado del río Muga, tomadas en julio (a-b, f) y en abril del 2006 (c-e).

Descripción de los ríos estudiados

Tabla 5. Datos climatológicos de temperatura y precipitación obtenidos en la estación climatológica de Castellfollit de la Roca (1985- 2006). Información proporcionada por el Centro Meteorológico Territorial en Cataluña (Barcelona), dependiente del Ministerio de Medio Ambiente.

| | Enero | Febrero | Marzo | Abril | Mayo | Junio | Julio | Agosto | Septiembre | Octubre | Noviembre | Diciembre | |
|-------------------------------|-----------------|-----------------|------------------|------------------|-------------------|------------------|-------------------|-------------------|------------------|------------------|------------------|-----------------|--------------------|
| Precipitación (mm) | | | | | | | | | | | | | Total |
| Media y rango (1985-2004) | 66,6 9,9-257 | 49,7 0-188 | 61 0-123 | 94 19,6-243 | 131,5 34,7-359 | 99,6 14-265,5 | 92,3 17,3-20,3 | 87,5 6,8-187,6 | 112 5,8-384,2 | 136 6,2-342,5 | 86 2,1-307,6 | 95,7 0-273 | 1102,7 719-1589 |
| 2005 | 3 | 77,5 | 67,5 | 57,5 | 75,7 | 54 | 35 | 89 | 84,1 | 176,3 | 98,5 | 3,3 | 821,2 |
| 2006 | 245,8 | 21,8 | 80,4 | 39,5 | 27,2 | 12,3 | 87,7 | 62,6 | 110 | 28,2 | 0,1 | 24,5 | 740,1 |
| Temperatura (°C) | | | | | | | | | | | | | Media anual |
| Media (1985-2004) | 5,5 | 7,07 | 9,9 | 11,8 | 15,7 | 19,7 | 22,6 | 22,8 | 18,5 | 14,3 | 8,7 | 6 | 13,5 |
| Media, mínima y máxima (2005) | 3,7 9,6-15,7 | 3,9 7,5-16,5 | 8,4 6,8-23,2 | 12,4 0,8-32,4 | 17,5 6,3-32,5 | 21,6 8,1-34,3 | 23,5 12-38,6 | 21,2 9,8-32,8 | 18,2 5-31,5 | 14,8 5,3-22,7 | 8 3,9-18,6 | 2,3 8,4-12,5 | 12,9 |
| Media, mínima y máxima (2006) | 5,1 4,9-15,2 | 6 3,4-17,3 | 10,4 2,1-24,3 | 13,6 1-26,7 | 18 4,9-33,2 | 21,3 4,8-34,1 | 24,9 14-36,9 | 20,9 10,4-31,7 | 19,7 8,3-32,1 | 16,6 8-27,2 | 11,1 0,9-20,2 | 5,5 4,2-19,5 | 14,4 |

Oedogonium y *Zygnema*) y menos del 0,1% por musgos. Otros organismos fotótrofos visibles macroscópicamente fueron *Tolypothrix distorta* var. *penicillata*, *Chara vulgaris* y *Ranunculus penicillatus* agg.

La microscopia mostró la existencia de dos formas de *Schizothrix*, siendo *S. coriacea* la más frecuente. También mostró la presencia de las siguientes especies: *Dicothrix gypsophila*, *Homoeothrix crustacea*, *Phormidium retzii*, *Cosmarium*, *Gongrosira incrustans*, *Achnantheidium minutissimum*, *Cocconeis*, *Cymbella*, *Gomphonema* y *Synedra*.

El río Muga, en este tramo estudiado, puede decirse que es un río en el que las comunidades de fotótrofos epilíticos se caracterizaron por la dominancia de cianobacterias, que aparecieron normalmente en el lecho del río formando tapetes o colonias visibles a simple vista. En general, es un río caracterizado por la dominancia de cianobacterias y la ausencia de cualquier tipo de perturbación humana o contaminación (Aboal y col., 2002), aunque en los últimos años con la apertura de un camping a kilómetro y medio de allí, ha favorecido la presencia de bañistas en la época estival.

XI.2. Características físico-químicas del agua.

Las características físico-químicas del agua se determinaron en las cinco campañas, comprendidas entre mayo de 2005 y julio de 2006, en las que se llevó a cabo la experimentación fisiológica “*in situ*”. Los resultados se muestran en **tabla 7**.

El río Muga, en el tramo estudiado, puede decirse que es un río que presenta generalmente aguas claras, bien oxigenadas (con valores cercanos al 100% de saturación en el tramo estudiado) y muy duras (244,1-266,9 mg l⁻¹ CaCO₃), con alta conductividad (362-569 μS cm⁻¹) y alto pH (8,1-8,5). Se trata de un río no regulado, de manera que pueden observarse algunos cambios en el nivel y flujo de las aguas a lo largo de las estaciones climatológicas (**tabla 6**), debido a las fuertes lluvias que produjeron riadas (conocidos localmente como “mugada”) en la zona, unos días antes de los muestreos de noviembre y marzo.

La irradiancia o radiación par que recibe el lecho del río también fue medida en todos los muestreos. Como cabría de esperar al tratarse de un parámetro claramente estacional, las mayores irradiancias se detectaron en las campañas de primavera y verano. La misma tendencia fue observada con la medida de temperatura ambiental, alcanzando el mayor valor en julio con 29°C y la mínima durante noviembre con

9.7°C. En cuanto a la temperatura del agua, los valores más altos se registraron en las campañas de mayo (2005) y julio (2006) mientras que los más bajos en noviembre (2005) y marzo (2006).

Tabla 6. Principales características hidrológicas y climatológicas del río Muga en el punto de muestreo durante las campañas de muestreo realizadas desde Noviembre 2005 hasta Julio 2006. Los datos mostrados son los valores medios.

| VARIABLES | UNIDADES | NOVIEMBRE | MARZO | ABRIL | JULIO |
|---------------------------|------------------------------------|------------------|--------------|--------------|--------------|
| Anchura | m | 8,17 | 13,75 | 10,61 | 8,60 |
| Profundidad | m | 0,53 | 0,46 | 0,29 | 0,23 |
| Velocidad de la corriente | m/s | 0,17 | 0,24 | - | 0,07 |
| Caudal | m ³ /s | 0,98 | 2,10 | - | 0,12 |
| Temperatura del aire | °C | 9,70 | 12,4 | 22,5 | 29 |
| Irradiancia | μE m ⁻² s ⁻¹ | 312 | 660 | 1054,4 | 2333 |

Con respecto a la mineralización de las aguas del río Muga, podemos decir que posee una alta concentración de sales en disolución, con valores altos de sulfato, que superaron generalmente los 40 mg.l⁻¹ y, de calcio, que se situaron en el rango medio de 185,3-234,2 mg L⁻¹ CaCO₃. Los valores de la alcalinidad total observados fueron también altos, detectándose una mayor alcalinidad de las aguas en las campañas de invierno. Respecto a la presencia del ión Cl⁻ en las aguas, parece ser poco variable, manteniéndose en valores bajos situados en el rango medio de 3.37 – 4.46 mg.l⁻¹.

Con respecto a la concentración de nutrientes, se realizó el análisis de las tres formas de nitrógeno: N-NO₃⁻, N-NO₂⁻ y N-NH₄⁺, además de la determinación del fósforo reactivo soluble (PRS), fósforo filtrado total (PFT) y fósforo orgánico filtrado (POS). De los resultados obtenidos, hay que destacar la baja concentración de nitrógeno inorgánico filtrado en el medio y bajas concentraciones de las distintas formas de fósforo medidas.

Los valores de las medidas individuales para las fracciones de nitrógeno nos indican que la concentración de N-NO₂⁻ presenta valores muy bajos, llegando a no ser detectable durante las campañas de abril y julio de 2006. En cuanto a los valores de los análisis del N-NO₃⁻ (**tabla 7**), presentan un valor medio en el agua de 0,9 mg.l⁻¹,

Tabla 7. Variables físico-químicas del agua del río Muga analizadas en las cinco campañas de muestreo realizadas durante 2005-6. Abreviaturas: PRF – fósforo reactivo filtrado; POF- fósforo orgánico filtrado; PFT- fósforo filtrado total.

| Variables | Unidades | Mayo 05 | | Noviembre 05 | | Marzo 06 | | Abril 06 | | Julio 06 | |
|--------------------------------|--|---------------|-------|---------------|-------|---------------|-------|---------------|-------|---------------|-------|
| | | rango | media | rango | media | rango | media | rango | media | rango | media |
| temperatura | °C | 15,5 – 21,6 | 18,6 | 10,7 – 11,9 | 11,3 | 9,6 – 10,4 | 10,1 | 12,1 – 18,1 | 15,6 | 19,4 – 25,2 | 22,6 |
| conductividad | μS cm ⁻¹ | 362 | | 347 – 469 | 426,1 | 385 – 420 | 407,4 | 405 – 507 | 462,7 | 514 – 569 | 545,6 |
| O ₂ | mg L ⁻¹ | 9,7 | | 9,5 – 11,3 | 10,6 | 8,9 – 11,1 | 9,95 | 7,8 – 10,4 | 9,2 | 7,3 – 9,5 | 8,6 |
| | % sat | 101 | | 90 – 107 | 99,8 | 83 – 101 | 93,3 | 85 – 102 | 95,8 | 93 – 110 | 101,9 |
| pH | | 8,13 – 8,63 | 8,5 | 7,13 – 8,4 | 8,1 | 8,33 – 8,54 | 8,5 | 8,28 – 8,56 | 8,4 | 7,78 – 8,5 | 8,1 |
| Dureza total | mg L ⁻¹ CaCO ₃ | 212 – 239 | 225,5 | 131,5 – 278 | 244,1 | 259 – 272 | 265,4 | 240 – 260 | 253,8 | 252 – 281 | 266,9 |
| Ca ²⁺ | mg L ⁻¹ CaCO ₃ | 185 – 185,5 | 185,3 | 175 – 210 | 202,1 | 155 – 249 | 224,2 | 196 – 258 | 234,2 | 199 – 228 | 217,5 |
| Alcalinidad total | mg L ⁻¹ CaCO ₃ | 187,5 | | 99 – 204 | 190,4 | 146 – 255 | 179,1 | 140 – 163 | 155,0 | 136 – 164 | 145,5 |
| Mg ²⁺ | mg L ⁻¹ Mg ²⁺ | 7,8 – 8,4 | 8,1 | 2,91 – 4,12 | 3,47 | 9,68 – 11,03 | 10,50 | 1,05 – 1,37 | 1,16 | 15,82 – 16,09 | 15,96 |
| Cl ⁻ | mg L ⁻¹ Cl ⁻ | 3,6 – 6,5 | 4,3 | 4,22 – 4,63 | 4,37 | 3,55 – 3,81 | 3,66 | 4,22 – 4,62 | 4,46 | 3,29 – 3,50 | 3,37 |
| SO ₄ ²⁻ | mg L ⁻¹ SO ₄ ²⁻ | 45,8 – 56 | 52,5 | 24,75 – 37,16 | 28,41 | 44,92 – 51,14 | 48,60 | 60,26 – 62,77 | 61,40 | 94,59 – 100,1 | 97,00 |
| N-NO ₂ ⁻ | μg L ⁻¹ N | 1,2 – 8,5 | 4,8 | 13,2 – 19,3 | 16,1 | 128,2 – 209 | 164,3 | ND | | ND | |
| N-NO ₃ ⁻ | μg L ⁻¹ N | 107,4 – 196,7 | 149,9 | 107,4 – 131,5 | 119,4 | 312,6 – 376,6 | 357,1 | 78,7 – 115,9 | 103,4 | 48 – 143 | 95 |
| N-NH ₄ ⁺ | μg L ⁻¹ N | 13,7 – 62,1 | 38,2 | 9,2 – 70 | 26,5 | 137,7 – 213,7 | 171,2 | 139,1 – 329,1 | 245,5 | 118,4 – 214,4 | 164,4 |
| PRS | μg L ⁻¹ P | 0,78 – 1,81 | 1,34 | 0,7 – 1,76 | 1,21 | 2,67 – 4,6 | 3,71 | 0,43 – 2,33 | 1,23 | 0,31 – 1,62 | 0,73 |
| POS | μg L ⁻¹ P | 0,12 – 1,81 | 0,59 | 0,15 – 1,17 | 0,71 | 1,53 – 4,61 | 3,15 | 2,73 – 10,34 | 5,54 | 3,84 – 4,71 | 4,32 |
| PFT | μg L ⁻¹ P | 1,93 | 1,93 | 1,83 – 2,14 | 1,91 | 5,84 – 8,4 | 6,86 | 4,68 – 11,56 | 6,66 | 4,48 – 6,27 | 5,12 |

ND: No detectado,

siendo por lo general, más altos que los obtenidos para el N-NH_4^+ , excepto en abril de 2006. Por último, la concentración del otro parámetro nitrogenado medido, el N-NH_4^+ , presentó variaciones durante el período de estudio, observándose la concentración más alta durante noviembre de 2005 (valor medio de $0,50 \text{ mg.l}^{-1}$).

Respecto a las concentraciones de fosfato registradas, se observaron claras diferencias, manteniéndose siempre en valores muy bajos, característicos de aguas oligotróficas. La concentración del PRS y del POS fueron por lo general bastante similares, excepto en las campañas de primavera y verano de 2006 donde la medida para PRS fue inferior a la de POS ($1,23$ frente $5,54 \mu\text{g l}^{-1} \text{ P}$ y $0,73$ frente $4,32 \mu\text{g l}^{-1} \text{ P}$ respectivamente). En cuanto a la concentración del fósforo total filtrado del agua, los datos obtenidos variaron entre $1,91$ y $6,86 \mu\text{g l}^{-1} \text{ P}$, con valores máximos en marzo y abril de 2006.

La razón nitrógeno inorgánico filtrado/fósforo filtrado total también fue analizada, A partir de los datos obtenidos podemos decir que la concentración de nitrógeno inorgánico total filtrado (NIF) fue casi siempre dos órdenes de magnitud más alto que el fósforo total filtrado (PTF). Además, se observó que los valores de NIF y PTF fueron más altos en marzo del 2006 (medidos después de una riada).

MATERIALES Y MÉTODOS

I. MATERIAL BIOLÓGICO.

Para la realización de este trabajo, se han empleado tanto muestras naturales como cultivos de laboratorio de cepas aisladas, crecidas en diferentes medios de cultivo bajo las condiciones descritas en el apartado 3 de estos materiales y métodos. Las poblaciones naturales estudiadas pertenecieron a los géneros *Rivularia*, *Tolypothrix* y *Nostoc* así como los tapetes microbianos, fueron las que presentaron una clara dominancia en ríos calcáreos (**tabla 8**). Algunas de las colonias de *Rivularia*, fueron cedidas gentilmente por el profesor Brian A. Whitton (Department of Biological Sciences, University of Durham, UK) procedentes del arroyo Red en la Reserva Natural Nacional de Upper Teesdale; por la Dra. M^a Angeles Puig (Departamento Biogeoquímica Acuática, Centro de Estudios Avanzados de Blanes, España), procedentes de los ríos Muga y Matarraña; por la Dra. Marina Aboal (Departamento Biología Vegetal, Universidad de Murcia, España) recogidas de los ríos Alhárabe y Endrinales y por la Dra. Elvira Perona (Departamento Biología, Universidad Autónoma de Madrid, España) del río Blanco.

Tabla 8. Poblaciones naturales examinadas en este estudio.

| Muestras naturales ambientales | Localización geográfica |
|---|--|
| Colonias de <i>Rivularia</i> Alhárabe | Río Alhárabe, Murcia, España |
| Colonias de <i>Rivularia</i> Blanco | Río Blanco, Teruel, España |
| Colonias de <i>Rivularia</i> Endrinales | Río Endrinales, Albacete, España |
| Colonias de <i>Rivularia</i> Matarraña | Río Matarraña, Teruel, España |
| Colonias de <i>Rivularia</i> Muga | Río Muga, Girona, España |
| Colonias de <i>Rivularia</i> Red | Arroyo Red, Upper Teesdale, Gran Bretaña |
| Colonias de <i>Tolypothrix</i> Muga | Río Muga, Girona, España |
| Colonias de <i>Nostoc</i> Matarraña | Río Matarraña, Teruel, España |
| Colonias de <i>Nostoc</i> Muga | Río Muga, Girona, España |
| Tapete microbiano A | Río Muga, Girona, España |
| Tapete microbiano B | Río Muga, Girona, España |
| Tapete <i>Phormidium</i> Muga | Río Muga, Girona, España |

Además, se han empleado cianobacterias del epilíton de los ríos Alberche, Amir, Endrinales, Guadarrama, Matarraña y Muga, así como del arroyo Mediano aisladas en estudios previos (**tabla 9**). Todas estas cianobacterias forman parte de la colección de la Universidad Autónoma de Madrid, por ello, se mantienen criopreservadas en glicerol al 15% y en el mismo tipo de medio de cultivo en el que estaban creciendo.

Tabla 9. Cultivos aislados pertenecientes a la colección de cianobacterias de la Universidad Autónoma de Madrid empleadas en este estudio.

| Cultivo | Código colección ¹ | Localización geográfica |
|---------|-------------------------------|----------------------------------|
| A1 | UAM-342 | Río Amir, Murcia, España |
| A2 | UAM-345 | Río Amir, Murcia, España |
| A8 | UAM-308 | Río Amir, Murcia, España |
| E1 | UAM-302 | Río Endrinales, Albacete, España |
| E7 | UAM-313 | Río Endrinales, Albacete, España |
| E8 | UAM-319 | Río Endrinales, Albacete, España |
| E16 | UAM-354 | Río Endrinales, Albacete, España |
| E17 | UAM-358 | Río Endrinales, Albacete, España |
| GU1 | UAM-315 | Río Guadarrama, Madrid, España |
| MA4 | UAM-307 | Río Matarraña, Teruel, España |
| MA7 | UAM-304 | Río Matarraña, Teruel, España |
| MA8 | UAM-355 | Río Matarraña, Teruel, España |
| MA11 | UAM-357 | Río Matarraña, Teruel, España |
| MA14 | † | Río Matarraña, Teruel, España |
| MU2 | UAM-376 | Río Muga, Girona, España |
| MU8 | UAM-362 | Río Muga, Girona, España |
| MU15 | UAM-369 | Río Muga, Girona, España |
| MU21 | UAM-367 | Río Muga, Girona, España |
| MU24 | UAM-305 | Río Muga, Girona, España |
| MU25 | UAM-359 | Río Muga, Girona, España |
| MU27 | UAM-314 | Río Muga, Girona, España |
| MU28 | UAM-341 | Río Muga, Girona, España |
| MU41 | UAM-370 | Río Muga, Girona, España |
| ALB2 | UAM-220 | Río Alberche, Madrid, España |
| ALB3 | UAM-225 | Río Alberche, Madrid, España |
| ME1 | UAM-360 | Arroyo Mediano, Madrid, España |

¹UAM- Universidad Autónoma de Madrid

Durante el desarrollo del trabajo, se aislaron nuevas cepas del género *Calothrix* del río Tejada y arroyo Cereal, así como nuevas cepas de colonias de *Rivularia* de los ríos Alhárabe y Blanco (**tabla 10**).

Tabla 10. Cultivos aislados durante este estudio.

| Cultivo | Código colección ¹ | Localización geográfica |
|---------|-------------------------------|----------------------------------|
| BL1 | UAM-346 | Río Blanco, Teruel, España |
| BL2 | UAM-347 | Río Blanco, Teruel, España |
| CR1 | UAM-332 | Arroyo Cereal, Madrid, España |
| TJ1 | UAM-333 | Arroyo de Tejada, Madrid, España |
| TJ6 | UAM-334 | Arroyo de Tejada, Madrid, España |
| TJ7 | UAM-335 | Arroyo de Tejada, Madrid, España |
| TJ9 | UAM-336 | Arroyo de Tejada, Madrid, España |
| TJ10 | UAM-337 | Arroyo de Tejada, Madrid, España |
| TJ11 | UAM-371 | Arroyo de Tejada, Madrid, España |
| TJ12 | UAM-372 | Arroyo de Tejada, Madrid, España |
| TJ13 | UAM-340 | Arroyo de Tejada, Madrid, España |
| TJ14 | UAM-352 | Arroyo de Tejada, Madrid, España |
| TJ15 | UAM-373 | Arroyo de Tejada, Madrid, España |
| TJ16 | UAM-374 | Arroyo de Tejada, Madrid, España |

¹UAM- Universidad Autónoma de Madrid

II. TÉCNICAS DE CULTIVO DE CIANOBACTERIAS.

II.1 Medios de cultivo.

Para el aislamiento y cultivo de cianobacterias del epilíton se han empleado distintos medios de cultivo: el medio de cultivo BG-11₀ (Rippka, 1979), ajustado a pH 7.8 con tampón HEPES 2.5 mM. La composición química de este medio fue modificada para carecer de fuente de nitrógeno combinado, con el fin de favorecer el crecimiento de cianobacterias fijadoras de N₂ atmosférico. La composición química de este medio se encuentra detallada en la tabla 10.

También se utilizó el medio de cultivo Chu no. 10D (Chu, 1942), modificado por Gibson y Whitton (1987). Es similar al medio anterior, diferenciándose básicamente en la concentración de sales minerales que es menor (**tabla 11**). También carece de fuente de nitrógeno combinado y su pH fue ajustado a 7.6 con tampón HEPES 2.5 mM. Puede asemejarse a un medio oligotrófico, de manera que puede permitir el desarrollo de aquellas estirpes que por problemas de altas concentraciones de nutrientes no puedan desarrollarse en el medio BG11₀. Ambos medios de cultivo líquido se esterilizaron en un autoclave automático HA240M/300M Sulzer España, S.A. a 1.5 Kg.cm⁻² de presión, durante 20 minutos a 121°C.

Tabla 11. Composición de los medios de cultivo BG-11₀ (Rippka, 1979) y Chu No.10D para cianobacterias (Gibson y Whitton, 1987).

| Componentes | BG-11₀ | Chu No.10D |
|--|--------------------------|-------------------|
| K ₂ HPO ₄ .3H ₂ O | 0.18 mM | 0.032 mM |
| Na ₂ -EDTA | 0.003 mM | 0.010 mM |
| MgSO ₄ .7H ₂ O | 0.3 mM | 0.101 mM |
| CaCl ₂ .2H ₂ O | 0.25 mM | 0.244 mM |
| Ácido cítrico | 0.029 mM | |
| Citrato férrico amónico | 0.020 mM | |
| FeCl ₃ .6H ₂ O | | 0.009 mM |
| Na ₂ CO ₃ | 0.19 mM | |
| NaHCO ₃ | | 0.188 mM |
| Microelementos: | | |
| H ₃ BO ₃ | 46.26 µM | 11.56 µM |
| MnCl ₂ .4H ₂ O | 9.1 µM | 0.229 µM |
| ZnSO ₄ .7 H ₂ O | 0.77 µM | 0.193 µM |
| Na ₂ MoO ₄ .2 H ₂ O | 1.60 µM | 0.028 µM |
| CuSO ₄ .5H ₂ O | 0.32 µM | 0.079 µM |
| CoSO ₄ .7 H ₂ O | 0.17 µM | 0.037 µM |

En algunos experimentos realizados en laboratorio, se utilizó el medio Allen y Arnon (1955) con un mayor contenido en sales que los medios descritos anteriormente y, con fuente nitrogenada. La composición química de este medio se encuentra detallada en la **tabla 12**.

Para la preparación de los cultivos en medio sólido, se añadió agar para una concentración final de 1,5 % (p/v).

II.2. Condiciones de cultivo y siembra.

Los cultivos madre se mantuvieron en matraces Erlenmeyer en un incubador a una temperatura constante de 18°C, estáticos (sin gaseo, ni agitación) y en condiciones de fotoperíodo, con el siguiente ciclo de luz y temperaturas: 16 h de luz, con una intensidad de luz constante de 11 µmol.m⁻².s⁻¹, y 8 h de oscuridad. Periódicamente, se sembraban en medio fresco para evitar su envejecimiento y muerte. La siembra de los cultivos tuvo lugar en condiciones de esterilidad en una cabina de flujo laminar vertical Captair 2005-HPS que había sido previamente irradiada con luz ultravioleta (U.V.) durante 10 min.

Tabla 12. Composición del medio de cultivo Allen y Arnon (1955).

| Componentes | Concentración |
|--|----------------------|
| K ₂ HPO ₄ ·3H ₂ O | 2 mM |
| NaCl | 4 mM |
| MgSO ₄ ·7H ₂ O | 1 mM |
| CaCl ₂ ·2H ₂ O | 0.50 mM |
| Na ₂ -EDTA | 76.75 mM |
| FeSO ₄ ·7H ₂ O | 69.16 mM |
| NaNO ₃ | 6.25 mM |
| KNO ₃ | 6.25 mM |
| Microelementos: | |
| H ₃ BO ₃ | 46.25 μM |
| MoO ₃ | 1.25 mM |
| MnCl ₂ ·4H ₂ O | 9.1 μM |
| ZnSO ₄ ·7 H ₂ O | 0.77 μM |
| NH ₄ NO ₃ | 0.196 μM |
| CuSO ₄ ·5H ₂ O | 0.32 μM |
| CoCl ₂ ·6 H ₂ O | 0.17 μM |

Para la preparación de los cultivos empleados en los diferentes ensayos de laboratorio, se crecieron los cultivos en un agitador orbital CH-4103 Bottminger con una velocidad constante de 150 rpm, a la misma temperatura e intensidad de luz que los cultivos madre y, se mantuvieron en fase logarítmica mediante resiembras periódicas siempre en el mismo tipo de medio del que procedían.

El material de vidrio utilizado en este proceso se lavó con HCl al 10% y esterilizado en una estufa Pasteur Haereus a 150°C durante dos horas y media, para evitar cualquier fuente de contaminación.

III. TÉCNICAS DE AISLAMIENTO DE CIANOBACTERIAS.

III.1. Aislamientos de cianobacterias del epilíton.

El epilíton, constituido por las comunidades bióticas localizadas en la superficie de las piedras del lecho del río, se recogió, tomando varias piedras del lecho del río, para proceder en el laboratorio a la extracción de dichas comunidades por duplicado, mediante el raspado con un cepillo fino. Los extractos recogidos se resuspendieron en

un volumen de 3 ml de medio de cultivo. A continuación se sembraron, 0,3 ml de las muestras extraídas, en placas Petri con distintos medios de cultivo. Las placas se colocaron en un cultivador de placas (luz, 15-20 $\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ y temperatura, 25-28 °C). El cultivador está provisto de una serie de bandejas de metacrilato en donde las placas son colocadas y, unos fluorescentes laterales que proporcionan aproximadamente la misma intensidad de luz a todas ellas. Los ventiladores laterales actúan reciclando el aire de la cámara, manteniendo mejor la temperatura.

Las placas se mantuvieron en el cultivador durante 3 o 4 semanas aproximadamente. Pasado ese tiempo, se procedió al aislamiento de las cepas siguiendo el método descrito por Rippka (1988b), extrayéndose las colonias con un capilar muy fino fabricado a partir de una pipeta Pasteur. Con ayuda de una lupa binocular, se recogió (a poder ser) un único filamento de la colonia, que se sembró en una placa de agar y en el mismo medio del que procedía. Se mantuvieron en el cultivador hasta su crecimiento y se repitió el procedimiento hasta conseguir colonias monoclonales de las estirpes.

Una vez conseguido el aislamiento, se procedió a resembrar las cianobacterias en matraces Erlenmeyer de 50 ml que contenían medio de cultivo líquido. Cuando dicha especie comenzó a crecer, se puso en agitación para conseguir así mayor volumen de cultivo, necesario para los experimentos de caracterización genética.

Todo el material utilizado para este proceso, fue previamente lavado con HCL y esterilizado para evitar posibles contaminaciones que entorpecieran el proceso de aislamiento.

III.2 Aislamientos de cepas a partir de colonias de *Rivularia*.

Las muestras se transportaron al laboratorio en botes de polietileno y, se mantuvieron en nevera a 4 °C. Una vez en el laboratorio se procedió al cultivo de las colonias de *Rivularia* para llevar a cabo después su aislamiento. El método empleado es una modificación del diseñado por Zehnder (1985) para el cultivo y aislamiento de los tricomas de la especie *Stigonema minutum*.

Como se muestra en la **figura 21**, el sistema estaba formado por una placa Petri de 90 mm con 3 ml de medio de cultivo Chu no.10D sin nitrógeno (Gibson y Whitton, 1987) que contenía en su interior la parte inferior de una placa Petri de 60 mm. Se situó sobre esta placa interior un papel de filtro con forma circular y dos pestañas a ambos lados, constituyendo el soporte en donde se colocó la colonia de *Rivularia*. De este modo, el medio de cultivo subía por capilaridad a través del papel filtro a las muestras,

favoreciendo la formación hormogonios. Las placas se incubaron en una cámara de cultivo a una temperatura constante de 18°C y en condiciones de fotoperíodo, con el consiguiente ciclo de luz-oscuridad: 16 horas de luz, con una intensidad $7-11 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ y 8 horas de oscuridad.

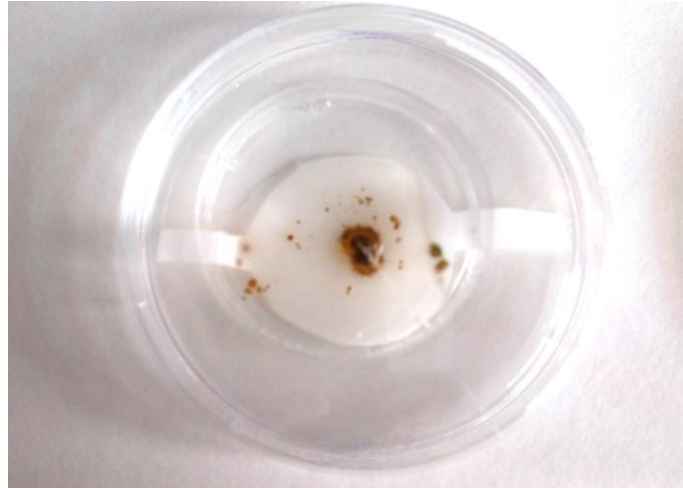


Figura 21. Fotografía del sistema diseñado para el aislamiento de hormogonios de colonias de *Rivularia*.

Cuando las colonias de *Rivularia* desarrollaron nuevas colonias alrededor, se procedió al aislamiento de las nuevas cepas. Con ayuda de una lupa binocular serie SZ 45 (Leica, Leica Microsystems, Wetzler, Alemania), se recortó el trozo de papel de filtro que contenía las nuevas colonias y, se sembró en una placa Petri con el mismo medio del que procedía. Las muestras se mantuvieron en la cámara de cultivo durante 3 semanas, tras las cuales se procedió a obtener cultivos monoclonales. Con la ayuda de un capilar muy fino fabricado a partir de una pipeta Pasteur, se sembró un único filamento en una placa de agar. Las placas se mantuvieron en el incubador de placas hasta su crecimiento. Para conseguir mayor volumen de cultivo, las colonias se transfirieron a matraces Erlenmeyer de 50 ml que contenían medio de cultivo Chu no.10D.

IV. TÉCNICAS UTILIZADAS PARA LA CARACTERIZACIÓN MORFOLÓGICA DE CIANOBACTERIAS.

El análisis morfológico se llevó a cabo mediante observación macroscópica y microscópica de las muestras. Para el análisis macroscópico se empleó una lupa binocular serie SZ 45 (Leica, Leica Microsystems, Wetzler, Alemania). El análisis

microscópico se llevó a cabo utilizando un microscopio óptico Olympus BH2-RFCA (Olympus, Tokio, Japón) equipado con contraste de fases y un sistema de cámara de video (Leica DC Camera, Leica Microsystems, Wetzler, Alemania) y en un microscopio Olympus BX61 (Olympus, Hamburg, Germany) equipado con una cámara DP70 CCD.

Se emplearon las siguientes características tradicionales para identificar a las cianobacterias estudiadas: morfología de la colonia, longitud y anchura de las células vegetativas, ausencia o presencia de vaina, morfología de la vaina, longitud y disposición de los tricomas en las colonias, presencia o ausencia de pelos terminales, heterocistos y acinetos, forma del filamento, tipo y frecuencia de las falsas ramas, capacidad de desarrollar hormogonios e inclusiones celulares (granulación). Además, en las cianobacterias con filamentos atenuados (géneros *Calothrix*, *Rivularia* y *Tolypothrix*), se calculó la relación basal-apical del tricoma como rasgo taxonómico, proporcionándonos información sobre el grado de atenuación de los filamentos. Se obtuvo a partir de la división de la anchura de la célula vegetativa más ancha, situada en la región basal del tricoma, entre la anchura de la célula más estrecha de la región apical (Herdman y col, 2001b; Rippka y col., 2001b).

Todas las cianobacterias empleadas en este estudio se clasificaron utilizando las claves dicotómicas de Geitler (1930-1932) y Desikachary (1959) principalmente, actualizando dichas determinaciones taxonómicas con las revisiones que han realizado Anagnostidis y Komarek (1985, 1988, 1990), Komarek y Anagnostidis (1986, 1989, 1998, 2005), Hoffmann (1988b) y Whitton (2002).

V. TÉCNICAS EMPLEADAS EN LA CARACTERIZACIÓN GENÉTICA DE CIANOBACTERIAS.

V.1. Extracción de ADN genómico de cianobacterias.

El método de aislamiento de ADN genómico empleado es una adaptación del método descrito por Saghai-Marroof y col. (1984) para hojas liofilizadas, modificado para el aislamiento de ADN de cianobacterias usando bromuro de cetiltrimetilamonio (CTAB) (Doyle y Doyle, 1990).

Para la extracción de ADN se recogieron 200 µl de muestra y se añadieron perlitas de vidrio estériles (212-300 micras, Sigma Chemical Co.). Se centrifugó a 14000 rpm durante 5 minutos. Se eliminó el sobrenadante y al sedimento se añadieron 400 µl de

buffer de extracción (CTAB 2,5% (p/v), NaCl 1,4 M, 2-mercaptoetanol 0,2% (v/v), EDTA 20 mM pH 8, Tris-HCl 100 mM pH 8) previamente precalentado a 60°C. La muestra se congeló en N₂ líquido y seguidamente, se homogeneizó con un homogenizador BOSCH CSB-850-2RET. Tras repetir la operación tres veces, las muestras se incubaron a 60 °C durante 30 minutos.

A continuación se añadieron a cada muestra 400 µl de cloroformo y después de mezclar el contenido se centrifugó a 14000 rpm durante 5 minutos. Se transfirió la fase acuosa a otro tubo eppendorf y se repitió de nuevo la operación. A la fase acuosa obtenida se añadieron 455 µl de isopropanol para precipitar los ácidos nucleicos. Ambas soluciones se mezclaron suavemente mediante inversión de los microtubos.

Las muestras se centrifugaron a 14000 rpm durante 10 minutos. Se desechó el sobrenadante mientras que el precipitado se resuspendió en 400 µl de agua bidestilada estéril. Después se añadieron 40 µl de acetato sódico 3M pH 4,5 y 800 µl de etanol absoluto. A continuación, se agitaron las muestras antes de centrifugarlas a 14000 rpm durante 10 minutos. Se desechó el sobrenadante y el precipitado se secó en una estufa a 37 °C. Finalmente, se resuspendió el precipitado en 15 µl de agua bidestilada estéril. Los ácidos nucleicos se resolvieron por electroforesis en geles horizontales de agarosa al 0,8% sumergidos en tampón TAE (Tris-HCl 40 mM pH 7,6, ácido acético 20 mM y EDTA 1 mM) (Sambrook, 1989). Las muestras se mezclaron con el tampón de carga (Ficoll 15% (p/v) en TAE con Bromofenol 0,25% (p/v)). El gel se tiñó con bromuro de etidio y las bandas se visualizaron bajo radiación ultravioleta en un transiluminador (Gel Doc 1000, BioRad). El tamaño de los fragmentos se estimó por su movilidad electroforética usando como referencia la escalera de 1 Kb Gene Ruler de MBL Biotools. El material se mantuvo a -20 °C hasta el momento de su análisis.

V.2. Determinación de la secuencia del operón de la ficocianina.

Se determinó la secuencia parcial del operón de la ficocianina (*cpcBA-IGS*) de diferentes cepas aisladas así como de muestras de poblaciones del medio natural mediante la extracción de ADN, amplificación de dicha región, clonación de los productos de amplificados y transferencia a *E. coli* DH5α por transformación.

V.2.1. Amplificación de la región *cpcBA-IGS*.

El ADN obtenido se usó como molde para la reacción en cadena de la polimerasa con los reactivos de un Ampli Taq Kit (Biotools, España). Para amplificar la

región *cpcBA*-IGS en las muestras extraídas se utilizaron inicialmente los cebadores denominados PC β F y PC α R diseñados por Neilan y col., 1995. Posteriormente, se diseñaron cebadores específicos para Rivulariaceas (RivF y RivR), a partir del alineamiento de las secuencias obtenidas previamente para algunos cultivos aislados mediante el programa GCG Sequence Analysis Software Package (Genetic Computer Group, Biotechnology Center, University of Wisconsin, Madison, WI, USA). Los oligonucleótidos utilizados en este estudio se sintetizaron comercialmente (Roche Applied Science, Alemania) y, sus secuencias se muestran en la **tabla 13**.

El volumen de la reacción fue de 25 μ l y contenía: 2,5 μ l Buffer de PCR 10x, 100 μ M de cada deoxinucleótido trifosfato, MgCl₂ 1,5 mM, 10 pmol de cada cebador, 1U DNA polimerasa (Biotools, España), agua mili-Q estéril y 10 ng de ADN genómico. La amplificación se llevó a cabo (usando un aparato de Perkin Elmer Gene Amp PCR System 2400) en las siguientes condiciones: 94 °C durante 5 minutos, seguido de 30 ciclos de: 94 °C/ 30 s, 50-52 °C/ 1 min y 72 °C/ 1 min, y una extensión final a 72 °C durante 1 minutos. La temperatura de anillamiento fue de 50 °C cuando los cebadores utilizados eran PC β F y PC α R o bien 52 °C para RivF y RivR.

Tabla 13. Secuencia de los diferentes cebadores utilizados para la amplificación de la región *cpcBA*-IGS.

| Nombre | Secuencia | Tm (°C) | nº pb amplificadas |
|---------------|------------------------------|---------|--------------------|
| PC β F | 5'-GGCTGCTTGTTTACGCGACA-3' | 62 | 722-677 |
| PC α R | 5'-CCAGTACCACCAGCAACTAA-3' | 60 | |
| RivF | 5'-TGGAAATCATCTTGCGCTATGT-3' | 62 | 670-566 |
| RivR | 5'-CACCAGCAACTAAACAGTA-3' | 54 | |

Para obtener la secuencia de *cpcBA*-IGS de alguna de las muestras, se realizó una amplificación en dos fases (denominada “*nested*-PCR”). En la primera fase, se amplificó el ADN extraído con los oligonucleótidos iniciadores PC β F y PC α R según se ha descrito anteriormente, reduciendo en este caso el número de ciclos a 25. Los amplicones resultantes de esta amplificación, se utilizaron como molde para una nueva amplificación realizada con los cebadores RivF y RivR diseñados en una región más interna. En este caso, el programa de amplificación constaba de 20 ciclos.

Los fragmentos amplificados por PCR se resolvieron por electroforesis en geles horizontales de agarosa al 2%, conforme se describe en el apartado 6.1., utilizando como patrón un marcador de peso molecular 1 Kb Gene Ruler de MBL Biotools.

V.2.2. Clonación de los fragmentos amplificados de la región *cpcBA*-IGS.

Los fragmentos amplificados se ligaron a un vector y con él se transformaron células de la bacteria *Escherichia coli* y estirpe DH5- α MC1022 (Φ 80 Δ lacZ Δ M15, *endA1*, *recA1*, *hsdR17*, *supE44*, *thi-1*, *gyrA96*, *relA1*, Δ (*lacZYA-argF*) U169). Los vectores empleados fueron los siguientes: el plásmido de alto número de copia pGEM^R-T del sistema pGEM^R-T Easy Vector Systems (3015 bp) de Promega, que contiene el gen que confiere resistencia al antibiótico ampicilina y el vector pDrive del sistema QUIAGEN PCR Cloning Kit (3.85 kb) de QUIAGEN posee los genes que confieren resistencia a ampicilina y kanamicina. Ambos vectores presentan los promotores de RNA polimerasa T7 y SP6 flanqueando a un región de clonación múltiple con varios sitios de reconocimiento de endonucleasas de restricción dentro de la región codificante del péptido α de la enzima β -galactosidasa (*lacZ*).

El proceso de ligación se realizó según las recomendaciones del fabricante, presentes en el manual de instrucciones de cada sistema empleado. Seguidamente, se comprobó la presencia del inserto de interés en el vector de expresión por restricción con la enzima adecuada.

Medios de cultivo empleados para E. coli.

Para el cultivo de las cepas de *E. coli* se utilizó el medio LB (medio lisogénico) para bacterias, al que se añadió 1.5% (p/v) de agar para su crecimiento en medio sólido, medio al que se denomina LA (medio lisogénico con agar). La composición de cada uno de ellos se describe en la **tabla 14**. Las soluciones se esterilizaron en un autoclave automático HA240M/300M Sulzer España, S.A. a 1.5 Kg/cm² de presión, durante 20 minutos a 121°C, si el medio no contenía agar, o 15 minutos a 115°C, si llevaba agar.

Para el crecimiento de cultivos de bacterias (tanto en medio sólido como en medio líquido) se añadió una cierta cantidad de antibiótico, bien ampicilina o bien kanamicina a una concentración final de 100 $\mu\text{g}.\text{ml}^{-1}$ o 25 $\mu\text{g}.\text{ml}^{-1}$ respectivamente. El empleo de un antibiótico u otro dependió de la resistencia que tuviera la cepa de *E. coli* transformada.

Tabla 14. Medios de cultivo utilizados para el cultivo de *E. coli*. (Bertani, G., 1951)

| Solución | Componentes | Cantidad añadida |
|-----------------|---|--|
| MEDIO LB | Extracto de levadura (0.5% p/v) Tryptona (1% p/v) NaCl (0.5% p/v) | 5 g.l ⁻¹ 10 g.l ⁻¹ 5 g.l ⁻¹ |
| MEDIO LA | Igual composición que en el medio LB más agar bacteriológico (1.5 % p/v) | 15 g.l ⁻¹ |

Preparación de bacterias competentes.

Las células competentes de *E. coli* DH5- α MC1022 se prepararon químicamente por el método de cloruro cálcico (Mandel y Higa, 1970), modificado posteriormente por Hanahan en 1983 para usar iones bivalentes. Las células de una colonia aislada de *E. coli* se inocularon en 3 ml de medio LB líquido y, se mantuvieron a 37 °C en agitación constante 250 rpm en un incubador InnovaTM 4000 (New Brunswick Scientific) durante una noche. A continuación, se inocularon 200 ml de medio LB líquido con 1 ml del cultivo crecido durante una noche. El cultivo se mantuvo en agitación a 37°C hasta alcanzar una absorbancia de 0.4-0.5 medida a 600 nm (aproximadamente 2 horas). A partir de este momento, tanto el cultivo como el material utilizado durante el proceso se mantuvieron en hielo.

Se centrifugó el cultivo a 3.500 rpm durante 10 minutos a 4°C. Después de descartar el sobrenadante, el sedimento se resuspendió suavemente en 20 ml de solución TFBI, cuya composición química se describe a continuación: acetato potásico 30 mM pH 5.8, MnCl₂ 50 mM, CaCl₂ 10 mM, RbCl₂ 100 mM y glicerol 15%. Transcurridos 10 minutos de incubación en hielo, el cultivo se centrifugó a 3500 rpm a 4°C durante 10 minutos y posteriormente, se resuspendió el sedimento en 4 ml de solución TFBII. La composición química de la solución TFBII es la siguiente: MOPS 10 mM pH 7, CaCl₂ 75 mM, RbCl₂ 10 mM y glicerol 15%. Finalmente, las células competentes se repartieron en alícuotas de 200 μ l en tubos Eppendorf y rápidamente guardadas a -80°C.

Transformación.

Para transformar células de *E. coli* con los distintos plásmidos construidos en el presente trabajo, se añadieron 10 μ l de mezcla de ligación (plásmido con el inserto de interés) a una alícuota de 200 μ l de células competentes de *E. coli* DH5 α (Sambrook y

col., 1989). Se incubó esta mezcla en hielo durante 20 minutos, para permitir que las moléculas de ADN entren en contacto con las células competentes y, poder así pasar a su interior. Las células se sometieron a un choque térmico, que consistía en una incubación a 42 °C sin agitación durante 2 minutos, seguida de una incubación en hielo durante 10 minutos. Seguidamente, se añadieron 0,9 ml de medio LB líquido, y se mantuvieron en agitación a 250 rpm durante una hora a 37 °C en un incubador Innova™ 4000 (New Brunswick Scientific).

Después del periodo de incubación, 100 µl de la mezcla de transformación se añadieron a una placa de medio LB sólido con X-Gal y el antibiótico adecuado. El resto de la mezcla se centrifugó a 14000 rpm durante 30 segundos a temperatura ambiente. Se desechó la mayor parte del sobrenadante, dejando la cantidad suficiente que nos permitiera resuspender el sedimento y añadirlo a otra placa de manera similar a la anterior. Ambas placas se incubaron durante toda la noche en una estufa a 37 °C.

V.2.3. Aislamiento de ADN plasmídico y análisis de restricción.

Para el aislamiento de plásmidos de *E. coli* a pequeña escala se utilizó el método descrito por Holmes y Quigley (1981) según el protocolo mejorado por Sambrook y colaboradores (1989).

Las células de una sola colonia de *E. coli* DH5α se inocularon con ayuda de palillos estériles en 5 ml de medio LB líquido con el antibiótico adecuado, e incubadas con agitación constante de 250 rpm durante toda la noche a 37°C en un incubador Innova™ 4000 (New Brunswick Scientific). Se transfirieron 1,5 ml de cultivo a un tubo eppendorf de 1,5 ml, y seguidamente se centrifugó a 14000 rpm durante 30 segundos a temperatura ambiente en una microcentrífuga. El mismo procedimiento se repitió una vez más. El precipitado se resuspendió suavemente en 350 µl de solución STET (sacarosa 8% (p/v), Triton X-100 5% (v/v), EDTA 50 mM, Tris-HCL 50mM pH 8.0), y se añadieron 25 µl de lisozima (preparada en el momento) a una concentración de 10 mg.ml⁻¹. La mezcla de transformación se incubó durante 50 segundos en agua a 100°C antes de centrifugar el lisado a 14000 rpm durante 20 minutos en una microcentrífuga a 4 °C. El precipitado se eliminó con un palillo estéril y se añadieron 375 µl de isopropanol al sobrenadante para precipitar el plásmido. Se mezcló mediante inversión y, se incubaron durante 30 minutos a -20 °C. A continuación, las muestras se centrifugaron a 14000 rpm durante 10 minutos a 4 °C en una microcentrífuga y, se

eliminó el sobrenadante. Finalmente, el ADN plasmídico (previamente secado a 37°C) se resuspendió suavemente en 50 µl de agua bidestilada estéril.

Para comprobar que el plásmido contiene el fragmento de interés, se analizó el ADN purificado mediante análisis de restricción. En este sentido, 10 µl de mezcla de reacción (1 µl de la enzima de restricción *EcoRI*, 2,5 µl del tampón H (10x) y 11,5 µl de agua bidestilada estéril) se añadieron a 10 µl de ADN plasmídico. Transcurridas 2 horas de incubación a 37 °C, se visualizó la digestión en un gel de agarosa al 1% conforme se describe en el apartado 6.1., utilizando como patrón un marcador de peso molecular 1 Kb Gene Ruler de MBL Biotools. Finalmente, se llevó a cabo el aislamiento de plásmidos para secuenciación mediante el método QIAprep Spin Miniprep kit Protocol de QUIAGEN. La cuantificación de la concentración de ADN plasmídico extraído se verificó en un gel de agarosa al 0,8%.

V.2.4. Secuenciación.

Se realizó una secuenciación automática de ambas hebras de ADN mediante el sistema ABI Pris (Applied Biosystems) de terminadores fluorescentes Big Dye™ y el instrumento de electroforesis multicapilar ABI 3730, en el Servicio de Secuenciación de ADN del Centro Nacional de Investigaciones Oncológicas (CNIO, Madrid). Los oligonucleótidos empleados fueron los mismos que para la amplificación por PCR de la región estudiada.

Las secuencias que habían sido clonadas en un vector se analizaron para eliminar posibles contaminaciones, como las debidas a segmentos derivados de la secuencia del vector producidas al menos en uno de los extremos. Este proceso se llevó a cabo mediante la búsqueda de similitud entre las secuencias obtenidas y la secuencia del vector empleado, a través del programa BLASTN del National Center for Biotechnology Information (NCBI) componente de U.S. National Institute of Health (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>). Se procesaron todas las secuencias generadas para corregir los errores producidos durante la secuenciación a través del programa informático BioEdit versión 5.0.9. (Hall, 1999). Finalmente, se compararon las secuencias con las publicadas en diferentes bases de datos mediante el programa BLASTN del NCBI, y el Servicio WU-BLAST del European Molecular Biology Laboratory (EMBL) (<http://www.ebi.ac.uk/blast2/index.html>).

V.3 Estudio de la región *cpcBA*-IGS mediante polimorfismo de los fragmentos de restricción del ADN (RFLP).

Las secuencias parciales del operón de la ficocianina de los cultivos aislados así como de algunas colonias de *Rivularia*, se analizaron mediante el programa GCG Sequence Analysis Software Package (Genetic Computer Group, Biotechnology Center, University of Wisconsin, Madison, WI, USA) para determinar las enzimas de restricción capaces de digerir dichas secuencias, así como el punto o puntos de corte correspondientes. De todas las enzimas que dieron positivo, se seleccionaron sólo 4 de ellas porque eran las únicas que nos permitían discriminar un patrón de bandas específico para cada tipo secuencia obtenida, pudiendo llegar así a obtener perfiles específicos de las distintas cepas.

Los productos de PCR (ver apartado V.2.1) se purificaron con el método de QUIAEX II Agarose Gel Extraction Protocol de QUIAGEN para eliminar todos los componentes utilizados en la amplificación, incluyendo los cebadores y los dNTPs. A continuación, se digirieron los fragmentos purificados se digirieron separadamente con las 4 endonucleasas de restricción seleccionadas (*AlwNI* y *AseI* de BioLabs (New England), *AvaII* y *HindIII* de Amersham). Para ello se tomaron 15 µl de ADN purificado y se añadieron 1 µl de la enzima de restricción; 2,5 µl del tampón (10x) y 11,5 µl de agua bidestilada estéril. Se dejó digiriendo durante toda la noche a 37 °C. Finalmente, los fragmentos de ADN procedentes de la digestión con enzimas de restricción se resolvieron por electroforesis en geles horizontales de agarosa al 2%, sumergidos en tampón TAE según se ha descrito anteriormente.

V.4 Análisis de la región *cpcBA*-IGS por medio de electroforesis en geles desnaturizantes por gradiente térmico (TGGE).

V.4.1 Amplificación de la secuencia parcial *cpcBA*-IGS.

Para amplificar la región intergénica entre los genes *cpcB* y *cpcA* de cianobacterias para TGGE, se utilizaron el siguiente conjunto de oligonucleótidos: RivF (secuencia mostrada en la **tabla 13**) con una secuencia de 23 nucleótidos rica en GC (CCCGCCGCGCCCCGCGCCCGCC) en su extremo 5' necesaria para separar los fragmentos amplificados mediante TGGE y TGGERivR (5'-TTCGGTGTGCTTAGG AAACG-3'), sintetizados comercialmente (Roche Applied Science, España).

La amplificación se llevó a cabo con un termociclador Perkin Elmer Gene Amp PCR System 2400 según se describe en el apartado 6.2.1 y con las condiciones siguientes: 94 °C durante 5 minutos, seguido de 30 ciclos de: 94 °C/ 30 s, 60 °C/ 1 min y 72 °C/ 1 min, y una extensión final a 72 °C durante 1 minuto. Las secuencias de *cpcBA-IGS* de los cultivos aislados E1 UAM-302 y MU27 UAM-314 y, la muestra natural de *Rivularia* del río Alhárabe clonadas en vectores de expresión, se utilizaron como controles positivos de los genotipos encontrados. La cuantificación de los fragmentos amplificados se realizó en geles de agarosa al 1,5%, según se describe en el apartado V.1., utilizando como patrón un marcador de peso molecular 1 Kb Gene Ruler de MBL Biotoools.

V.4.2 Utilización de TGGE para la separación de los amplicones de la región *cpcBA-IGS*.

Los fragmentos amplificados por PCR de las distintas cianobacterias se resolvieron por electroforesis en geles desnaturizantes por gradiente térmico, según las especificaciones del fabricante.

Para la preparación del gel se disolvieron en agua destilada 32,46 grs de urea (concentración final 8M), 1,59 ml de glicerol al 85%, 1,35 ml de Buffer TAE 50x, 8,4375 ml de acrilamida/bis-acrilamida [40% (29:1)] (BioRad Laboratories) y 13,5 ml de formamida desionizada para alcanzar una concentración final del 20%. Finalmente, se añadieron a la solución, previamente esterilizada con filtros de acetato de celulosa filtros (0,2 µm), 160 µl de persulfato amónico al 10% (Sigma, Sigma-Aldrich) y 85 µl de TEMED (Fluka, Sigma-Aldrich) para la polimerización del gel. Las muestras se mezclaron con el tampón de carga (Triton-X 100 0,1%, azul de bromofenol 0,01% (p/v), xileno cianol 0,01% y EDTA 2mM disueltos en buffer TAE). Las electroforesis se realizaron a 130 V durante 18 horas en el sistema TGGE Maxi (Biometra, Alemania). Conforme a los resultados obtenidos en los geles perpendiculares de TGGE (en donde el gradiente de temperatura es perpendicular a la migración electroforética) realizados previamente, el gradiente de temperatura empleado para separar las múltiples muestras en los geles paralelos de TGGE (en donde el gradiente de temperatura es paralelo a la migración electroforética) se estableció en 40 °C a 51 °C.

La visualización de las bandas se llevó a cabo mediante la tinción de los geles de poliacrilamida con nitrato de plata. Para ello, se fijaron las muestras con una solución de ácido acético glacial 0,5% (v/v) y de etanol 10% (v/v) durante 3 min. Seguidamente, se

tiñó el gel de poliacrilamida con una solución de nitrato de plata al 0,2% (p/v) durante aproximadamente media hora. A continuación se realizaron dos lavados muy cortos con agua destilada y se incubó el gel en solución de revelado hasta la visualización de las bandas. La composición de esta solución fue: hidróxido sódico al 1,5% (p/v), formaldehído al 0,18% (v/v) y tetrabromuro de sodio al 0,15% disueltos en agua destilada. Para parar el proceso de revelado, se incubó el gel en una solución de carbonato sódico al 0,75 % (p/v) (solución de parada) durante 10 min. Finalmente, los geles se mantuvieron en solución conservante (etanol al 25% y glicerol al 10%) durante aproximadamente 8 minutos. Los geles se fotografiaron con una cámara digital marca Nikon coolpix 995. Al ser la tinción de plata un método muy sensible, las soluciones empleadas en este proceso se prepararon en el momento. Además los agentes químicos empleados fueron de alta calidad, para evitar así posibles artefactos que pudieran interferir en el posterior análisis de las bandas.

V.4.3. Recuperación de los amplicones de los geles de poliacrilamida.

Para recuperar los amplicones de los geles de poliacrilamida fue necesario cambiar el método de tinción empleado hasta el momento. De este modo, los geles de poliacrilamida se incubaron en una solución de bromuro de etidio ($0.5 \mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$) en buffer TAE 1x durante 30 minutos. Después de lavar el gel con agua destilada durante media hora, se visualizaron las bandas bajo radiación ultravioleta en un transiluminador (Gel Doc 1000 BioRad). Las bandas de interés se seleccionaron y escindieron del gel de poliacrilamida con la ayuda de una lámina de bisturí quirúrgico esterilizada. A continuación, se incubaron las bandas en 100 μl de agua bidestilada estéril durante 48 horas a 4 °C. Después de centrifugar las muestras a 13000 rpm durante 1 minutos, se guardó el sobrenadante a -20 °C hasta su análisis. Se reamplificó 1 μl del ADN obtenido de cada banda de TGGE siguiendo las condiciones ya descritas (apartado V.4.1.), exceptuándose el hecho de que se empleó el cebador RivF sin la secuencia rica en GC en el extremo 5', necesaria sólo para separar los amplicones en la TGGE. Los productos amplificados se purificaron con Real Clean Spin Kit (Real, Durviz, s.l.u., España) siguiendo las recomendaciones del fabricante y finalmente se secuenciaron.

V.5. Determinación del gen ARNr 16S en cianobacterias mediante PCR.

Se determinó la secuencia del gen ARNr 16S en diferentes cultivos aislados mediante el aislamiento de ADN genómico, amplificación de dicha región por PCR y,

posterior secuenciación directa de los fragmentos amplificados. Sin embargo, para amplificar las muestras de poblaciones del medio natural se recurrió a la clonación de los productos amplificados en vectores de expresión, siguiendo el mismo procedimiento descrito para el análisis de la región *cpcBA*-IGS. El nombre, la secuencia y el sitio de unión de todos los cebadores empleados para amplificar el gen que codifica para el ARNr 16S de las cianobacterias analizadas en este estudio se muestran en la **tabla 15**.

V.5.1. Amplificación del gen que codifica para el ARNr 16S.

Para amplificar de forma parcial los genes de ARNr 16S de las cianobacterias estudiadas, se emplearon el siguiente conjunto de oligonucleótidos iniciadores: 16S106F y 16S781Ra o 16S781Rb (Nübel y col., 1997; ver **tabla 15**), sintetizados comercialmente por Roche (Roche Applied Science, Alemania).

La amplificación se llevó a cabo con un termociclador (Perkim Elmer Gene Amp PCR System 2400) según Nübel y col., 1997: 94 °C durante 5 minutos, 80°C durante 1 minuto, seguido de 35 ciclos de: 94 °C/ 1 min, 60 °C/ 1 min y 72 °C/ 1 min, y una extensión final a 72 °C, que se amplió a 30 minutos para prevenir la formación de artefactos que se pueden producir durante el proceso (Janse y col., 2004b). Se preparó una mezcla de reacción que contenía: 2,5 µl de Buffer de PCR 10X, MgCl₂ 1,5 mM, 50 µM de cada deosinucleótido trifosfato, 10 pmol de cada cebador, suero de albúmina bovina (BSA) 1 mg.ml⁻¹, 5 µl TaqMasterTM PCR Enhancer 5x (Eppendorf, Alemania), 0,75 U Ultratools DNA polimerasa (Biotools, España), agua mili-Q estéril y 10 ng de ADN molde para un volumen final de reacción de 25 µl.

La secuencia completa del gen ARNr 16S, se determinó en al menos un representante de cada genotipo encontrado en los análisis de muestras de Rivulariaceas de ríos calizos con dominancia de *Rivularia*, utilizando para ello los siguientes conjuntos de oligonucleótidos iniciadores (**tabla 15**): 16S27F (Wilmotte y col., 1993) y 16S781Ra (Nübel y col., 1997); 16S684F diseñado en este estudio a partir del alineamiento múltiple de las secuencias obtenidas de los cultivos aislados mediante el programa Clustal W 1.4 (Thompson y col., 1994) y 16S1494R (Wilmotte y col., 2002), en las mismas condiciones descritas anteriormente, o bien los cebadores 16S27F (Wilmotte y col., 1993) y 16S781Ra (Nübel y col., 1997); 16S697F diseñado también durante este estudio y 23S30R (Léperre y col., 2000). Los fragmentos amplificados se resolvieron por electroforesis en geles horizontales de agarosa al 1.5%, conforme se describe en el apartado V.1., utilizando como patrón un marcador de peso molecular 1

Kb Gene Ruler de MBL Biotools. Finalmente, los productos amplificados se purificaron con Real Clean Spin Kit (Real, Durviz, s.l.u., España) siguiendo las recomendaciones del fabricante para ser secuenciados.

Tabla 15. Oligonucleótidos iniciadores empleados en este estudio para amplificar el gen ARNr 16S.

| Oligonucleótido ^a | Secuencia (5' → 3') | Sitio de Unión ^b | Referencia |
|------------------------------|----------------------------------|-----------------------------|---------------------------|
| 16S106F | CGGACGGGTGAGTAACGCGTGA | 106-127 | Nübel y col., 1997 |
| 16S359F | GGGAATYTTCCGCAATGGG ^c | 359-378 | Nübel y col., 1997 |
| 16S781R(a) | GACTACTGGGGTATCTAATCCATT | 781-805 | Nübel y col., 1997 |
| 16S781R(b) | GACTACAGGGGTATCTAATCCCTTT | 781-805 | Nübel y col., 1997 |
| 16S27F | AGAGTTTGATCCTGGCTCAG | 7 - 27 | Wilmotte y col., 1993 |
| 16S1494R | GTACGGCTACCTGTTACGAC | 1494-1514 | Wilmotte y col., 2002 |
| 16S684F | GTGTAGCGGTGAAATGCGTAGA | 684-705 | Diseñados en este trabajo |
| 16S697F | ATGCGTAGAGATTGGGAAG | 697-715 | Diseñados en este trabajo |
| 23S30R | CTTCGCCTCTGTGTGCCTAGGT | 30-52 | Lépere y col., 2000 |

^a R (3' → 5') y F (5' → 3'), designaciones empleadas para expresar la orientación de los cebadores en relación al ARNr.

^b posición con respecto a la secuencia nucleotídica del ADNr 16S o 23S de *E. coli*.

^c Y indica una degeneración nucleotídica C/T.

V.5.2. Clonación de los fragmentos amplificados del gen ARNr 16S.

Los fragmentos amplificados de las muestras naturales se ligaron al vector de expresión pGEM^R-T del sistema pGEM^R-T Easy Vector Systems (3015 bp) de Promega, siguiendo las recomendaciones del fabricante. Este vector posee el gen que confiere resistencia al antibiótico ampicilina, un sitio con múltiples sitios de restricción y un fragmento del operon *LacZ* (características descritas en el apartado V.2.2.). Posteriormente, se introdujo el vector con el inserto en bacterias competentes de *E. coli* DH5 α mediante choque térmico según se describe en el apartado V.2.2. Para comprobar la presencia del inserto de interés en las colonias transformadas, se empleó la técnica de PCR. De este modo, una pequeña cantidad de células de cada clon transformado se añadió a 25 μ l de mezcla de reacción (conforme se describe en el apartado V.5.1.), conteniendo el siguiente conjunto de oligonucleótidos 16S106F y 16S781Ra/Rb para amplificar el inserto (**tabla 15**). El tamaño de los fragmentos amplificados fue verificado en un gel de agarosa al 1,5 % según se describe en el apartado V.1.

Finalmente, se purificaron los productos amplificados con Real Clean Spin Kit (Real, Durviz, s.l.u., España) siguiendo las recomendaciones del fabricante y se secuenciaron.

V.6. Estudios de biodiversidad de cianobacterias mediante el análisis del ADNr 16S empleando TGGE.

V.6.1. Amplificación del gen que codifica para el ARNr 16S.

La amplificación del gen ARNr 16S de cianobacterias fue realizada de manera similar a la descrita en el apartado V.5.1, empleando el siguiente conjunto de oligonucleótidos iniciadores: CYA359 (Nübel y col., 1997) con una secuencia de 23 nucleótidos rica en GC (CCCGCCGCGCCCCGCGCCCGCC) en su extremo 5' necesaria para separar los fragmentos de amplificados por TGGE y 16S781Ra o 16S781Rb, sintetizados comercialmente (Roche Applied Science, España) (**tabla 15**). La cuantificación de los fragmentos amplificados se realizó en geles de agarosa al 1.5%, según se describe en el apartado V.1., utilizando como patrón un marcador de peso molecular 1 Kb Gene Ruler de MBL Biotools.

V.6.2. Utilización de TGGE en la separación de los amplicones del gen ARNr 16S.

Los distintos fragmentos obtenidos de la amplificación por PCR del gen ARNr 16S, se separaron por electroforesis en geles desnaturalizantes por gradiente térmico, según las especificidades del fabricante. Se preparó un gel de poliacrilamida al 5% según se describe en el apartado V.4.2. Las electroforesis se realizaron a 130 V durante 18 horas, en el sistema TGGE Maxi (Biometra, Alemania). Conforme a los resultados obtenidos en los geles perpendiculares de TGGE realizados previamente, el gradiente de temperatura empleado para separar las múltiples muestras en los geles paralelos de TGGE fue establecido en 38.5 °C a 49.5 °C.

La visualización de las bandas se llevó a cabo mediante la tinción de los geles de poliacrilamida con nitrato de plata siguiendo el método descrito por Sanguinetti, y col. (1994). Para ello las muestras se fijaron con una solución de ácido acético glacial 0,5% (v/v) y etanol 10% (v/v) durante 3 minutos antes de teñir los geles de poliacrilamida con una solución de nitrato de plata al 0,2% (p/v) durante aproximadamente media hora. A continuación, se lavaron los geles dos veces con agua destilada (el primer lavado de 20 segundos y el segundo de 2 minutos). Posteriormente, se incubó el gel en solución de revelado (hidróxido sódico 3% y formaldehído 0,5%) hasta la visualización de las

bandas (aproximadamente 5 minutos). Después de la tinción, los geles se incubaron en solución fijadora durante 5 minutos y lavados con agua mili-Q durante 10 minutos con el fin de mantener un registro permanente del experimento. Finalmente, los geles se colocaron en una placa de cristal cubiertos con papel transparente y se dejaron secar al menos durante 24 horas. Los geles se fotografiaron con una cámara digital marca Nikon coolpix 995.

V.6.3. Recuperación de los amplicones de los geles de poliacrilamida.

Las bandas de interés obtenidas mediante TGGE se seleccionaron y se escindieron del gel de poliacrilamida con la ayuda de una lámina de bisturí quirúrgico esterilizada. Estas bandas se incubaron en 100 µl de una solución de Tris-HCl 10 mM, KCl 50 mM, MgCl₂ 1,5 mM y Triton® X-100 0,1% pH 9 a 95°C durante 20 minutos. Después de centrifugar las muestras durante 1 minutos a 13000 rpm, se reamplificó 1 µl del ADN eluído de cada banda de TGGE siguiendo las condiciones ya descritas en el apartado 6.5.1, utilizando los oligonucleótidos CYA359F sin la secuencia rica en GC en el extremo 5', necesario sólo para separar los fragmentos amplificados en TGGE y 16S781Ra o 16S781Rb (**tabla 15**). Los fragmentos amplificados por PCR se resolvieron por electroforesis en geles horizontales de agarosa al 1,5%, conforme se describe en el apartado V.1., utilizando como patrón un marcador de peso molecular 1 Kb Gene Ruler de MBL Biotools. Finalmente, se purificaron los productos amplificados con Real Clean Spin Kit (Real, Durviz, s.l.u., España) siguiendo las recomendaciones del fabricante y se secuenciaron.

V. 7. Procesamiento y análisis filogenético de las secuencias obtenidas.

Las secuencias generadas se procesaron para eliminar errores producidos durante la secuenciación y las posibles contaminaciones, como por ejemplo segmentos de secuencia del vector empleado para clonar algunas de las secuencias obtenidas. El método empleado se describe en el apartado V.4.2. Posteriormente, se compararon las secuencias con las depositadas en la base de datos del GenBank del National Center for Biotechnology Information (NCBI), utilizando la herramienta de Basic Local Alignment and Search Tool (BLAST) (Altschul y col., 1990). Mediante este programa podemos visualizar la similitud que presenta nuestra secuencia con otras especies de cianobacterias.

Durante la amplificación por PCR y secuenciación se introducen inevitablemente artefactos. Los errores comunes que se producen son la formación de quimeras, una pobre secuenciación o un pobre ensamblaje de las secuencias. Las anomalías no detectadas pueden conllevar a la formación de árboles filogenéticos, que nos proporcionan una falsa impresión de la diversidad de las especies y una confusa clasificación e identificación de las mismas. Para identificar de forma simultánea las secuencias anómalas del gen ARNr 16S, se empleó el programa Mallard versión 1.02 (Ashelford, 2006) (disponible en www.cardiff.ac.uk/biosi/research/biosoft).

Posteriormente, se procedió al alineamiento múltiple de las secuencias obtenidas, con otras seleccionadas de las bases de datos mediante el programa Clustal W 1.4 (Thompson y col., 1994). El ajuste de los extremos de las secuencias de ADN, se realizó con la ayuda del programa GenDoc versión 2.6.002 (Nicholas y col. 1997).

Los árboles filogenéticos se generaron por el método de neighbour-joining (NJ) (Saitou y Nei, 1987) usando la matriz de Tajima y Nei (1984) para calcular la distancia evolutiva. Las similitudes de las secuencias se calcularon sin tomar en cuenta las mutaciones debidas a deleciones o inserciones ni las bases ambiguas. Para comprobar la validez de este análisis, se construyeron árboles filogenéticos adicionales por maximum-parsimony (MP) y maximum-likelihood (ML). Todos los árboles filogenéticos se obtuvieron con el programa MEGA versión 4 (Tamura y col, 2007). El cálculo de la significación estadística de las similitudes entre las secuencias se obtuvo mediante el test de bootstrap de Felsenstein (1985) para 1000 replicas. Los árboles filogenéticos constan de las secuencias determinadas en este estudio junto con secuencias de especies relacionadas, que han sido seleccionadas de las bases de datos utilizando el programa BLAST.

VI. TÉCNICAS EMPLEADAS PARA LA EXPERIMENTACIÓN FISIOLÓGICA *in situ*.

6.1. Río seleccionado para los ensayos *in situ*.

De los posibles ríos que reunían las condiciones favorables que permitían el crecimiento de las cianobacterias objeto de estudio, se seleccionó el río Muga situado al noreste de España, en la provincia de Girona (Cataluña) y, como lugar para los ensayos, se eligió uno situado en la parte alta del río al tratarse de una zona con menos

perturbaciones y sin vertidos contaminantes, al no existir ningún núcleo urbano, agrícola, ganaderos, etc., en sus alrededores, presentado de este modo una gran calidad natural del agua.

Desde mayo del 2005 hasta julio del 2006 se realizaron muestreos periódicos coincidiendo con las diferentes estaciones climatológicas, durante los cuales se llevaron a cabo los experimentos fisiológicos para determinar la actividad fosfatasa de distintas poblaciones naturales de cianobacterias. Sólo durante el muestreo realizado en Abril del 2006 se realizaron los experimentos de actividad nitrogenasa *in situ*.

En cada campaña, se midieron también las variables físico-químicas del agua, a la vez que se recogieron muestras naturales de las cianobacterias dominantes del punto de muestreo para su posterior análisis en el laboratorio.

VI.1.1. Determinaciones físico-químicas del agua.

Directamente en el cauce del río se realizaron las siguientes determinaciones:

1 y 2. **Temperatura del agua y el O₂ disuelto:** Las medidas se realizaron con un electrodo de oxígeno portátil WTW (Wissenschaftliche Technische Werkstetten, Weilheim, Germany), provisto de ajuste automático de presión y de temperatura, y dotado con un electrodo OXI 196.

3. **Conductividad:** Medida con un conductivímetro portátil CRISON CATM-523 (Barcelona, España).

4. **Anchura y profundidad:** Medida puntual de la anchura del cauce y de la profundidad que lleva el flujo de agua en el punto concreto de la recogida de muestras.

5. **Caudal medio del río:** Medida con un caudalímetro o fluómetro portátil marca Global Water Flor Probe modelo FP 101-201 (Gold River, USA) y calculado a partir de la medición del caudal parcial de transectos de 1m de longitud.

Además, se midió en cada estación, la temperatura ambiente con un termómetro de mercurio y, la luz con un medidor de luz cuanto-foto-radiómetro (modelo HD 9021 y sonda radiométrica LP9021PAR).

6. **pH:** Se determinó directamente en la corriente de agua utilizando un pH-metro portátil WTW modelo pH-96, con un electrodo de vidrio con sonda de ajuste de temperatura modelo Sentix-96.

Las determinaciones químicas de alcalinidad, calcio y dureza total, se realizaron “*in situ*” utilizando un laboratorio portátil DREL-2000 de HACH, siguiendo los análisis del *Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater* (APHA, 1995).

7. **Alcalinidad:** Se midió con indicador de fenolftaleína y valorando con ácido sulfúrico 1.6 N siendo el indicador el verde de bromocresol y rojo de metilo.

8. **Calcio:** Para su análisis, se utilizó el indicador de la cápsula Calver 2 Calcium y valoró con EDTA 0,8 M en medio básico (añadiendo KOH 8 N).

9. **Dureza total:** Para su determinación se utilizó como indicador la cápsula Manver 2 y se valoró con EDTA 0,8 M en medio básico (añadiendo solución tampón).

10. **Cationes y aniones:** Algunos cationes (Na^+ , K^+ , Li^+ , Mg^{2+} , Ca^{2+} , NH_4^+) y aniones (F^- , Cl^- , NO_2^- , Br^- , NO_3^- , SO_4^{2-}) se midieron mediante Cromatografía iónica en un cromatógrafo iónico modelo Diones D-600 en el Servicio Interdepartamental de Investigación (S.I.D.I.) de la Universidad Autónoma de Madrid (los límites de detección son: 0.4942 ppb para el Li^+ , 1.5671 ppb para el Na^+ , 3.0794 ppb para el NH_4^+ , 2.3678 ppb para el K^+ , 0.8461 ppb para el Mg^{+2} y 1.2827 ppb para el Ca^{+2} en el caso de los distintos cationes analizados y 29 ppb para el F^- , 38 ppb para el Cl^- , 50 ppb para el NO_2^- , 72 ppb para el Br^- , 10 ppb para el NO_3^- y 53 ppb SO_4^{-2} para el caso de los aniones).

11. **Fósforo reactivo soluble (PRS) y Fósforo filtrado total (PFT):** El fósforo reactivo soluble se midió con una determinación de ortofosfato, empleando el método del ácido ascórbico según *Standard Methods* (APHA, 1995). La absorbancia se midió a 880 nm en un espectrofotómetro modelo Hitachi U-100 con cubetas de cristal de 10 cm de longitud, para conseguir una mayor sensibilidad del método. Para medir el fósforo disuelto total fue necesario una digestión ácida previa según el método de digestión con persulfato potásico (descrito en *Standard Methods*, APHA 1995). La hidrólisis ácida del fosfato orgánico a ortofosfato se realizó en un autoclave automático HA240M/300M Sulzer España, S.A. a 1.5 Kg.cm^{-2} de presión, durante 30 min a 121°C . La diferencia entre los valores obtenidos para el PRS y el PFT da como resultado la cantidad de fósforo orgánico filtrado (POF) presente en la muestra.

La concentración de fósforo se determinó a partir de una recta patrón obtenida a partir de diferentes soluciones estándar de fósforo. Se realizaron 2 rectas de calibrado con distintas concentraciones de fósforo para calcular la cantidad de PRS y PFT. Las distintas soluciones estándar (0, 5, 10, 20, 30, 40 y $100 \mu\text{g.l}^{-1}$ para las medidas de PFT y 0, 1, 2, 3, 4, 5, 10, 15, 20, 30, 40 $\mu\text{g.l}^{-1}$ para las medidas de PRS) se prepararon a partir

de una solución madre de fósforo 6 mM (preparado a partir de KH_2PO_4 disuelto en agua mili-Q). A continuación, se añadieron 5 ml de mezcla colorimétrica a 25 ml de cada solución estándar de fósforo y, la absorbancia se midió a 880 nm. La composición química de la mezcla colorimétrica fue: H_2SO_4 6,86 %, K (SbO) $\text{C}_4\text{H}_4\text{O}_6 \cdot \frac{1}{2}\text{H}_2\text{O}$ 0,41 mM, ácido ascórbico 0,1 M y $(\text{NH}_4^+)_6 \text{Mo}_7\text{O}_{24} \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 5.25 mM. El procedimiento seguido fue similar al empleado para el análisis de las muestras de agua recogidas. Las ecuaciones de las rectas patrón obtenidas fueron $\text{D.O.}_{880 \text{ nm}} = 0.0056 \mu\text{g.l}^{-1} \text{ de P} + 0.0083$ con un $R^2 = 0.9953$ para el PFT y $\text{D.O.}_{880 \text{ nm}} = 0.006 \mu\text{g.l}^{-1} \text{ de P} + 0.0013$ con un $R^2 = 0.9993$ para el PRS, estando el límite de detección en $1 \mu\text{g.l}^{-1}$ de fósforo en ambos casos.

VI.1.2. Recogida de muestras.

En las diferentes campañas de muestreo realizadas se han recogido muestras de agua a diferentes horas del día durante los días de muestreo realizados. El material empleado (portafiltros, jeringas, botes de polietileno, etc.) se lavó previamente en el laboratorio con HCl al 10% y aclarado 4 veces con agua destilada, con el fin de eliminar cualquier resto de fósforo.

Las muestras de agua se recogieron en botes de polietileno de boca ancha y con cierre hermético. Seguidamente, se filtraron a través de filtros de microfibras de vidrio GF/F Whatman (Whatman International Maidstone, UK) de 25 mm de diámetro en botes de plástico de boca estrecha. Dependiendo del tipo de análisis al que iba destinada, el agua siguió un tratamiento diferente. Las muestras destinadas al análisis químico de cationes y aniones, que se llevó a cabo en el Servicio de Cromatografía Iónica del S.I.D.I. de la Universidad Autónoma de Madrid, se conservaron en nevera a 4 °C hasta el momento de la medida. Por otra parte, las muestras destinadas para el análisis del contenido de PRS y PFT mediante el método del ácido ascórbico (APHA, 1995), fueron conservadas congeladas en nitrógeno líquido durante su transporte al laboratorio y posteriormente mantenidas a -80 °C hasta el momento de su análisis.

Al mismo tiempo se recogieron muestras biológicas de las cianobacterias dominantes en el punto de muestreo, para los ensayos de actividad fosfatasa y nitrogenasa realizados “*in situ*”. Una parte de estas muestras se llevaron al laboratorio en botes de polietileno y, se mantuvieron en nevera a 4 °C para la realización de experimentos de actividad fosfatasa, así como para los estudios morfológicos.

Finalmente, otra parte fue guardada en tubos de criocongelación en nitrógeno líquido para su posterior caracterización genética.

VI.2. Ensayos de actividad fosfatasa.

Se caracterizó la actividad fosfatasa en las cianobacterias dominantes del río Muga en localidad seleccionada, utilizando para ello diferentes sustratos análogos al fosfato, como *para*-nitrofenil fosfato (*p*NPP) y bis *para*-nitrofenil fosfato (bis-*p*NPP). El método empleado para medir la actividad fosfatasa es una adaptación del descrito por Whitton y col. (1999) para musgos y algas verdes en ríos, basado a su vez en la metodología empleada por Grainger y col. (1989). El estudio de la actividad fosfatasa de las diferentes muestras, se llevó a cabo mediante una caracterización de distintos parámetros para optimizar y estandarizar la metodología que va a ser empleada en los ensayos, y comparar después los resultados obtenidos para cada una de las especies estudiadas. En este sentido, se han caracterizado parámetros ambientales como la temperatura y la luz/oscuridad y, los parámetros cinéticos de las enzimas, así como el tiempo necesario de incubación. Además se llevaron a cabo ensayos para determinar la actividad fosfatasa extracelular. Así mismo, se llevaron a cabo ensayos de actividad fosfatasa en campo en las distintas campañas realizadas.

VI.2.1 Preparación de las muestras biológicas y del material.

El material biológico recogido se lavó con medio de ensayo para eliminar los restos de tierra que presentaban y se mantuvieron en botes de polietileno de boca ancha con agua del río, hasta el momento de realizar los ensayos de actividad fosfatasa en campo. Durante el transporte al laboratorio, las muestras se mantuvieron en oscuridad a 4 °C. El material empleado en estos ensayos (tubos de ensayo, matraces aforados, vasos de precipitados, etc.) se lavó previamente en el laboratorio con HCl al 10% y aclarado 4 veces con agua destilada, con el fin de eliminar cualquier resto de fósforo.

VI.2.2. Preparación de los reactivos químicos.

Sustratos.

La actividad fosfatasa se determinó empleando *para*-nitrofenil fosfato (*p*NPP) y bis-*para*-nitrofenil fosfato (bis-*p*NPP) como sustratos análogos para las enzimas fosfomonoesterasa (PMEase) y fosfodiesterasa (PDEase), respectivamente. Las concentraciones usadas en los ensayos de actividad fosfatasa se detallan en la **tabla 16**.

Tabla 16. Concentraciones de sustrato empleada en los ensayos de actividad enzimática.

| Ensayos | Concentración final en el ensayo |
|------------------------------------|----------------------------------|
| Luz/Oscuridad | 50 μM |
| Temperatura | 50 μM |
| Tiempo de incubación | 50 μM |
| Actividad fosfatasa en laboratorio | 50 μM |
| Actividad fosfatasa extracelular | 50 μM |
| Actividad fosfatasa 'in situ' | 50 μM |
| | 30 μM |
| | 10 μM |
| Cinética enzimática | 5 μM^2 |
| | 10 μM^* |
| | 20 μM^2 |
| | 30 μM^* |
| | 40 μM^2 |
| | 50 μM^* |
| | 100 μM^* |
| | 200 μM^* |
| | 250 μM^2 |
| | 300 μM^1 |
| | 400 μM^1 |

¹ Concentraciones utilizadas sólo para el sustrato *p*NPP en los ensayos de cinética enzimática

² Concentraciones utilizadas sólo para el sustrato bis-*p*NPP en los ensayos de cinética enzimática

* Concentraciones utilizadas para ambos sustratos

Solución de parada.

La solución de parada se utiliza para detener la actividad enzimática al elevar el pH de la mezcla de ensayo por encima de 11 y sin superar el valor de 12, pH a partir del cual se puede producir la hidrólisis del sustrato bis-*p*NPP. La composición química de la solución de parada se describe a continuación: NaOH 0,55 M, EDTA 27,5 mM y K_2HPO_4 0,55 M (Christmas y Whitton 1998a).

VI.2.3. Medio de ensayo.

El medio de ensayo empleado es una modificación del medio Chu no. 10 (Chu, 1942), caracterizado la ausencia de cualquier fuente de nitrógeno y de fósforo. El medio de ensayo se ajustó a pH 8.5 con tampón BTP 20 mM y su composición química aparece detallada en la **tabla 17**. El medio de cultivo se esterilizó en un autoclave

automático HA240M/300M Sulzer España, S.A. a 1.5 Kg/cm² de presión, durante 20 minutos a 121°C.

Tabla 17. Composición del medio de ensayo empleado en los experimentos de actividad fosfatasa (Gibson y Whitton, 1987).

| Componentes | Concentración (µM) |
|--|--------------------|
| KCl | 57.49 |
| MgSO ₄ .7H ₂ O | 101.50 |
| CaCl ₂ .6H ₂ O | 250.10 |
| NaHCO ₃ | 188.69 |
| FeNa-EDTA: | |
| FeCl ₃ .6 H ₂ O | 8.97 |
| Na ₂ -EDTA | 11.06 |
| Microelementos: | |
| H ₃ BO ₃ | 11.56 |
| MnCl ₂ .4H ₂ O | 0.229 |
| ZnSO ₄ .7 H ₂ O | 0.193 |
| Na ₂ MoO ₄ .2 H ₂ O | 0.023 |
| CuSO ₄ .5H ₂ O | 0.079 |
| CoSO ₄ .7 H ₂ O | 0.037 |

VI.2.4. Determinación de la actividad fosfatasa.

La actividad fosfatasa se determinó a partir de la recta de calibrado de D.O. a 405 nm frente al producto de la reacción enzimática, *para*-nitrofenol (*p*NP). Para ello se prepararon distintas soluciones estándar (0,25, 0,5, 1, 2,5, 5, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70 y 80 µM), de las que se tomaron 12,5 ml y se añadieron 1,25 ml de solución de parada contenida en un tubo de ensayo. Se midió la absorbancia a 405 nm usando un espectrofotómetro modelo Hitachi U-2000. La ecuación de la recta patrón obtenida fue $D.O._{405\text{ nm}} = 0,0164 \mu\text{M de } p\text{NP} + 9 \cdot 10^{-5}$ con un $R^2 = 0.9994$, estando el límite de detección en 0,25 µM de *p*NP.

VI.2.5. Ensayos de actividad fosfatasa.

Para determinar la actividad fosfatasa, las muestras se colocaron en matraces Erlenmeyer de 50 ml o en botellas para el cultivo de tejidos de 25 cm² con 14.6 ml de medio de ensayo con un pH de 8.5, similar al existente en el medio natural (Chróst y

Krambeck, 1986). Todos los ensayos enzimáticos constaron de cuatro replicas para cada muestra con medio de ensayo y sustrato, un control al que no se añadía sustrato y un blanco con sólo medio de ensayo y sustrato.

El ensayo se inició al añadir 0,5 ml de sustrato (*p*NPP o bis-*p*NPP) hasta conseguir la concentración final adecuada en cada caso (**tabla 16**). El tiempo de incubación fue de 30 minutos. Para terminar el ensayo, se añadieron 1,64 ml de solución de parada a la mezcla de ensayo, de este modo el pH de la mezcla de reacción se incrementa causando la lisis de la enzima y facilitando el desarrollo del color de los productos. Esta solución se filtró a través de filtros de microfibra de vidrio GF/F Whatman de 25 mm de diámetro, antes de medir la absorbancia en el espectrofotómetro a 405 nm.

La actividad fosfatasa se determinó a partir de la recta de la calibración como se describió anteriormente. Se restó la absorbancia de los blancos al de las muestras para corregir la hidrólisis química de los sustratos (actividad abiótica), así como la absorbancia de los controles para eliminar la actividad fosfatasa basal. Las muestras biológicas se retiraron de la mezcla de ensayo antes de añadir la solución de parada y, se congelaron para determinar posteriormente su biomasa a partir de la extracción de clorofila a, según se describe más adelante. La actividad enzimática se expresó como $\mu\text{mol pNP liberados mg}^{-1} \text{ clorofila a h}^{-1}$.

En los ensayos realizados en el laboratorio, las cianobacterias se incubaron en matraces Erlenmeyer de 50 ml en una cámara de incubación IBERCEX a 20°C durante 30 minutos. Durante todo el experimento, las muestras se mantuvieron en agitación continua (agitador orbital CH-4103 Bottminger) para conseguir la difusión uniforme del sustrato. La intensidad de luz fue de $60 \mu\text{mol.m}^{-2}\text{s}^{-1}$. Finalizado el ensayo, se lavaron las muestras con medio de ensayo para eliminar el sustrato que pudiera quedar sin transformar y, se incubaron con medio de ensayo nuevo durante 30 minutos en las mismas condiciones, para estimar la cantidad de hidrolizado que quedaba en la muestras al finalizar el ensayo.

En los experimentos de campo, se colocaron las muestras en botellas de cultivo de tejidos de 25 cm², con 14,5 ml de medio de ensayo a pH 8,5. El ensayo se inició al añadir 0,5 ml de sustrato para alcanzar la concentración de sustrato 50, 30 o 10 μM . Las botellas se colocaron en planchas de metacrilato sumergidas en el río cerca de la orilla como se muestra en la **figura 22**, durante los 30 minutos que dura la incubación, asemejándose a las condiciones naturales de temperatura e iluminación. Antes de

terminar el ensayo, las muestras biológicas se transfirieron a tubos de criocongelación y, se conservaron en nitrógeno líquido para ser transportadas al laboratorio, donde se procedió a la determinación de la biomasa mediante la cuantificación de clorofila a presente en la muestra.



Figura 22. Ensayo de actividad fosfatasa realizado en campo en Noviembre de 2005.

VI.2.6. Determinación del contenido en clorofilas a.

Las muestras de cianobacterias empleadas en los diferentes experimentos se homogeneizaron en tubos eppendorf y, el sedimento se resuspendió en 1 ml de metanol al 100%. Se incubó en un baño de ultrasonidos durante 5 minutos antes de guardar las muestras a 4°C y, en oscuridad para asegurarnos la completa extracción de clorofila. Transcurridas 24 h, las muestras se centrifugaron a 5000 rpm durante 5 min para sedimentar los restos celulares. Se repitió el proceso varias veces (2-5 veces) dependiendo de la muestra. Finalmente, se midió la densidad óptica del sobrenadante en un espectrofotómetro HITACHI U-2000 a 665 nm.

El cálculo de la concentración de clorofila a se realizó aplicando el coeficiente de extinción molar $E_{\text{cm}}^{\text{mg/ml}} = 76.07$ según Marker (1972).

VI.2.7. Ensayos de actividad fosfatasa realizados en el laboratorio.

Test de temperatura.

El comportamiento de la actividad enzimática con respecto a la temperatura de incubación, se estudió en el rango de 10 °C hasta 35 °C, empleando las muestras recogidas en el muestreo realizado en mayo del 2005. En todos los ensayos enzimáticos

fue necesario un periodo de preincubación previo de las muestras biológicas y del medio de ensayo, a las condiciones a las cuales el experimento iba a ser realizado. La concentración de sustrato utilizada en todos los casos fue de 50 μM . Durante el ensayo, los matraces se mantuvieron en un incubador con agitación continua durante 30 minutos, excepto en el experimento realizado a 10°C en el que el tiempo de incubación fue de 1 hora para asegurarnos de que los niveles de producto se encontraban por encima del límite de detección.

Ensayos de actividad fosfatasa a lo largo del tiempo.

Se recogieron 2 ml de mezcla de ensayo en los siguientes tiempos: 10, 20, 30, 40, 50 y 60 minutos en las tres replicas de cada muestra. De forma paralela, se realizó otro experimento en el que se incubaron dos replicas de cada muestra a diferentes tiempos hasta llegar a 1 hora. Las condiciones de incubación fueron las mismas a las descritas anteriormente. En el ensayo también se incluyeron un control (sin sustrato) y un blanco (solo con sustrato y medio de ensayo).

Ensayos de luz vs oscuridad.

Los matraces se mantuvieron a 20°C en un incubador bajo condiciones de luz de 60 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ y agitación continua durante 30 minutos. En paralelo, se envolvieron cuatro replicas en papel de aluminio, para simular las condiciones de oscuridad. También se realizaron experimentos para determinar si la actividad enzimática se veía afectada a 1 hora bajo las mismas condiciones.

Cinética enzimática.

Se realizaron ensayos para estudiar el efecto de la concentración del sustrato sobre la velocidad de la reacción catalizada enzimáticamente. La cinética de las enzimas fosfomonoesterasa y fosfodiesterasa se caracterizó en cada una de las muestras usando el rango de concentraciones de 10-250 μM para el *p*NPP y de 10-400 μM para bis-*p*NPP. Todos los ensayos enzimáticos se realizaron en medio de ensayo a pH 8.5 bajo condiciones de luz y agitación durante 30 min a 20°C. En el experimento, también se incluyeron blancos para cada concentración del sustrato utilizado y un control.

Los parámetros cinéticos (V_{max} and K_{M}) se calcularon usando las tres transformaciones lineales de la ecuación de Michaelis-Menten posibles: la ecuación de Lineweaver-Burk o también denominada representación doble-recíproca ($1/V$ frente a

$1/S$, donde la intersección sobre el eje y es $1/V_{\max}$ y la pendiente es K_m/V_{\max}), la representación de Eadie-Hofstee (V frente V/S , donde la intersección sobre el eje y es V_{\max} y la pendiente es $-K_m$) y la representación de Hanes-Woolf (S/V frente S , donde la intersección del eje y es K_m/V_{\max} y la pendiente es $1/V_{\max}$).

Ensayos de actividad fosfatasa extracelular.

Se incubaron las muestras en medio de ensayo durante 2 horas bajo las mismas condiciones que se han descrito para los ensayos de cinética enzimática. Finalizado este tiempo, el medio de ensayo se filtró a través de filtros de microfibras de vidrio GF/F Whatman de 25 mm de diámetro para eliminar los filamentos que pudiera haber. Seguidamente, se añadieron 0,5 ml de solución de sustrato 1,5 mM al medio de ensayo. Tras una hora de incubación se añadió solución de parada para terminar el ensayo y medir la absorbancia a 405nm. La biomasa se determinó mediante la cuantificación de la concentración de clorofila presente en la muestra.

VI.3. Determinación de la fijación de N_2 .

Se determinó la actividad nitrogenásica en las cianobacterias dominantes del río Muga en el punto de muestreo seleccionado en Abril de 2006, empleando para ello el método de reducción del acetileno (C_2H_2) a etileno (C_2H_4) descrito por Stewart y col. (1968).

VI.3.1. Método experimental.

El material biológico empleado en estos experimentos se lavó con medio de ensayo para eliminar los restos de tierra que pudieran presentar y, se mantuvieron en botes de polietileno de boca ancha con agua del río hasta el momento de realizar los ensayos de actividad nitrogenasa en campo.

Para determinar la actividad nitrogenásica, las muestras se introdujeron en botellas de 25 cm² empleadas para el cultivo de tejidos, con 15 ml de agua del río. Las botellas, cerradas herméticamente con tapones de goma, se colocaron en planchas de metacrilato sumergidas en el río cerca de la orilla como se muestra en la **figura 23**, durante los 30 minutos que dura la preincubación. Todos los ensayos constaron de tres replicas para cada muestra y un control, que contenía muestra biológica y al que no se añadió acetileno.

Finalizado el periodo de preincubación, se reemplazó el 10 % de la atmósfera interna de las botellas por acetileno, preparado a partir de carburo cálcico. Seguidamente, las muestras se incubaron durante 6 o 13 horas dependiendo del experimento, en las mismas condiciones descritas para la preincubación. Se tomaron 3 muestras de 0,5 ml de la atmósfera interna de cada vial al finalizar el período de incubación, con un sistema de dobles agujas y tubos de vacío Vacutainer® de 10 ml, para su posterior análisis por cromatografía de gases en el laboratorio. Adicionalmente, se recogió una muestra simple por cada botella a tiempo 0. Los tubos de Vacutainer® se mantuvieron a temperatura ambiente hasta su análisis en un cromatógrafo de gases modelo Shimadzu 6C-8^a en el laboratorio. Las muestras biológicas se transfirieron a tubos de criocongelación y se conservaron en nitrógeno líquido durante su transporte al laboratorio, donde se procedió a la determinación de la biomasa mediante la cuantificación de clorofila a presente en la muestra (ver apartado VI.1.6).



Figura 23. Ensayo de actividad nitrogenasa realizado en campo el 24 de abril de 2006.

VI.3.2. Análisis cromatográfico de las muestras.

La cantidad de etileno producido se determinó por cromatografía de gases mediante un cromatógrafo modelo Shimadzu GC-8A con detector de ionización de llama de hidrógeno con las siguientes condiciones:

| | |
|--|------------------------|
| T°C inyector/detector | 150°C |
| T°C columna | 50°C |
| Presión gas portador (N ₂) | 1,2 kg/cm ² |
| Columna Porapak N 80/100 | int 1m (1/8)'' 55 |

Los datos se registraron usando un integrador SP 4290. Los cálculos se hicieron en base a la siguiente fórmula:

$$\frac{\text{nmol C}_2\text{H}_4}{\text{h}} = \frac{\text{M} * 10 \text{ nmol (C}_2\text{H}_4 \text{ patrón)} * 15 \text{ ml (V final del experimento)}}{\text{P} * 0.5 \text{ ml} * \text{h}}$$

Donde:

0,5 ml volumen de la muestra inyectada

M = altura del pico de etileno en la muestra.

P = altura del pico de etileno patrón.

h = tiempo de incubación en horas.

10 nmol = concentración del etileno patrón.

Las tasas de fijación del N₂ se expresaron en nmol C₂H₄ liberados mg⁻¹ Chl a h⁻¹.

VI.3.3. Tipos de ensayos de fijación de N₂ realizados.

La actividad nitrogenasa así como el efecto de la luz ambiental tiene sobre ella, se estudió *in situ* en dos tapetes microbianos distintos donde *Schizothrix* era mayoritario. Tres de las replicas de cada muestra fueron envueltas en papel de aluminio para simular las condiciones de oscuridad. Se llevó a cabo dos experimentos diferentes: uno diurno con un tiempo de incubación de 6 horas y el otro experimento fue realizado para cubrir las horas del atardecer y amanecer, alcanzando las 13 horas de incubación.

Además, se estudió la actividad nitrogenasa en muestras biológicas pertenecientes a los géneros *Rivularia*, *Tolypothrix* y *Nostoc*, siguiendo la metodología descrita en el apartado VI.2.1. El experimento se realizó durante el día y el tiempo de incubación fue de 6 horas.

VI.4. Análisis estadístico de los datos obtenidos.

Los estudios estadísticos con los datos obtenidos de actividades se analizando mediante el programa estadístico SIGMA-STAT. Para determinar la existencia o no de diferencias significativas entre las actividades de *Rivularia*, *Schizothrix*, *Tolypothrix* y *Nostoc* obtenidas se empleó el test de *t*-Student. Las actividades de cada una de las cianobacterias analizadas se examinaron por análisis de varianza, para determinar si había diferencias significativas entre las diferentes condiciones ensayadas.

RESULTADOS

I. CARACTERIZACIÓN MORFOLÓGICA DE LAS CIANOBACTERIAS.

Se evaluaron, tanto macroscópica como microscópicamente, poblaciones de cianobacterias dominantes de ríos calizos mediterráneos (ríos Alhárabe, Blanco, Endrinales, Matarraña y Muga) y, de la región de Upper Teesdale en el norte de Inglaterra (arroyo Red), pertenecientes al orden Nostocales y Oscillatoriales según la sistemática tradicional (Subsección IV y III de la bacteriológica, respectivamente), para caracterizarlas morfológicamente y, poder así estudiar la variabilidad morfológica existente entre las diferentes muestras, distinguir entre aislados relacionados y, compararlos con las muestras ambientales naturales. Dentro del orden Nostocales, las muestras se correspondieron con los géneros *Rivularia*, *Calothrix*, *Tolypothrix* y *Nostoc*, mientras que del orden Oscillatoriales, se recogieron fundamentalmente muestras pertenecientes al género *Schizothrix*, que formaban mayoritariamente tapetes que cubrían el lecho rocoso del río. Se realizará una descripción más detallada de cada una de las estirpes cianobacterianas más abundantes del río Muga y, que han sido empleadas en los ensayos fisiológicos.

Paralelamente se caracterizaron morfológicamente diferentes cianobacterias con heterocistos atenuadas, aisladas de los ríos calizos con dominancia de *Rivularia*, Alhárabe, Blanco, Endrinales, Matarraña y Muga y, del río calizo Amir, que por sus altas concentraciones de nutrientes nunca presentó colonias de *Rivularia*, y del arroyo silíceos Tejada, con el fin de estudiar la variabilidad existente entre ellas y compararlas con las muestras naturales.

I.1. Caracterización de cianobacterias con tricomas atenuados: morfotipos *Rivularia*, *Calothrix* y *Tolypothrix*.

I.1.1. Caracterización de muestras de campo.

I.1.1.1. Análisis macroscópico y microscópico de muestras naturales de *Rivularia*.

Las colonias de *Rivularia* recogidas de los ríos Alhárabe, Blanco, Endrinales, Matarraña y Muga, y del arroyo Red (**figura 24 a-m**), formaron generalmente

colonias hemiesféricas, en las que los filamentos se dispusieron más o menos radiales o paralelos, con los heterocistos orientados hacia el interior de la colonia. Algunas de estas colonias, pudieron ser identificadas según los criterios morfológicos tradicionales (Geitler, 1932; Komárek y Anagnostidis, 1989; Whitton, 2002) como *R. biasolettiana* [Meneghini] Borner *et* Flahault, al mostrar los caracteres típicos de este taxón, como son la formación de colonias hemiesféricas, de color verde-azulado a marrón-dorado, con cristales de calcita depositados dentro del mucílago y, el desarrollo de vainas anchas, lameladas, abiertas hacia el extremo apical, algunas veces de color pardo-amarillento, aunque normalmente muy pálidas (**figura 24 g-i**). Otras colonias extremadamente calcificadas y cuyas secciones mostraron una zonación obvia, se identificaron como *R. haematites* [Agardh] Borner *et* Flahault (**figura 24 d-f**). Las características de la colonia y los caracteres morfológicos de algunas de las muestras naturales de *Rivularia* de los ríos Muga y Matarraña, se muestran en la **tabla 18**, como representativas de las colonias empleadas en el presente estudio. Se encontraron resultados similares (datos no mostrados) para las colonias de los ríos Alhárabe, Blanco y Endrinales y, del arroyo Red, observándose una gran variabilidad entre las dimensiones celulares y/o filamentos.

Tabla 18. Características morfológicas de diferentes colonias naturales de *Rivularia* de diferentes ríos calizos empleadas en este estudio.

| | <i>R.biasolettiana</i> MUGA | <i>R.biasolettiana</i> MATARRAÑA | <i>R.haematites</i> MUGA | <i>R.haematites</i> MATARRAÑA |
|-------------------------|--------------------------------|-------------------------------------|-----------------------------|----------------------------------|
| Filamento | 9,6-12 | 11-13 | 8-9,6 | 7,2-9,6 |
| Tricoma | 3,2-5,6 | 3,8-5,8 | 4,8-5,6 | 2,4-4 |
| Longitud célula | 3,2-6,4 | 1,6-3,2 | 6-8 | 5,6-8-11,2 |
| Heterocistos | 5,6-7,2 x 6,4-8,8 | 6-7 x 6-8 | 6,4 x 8 | 3,2-5,6 x 2,4-5,6 |
| Colonia | Blanda | Blanda | Dura | Dura |
| Mucílago | si | si | si | si |
| Ramas | frecuentes | frecuentes | frecuentes | frecuentes |
| Pelos | largos | largos | largos | largos |
| Acinetos | no | no | no | no |
| Hormogonios | invierno | invierno | no | no |
| Vaina color | amarilla/parda | amarilla | amarilla/parda | amarilla |
| Vaina estructura | lamelada | lamelada | lamelada | lamelada |

Al mismo tiempo, se encontraron colonias de *Rivularia* con distinto grado de calcificación (**figura 24 b, c**), que al ser observadas al microscopio óptico, se vio que algunas de ellas estaban formadas por más de un morfotipo, como sucedió en la colonia de *Rivularia* del río Matarraña, mostrada en las **figura 24 j-m**.

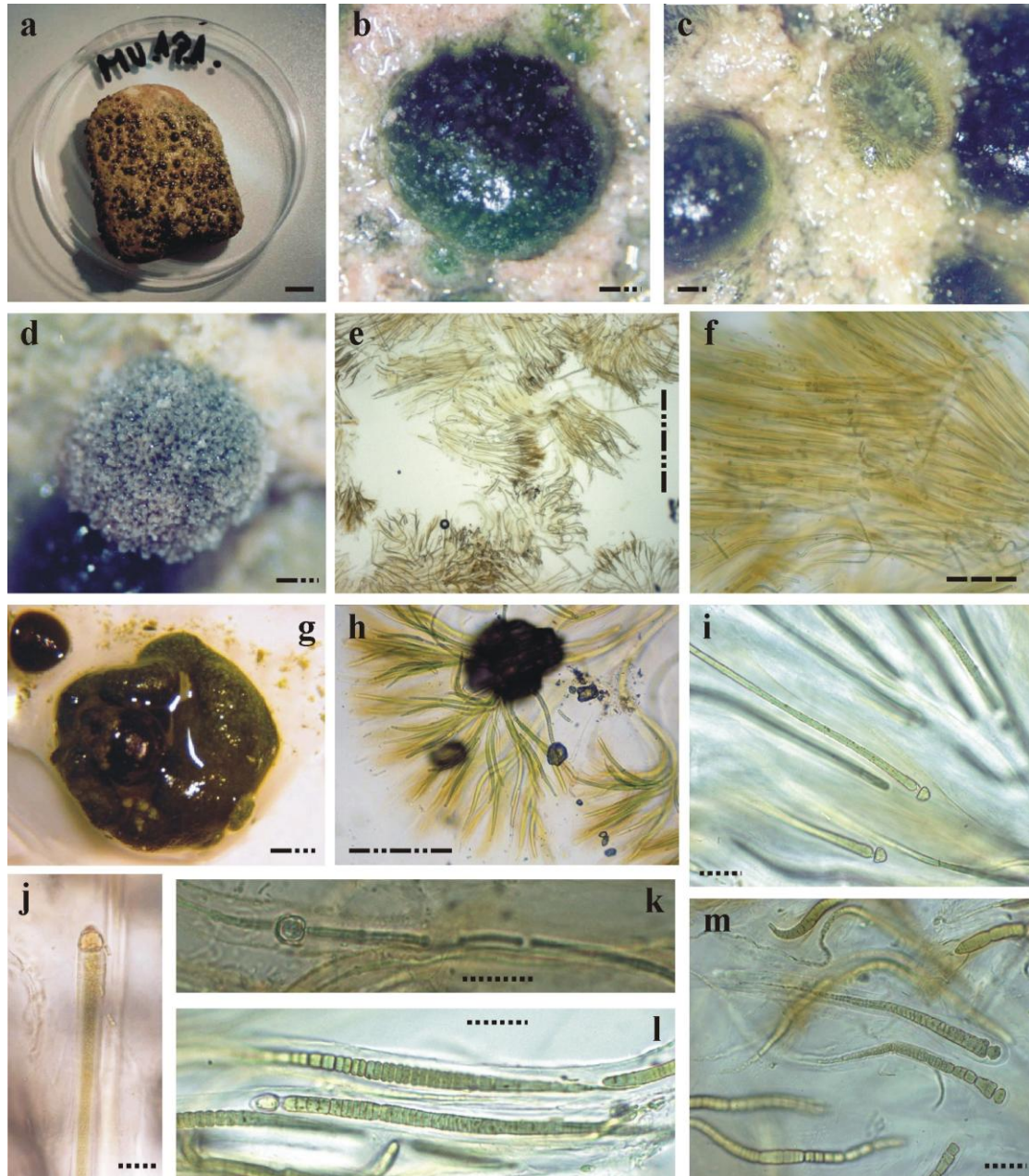


Figura 24. Macrofotografías y microfotografías de muestras naturales de *Rivularia* empleadas en este estudio: (a) detalle de las colonias de *Rivularia* adheridas a la superficie de una piedra; (b-c) colonias de *Rivularia* del río Muga con distinto grado de calcificación; (d-f) colonia de *Rivularia* del río Muga, tipo *R. haematites*; (g-i) colonia de *Rivularia* del río Álharabe, tipo *R. biasoletiana*, (j-m) diferentes tricomas de una única colonia de *Rivularia* del río Matarraña [Escala barra continua = 10 mm; escala barra de línea y dos puntos = 0.5 mm; escala barra discontinua = 100 μ m; escala barra de puntos = 20 μ m].

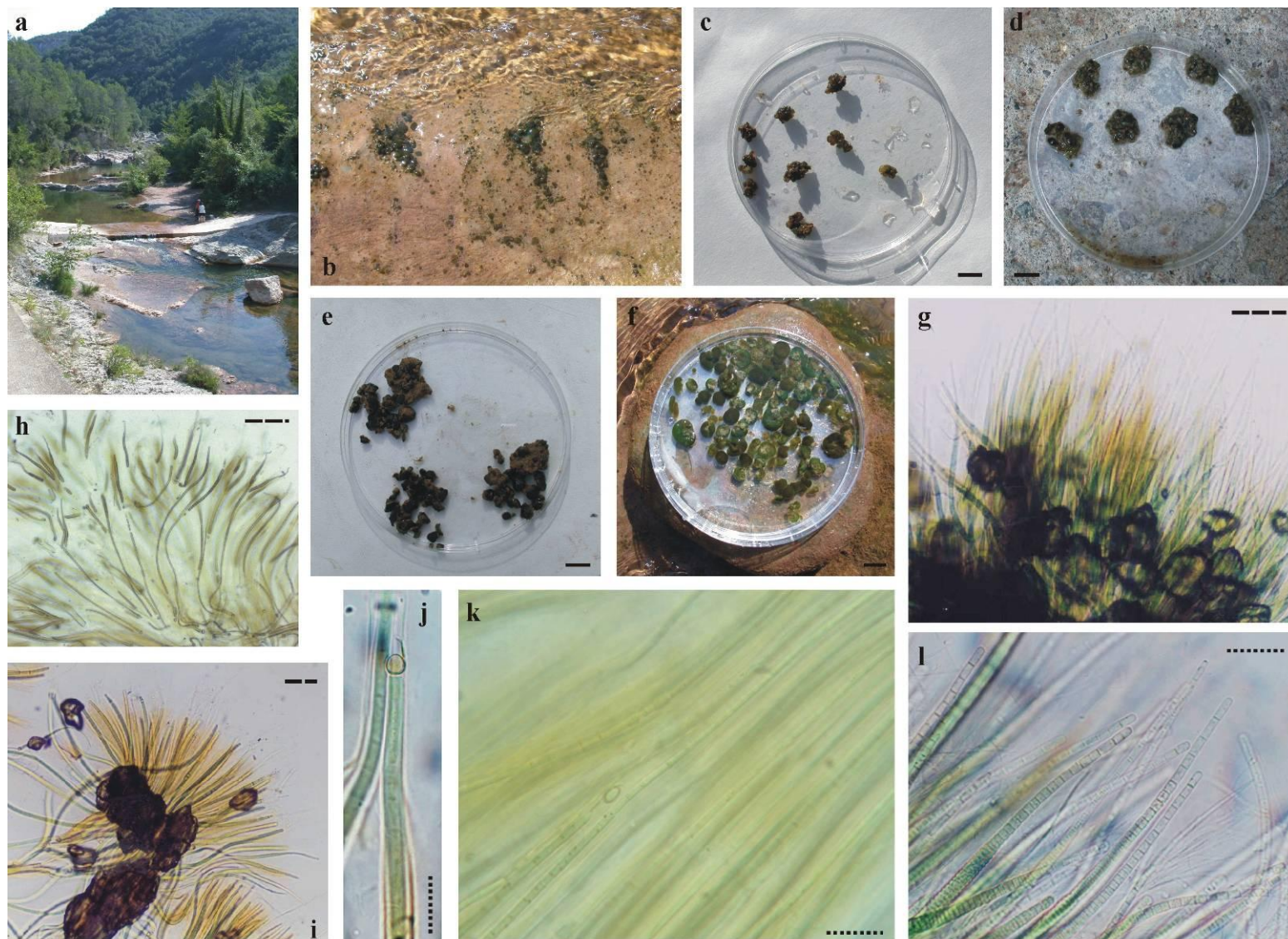
Colonias de *Rivularia* del río Muga.

Rivularia creció generalmente en áreas poco profundas con flujo laminar (**figura 25 a, b**), formando colonias hemiesféricas o subesféricas, de color verde oliva oscuro a marrón dorado (**figura 25 c-f**), que contenían un gran número de filamentos agrupados radialmente (**figura 25 h, i**). Algunas veces, se observaron en las colonias zonas de filamentos dispuestos de forma paralela (**figura 25 g, k**). Los cristales de carbonato cálcico se encontraron depositados dentro del mucílago; variando marcadamente su extensión según las estaciones, lo que influyó en la forma de la colonia. Las colonias de *Rivularia* presentaron distinto grado de calcificación durante este periodo de estudio, mostrando aparentemente una ligera calcificación en las campañas de verano, mientras que en invierno, los precipitados de carbonato cálcico fueron muy numerosos (**figura 25 c-f**). El tamaño de la colonia varió desde 1-1,5 mm de diámetro observado en noviembre, hasta los 10 mm alcanzados en mayo y julio.

La distribución de *Rivularia* en el lecho del río fue desigual. En noviembre, las colonias aparecieron de forma dispersa en pequeños recovecos, protegidos de los cambios bruscos producidos en el flujo de agua y, situados en la parte final de la zona de estudio. Posteriormente, la cobertura se fue ampliando a lo largo de las estaciones hasta alcanzar su máximo desarrollo en julio, momento en que se detectó su presencia en todo el tramo estudiado del río Muga.

Como se muestra en la **figura 25 g y l**, se distinguieron filamentos atenuados, que por lo general, terminaban en un largo pelo multicelular. Los tricomas se formaron por células más cortas que anchas hacia la base, presentando siempre un heterocisto basal (**figura 25j**). Las vainas fueron amplias, lameladas y, abiertas hacia el extremo apical. En ocasiones se detectaron hormogonios desarrollados en las partes apicales del tricoma.

Figura 25. Fotografías de las colonias de *Rivularia* empleados en este estudio. (a) Vista general del área donde se encontraron colonias de *Rivularia* (Abril del 2006); (b) detalle de colonias de *Rivularia* creciendo sobre una superficie rocosa (Julio del 2006); (c-f) macrofotografías de las colonias de *Rivularia* empleadas en los experimentos de fosfatasa realizados “*in situ*” en noviembre del 2005 y marzo, abril y julio del 2006, respectivamente; (g-i) microfotografías de colonias de *Rivularia* en donde observamos la diferente disposición de los filamentos dentro de la colonia; (h, j-l) microfotografías de diferentes filamentos de *Rivularia*, en donde se muestran detalles característicos de este género como (j) vaina lamelada y (l) desarrollo del pelo multicelular al final del tricoma. [Escala barra sólida = 10 mm; escala barra discontinua = 50 µm; escala barra de puntos = 20 µm]. →



I.1.1.2. Análisis microscópico de muestras naturales de *Calothrix*.

Entre las muestras del raspado del epilíton, se pudieron observar filamentos tipo *Calothrix*, que fueron identificados como *Calothrix parietina* [Thuret] Borner *et* Flahault, según los criterios taxonómicos tradicionales (Komárek y Anagnostidis, 1989; Whitton, 2002). Dichos filamentos se encontraban a veces entremezclados a modo de penachos, de 10-13(-18) μm de ancho, normalmente con falsas ramificaciones. Los tricomas atenuados estuvieron formados por células más cortas que anchas, de 8,6-10,6(-17) μm de anchura y 4-4,8 μm de longitud (**figura 26**). La vaina fue de color amarillo/marrón, generalmente extendida hacia el extremo apical. Presentaron un heterocisto basal con unas dimensiones de 4,8-16 x 8-9,6 y, en algunos filamentos, se observó el desarrollo de un pelo multicelular.



Figura 26. Microfotografías de muestras naturales recogidas en el río Muga e identificadas como *Calothrix parietina* [Escala barra continua = 10 μm].

I.1.1.3. Análisis macroscópico y microscópico de muestras naturales de *Tolypothrix*.

Las muestras de *Tolypothrix* del río Muga analizadas, se correspondieron con *T. distorta* var. *penicillata* [Agardh] Lemmermann (Komárek y Anagnostidis, 1989; Whitton, 2002). Se trata de una de las cuatro cianobacterias que dominaron en el punto de muestro durante todas las campañas realizadas. Como puede observarse en las **figura 27 b y c**, esta cianobacteria creció en la naturaleza formando colonias macroscópicas a modo de mechones, de color marrón y algunas veces calcificadas. Aparecieron unidas a la superficie de las rocas en zonas de flujo moderadamente rápido (**figura 27a**). Se caracteriza por presentar filamentos con falsas ramas,

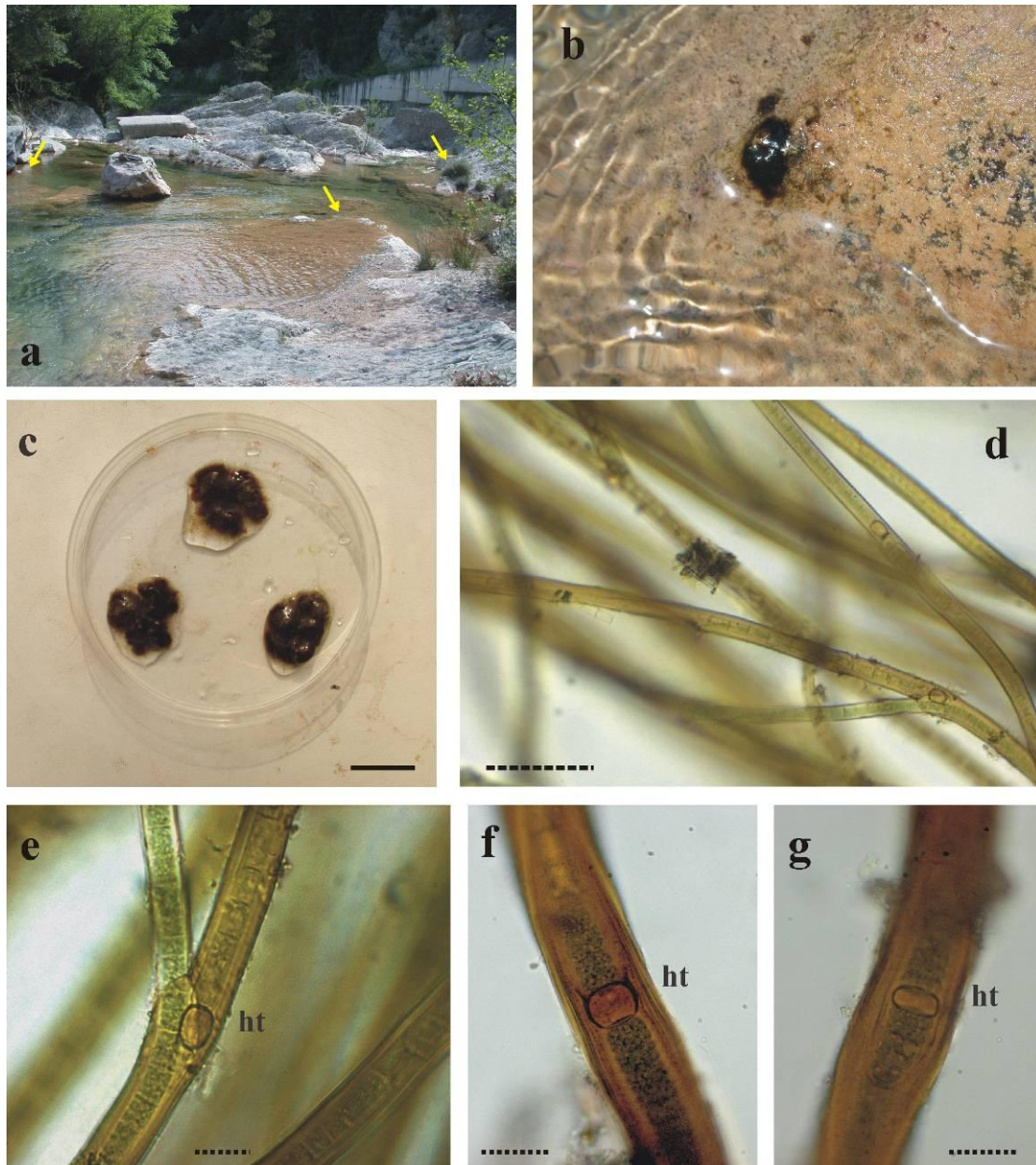


Figura 27. Fotografías de las colonias de *Tolypothrix* empleados en este estudio. (a) Vista general del área donde se encontraron las colonias de *Tolypothrix*; (b) detalle de una colonia de *Tolypothrix* adherida a una superficie rocosa; (c) macrofotografía de las colonias de *Tolypothrix* empleadas en el experimento de fosfatasa realizado “*in situ*” en abril del 2006; (d, e, f y g) microfotografías de diferentes filamentos de *Tolypothrix* en donde se muestran los tricomas envueltos en vainas altamente pigmentadas constituidas por diferentes capas y la presencia de heterocistos intercalados. Se observa también en las figuras .d y f, la formación de falsas ramificaciones en algunos de los filamentos. [Escala barra sólida = 20 mm; escala barra discontinua = 100 μ m; escala barra de puntos = 25 μ m]. Abreviatura: ht – heterocisto. Las flechas amarillas indican los lugares donde se encontraron colonias de *Tolypothrix*.

apareciendo una única rama normalmente sustentada por un heterocisto en la base de la ramificación (**figura 27d**). El patrón de ramificación es repetitivo y se encuentra formado por ramas funcionales, bastante próximas a los filamentos originales, que conducen normalmente a estructuras filamentosas de 2-3 cm de longitud. Los filamentos mostraron una ligera atenuación, teniendo 10-17 μm de ancho y por encima de 3 cm de largo. Inicialmente, las vainas están próximas al tricoma, son delgadas y no tienen color, pero con el tiempo se vuelven gruesas, de color amarillo-parduzo y están más separadas del tricoma, pudiendo alcanzar los 29 μm de anchura. Las células fueron ligeramente estrechas, de 10-13 μm de ancho y 6-14 μm de longitud. Los heterocistos aparecen normalmente en solitario e intercalados en los filamentos, con unas dimensiones de 12-17 x 8-17 μm (**figura 27 e-g**).

I.1.2. Caracterización de cepas aisladas.

I.1.2.1. Cianobacterias con tricomas atenuados aisladas de ríos calizos con dominancia de *Rivularia*.

I.1.2.1.1 Cianobacterias tipo Rivulariaceae.

Cuando cepas tipo Rivulariaceae aisladas de ríos calizos (**tabla 19**) donde *Rivularia* era dominante, fueron cultivadas bajo condiciones de laboratorio y examinadas morfológicamente, se vio que todas ellas fueron fenotípicamente muy similares (**figura 28**), mostrando características morfológicas semejantes a *Calothrix*, y no manifestando características típicas del género *Rivularia*, como por ejemplo la formación de colonias gelatinosas en cultivo.

Los filamentos de las 15 cepas cianobacterianas analizadas durante este estudio mostraron polaridad basal-apical típica de esta familia, cuya relación varió desde 2,1 de la cepa MU15 UAM-369 a 3,8 de las cepas E7 UAM-313 y MU31 UAM-349 (**tabla 19**). Todas ellas formaron sobre el medio sólido de agar una colonia más o menos extendida, sin forma fija, con una variación de la tonalidad desde verde-parda y aspecto mate hasta verde oscuro y brillante y, presentaron heterocistos terminales, aunque ocasionalmente se detectaron heterocistos intercalados en los filamentos. Los heterocistos fueron generalmente redondeados o hemiesféricos, con unas dimensiones medias de 6,3-11,2 x 5,1-7,3. Los filamentos maduros estaban envueltos en una vaina mucilaginosa hialina (**figura 28 b, e, g**) y solamente en algunos ejemplares y, en ciertas condiciones de cultivo, fue lamelada. En cultivos viejos de MU27 UAM-314 (**figura 28ñ**), MU28 UAM-341 y MU41 UAM-370 se

Tabla 19. Características morfológicas de las distintas cepas tipo Rivulariaceae aisladas de ríos calizos donde las colonias de *Rivularia* eran dominantes.

| Cultivo | Filamento | | Tricoma | | Longitud de la célula | | Heterocistos | | Vaina color | Relación basal-apical filamento | | Hormogonios |
|---------------------|-----------|----------|---------|----------|-----------------------|--------|--------------|---------------|----------------|---------------------------------|---------|-------------|
| | media | rango | media | rango | media | rango | media | rango | | media | rango | |
| BL1 UAM-346 | 13 | 11-15 | 11,2 | 9,4-12,6 | 8,2 | 5-13 | 9,3 x 6,7 | 7-11 x 5-9 | hialina | 3,7 | 2,5-4,4 | si |
| BL2 UAM-347 | 13,9 | 12-15,4 | 11,5 | 10-13 | 8,8 | 6-12 | 8,4 x 6,1 | 8-10 x 5-8 | hialina | 2,8 | 2,5-3 | si |
| E1 UAM-302 | 12,6 | 10-15 | 9,5 | 8-11 | 6,6 | 6-8 | 8,8 x 7,3 | 6-12 x 5-10 | hialina | 3,4 | 2-5 | si |
| E7 UAM-313 | 11,8 | 8-14 | 8,8 | 6-11 | 6,3 | 5-8 | 7,3 x 6,2 | 6-8 x 6-7 | hialina | 3,8 | 2,5-5,5 | si |
| E8 UAM-319 | 10,4 | 9-15 | 8,5 | 7-11 | 6,2 | 4-7 | 7,4 x 6,7 | 6-9 x 6-8 | hialina | 2,3 | 1,8-3 | si |
| E16 UAM-354 | 13,8 | 10,6-18 | 11,5 | 8,5-15 | 10,8 | 4,5-17 | 8,7 x 7,1 | 6,5-12 x 5-8 | hialina | 2,7 | 2,4-3,1 | si |
| E17 UAM-358 | 13,2 | 12-14 | 11 | 10-12 | 7,2 | 6-8 | 8,4 x 6,8 | 8-9 x 6-8 | hialina | 2,7 | 2,4-3 | si |
| MA8 UAM-355 | 12 | 10-18 | 9,2 | 8,6-11 | 4,8 | 4-5,5 | 6,7 x 5,1 | 4,5-9 x 4-6,5 | hialina | 2,3 | 1,7-2,8 | si |
| MA14 UAM-312 | 14,6 | 12-18 | 13 | 11-16 | 11 | 9-12 | 10,2 x 6,6 | 8-14 x 6-8 | hialina | 3,5 | 2,8-4 | si |
| MU15 UAM-369 | 15 | 11-20 | 11,3 | 9-14 | 6,4 | 5-8 | 11,2 x 8,6 | 7-16 x 6-12 | hialina | 2,1 | 1,5-3,5 | si |
| MU24 UAM-305 | 9,8 | 8-12 | 8,2 | 7-10 | 6,4 | 4-8 | 7,3 x 6,6 | 6-9 x 6-8 | hialina | 2,3 | 1,6-2,7 | si |
| MU27 UAM-314 | 11,6 | 10-17 | 9 | 7-12 | 4,9 | 4-6 | 6,5 x 5,3 | 4-9 x 4-7 | hialina | 2,8 | 1,75-4 | si |
| MU28 UAM-341 | 10,2 | 9-11 | 8,1 | 6-10 | 7,5 | 6-10 | 6,3 x 5,5 | 4-8 x 4-7 | hialina | 3,1 | 1,5-4 | si |
| MU31 UAM-349 | 13,2 | 11-16 | 11,3 | 10-14 | 8,7 | 6-11 | 8,7 x 6,8 | 7-10 x 6-9 | hialina | 3,8 | 3-5,5 | si |
| MU41 UAM-370 | 9,3 | 6,4-12,5 | 7,5 | 5,4-10,5 | 7,1 | 4-10,5 | 6,9 x 5,8 | 5-10 x 5-9 | hialina | 2,2 | 1,8-2,5 | si |

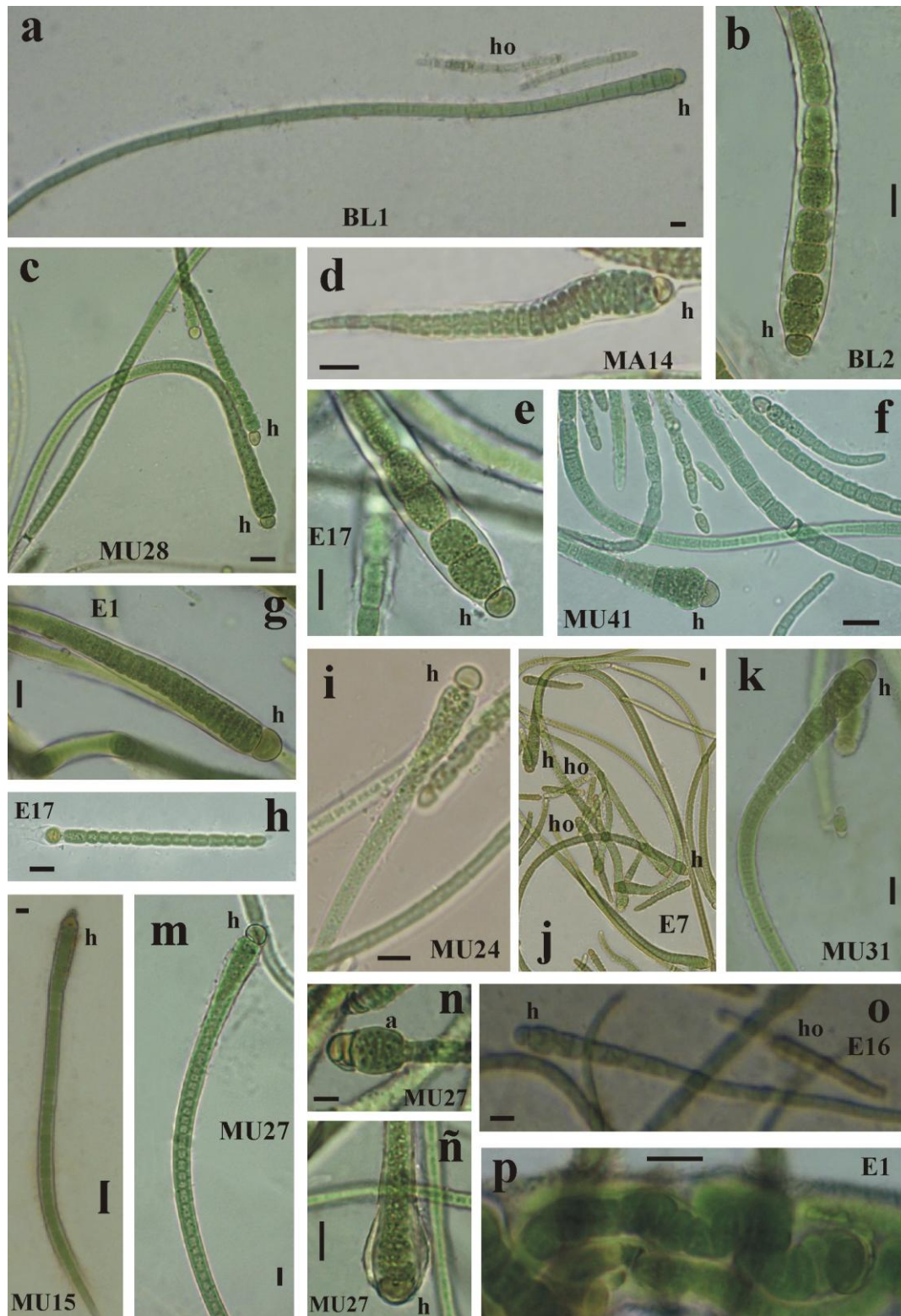


Figura 28. Microfotografías de los cultivos cianobacterianos más representativos, caracterizados morfológicamente durante este estudio: (a) BL1 UAM-346; (b) BL2 UAM-347; (c) MU28 UAM-341; (d) MA14 UAM-312; (e) E17 UAM-358; (f) MU41 UAM-370; (g) E1 UAM-302; (h) detalle de un filamento joven de E17 UAM-358; (i) MU24 UAM-305; (j) E7 UAM-313; (k) MU31 UAM-349; (l) MU15 UAM-369; (m-ñ) filamentos de MU27 UAM-314, en donde se observa la diferenciación de un acinet (n) y el ensanchamiento basal de la vaina (ñ); (o) E16UAM-354 y; (p) enrollamiento del tricoma dentro de la vaina observado en E1 UAM-302. [Escala barra continua = 10 µm]. Abreviaturas: a- acinet; h-heterocisto; ho-hormogonio.

observó el ensanchamiento de la vaina en la zona basal. Todos los aislados produjeron hormogonios móviles sin vaina, formados por células más pequeñas que las células de los filamentos maduros (**figura 28h**). En algunas cepas como MU27 UAM-314 y MU41 UAM-370, se observaron acinetos (**figura 28n**). Ocasionalmente se observó en algunos cultivos viejos el enrollamiento de tricomas dentro de la vaina (aislados E1 UAM-302, E7 UAM-313 y MU41 UAM-370; **figura 28p**) y la formación de gránulos (**figura 25e**). Las células vegetativas fueron generalmente más anchas que largas (7,5 a 11,5 μm de anchura frente 6,3 a 10,8 μm de largo), siendo las dimensiones celulares y del filamento muy similares en todas las cianobacterias.

I.1.2.1.2 Cianobacterias tipo *Tolypothrix*.

También se empleó el cultivo MA11 UAM-357 perteneciente a la colección de cianobacterias de la Universidad Autónoma de Madrid, muestra que fue aislada de muestras de epilíton del río calizo Matarraña y se identificó como perteneciente al género *Tolypothrix*.

La forma y aspecto de esta cepa, MA11 UAM-357, puede observarse en la **figura 29**. Aunque no presentó exactamente la misma morfología que la encontrada en campo, este aislado fue identificado como *Tolypothrix distorta* var. *penicillata* [Agardh] Lemmermann. Al microscopio se observaron filamentos ligeramente atenuados, de 7-8 μm de anchura que exhibieron falsas ramificaciones. Se trataba de una única rama, normalmente sustentada por un heterocisto en la base de la ramificación, con unas dimensiones medias de 7 x 7,3 (**figura 29a**). El patrón de ramificación fue repetitivo y, se encuentra formado por ramas bastante próximas a los filamentos originales. Los tricomas individuales encerrados dentro de una vaina clara, fina y transparente, estuvieron formados por células ligeramente más largas que ancha (alrededor de 6,3 μm de anchura y 8,8 μm de longitud). Las células terminales fueron redondeadas, mostrando una diferente pigmentación que el resto del tricoma en campo claro (**figura 26 a,c**) y con una autofluorescencia más intensa (**figura 26c**).

I.1.2.2. Cianobacterias con tricomas atenuados aisladas de ríos silíceos o calizos sin *Rivularia*.

Con el fin de poder discriminar mejor entre los géneros *Calothrix* y *Rivularia*, se procedió al aislamiento de cepas tipo *Calothrix*, de ríos en los que nunca se

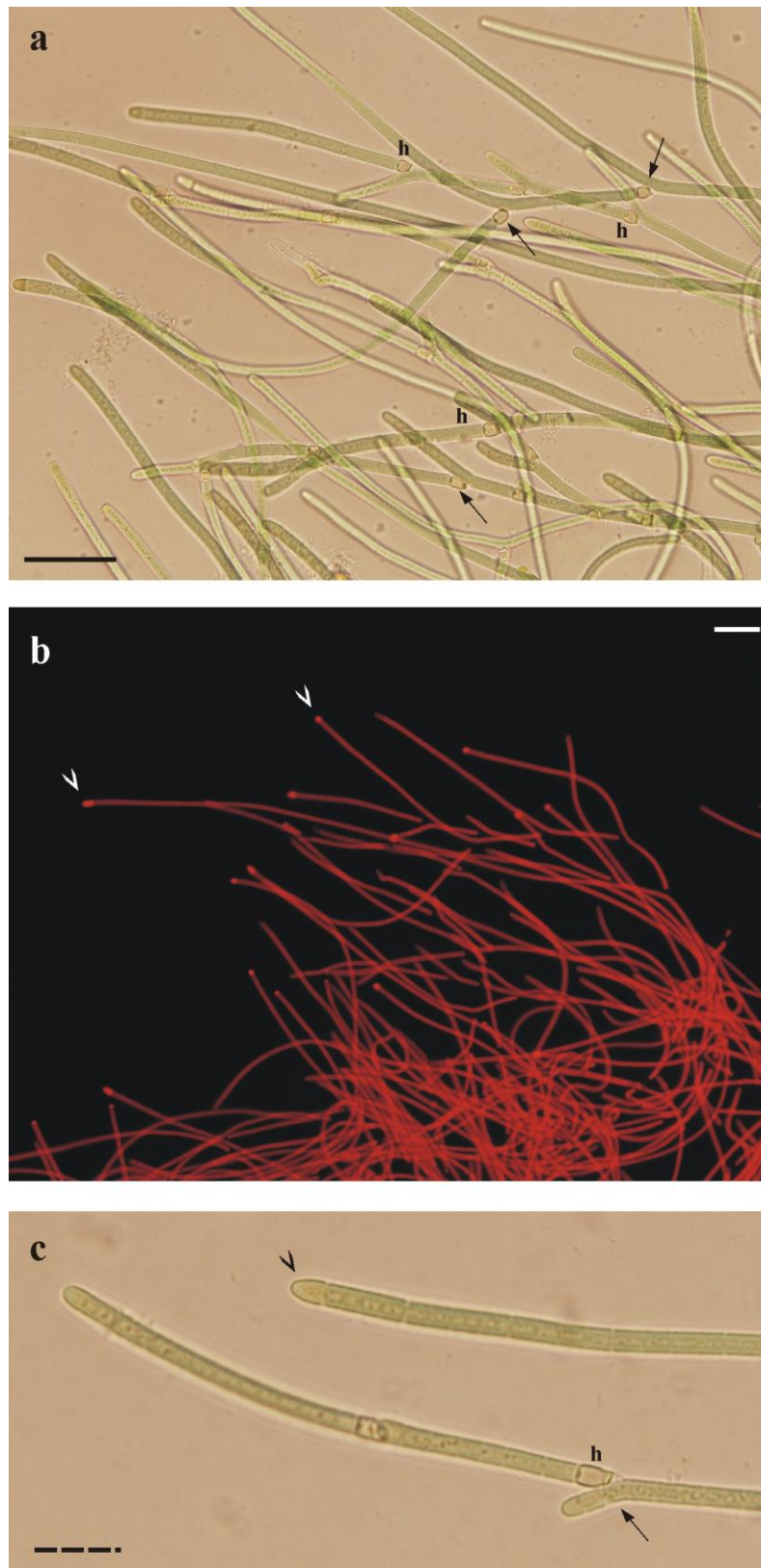


Figura 29. Microfotografías de la cepa MA11 UAM-357 vistas por microscopía óptica (a,c) donde se muestra la existencia de falsas ramificaciones (flechas) y heterocistos intercalados a lo largo del filamento; (b) imagen de autofluorescencia, mostrando que los pigmentos fotosintéticos están principalmente localizados en la región periférica. Las células apicales recién formadas muestran más autofluorescencia, que las otras células de los filamentos (puntas de flecha). [Escala barra sólida = 50 μm ; escala barra discontinua = 100 μm]. Abreviatura: h – heterocisto.

observaron colonias de *Rivularia*. Las especies de este género son características de aguas oligotróficas y desaparecen rápidamente cuando se eleva el nivel de nutrientes (Whitton, 1987). De este modo, se aislaron 14 cianobacterias atenuadas con heterocistos de muestras de epilíton del arroyo silíceo Tejada y el río calizo Amir, ambos con elevados contenidos en nutrientes.

Cuando las cianobacterias aisladas se cultivaron en el laboratorio y se examinaron morfológicamente, se comprobó que todas ellas fueron fenotípicamente muy similares, mostrando características morfológicas semejantes a *Calothrix* (**figura 30 a-ñ**). Además, estas cepas formaron sobre el medio sólido de agar una colonia más o menos extendida, sin forma fija, con una variación de la tonalidad desde verde parda y aspecto mate hasta verde oscuro y brillante (**figura 30a**) y, desarrollaron filamentos heteropolares (**figura 30 b-ñ**), con un heterocisto en posición basal y atenuación hacia el extremo apical.

Sin embargo, al cambiar las condiciones de cultivo, de un medio BG11₀ en el que se realizó el aislamiento, al medio CHU10 bajo en nutrientes y descrito como idóneo para Rivulariaceas (Whitton, 2002), se observaron diferencias morfológicas entre las cepas analizadas (**figuras 31 y 32**), distinguiéndose dos morfotipos distintos correspondientes a los tipos *Calothrix* y *Tolypothrix* (**tabla 20**). Un primer grupo, formado por las cepas A1 UAM-342, A2 UAM-345, TJ9 UAM-336, TJ12 UAM-372, TJ14 UAM-352, TJ15 UAM-373 y TJ16 UAM-374, siguió manteniendo características similares a *Calothrix*, y las cepas mostraron tricomas con una polaridad basal-apical mayor de 1,9 (**tabla 10**). La longitud de los filamentos fue muy variable, pero por lo general fueron filamentos muy largos, de hasta 1 mm de longitud y de dimensiones grandes (**figura 31 a-m**), llegándose alcanzar 16 µm de anchura y, en los que la célula terminal presentó normalmente forma cónica (**figura 31i**). En algunos aislados como TJ12 UAM-372 (**figura 31f**) y TJ15 UAM-373, los filamentos aparecieron unidos unos a otros, con los heterocistos basales entrelazados.

Los tricomas estuvieron formados por células ligeramente más anchas que largas, que fueron alargándose hacia el final del tricoma (**figura 31b**). Sin embargo, en las cepas TJ12 UAM-372, TJ15 UAM-373 y TJ16 UAM-376, se observaron que las células fueron más anchas que largas en la parte basal, alargadas hacia la mitad del tricoma y células isodiamétricas al final del mismo. Los valores medios de las células vegetativas fueron 5,6-12,6 x 3,6-8,2. Todos los aislados presentaron un heterocisto basal, pero ocasionalmente se detectaron heterocistos intercalados en los filamentos.

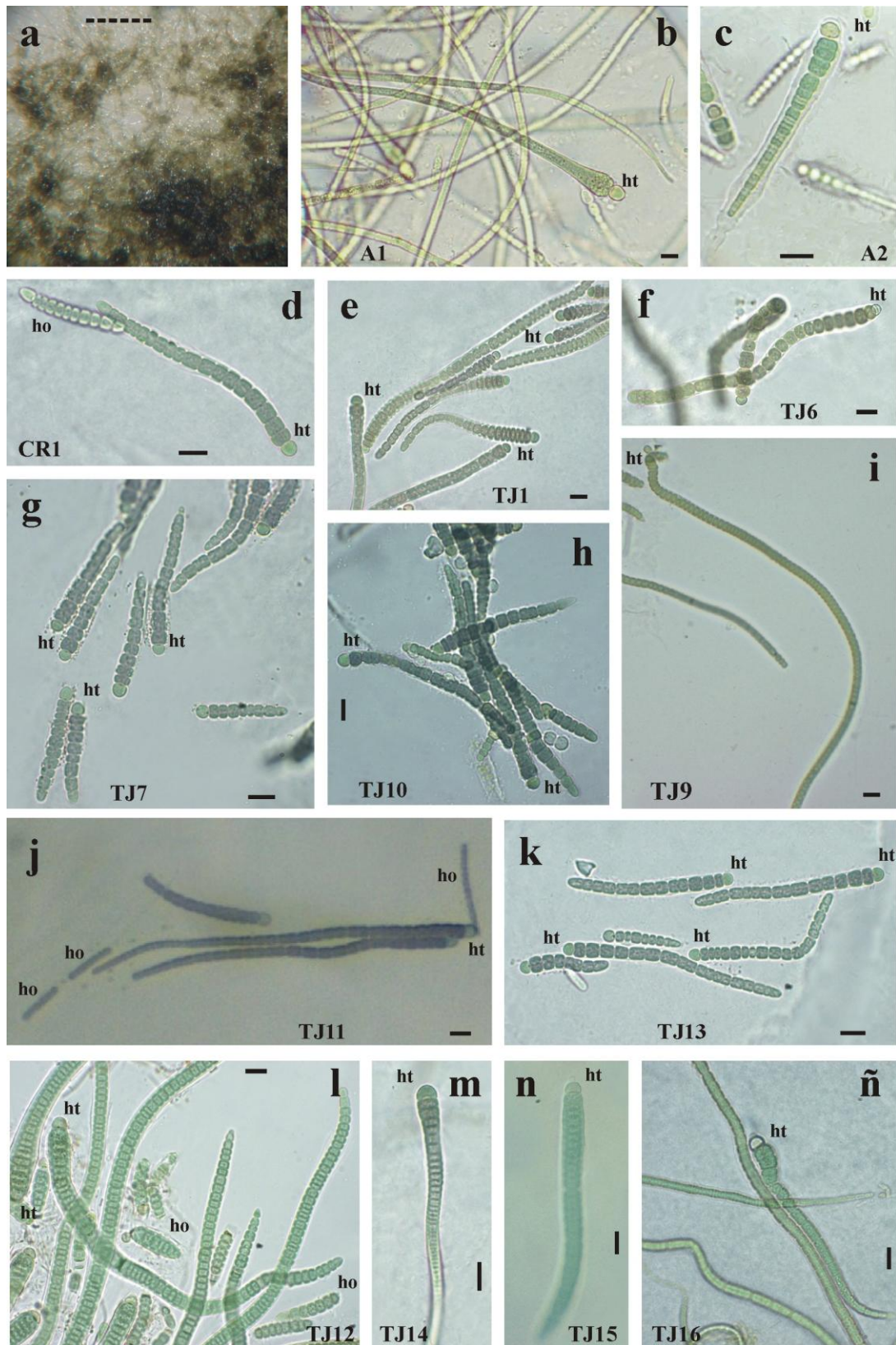


Figura 30. (a) Aspecto de la colonia de TJ13 UAM-340 observada a la lupa; (b-ñ) microfotografías de las cepas aisladas de ríos silíceos o calizos sin *Rivularia* caracterizadas morfológicamente: (b) A1 UAM-342; (c) A2 UAM-345; (d) CR1 UAM-332; (e) TJ1 UAM-333; (f) TJ6 UAM-334; (g) TJ7 UAM-335; (h) TJ10 UAM-337; (i) TJ9 UAM-336; (j) TJ11 UAM-371; (k) TJ13 UAM-340; (l) TJ12 UAM-372; (m) TJ14 UAM-352; (n) TJ15 UAM-373 y (ñ) TJ16 UAM-374 [Escala barra continua = 10 μ m; escala barra discontinua = 500 μ m]. Abreviaturas: h – heterocisto; ho – hormogonio.

Tabla 20. Características morfológicas de las distintas cepas con tricomas atenuados aisladas de ríos silíceos ó calizos en los que se han observado *Rivularia* utilizadas durante este estudio. Las medidas son expresadas como valores medios y el valor máximo y mínimo encontrado en μm .

| Cultivo | Filamento | | Tricoma | | Longitud de la célula | | Heterocistos | | Relación Basal-apical filamento | | Vaina | Hormogonios |
|---------------------|-----------|---------|---------|---------|-----------------------|-------|--------------|---------------|---------------------------------|---------|---------|-------------|
| | media | rango | media | rango | media | rango | media | rango | media | rango | | |
| A1 UAM-342 | 15,9 | 11-19 | 12,6 | 9,4-15 | 8,2 | 5-11 | 11 x 9,5 | 8-16 x 5-16 | 1,9 | 1,5-2,7 | hialina | si |
| A2 UAM-345 | 10,9 | 9-13 | 8,3 | 6-10,5 | 5,8 | 4-8 | 7,4 x 4,8 | 5-10 x 4-6 | 1,9 | 1,5-2,5 | hialina | si |
| CR1 UAM-332 | 9,4 | 6-10,6 | 7,7 | 4,8-10 | 5,2 | 4-7 | 8,1 x 4,7 | 7-9 x 3,3-7 | 1,2 | 1-1,6 | hialina | si |
| TJ1 UAM-333 | 8,4 | 5-10,4 | 7,2 | 6-8 | 5,5 | 3-8,2 | 6,2 x 4,6 | 5-7 x 3,6-5,7 | 1,3 | 1,1-1,5 | hialina | si |
| TJ6 UAM-334 | 6,8 | 5,1-9 | 5,8 | 4,4-7 | 4,8 | 3-5,7 | 5,5 x 4,7 | 3,6-7,7 x 3-6 | 1,3 | 1-1,7 | hialina | si |
| TJ7 UAM-335 | 9,5 | 9-10 | 6 | 6 | 5 | 4-6 | 5 x 4 | 4-6 x 4 | 1,1 | 1-1,2 | hialina | si |
| TJ9 UAM-336 | 6,4 | 5-8 | 5,6 | 4-7 | 5,1 | 4-7 | 5,8 x 5,9 | 4-8 x 4,6-8 | 2,2 | 1,5-2,9 | hialina | si |
| TJ10 UAM-337 | 7,4 | 6,4-8,3 | 6,3 | 5,4-7 | 5,3 | 3-6,7 | 5,8 x 5,1 | 4,9-7 x 4-6 | 1,4 | 1,1-1,6 | hialina | si |
| TJ11 UAM-371 | 7,7 | 6,4-9 | 6,6 | 5,7-7,5 | 5,7 | 3-7,6 | 6,2 x 5,4 | 4,8-8 x 3,5-8 | 1,3 | 1-2 | hialina | si |
| TJ12 UAM-372 | 10,8 | 8-17 | 8,4 | 5-11,5 | 4,9 | 3-7 | 7,8 x 5,3 | 6-13 x 4-7 | 2,1 | 1,5-2,9 | hialina | si |
| TJ13 UAM-340 | 7,4 | 6,3-9 | 6,1 | 5-7,5 | 5,1 | 4-6,6 | 6,1 x 4,6 | 5-7 x 4-5,4 | 1,1 | 0,8-1,2 | hialina | si |
| TJ14 UAM-352 | 7,6 | 6,5-9 | 6,0 | 5-8 | 5,5 | 4-9 | 5,9 x 4,9 | 5-7 x 3-7 | 1,9 | 1,4-2,9 | hialina | si |
| TJ15 UAM-373 | 13,8 | 12-16 | 10,3 | 9-12 | 7,4 | 6-10 | 8,4 x 3,7 | 6-10 x 2-6 | 2,0 | 1,5-2,9 | hialina | si |
| TJ16 UAM-374 | 12 | 8-17,5 | 10,1 | 7-13 | 3,6 | 2-5 | 8,8 x 5,2 | 5-12 x 4-6 | 2,6 | 2-3,5 | hialina | Si |

Estos heterocistos fueron normalmente esféricos, con unas dimensiones medias de 5,8-11 x 3,7-9,5, pero también aparecieron heterocistos hemiesféricos, ovalados o más largos que anchos. En algunas cepas (A1 UAM-342, TJ14 UAM-352, TJ16 UAM-374) se observaron restos de heterocistos anteriores (**figura 21a**). Los filamentos maduros estuvieron encerrados en una vaina mucilaginoso hialina (**figura 31 d, g**). En algunos aislados como TJ12 UAM-372 y TJ16 UAM-374 (**figura 31 e-f, i**), los tricomas adquirieron una pigmentación marrón-amarillenta, especialmente intensa en la parte basal. Ocasionalmente se observó en algunos cultivos viejos el enrollamiento de tricomas dentro de la vaina (aislados TJ12 UAM-372 y TJ15 UAM-373). Un ejemplo de la curvatura de un tricoma de TJ12 UAM-372 puede observarse en la **figura 31g** y, de la formación de gránulos en A1 UAM-342 de la **figura 31m**. Además, se observó un enrollamiento del extremo apical del filamento a modo de caracol (**figura 31h**) en el aislado TJ16 UAM-374 y, la formación de un pelo multicelular corto en el extremo apical de los filamentos de los aislados TJ12 UAM-372 (**figura 31f**), TJ16 UAM-374 (**figura 31 i**), A1 UAM-342 y A2 UAM-345.

El segundo grupo, formado por los aislados CR1 UAM-332, TJ1 UAM-333, TJ6 UAM-334, TJ7 UAM-335, TJ10 UAM-337, TJ11 UAM-371 y TJ13 UAM-340 (**figura 32 a-ñ**), se caracterizó por mostrar una ligera atenuación de los filamentos, con una relación de la polaridad basal-apical menor de 1,4, presentando un morfotipo correspondiente a *Tolypothrix*. Las principales características morfológicas de estas cepas cianobacterianas en cultivo se resumen en la **tabla 20**. La longitud de los filamentos fue muy variable (**figura 32 a, h**), pero generalmente, todos los aislados presentaron filamentos maduros largos (**figura 32a**), de más de 0,5 mm de longitud y con una anchura de 6,8-9,5 μm . En la mayoría de los aislados se distinguió una vaina hialina y firme recubriendo a los filamentos maduros (**figura 32 e**). Los tricomas estuvieron compuestos por células ligeramente constrictas, de 5,8-7,7 μm de anchura y 4,8-5,7 μm de longitud (**figura 32 b, e, m**). Las células vegetativas adoptaron diversas formas, entre las que se encontraron células ligeramente más anchas que cortas (**figura 32 e, i, l**), células cilíndricas (**figura 32 g, j**) o células ligeramente más largas que anchas (**Figura 32 d, f, h**). Los heterocistos fueron redondeados, hemiesféricos o isodiamétricos, localizados en posición basal en los filamentos más jóvenes (**figura 32 f, h, j-k**) o bien intercalados a lo largo de los filamentos maduros (**figura 32 b, e, i, m**), siendo las dimensiones medias de 5-8,1 x 4-5,4 μm .

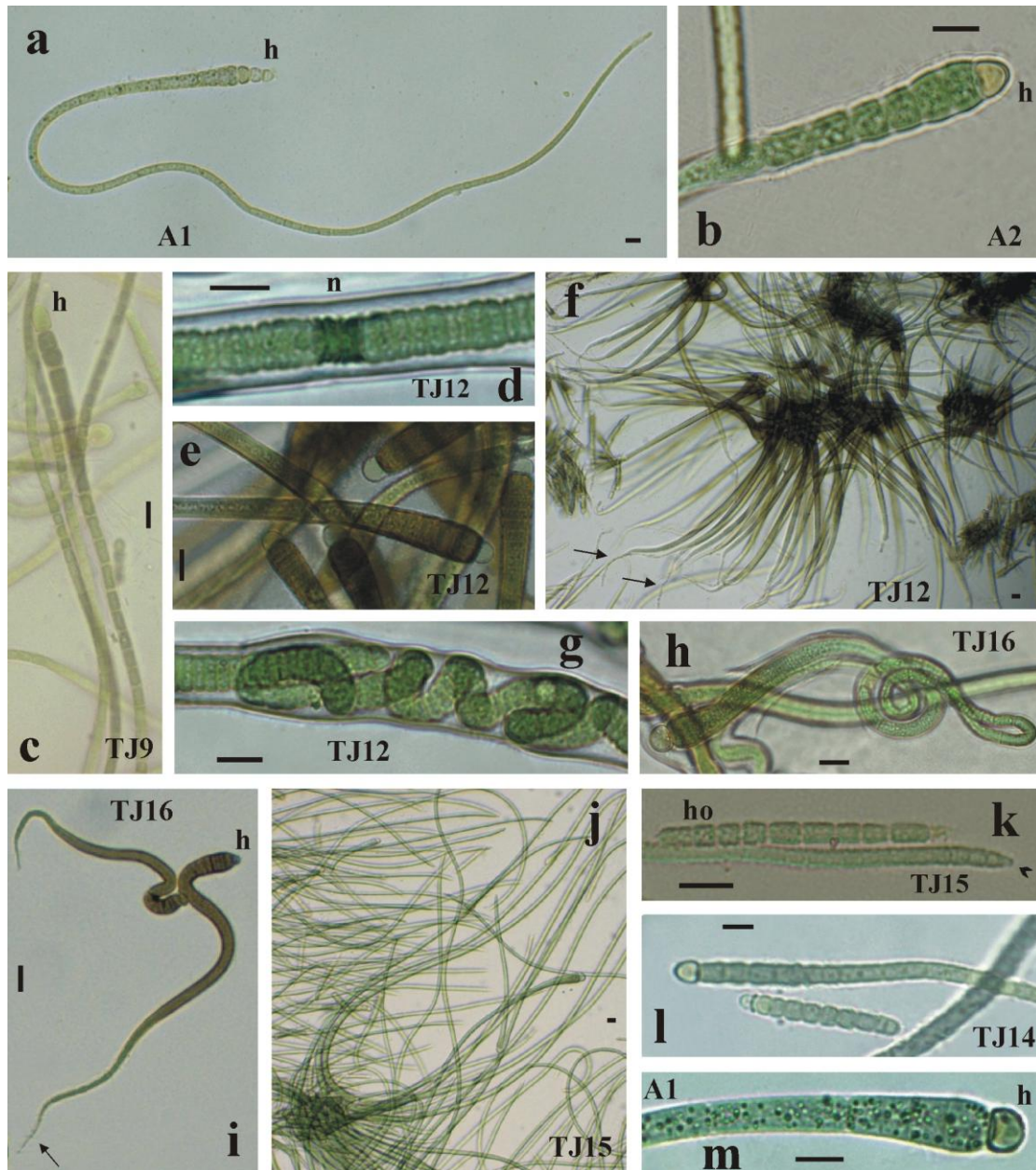


Figura 31. Microfotografías de los aislados de ríos síliceos o calizos sin *Rivularia*, que mantuvieron características morfológicas similares a *Calothrix*: (a) A1 UAM-342; (b) A2 UAM-345; (c) TJ9 UAM-336; (d-g) diferentes filamentos de TJ12 UAM-372, en donde se observa una intensa pigmentación marrón de las vainas en los ejemplares adultos (e-f) y el detalle de la curvatura de un tricoma dentro de la vaina (g); (h-i) distintos filamentos de TJ16 UAM-374; (j-k) filamentos de TJ15 UAM-373, (l) TJ14 UAM-352; (m) A1 UAM-342 [Escala barra continua = 10 μ m]. Abreviaturas: h – heterocisto; ho – hormogonio; n – necridio.

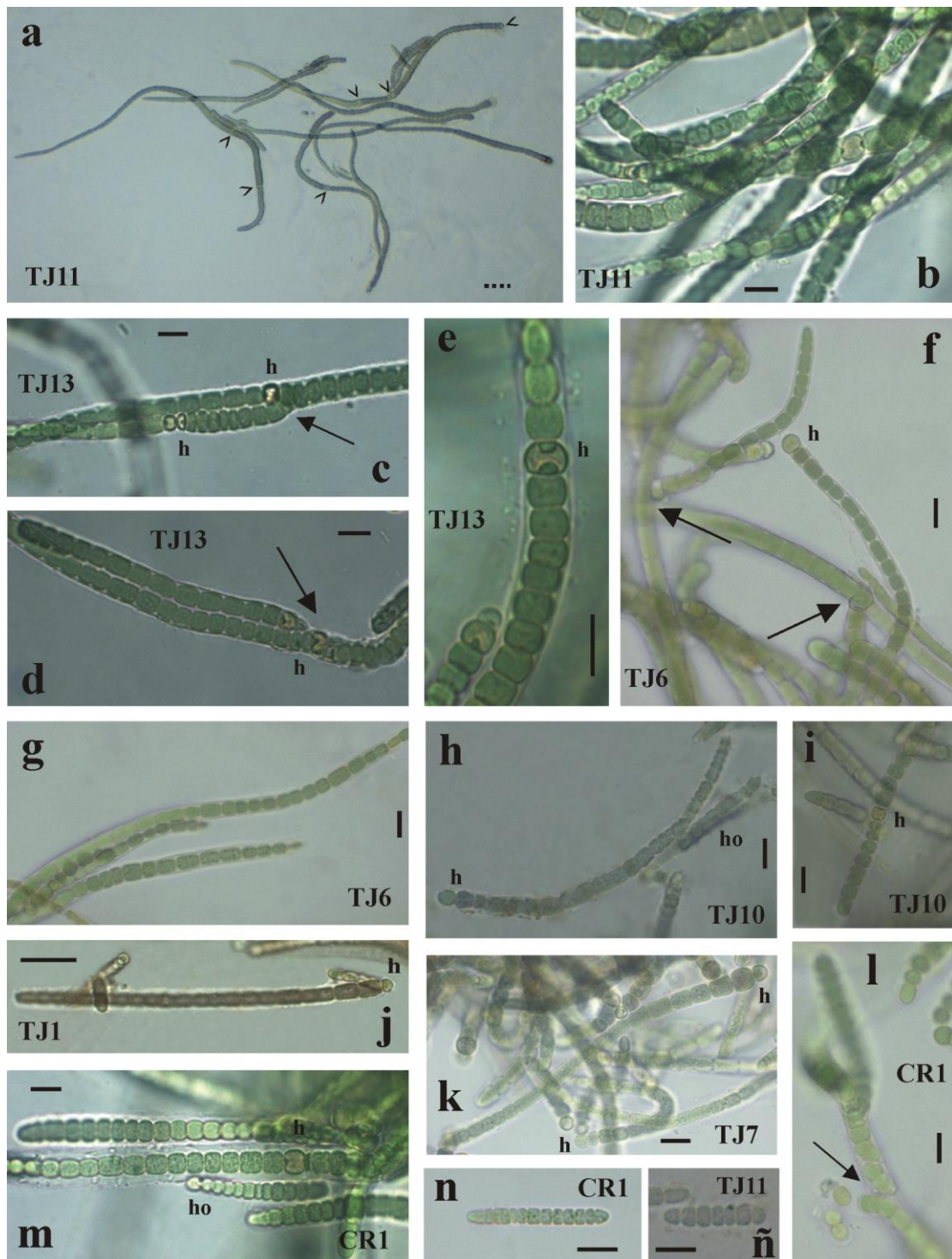


Figura 32. Microfotografías de cultivos aislados del río Tejada y arroyo Cereal identificadas como especies pertenecientes al género *Tolypothrix*, que han sido caracterizados morfológicamente durante este estudio: (a-b) diferentes filamentos de TJ11 UAM-371, donde se observan heterocistos intercalados (puntas de flecha); (c-e) filamentos maduros de TJ13 UAM-340, donde puede observarse (c-d) la formación de falsas ramificaciones; (f-g) TJ6 UAM-334; (h-i) TJ10 UAM-337; (j) TJ1 UAM333; (k) TJ7 UAM-335; (l-n) distintos filamentos de CR1 UAM-332, en las que se observa (l) la formación de una ramificación (flecha) y (n) un hormogonio; (ñ) detalle de un hormogonio de TJ11 UAM-371 [Escala barra discontinua = 50 μ m; escala barra continua = 10 μ m]. Abreviaturas: h – heterocisto; ho – hormogonio.

Todos los aislados produjeron hormogonios móviles, sin vaina, constituidos por células más pequeñas que las células de los filamentos maduros (**figura 32 m-ñ**). Ocasionalmente, se formaron gránulos en algunos cultivos viejos, como sucedió en los aislados TJ13 UAM-340 (**figura 32e**) y TJ6 UAM-334 **figura 32g**). En los filamentos maduros se observó la formación de falsas ramificaciones (**figura 32 c-d, f, l**) aunque con muy baja frecuencia si se compara con el cultivo MA11 UAM-357. Además, en ninguna de las cepas analizadas se distinguió mucílago rodeando a la colonia, ni se detectó el desarrollo de un pelo multicelular en el extremo apical de los filamentos, ni formación de acinetos.

I.1.3. Influencia del medio de cultivo en el crecimiento y características morfológicas de las cianobacterias.

A la vista de los resultados anteriores se procedió a realizar un estudio en profundidad de la incidencia de distintos medios y condiciones de cultivo, sobre el crecimiento y características morfológicas de las cianobacterias estudiadas. Para ello, en primer lugar se seleccionaron 6 cepas aisladas de diferentes ríos, todos ellos con morfotipo *Calothrix* (A1 UAM-342, A2 UAM-345, E1 UAM-302, MA14 UAM-312, MU24 UAM-305 y MU27 UAM-314), con el fin de analizar si el cambio en las condiciones de cultivo nos permitiría distinguir los géneros *Calothrix* y *Rivularia*. Una de las características distintivas descrita previamente para separar dichos géneros es la permanencia de los nuevos tricomas dentro de la vaina “materna” en el género *Rivularia*, frente a nuevos tricomas independientes para el género *Calothrix*. Por este motivo se analizó esta característica en las especies seleccionadas en los medios de cultivo: BG11₀-P y CHU10D-P, con una concentración de nutrientes diferente, especialmente de fósforo (3,4 y 0,2 mg de P.l⁻¹ para los medios BG11₀-P y CHU10D-P, respectivamente). Tras unas semanas de incubación, las cepas aisladas se observaron al microscopio para determinar la frecuencia y el tipo de falsas ramificaciones que presentaron cada una de ellas en los distintos medios de cultivo empleados.

Los resultados obtenidos mostraron que todas las cianobacterias aisladas presentaron falsas ramificaciones, si bien su presencia y/o frecuencia varió en función del medio de cultivo (**tabla 21**). En los aislados E1 UAM-302, MU24 UAM-305 y MA14 UAM-312, los nuevos filamentos se observaron mayoritariamente dentro de la vaina “materna”, característica típica de *Rivularia* y, sin embargo, en A1 UAM-342,

A2 UAM-345 y MU27 UAM-314, los nuevos filamentos fueron independientes, desarrollándose normalmente una nueva vaina, asemejándose más a las características que presentan las especies del género *Calothrix*.

Tabla 21. Frecuencia y tipo de falsas ramificaciones que presentan las diferentes cepas aisladas en distintos medios de cultivo.

| Cepas aisladas | MEDIO LÍQUIDO | |
|----------------|--|--|
| | BG11 ₀ -P | CHU10D -P |
| A1 | + Independientes | ++ Independientes |
| A2 | + Independientes | + Independientes |
| E1 | + Dentro de vaina “materna | + Dentro de vaina “materna |
| MU24 | +++ Dentro de vaina “materna” | +++ Dentro de vaina “materna” |
| MU27 | + Independientes | + Independientes |
| MA14 | +++ Dentro de vaina e independientes | + Dentro de vaina e independientes |

Posteriormente, este estudio fue ampliado a todos los aislados tipo Rivulariaceae, y ya que los primeros aislamientos fueron realizados en medios ricos en nutrientes, todos los cultivos fueron transferidos a un medio con un nivel de nutrientes más bajo, más aproximado a las características de los ríos con colonias de *Rivularia* (medio líquido CHU10D modificado – ver materiales y métodos). Al mismo tiempo, se cambiaron las condiciones de cultivo como temperatura e intensidad de luz para adecuarlas a las condiciones existentes en su medio natural.

En la **figura 33**, se observa que algunas de las cepas aisladas (MA8 UAM-355; MA14 UAM-312; MU15 UAM-369; MU24 UAM-305; MU31 UAM-349; E1 UAM-302; E7 UAM-313; E8 UAM-319; BL1 UAM-346; BL2 UAM-347) fueron capaces de adoptar características morfológicas semejantes a *Rivularia* cuando se cambiaron las condiciones de cultivo, como son: la permanencia de los tricomas secundarios dentro de la vaina “materna” (**figura 33 d-e**); vainas lameladas (**figura 33 c, h**),

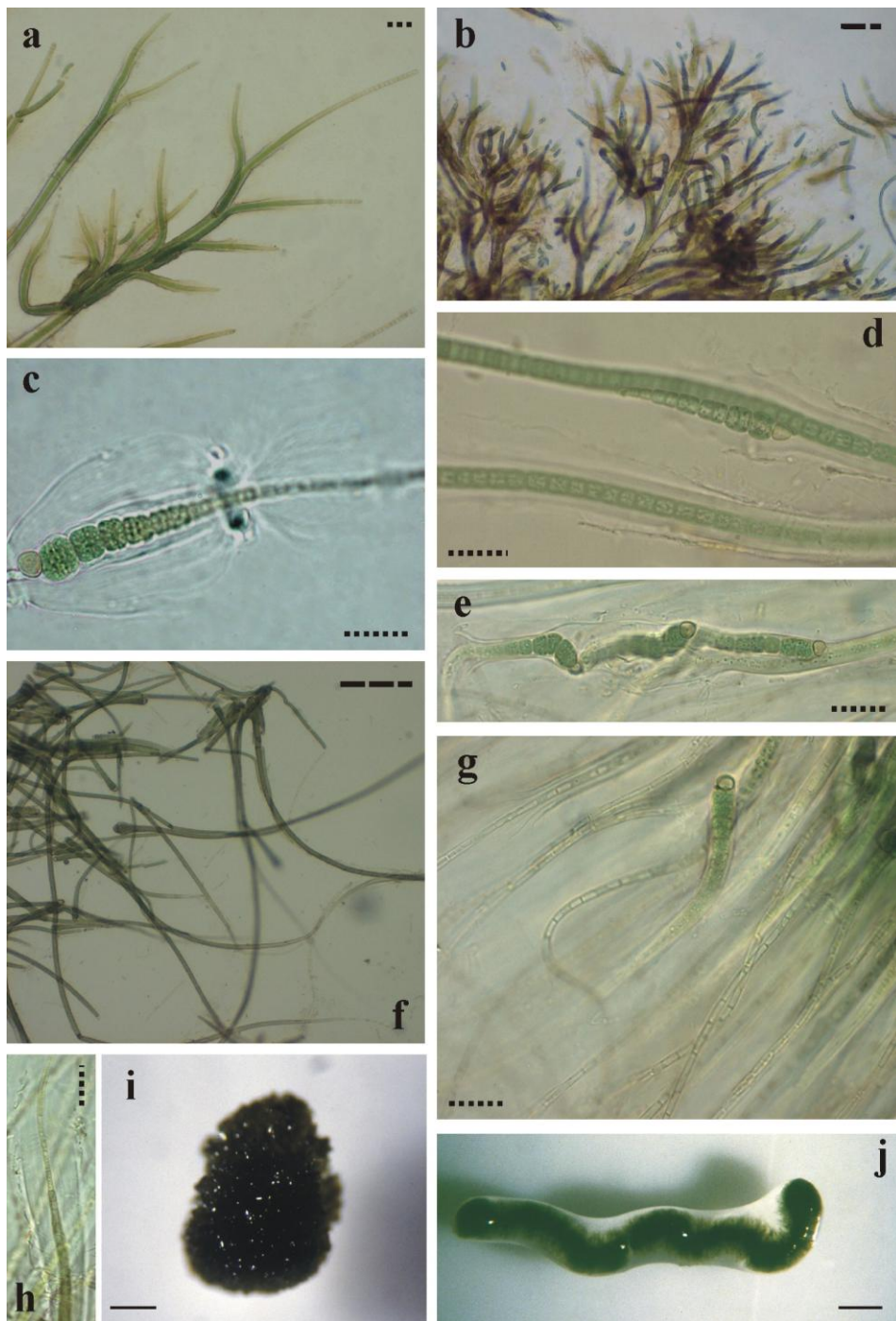


Figura 33. Morfología de algunas cepas aisladas cultivadas en medio (líquido) CHU10 modificado con un contenido bajo de nutrientes, en la que se observa: (a – e) algunas de las características típicas de las cianobacterias del género *Rivularia*: como la formación de tricomas confluentes en (a-b) MU15 UAM-369; vaina lamelada como en (c) E1 UAM-302; permanencia de los tricomas secundarios dentro de la vaina “materna” como en (d) BL2 UAM-347 y (e) MU24 UAM-305; microfotografías donde se observa el desarrollo del pelo multicelular al final del tricoma en las cepas (f) MU27 UAM-314; (g) MU24 UAM-305 y (h) BL2 UAM-347; aspecto de las colonias de (i) MU24 UAM-305 y (j) MU27 UAM-314 vistas a la lupa. [Escala barra de continua = 2 mm; escala barra discontinua = 100 μ m; escala barra de puntos = 20 μ m].

normalmente ensanchadas, bien en la parte basal o bien en la parte más distal y, tricomas confluentes (**figura 33 a, b**). Sin embargo, otras cepas aisladas (MU27 UAM-314; MU28 UAM-341; MU41 UAM-370; E16 UAM-354; E17 UAM-358; A1 UAM-342 y A2 UAM-345) mantuvieron las características morfológicas semejantes a *Calothrix* cuando las condiciones de cultivo cambiaron (**figura 33f**). Además, las colonias de las cepas aisladas correspondientes a las cepas que mostraron características típicas de *Rivularia* tendieron a ser esféricas (**figura 33i**), mientras que las cepas que presentaron características similares a *Calothrix*, formaron grupos de filamentos o paquetes de tricomas con formas irregulares en el medio de cultivo líquido (**figura 33j**). En ambos grupos se observó además el desarrollo de un pelo multicelular al final del tricoma (**figura 33 f-h**), que a veces estuvo formado por un pequeño número de células como en el caso de MU27 UAM-314 o bien fueron muy largos, superando considerablemente el tamaño del resto del tricoma en las especies con características similares a *Rivularia*, como MU24 UAM-305 y BL2 UAM-347 (**figura 33 g, h**).

Por otra parte, se llevó a cabo un estudio más detallado para evaluar la influencia del medio de cultivo en la variabilidad morfológica de *Rivularia* en placas de agar. Se seleccionaron tres tipos de medio diferentes con el fin de tener un rango amplio de concentraciones de nutrientes. Los medios empleados fueron: una versión del medio CHU10D modificado, como medio con un contenido de sal y nutrientes muy bajos ($0,2 \text{ mg P.l}^{-1}$); medio BG11₀ ($5,58 \text{ mg P.l}^{-1}$) y medio AA, como medio con concentraciones altas de nutrientes (62 mg P.l^{-1}). Cuando una única colonia natural de *Rivularia*, previamente homogeneizada y alícuotada, fue extendida en placas de agar con estos medios, se encontraron diferencias en el crecimiento y morfología (**figura 34**). Así, en el medio CHU10D bajo fósforo se observó el crecimiento de colonias hemiesféricas después de una incubación aproximada de dos meses (**figura 34 a, d-g**), sin embargo, en medio BG11₀, los filamentos se extendieron por toda la superficie, de manera similar a los cultivos de *Calothrix* (**figura 34b**) y, finalmente, en el medio Allen y Arnon (AA) con una concentración de nutrientes muy alta, *Rivularia* fue incapaz de crecer (**figura 34c**).

Los resultados obtenidos en esta investigación parecen indicar que las cianobacterias aisladas BL1 UAM-346, BL2 UAM-347, E1 UAM-302, E7 UAM-313, E8 UAM-319; MA8 UAM-355, MA14 UAM-312; MU15 UAM-369, MU24 UAM-

305 y MU31 UAM-349, pertenecen al género *Rivularia* mientras que las cepas E16 UAM-354, E17 UAM-358, MU27 UAM-314, MU28 UAM-341, MU41 UAM-370, pertenecen al género *Calothrix*, según la sistemática tradicional, demostrando que tanto las condiciones como el tipo de medio de cultivo empleado para el crecimiento y mantenimiento de las cianobacterias en el laboratorio influyen en la morfología de estas cepas, permitiendo o impidiendo el desarrollo de caracteres morfológicos importantes para su clasificación taxonómica.

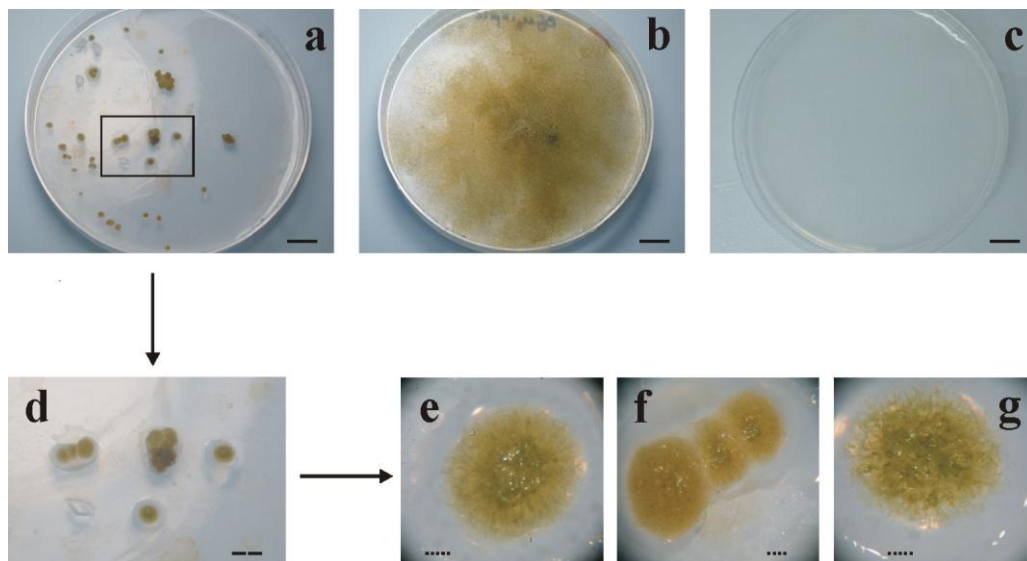


Figura 34. Influencia de diferentes medios de cultivos en el crecimiento de una colonia de *Rivularia* en placas de agar: (a) medio CHU10D modificado (Gibson y Whitton, 1987) con bajo contenido en fósforo; (b) medio BG11₀ (Rippka y col., 1979); (c) medio Allen y Arnon (AA+N) (Allen y Arnon, 1955); (d-g) detalles de diferentes colonias crecidas en medio CHU10D modificado [Escala barra de continua = 10 mm, escala barra discontinua = 5 mm; escala barra de puntos = 500 μ m].

I.2. Caracterización de muestras de campo de *Nostoc*.

Se encontraron colonias de *Nostoc* en el río Muga, distribuidas de manera dispersa en noviembre de 2005 y, más frecuentemente en marzo de 2006 (**figura 35 a, b**). Como se puede observar en las **figura 35 c-d**, las colonias aparecieron unidas a las rocas situadas en zonas de salpicadura de la cascada. Inicialmente, estas colonias fueron esféricas (morfología observada en noviembre), pero seguidamente desarrollaron una forma más irregular, con pliegues e hinchazones (**figura 35e**), convirtiéndose en vesículas huecas y blandas que llegaron a alcanzar los 2-3 cm de diámetro (marzo). Al microscopio, se observaron unos filamentos flexionados,

densamente enmarañados hacia el borde de la colonia (**figura 35f**), recubiertos de una vaina gruesa y parda en la periferia y, sin color y más fina en el centro (**figura 35h**). Estos filamentos estaban formados por células más cortas que anchas, con forma de barril, de 3-3,5 μm de ancho. Se distinguieron heterocistos subesféricos intercalados en el filamento, con unas dimensiones medias de 5,8 μm (**figura 35g**). Además, se observó la presencia de un mucílago interno blando en las colonias viejas.

Estas características morfológicas se corresponden con *N. verrucosum* [Vaucher] Borner *et* Flahault (Komárek y Anagnostidis, 1989; Whitton, 2002) y así fue identificado por el profesor B.A. Whitton (comunicación personal).

I.3. Caracterización de tapetes microbianos.

El lecho rocoso del río Muga estaba prácticamente cubierto por un tapete microbiano. Se recogieron diferentes muestras de dicho tapete en varios puntos de la zona de experimentación durante todas las campañas, para caracterizarlas morfológicamente. Generalmente, estos tapetes se localizaron en las áreas sumergidas más visibles del tramo estudiado, debajo de un flujo de agua escaso (**figura 36 a-c**), sin embargo, en primavera y verano, aparecieron sobre todo en las zonas emergidas completamente secas. Macroscópicamente, los tapetes fueron planos, algunas veces arrugados en la superficie, que por lo general, aparecieron con fuertes incrustaciones de carbonato cálcico. La parte externa de los tapetes, expuesta completamente a la luz diaria, fue de color ladrillo u otros colores rojizos. Su consistencia fue variable, distinguiéndose normalmente finas películas sobre el sustrato rocoso, aunque a veces alcanzaron un mayor grosor (2-2,5 mm) (tapete tipo A) y tapetes con una morfología tipo penacho (tapete tipo B), empleados solamente en los ensayos de actividad nitrogenásica (ver descripción en el apartado III.2).

En la **figura 36** se pueden observar los tapetes empleados en los ensayos de actividad fosfatasa. Se trataban de tapetes curtidos y planos, de 1-2 milímetros de grosor, con incrustaciones de carbonato cálcico, que en ocasiones pudieron alcanzar los 0,5 cm (**figura 36 d-e**). Cuando se examinaron estas muestras microscópicamente, se observó que contenían mayoritariamente un morfotipo, correspondiente a la cianobacteria filamentosa sin heterocistos *Schizothrix coriacea* [Kützing] Gomont. Se trataban de filamentos largos fuertemente entrelazados (**figura 36 i-j**), normalmente dispuestos en grupos de tricomas, aunque también aparecieron en solitario (**figura 36 k-l**). Los tricomas de color verde-azulado pálido, estuvieron formados por células

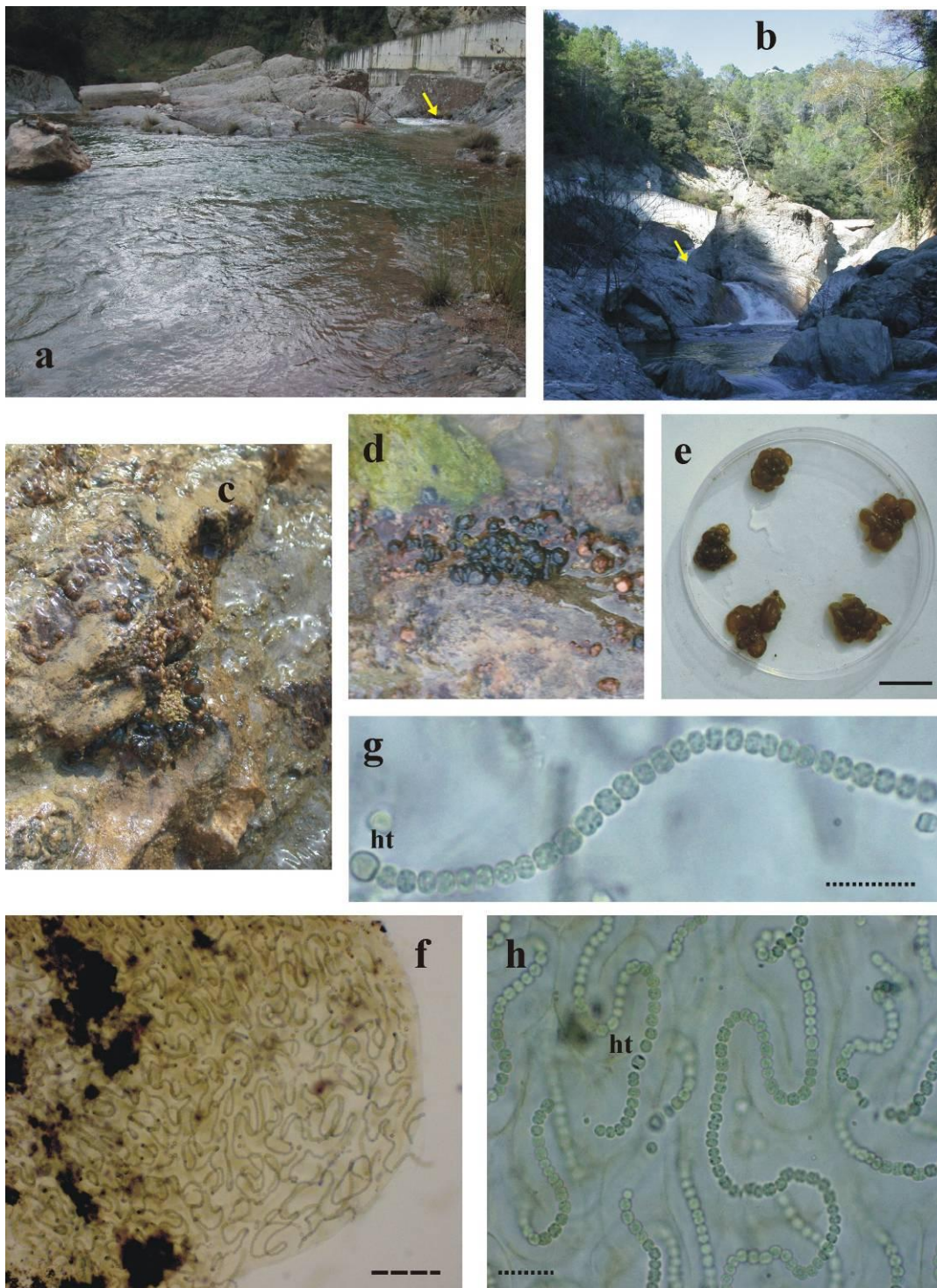


Figura 35. Fotografías de las colonias de *Nostoc* empleadas en este estudio. (a y b) Macrofotografías del área donde se encontraron las colonias de *Nostoc*; (c y d) detalle de colonias de *Nostoc* adherida a la superficie rocosa; (e) macrofotografía de las colonias de *Nostoc* empleadas en el experimento de fosfatasa realizado “*in situ*” en abril del 2006; (f-h) microfotografías de una colonia de campo de *Nostoc* realizada en noviembre del 2005 en donde se observa (f) el mucílago que rodea a la colonia y (g y h) filamentos de *Nostoc* en donde se observa la presencia de heterocistos. [Escala barra sólida = 20 mm, escala barra discontinua = 100 μ m, escala barra de puntos = 20 μ m]. Abreviatura: ht – heterocisto. Las flechas amarillas indican los lugares donde se encontraron colonias de *Nostoc*.

cilíndricas, más largas que anchas, con 1,2-2,6 μm de ancho y 4,5-5,3 μm de largo, excepto en los extremos que fueron células cónicas y puntiagudas. Las vainas fueron delgadas, firmes, no lameladas y atenuadas hacia los extremos (**figura 36 k**), normalmente sin color y con una anchura de 4,4-9,1 μm .

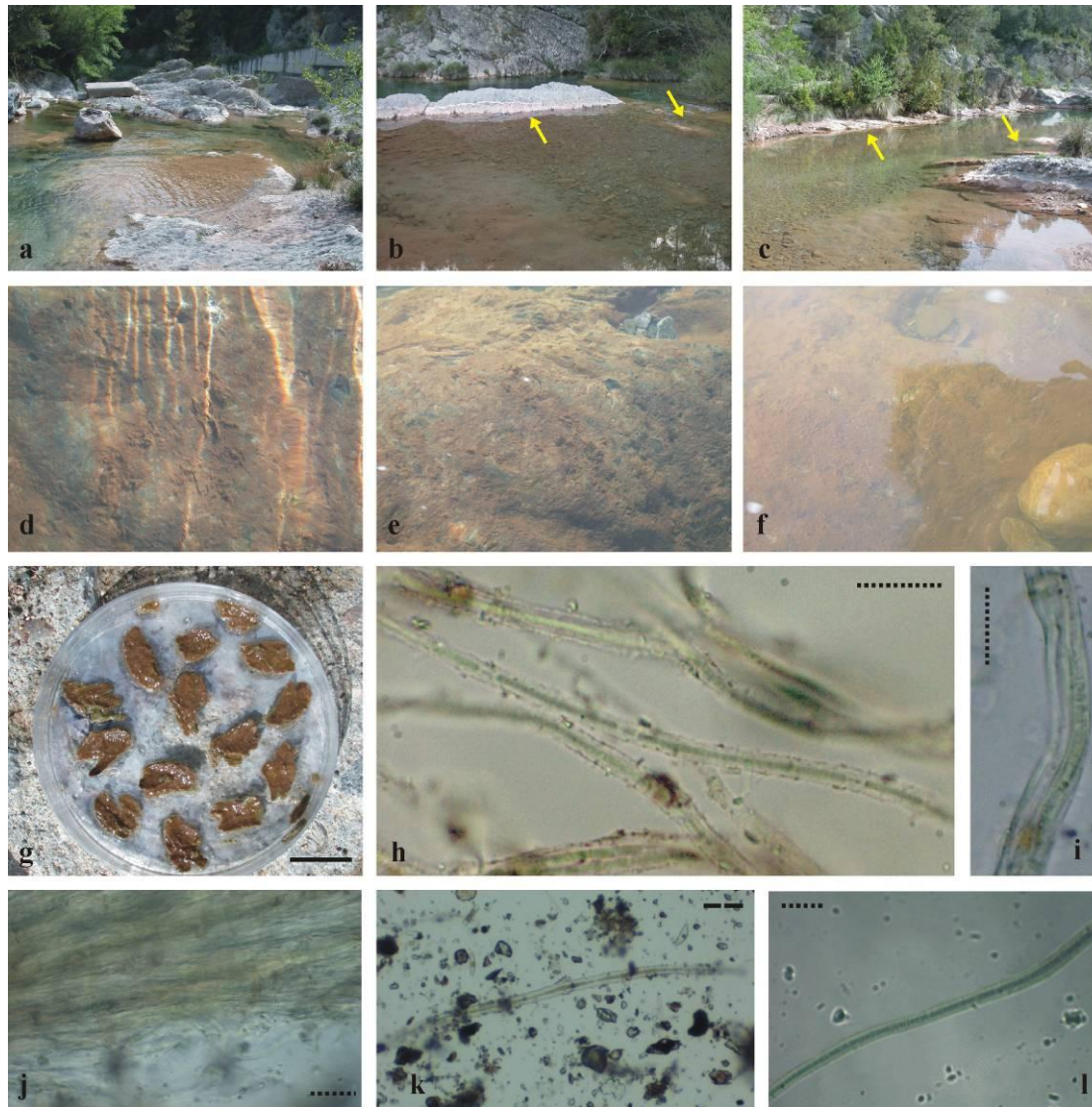


Figura 36. Fotografías de los tapetes tipo A de *Schizothrix* empleados en este estudio. (a-c) Áreas donde se encontraron los tapetes de *Schizothrix*; (d-f) detalle los tapetes de *Schizothrix* adheridos a la superficie rocosa (fotografías d y e fueron realizadas en noviembre del 2005 mientras que la fotografía fue en marzo del 2006); (g) macrofotografía de los fragmentos de tapete de *Schizothrix* empleados en el experimento de fosfatasa realizado “*in situ*” en marzo del 2006; (h-l) microfotografías de diferentes filamentos de *Schizothrix* observados en los tapetes. [Escala barra sólida = 20 mm; escala de barra discontinua = 50 μm ; escala barra de puntos = 20 μm]. Las flechas amarillas indican los lugares donde se encontraron los tapetes de *Schizothrix*.

En algunos tapetes analizados microscópicamente, se encontró de forma minoritaria, un segundo morfotipo de *Schizothrix*, caracterizado por presentar filamentos largos y entrelazados, recubiertos por una vaina gruesa, lamelada, generalmente sin color, de 7-8 μm de ancho. Como puede observarse en la **figura 36m**, estos filamentos estaban constituidos por un tricoma de color verde-parduzco, formado por células más cortas que anchas hacia los extremos y, con unas dimensiones de 3-3,5 x 3-2 μm . Además, se observaron en algunos de los tapetes recogidos en julio, filamentos de *Rivularia* y *Calothrix*, además de algunas diatomeas.

II. CARACTERIZACIÓN GÉNÉTICA DE LAS CIANOBACTERIAS Y ANÁLISIS FILOGENÉTICO.

Se caracterizaron genéticamente poblaciones naturales de cianobacterias dominantes de ríos calizos mediterráneos con dominancia de *Rivularia* (ríos Alhárabe, Blanco, Endrinales Matarraña y Muga) y de la región de Upper Teesdale en el norte de Inglaterra (arroyo Red), de los taxones descritos anteriormente (*Calothrix*, *Nostoc*, *Rivularia*, *Schizothrix* y *Tolypothrix*), así como distintas cianobacterias sin heterocistos aisladas de dichos ríos calizos y, de los ríos silíceo y calizo sin *Rivularia*, Tejada y Amir, mediante el análisis del espacio intergénico y de las regiones codificantes flanqueantes, *cpcB* y *cpcA*, del operon de la ficocianina (*cpcBA*-IGS) y, del gen que codifica para el ARN ribosómico 16S.

II.1. Caracterización genética de cianobacterias con tricomas atenuados: morfotipos *Rivularia*, *Calothrix* y *Tolypothrix*.

II.1.1. Empleo de la secuencia *cpcBA*-IGS en la caracterización de muestras naturales de *Rivularia* y especies aisladas tipo Rivulariaceae de ríos calizos con dominancia de *Rivularia*.

II.1.1.1. Análisis de la secuencia *cpcBA*-IGS por PCR y posterior secuenciación.

La secuencia nucleotídica parcial del operon de la ficocianina (*cpcBA*-IGS) se determinó en 13 aislados tipo Rivulariaceae, así como en colonias naturales de *Rivularia* de diferentes localizaciones geográficas. El alineamiento completo de la

Resultados

secuencias de *cpcBA*-IGS obtenidas con respecto a una secuencia consenso (ANEXO), mostró que todas ellas cayeron dentro de tres genotipos distintos, designados como: *cpcBA*-IGS tipo I, *cpcBA* -IGS tipo II y *cpcBA* -IGS tipo III (tabla 22). En la figura 37, se muestra el alineamiento de la región IGS, como representativo de los tres genotipos encontrados. El genotipo I se encontró en colonias naturales de *Rivularia* de los ríos Endrinales y Matarraña, y en las cepas aisladas BL1 UAM-346, BL2 UAM-347, E7 UAM-313, MU24 UAM-305, E1 UAM-302, E8 UAM-319, MA8 UAM-355 y MU15 UAM-369. El genotipo II se halló solo en los cultivos aislados

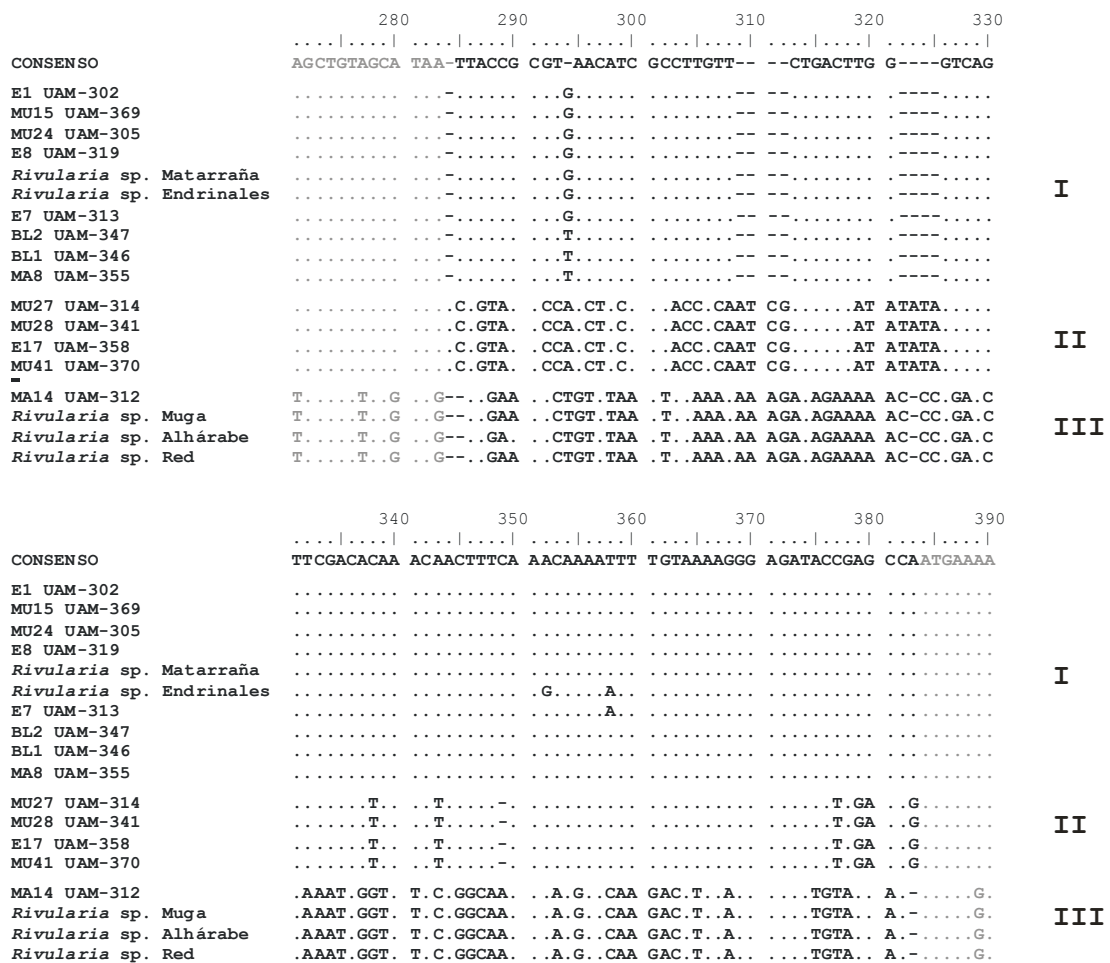


Figura 37. Alineamiento múltiple de las secuencias de la región IGS de 13 cianobacterias aisladas y muestras naturales de *Rivularia* de diferentes localizaciones geográficas examinadas en este estudio. Observad las longitudes diferentes de la región IGS: Tipo I - 91bps, Tipo II - 99 bps y Tipo III - 96 bps. Las rayas (-) representan un gap en el alineamiento, los puntos (.) representan secuencias idénticas a la secuencia consenso y los dos puntos (i) indican secciones de 10 bp. La secuencia nucleotídica de la región IGS aparece en color negro mientras que secuencias parciales de las regiones codificantes de *cpcB* y *cpcA* aparecen en color gris.

E17 UAM-358, MU27 UAM-314, MU28 UAM-341 y MU41 UAM-370 y finalmente, el genotipo III se encontró en colonias naturales de *Rivularia* de los ríos Muga y Alhárabe y del arroyo Red así como en el cultivo MA14.

Los tres genotipos mostraron la misma longitud de las regiones codificantes: 283 nucleótidos (nt) del *cpcB* y 314 nt del *cpcA*, pero difirieron en la longitud de la región IGS (91 nt en el tipo I, 99 en el tipo II, y 96 en el tipo III), de manera que la longitud total del fragmento *cpcBA*-IGS varió desde los 688 nucleótidos correspondientes al genotipo I hasta los 696 nt del genotipo II. Con respecto a la secuencia nucleotídica, las secuencias dentro de cada clase de genotipo fueron idénticas o tuvieron un alto porcentaje de similitud (**tabla 22**).

Tabla 22. Resumen de la longitud de los genotipos tipo I, II y III del locus *cpcBA*-IGS (PC-IGS), porcentaje de similitud y colonias ambientales o cultivos aislados en los que estos genotipos han sido encontrados.

| | Fragmento PC-IGS (nt) | <i>cpcB</i> (nt) | <i>cpcA</i> (nt) | IGS(nt) | % similitud | Cepas/ colonias | Nº de acceso GenBank |
|---------------------|-----------------------|------------------|------------------|---------|-------------|-----------------------------|----------------------|
| Genotipo I | 688 | 283 | 314 | 91 | 99-100 | <i>Rivularia</i> Endrinales | EU009159 |
| | | | | | | <i>Rivularia</i> Matarraña | EU009158 |
| | | | | | | BL1 UAM342 | EU009162 |
| | | | | | | BL2 UAM345 | EU009161 |
| | | | | | | E1 UAM-302 | EU009155 |
| | | | | | | E7 UAM-313 | EU009160 |
| | | | | | | E8 UAM-319 | |
| | | | | | | MA8 UAM-355 | EU009163 |
| | | | | | | MU15 UAM-369 | EU009156 |
| | | | | | | MU24 UAM-305 | EU009157 |
| Genotipo II | 696 | 283 | 314 | 99 | 97,3-100 | E17 UAM-358 | EU009167 |
| | | | | | | MU27 UAM-314 | EU009164 |
| | | | | | | MU28 UAM-341 | EU009165 |
| | | | | | | MU41 UAM-370 | EU009168 |
| Genotipo III | 693 | 283 | 314 | 96 | 99,4-100 | <i>Rivularia</i> Muga | EU009169 |
| | | | | | | <i>Rivularia</i> Alhárabe | EU009171 |
| | | | | | | <i>Rivularia</i> Red | EU009172 |
| | | | | | | MA14 UAM-312 | EU009170 |

El alineamiento de las secuencias *cpcBA*-IGS obtenidas reveló una similitud del 100% de algunas cepas aisladas con secuencias encontradas en algunas colonias de campo de *Rivularia*, lo que sugería que pertenecerían a este género. Un ejemplo de ello es MA14, cuya secuencia es idéntica a las secuencias de *Rivularia* de los ríos Muga y Alhárabe.

Cuando consideramos dentro de un genotipo, el fragmento contuvo una divergencia máxima del 1% en el tipo I, 0,3% en el tipo II, y del 0,6% en el tipo III, mientras que la divergencia en la secuencia entre los genotipos encontrados varió

desde un 13,7% (entre los genotipos I y II) hasta un 31,9% (entre los genotipos II y III), como puede observarse en la **tabla 23**. Las secuencias tipo III fueron las más divergentes con respecto a los otros tipos, con porcentajes de sustitución nucleotídica muy similares a lo largo de todo el segmento y variaciones con respecto al tipo I y tipo II del 21,9% y 21,2% en *cpcB* y del 62,2% y 66% en IGS respectivamente, y para ambos genotipos del 30,5% en *cpcA*. Las diferencias entre las secuencias del genotipo I y II fueron del 7% para *cpcB*, 38,6% IGS, y 11,7% *cpcA*.

Tabla 23. Sustituciones variables determinadas en la secuencia nucleotídica de los genotipos I, II y III.

| | Fragmento <i>cpcBA</i> -IGS | <i>cpcB</i> | <i>cpcA</i> | IGS |
|-----------------------------|-----------------------------|-------------|-------------|------|
| % divergencia I-II | 13,7 | 7 | 11,7 | 38,6 |
| % divergencia I-III | 31,5 | 21,9 | 30,5 | 62,2 |
| % divergencia II-III | 31,9 | 21,2 | 30,5 | 66 |

El alineamiento múltiple de las secuencias de la región IGS de algunas cepas representativas de este estudio y de la base de datos (**figura 38**) indicó que la secuencia nucleotídica dentro de cada genotipo se encuentra muy conservada, pero difiere claramente entre ellos, variando la longitud de la región IGS según el género analizado. Así, la gran divergencia de secuencia existente entre la región *cpcBA*-IGS de los tres genotipos hallados, indicó una clara separación taxonómica, lo que parece sugerir la pertenencia a géneros diferentes.

II.1.1.2. Análisis de la región *cpcBA*-IGS amplificada mediante RFLP.

Con el fin de analizar la posibilidad de que las cianobacterias estudiadas presentasen una o varias copias del operón de la ficocianina, tal y como se había descrito previamente para los géneros *Tolypothrix* (Mazel y col., 1988) y *Pseudanabaena* (Dubbs y Bryant, 1993), se llevó a cabo el análisis de dicha región *cpcBA*-IGS, mediante el análisis del polimorfismo de la longitud de los fragmentos de restricción del ADN (RFLP).

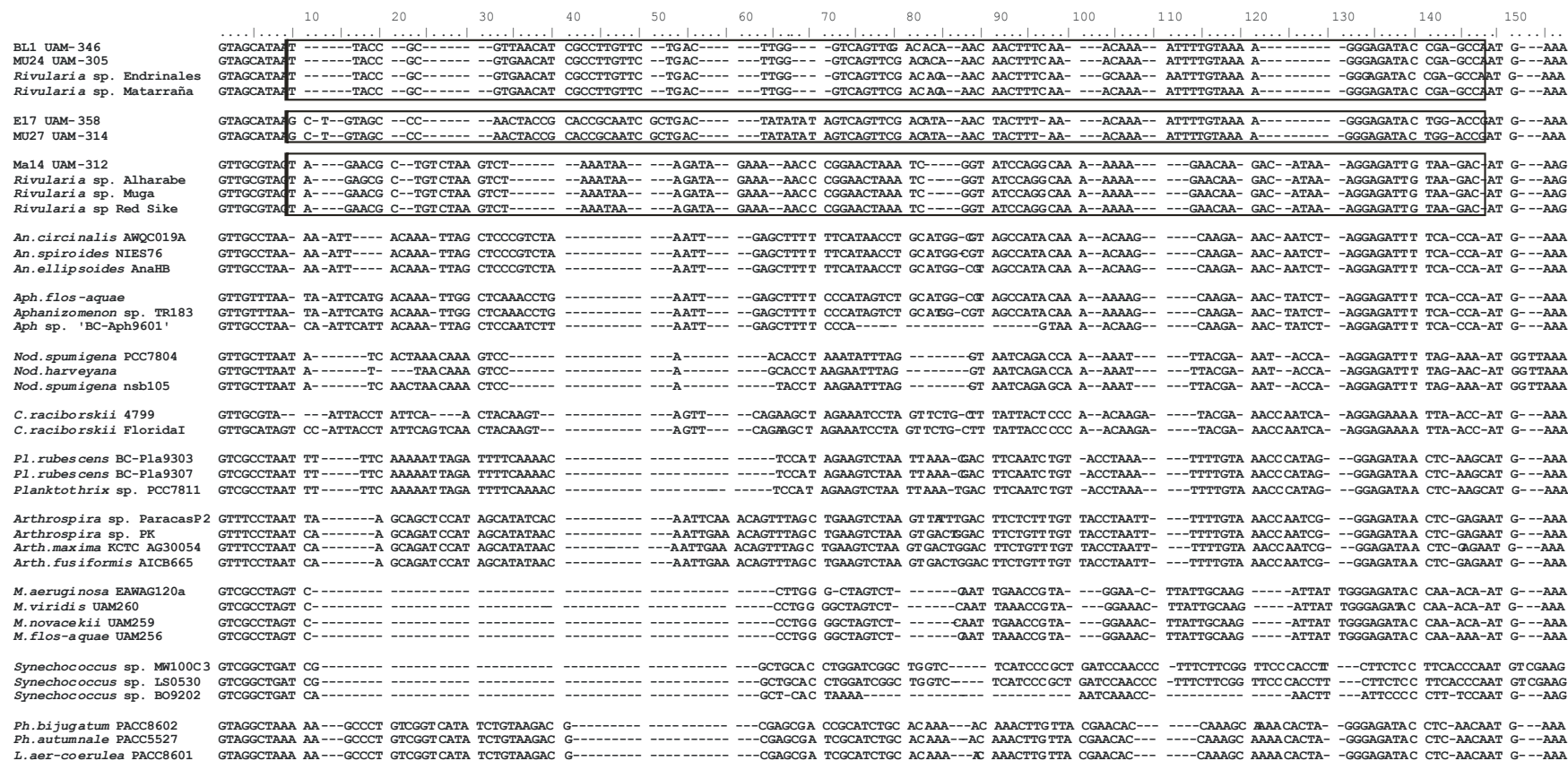


Figura 38. Alineamiento múltiple de secuencias con respecto a una secuencia consenso generada por el programa BioEdit (Hall,1999) de la región IGS de distintas especies aisladas y muestras naturales de *Rivularia* analizadas en este estudio, comparado con miembros de otros géneros cianobacterianos. Observad las longitudes diferentes de la región IGS. Las rayas (-) representan un gap en el alineamiento, los puntos (.) representan secuencias idénticas a la secuencia consenso y los dos puntos (i) indican secciones de 10 bp. Las secuencias correspondientes a IGS de los genotipos I, II y III del estudio aparecen encerradas en las cajas.

Resultados

Se emplearon de forma separada, cuatro enzimas de restricción tipo endonucleasa (*Ase I*, *Alw NI*, *Hind III*, y *Ava I*) para las digestiones de los productos de PCR, los cuales produjeron patrones de restricción específicos para cada genotipo encontrado. Dependiendo del enzima de restricción empleado, el patrón de RFLP obtenido fue distinto, aunque todos ellos presentaron 2 bandas con un tamaño entre 98 y 585 bp. El enzima *Ase I* digirió la secuencia tipo I en dos fragmentos de 455 nt y 216 nt, pero no se obtuvo ningún fragmento en la digestión de los secuencias tipo II o tipo III. *Alw NI* digirió solo secuencias del tipo II produciendo dos fragmentos de 410 nt y 280 nt, mientras que *Hind III* y *Ava I* digirieron secuencias tipo II y tipo III, aunque se originaron fragmentos de diferente longitud (**tabla 24**) con cada uno de ellos.

Tabla 24. Longitud (en pares de bases) de los fragmentos obtenidos de la digestión de las secuencias amplificadas por diferentes enzimas de restricción.

| Tipo de secuencia | Enzima de restricción | | | |
|---------------------|-----------------------|---------------|---------------|--------------|
| | <i>Hind III</i> | <i>Ava II</i> | <i>Alw NI</i> | <i>Ase I</i> |
| Genotipo I | - | - | - | 455 216 |
| Genotipo II | 490 200 | 370 320 | 410 280 | - |
| Genotipo III | 570 114 | 585 98 | - | - |

Como puede observarse en la **figura 39**, los patrones de digestión para los cultivos aislados de cianobacterias correspondientes a cada genotipo, consistieron en un solo patrón esperado para cada enzima (**figura 39 a-b**), sugiriendo que solo un operon esta presente o bien que los operones duplicados son casi idénticos. Sin embargo, cuando se analizaron las poblaciones naturales de *Rivularia* mediante RFLP, se encontraron colonias, como las del río Alhárabe, con un patrón correspondiente a un sólo genotipo, el tipo III (**figura 39c**), mientras que otras colonias mostraron al menos dos genotipos distintos, sugiriendo la existencia de diversidad genética dentro de una misma colonia. Ejemplos de ello, fueron las colonias de *Rivularia* del río Matarraña (**Figura 39d**) con los tres genotipos hallados y del río Muga (**figura 39e**), con el genotipo 2 y 3.

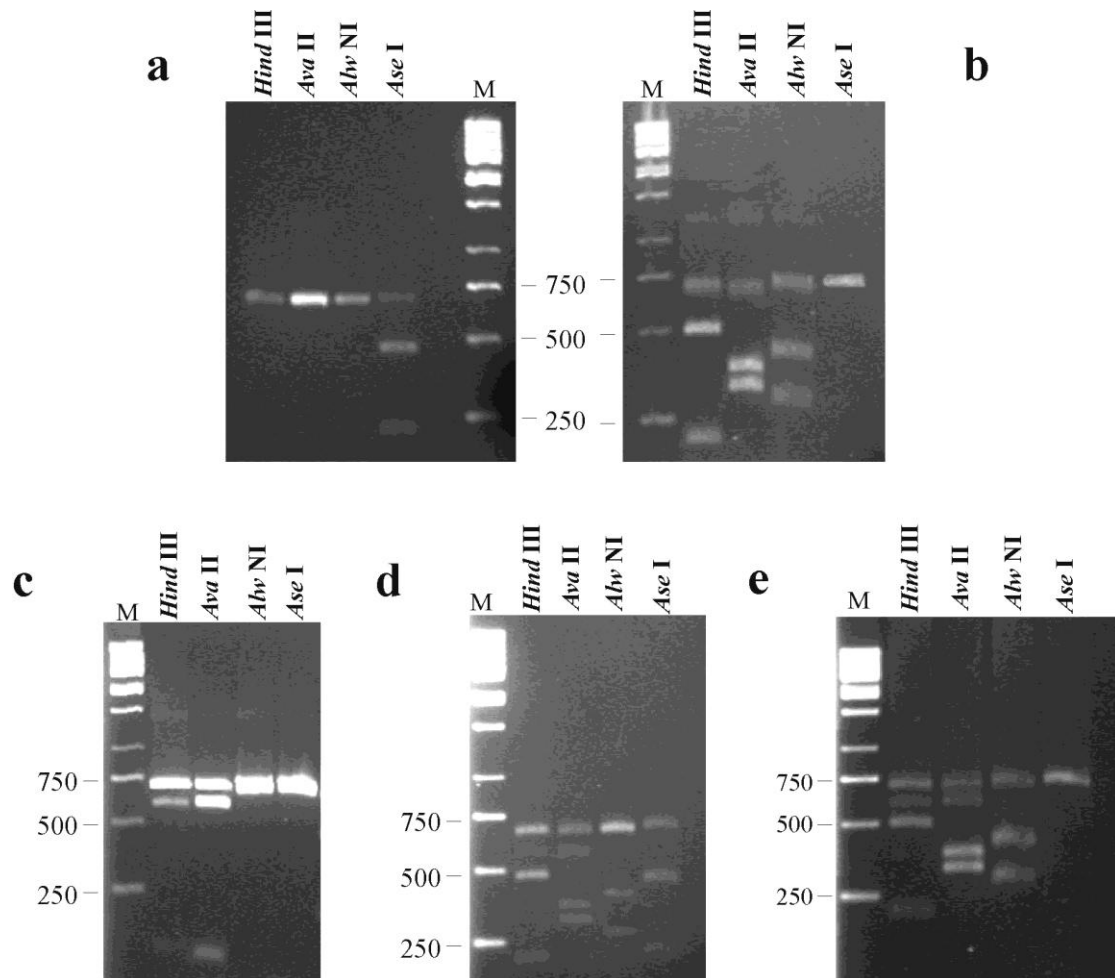


Figura 39. Patrón de digestión obtenido de la digestión con diferentes enzimas de restricción de los fragmentos amplificados por PCR de la región *cpcBA-IGS* de (a-b) cultivos aislados: (a) cepa E1 UAM-302, (b) cepa MU27 UAM-314 y (c-e) colonias de campo de *Rivularia* procedentes del: (c) río Alhárabe, (d) río Matarraña y (e) río Muga. M: marcador de peso molecular (bp); Carril 1 – digestión con la enzima de restricción *Hind* III; Carril 2 – digestión con *Ava* II; Carril 3 – digestión *Alw* NI y Carril 4 – digestión con *Ase* I

II.1.1.3. Análisis mediante TGGE de la región *cpcBA-IGS* amplificada.

Con el fin de confirmar los resultados obtenidos en las colonias naturales de *Rivularia* y en las cepas aisladas, se llevó a cabo electroforesis en geles desnaturizantes con gradiente térmico (TGGE), basándose en el hecho de que fragmentos de PCR del mismo tamaño pero con secuencia diferente pueden ser separados (Muyzer y Smalla, 1998).

Para este análisis se ha empleado secuencias específicas clonadas de las cepas o colonias (confirmadas por secuenciación) como marcadores correspondientes a los tres genotipos hallados. Los productos de PCR de cada genotipo se clonaron en un vector comercial con el fin de asegurar que, solo un fragmento podía estar inserto en el vector, y por tanto, solo una copia podía aparecer al resolverse el gel. Debido a la

alta variabilidad de secuencia existente entre los tres genotipos encontrados, se visualizaron tres bandas claramente separadas, permitiéndonos caracterizar cada genotipo por su correspondiente huella genética (**figura 40**).

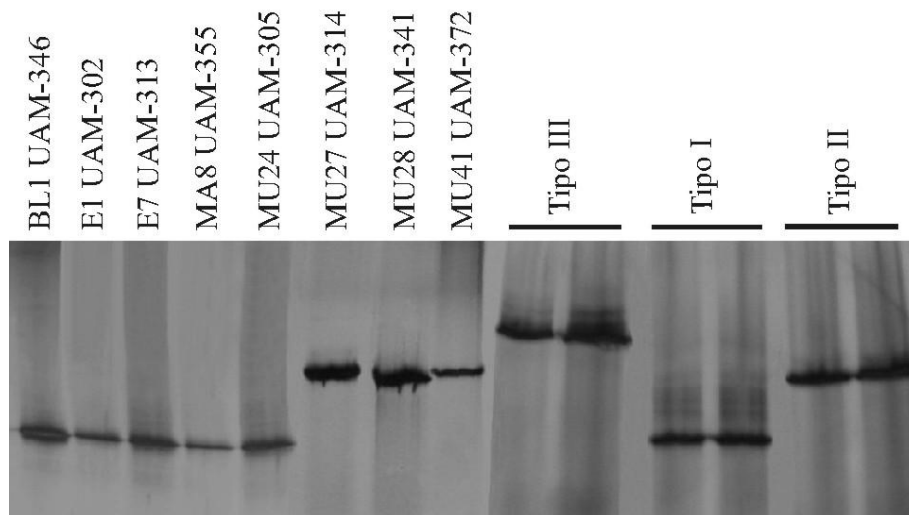


Figura 40. Análisis mediante electroforesis en geles desnaturalizantes por gradiente térmico (TGGE) de los productos amplificados por PCR de la región *cpcBA*-IGS de distintos representantes de cepas aisladas de ríos calizos mostrando una sólo banda. Tipo I, II y III corresponden a los productos de PCR clonados de la región *cpcBA*-IGS de los genotipos I, II, III respectivamente, previamente secuenciados.

El análisis por TGGE de las cepas aisladas de ríos calizos con *Rivularia* mostró una única banda para cada cultivo, demostrando el hecho de que estas cepas disponen de una sola copia del operon o bien que los operones duplicados son casi idénticos. Además, estas bandas fueron coherentes con su correspondiente huella genética, confirmándose de este modo los resultados obtenidos en el análisis por RFLP de esta región.

Para el análisis por TGGE de colonias naturales de *Rivularia*, se caracterizaron morfológicamente muestras de diferentes localizaciones geográficas. Así, se examinaron colonias grandes recogidas del río Alhárabe, con una textura muy suave que contenía claramente *Rivularia* tipo *R. biasolettiana* (**figura 41 a-c**). También se examinaron colonias hemisféricas altamente calcificadas y con una zonación obvia (**figura 41 d-f**) del río Endrinales, del tipo *R. haematites*. Sin embargo, algunas colonias mostraron una morfología ambigua tanto macroscópica como microscópica, existiendo gran heterogeneidad entre los tricomas de *Rivularia*, e incluso entre los tricomas de una misma colonia (**figura 41 g-j**). Además, se visualizaron ocasionalmente tricomas de *Calothrix* dentro de algunas de las colonias (**figura 41n**).

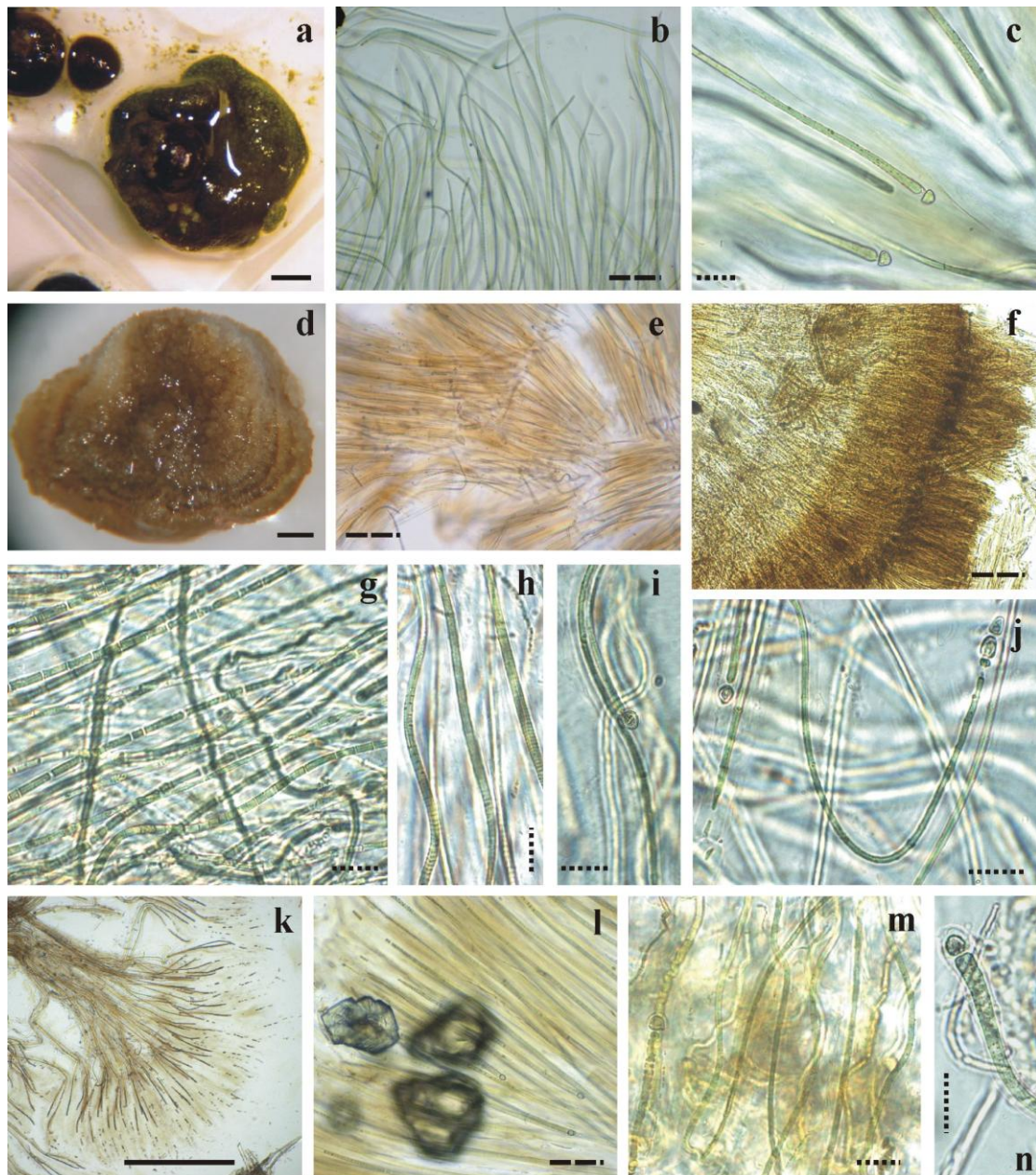


Figura 41. Microfotografías de las colonias de campo de *Rivularia* empleadas en los análisis de la región *cpcBA*-IGS mediante TGGE, en las que se muestra variabilidad morfológica: (a–c) colonia de *Rivularia* del río Alhárabe, tipo *R. biasoletiana*; (d–f) colonia de *Rivularia* del río Endrinales, tipo *R. haematites*; (g–j) diferentes tricomas encontrados en una única colonia del río Matarraña; (k) colonia de *Rivularia* del río Blanco; (l) colonia de *Rivularia* del río Matarraña, tipo *R. haematites*; (m) colonia de *Rivularia* del arroyo Red; (n) filamento de *Calothrix* encontrado en una colonia de *Rivularia* del río Muga [Escala barra continua = 0,5 mm, escala barra discontinua = 100 μ m, escala barra de puntos = 20 μ m].

Así, se observó mediante TGGE que muchas de las colonias analizadas presentaron al menos dos bandas distintas (**figura 42**), correspondientes cada una de ellas con un alelo o genotipo diferente. Las colonias recogidas en el arroyo Red y en el río Alhárabe (**figura 41 b-c**), claramente del tipo *R. biasolettiana*, presentaron un patrón que se correspondió con el genotipo III. Las colonias del río Endrinales, típicamente *R. haematites* (**figura 41 e-f**), con una calcificación muy alta y con zonas distintivas en el interior, mostraron un patrón de bandas que coincidió con el del genotipo I, aunque también se distinguió una banda correspondiente al genotipo II. Las colonias del río Blanco (**figura 41k**) presentaron dos bandas claras que se correspondieron con los genotipos I y III, al igual que una colonia del río Matarraña (**figura 41 g-j**). Sin embargo, otra colonia del mismo río mostró un patrón diferente con genotipos II y III. Por último, dos colonias del río Muga mostraron un patrón similar que se correspondió con el genotipo III, aunque se pudo observar una banda difusa correspondiente al genotipo II (**figura 42**). Estos resultados confirmaron los resultados previos que indicaban que incluso dentro de una colonia de *Rivularia* puede haber diversidad genética. Además, no se puede descartar la posibilidad de que puedan ser amplificados otros tricomas dentro de la colonia, como esos *Calothrix* encontrados algunas veces, (**figura 41n**) y, que podrían corresponderse con el genotipo II que aparece en los geles como bandas difusas (**figura 42**).

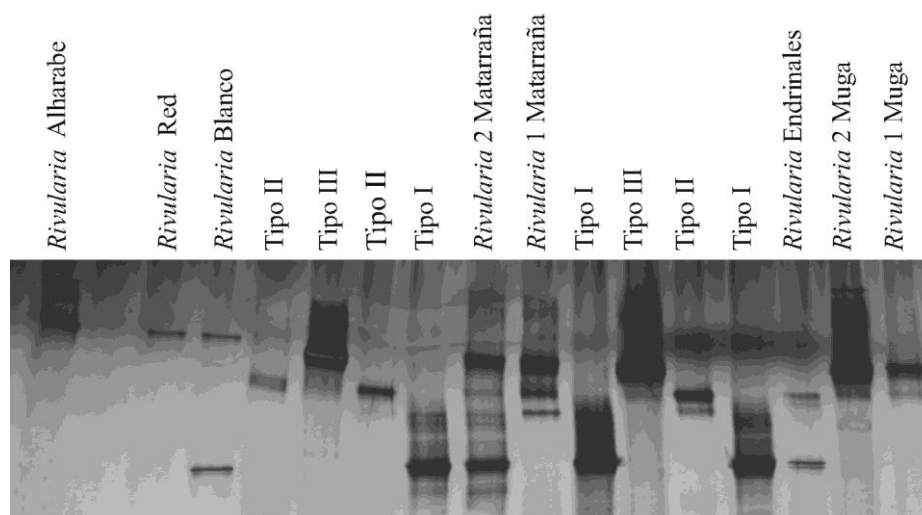


Figura 42. Análisis mediante electroferesis en geles desnaturalizantes por gradiente térmico (TGGE) de los productos amplificados por PCR de la región *cpcBA*-IGS de poblaciones naturales de *Rivularia*. Tipo I, II y III corresponden a los productos de PCR clonados de la región PC-IGS de los genotipos I, II, III respectivamente, previamente secuenciados.

II.1.1.4. Análisis filogenético de las secuencias obtenidas.

El análisis filogenético de las secuencias nucleotídicas del *cpcBA*-IGS mediante los métodos de neighbor-joining (NJ), maximum parsimony (MP) y maximum likelihood (ML) produjo una topología del árbol similar y confirmaron la distribución diferente de los tres genotipos hallados (**figura 43**), representándose sólo el correspondiente al método de NJ. El genotipo I formó un grupo de diez secuencias, de las cuales dos fueron de colonias naturales de *Rivularia* (del río Matarraña y Endrinales) y ocho de cultivos aislados. El segundo grupo contuvo a cuatro secuencias de cepas aisladas correspondientes con el genotipo II y finalmente, cuatro secuencias de muestras ambientales de *Rivularia* y, una cepa aislada (MA14) formaron el tercer grupo correspondiente con el genotipo III (**figura 43**). Los genotipos I y II se encontraron juntos en un grupo bien sustentado por unos valores de bootstrap altos (100/99/98 para los análisis de NJ, MP y ML, respectivamente). Sin embargo, el genotipo III se encontró más distanciado de éstos y, al igual que los anteriores genotipos, estuvo sustentado por valores de bootstrap altos. Por otra parte, las secuencias de los tres operones de *Tolypothrix* sp. PCC7601 se agruparon en otra rama del árbol con valores de bootstrap más bajos.

II.1.2. Empleo de los genes que codifican para el ARNr 16S para la caracterización de muestras naturales de *Rivularia* y cepas tipo Rivulariaceae aisladas de ríos calizos con dominancia de *Rivularia*.

II.1.2.1. Análisis de la secuencia de ADNr 16S por PCR y posterior secuenciación.

Se amplificó un fragmento de aproximadamente 660 bp del gen ARNr 16S de poblaciones naturales de *Rivularia* y cultivos aislados tipo Rivulariaceae. Las secuencias de ARNr 16S obtenidas en este estudio, se depositaron en la base de datos del GenBank con los números de acceso EU009142 al EU009154. Posteriormente, se determinó en un representante de cada genotipo (correspondiente a los análisis del locus *cpcBA*-IGS) la secuencia casi completa de ADNr 16S (1444-1445 bp).

El alineamiento múltiple de las secuencias de ADNr 16S obtenidas con respecto a una secuencia consenso (**ANEXO**) mostró resultados similares a los obtenidos para el fragmento *cpcBA*-IGS, de forma que todas ellas cayeron dentro de tres genotipos distintos, designados como: genotipo I, genotipo II y genotipo III. El genotipo I se encontró en una colonia natural de *Rivularia* del arroyo Red, y en las cepas aisladas

BL1 UAM-346, BL2 UAM-347, E7 UAM-313, MU24 UAM-305, E1 UAM-302, E8 UAM-319, MA8 UAM-355 y MU15 UAM-369. El genotipo II se halló en los cultivos aislados MU27 UAM-314, MU28 UAM-341 y MU41 UAM-370 y finalmente, el genotipo III se encontró en una colonia natural de *Rivularia* del río Alhárabe. Tanto las cepas como de las colonias de *Rivularia* que presentaron genotipo III mostraron una clara divergencia con respecto a los genotipos I y II. Entre el genotipo III y II se encontró solo un 89.3 % de similitud en la secuencia génica del ARNr 16S, mientras que la semejanza entre los genotipos III y I varió entre el 90.6% y el 91.1%. Por otro lado, la similitud de la secuencia entre los genotipos I y II se extiende desde el 93,3% al 94,3%.

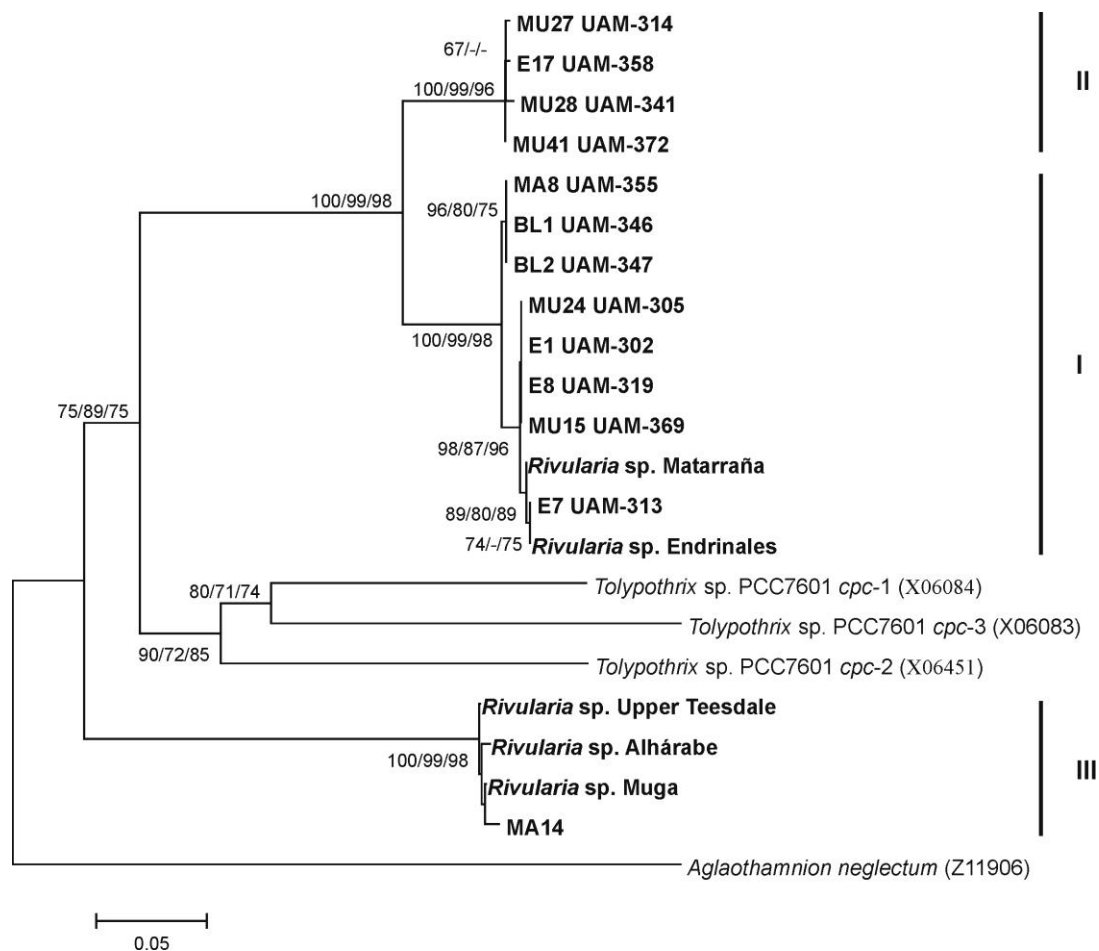


Figura 43. Árbol filogenético de las secuencias de la región *cpcBA-IGS* (698 bp) construido por el método de neighbour-joining, empleando la matriz para el cálculo de la distancia establecida por el modelo de Tajima-Nei (Tajima y Nei, 1982) del programa MEGA versión 4 (Tamura y col., 2007). Las secuencias determinadas en este estudio aparecen en negrita. El número que aparece en los internodos de las ramas indica el valor de bootstrap (Felsenstein, 1985) determinado para 1000 replicas en los análisis de neighbour-joining (NJ), maximum-parsimony (MP) y maximum-likelihood (ML) y sólo los valores de bootstrap mayores de 65% se muestran. I-genotipo tipo I; II-genotipo tipo II; II-genotipo tipo III. Los números de acceso de las secuencias empleadas para la construcción de este árbol filogenético se indican después del nombre del taxón.

II.1.2.2. Análisis filogenético de las secuencias obtenidas.

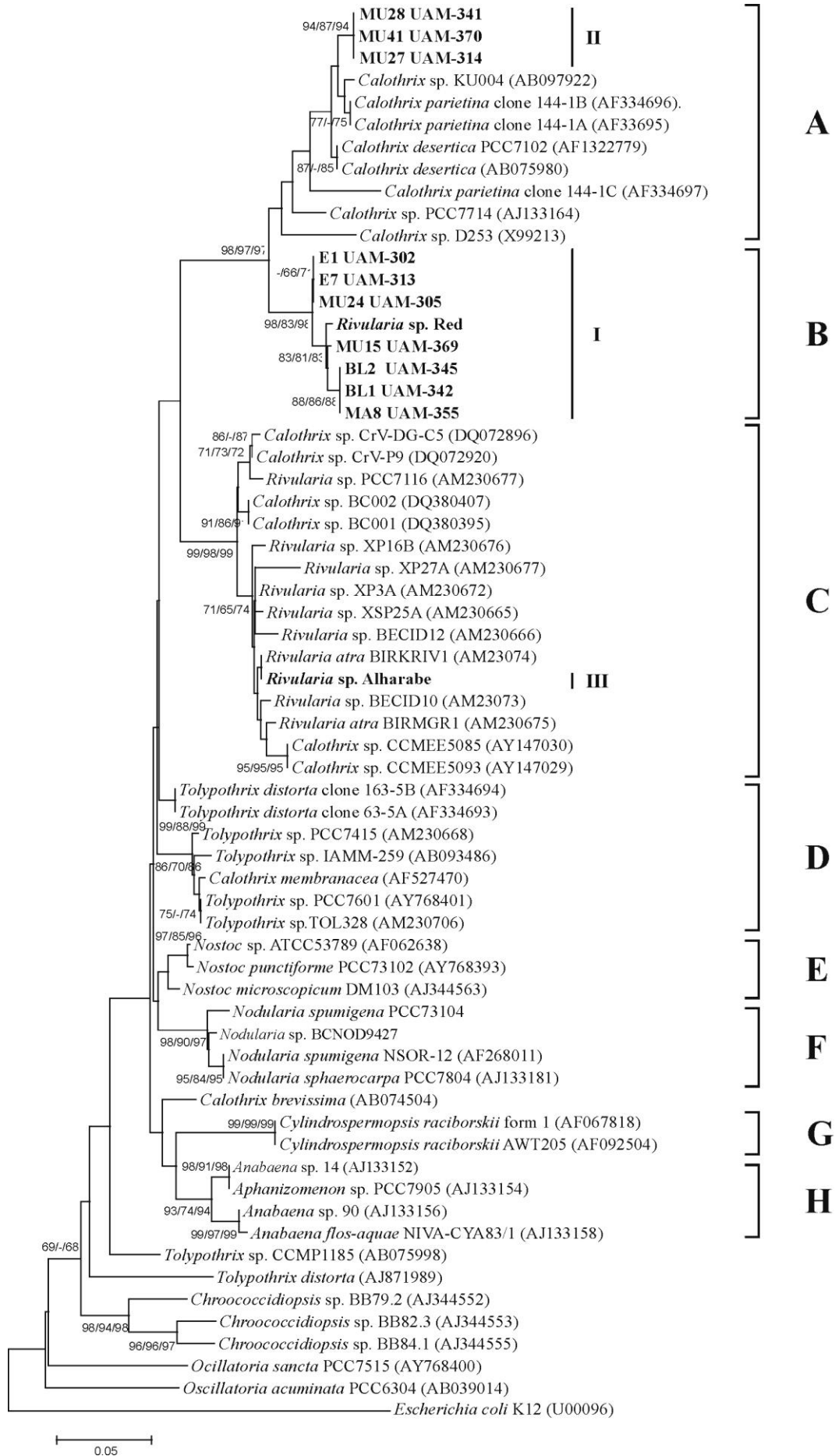
Para discutir la posición filogenética de las Rivulariaceae dentro de la radiación cianobacteriana, las secuencias de ADNr 16S obtenidas en este estudio junto con las secuencias recientemente publicadas de *Rivularia* y *Calothrix* de las bases de datos (**figura 44**), se compararon con representantes de otros géneros de Nostocales, por ejemplo, cepas de los géneros de *Tolypothrix*, *Nostoc*, *Nodularia*, *Cylindrospermopsis*, *Anabaena* y *Aphanizomenon*, además de algunas cianobacterias relacionadas lejanamente, como cepas de *Chroococciopsis* y *Oscillatoria*.

Las secuencias tipo Rivulariaceae de este estudio junto con otras de las bases de datos formaron un grupo, separado de otras cianobacterias. Este grupo se dividió en tres subgrupos (A, B, C) (**figura 44**) en los cuales se incluyeron los genotipos II, I, y III, respectivamente. Los grupos E, F y G contenían cianobacterias pertenecientes a los géneros *Nostoc*, *Nodularia* y *Cylindrospermopsis*, respectivamente y grupo H incluía especies de *Anabaena* y *Aphanizomenon*.

El grupo A estaba formado por tres secuencias idénticas correspondientes al genotipo II de este estudio: tres cepas (MU27 UAM-314, MU28 UAM-341 y MU41-370) del río calizo Muga, así como otras secuencias de *Calothrix* de las bases de datos. Estas incluyeron dos secuencias de *C. parietina*, las cuales mostraron un 98.8% de similitud con las cepas del genotipo II, dos cepas de *C. desertica* (98% similares), *Calothrix* D253, originalmente clasificado como *C. vigueri*, y *Calothrix* PCC7714, originalmente clasificado como *C. marchica* (96% y 95.6% de similitud, respectivamente). Un tercer clon de *C. parietina* fue también incluido en el grupo pero sólo tuvo un 93.5% de similitud. La mayor similitud en este grupo de cepas correspondientes al genotipo II fue del 98.8% con *C. parietina*, una especie también encontrada frecuentemente en muestras de campo.

El grupo B altamente soportado contiene solo secuencias de cultivos aislados, y una colonia de campo de *Rivularia* del arroyo Red, obtenidas en este estudio, correspondientes con el genotipo I, con unas similitudes del 98.8% al 100 %.

Figura 44. Árbol filogenético de las secuencias del gen ARNr 16S de colonias naturales de *Rivularia* y cultivos tipo Rivulariaceae aislados de ríos calizos con dominancia de *Rivularia*. Este árbol se construyó por el método de neighbour-joining mediante el programa MEGA v4 (Tamura y col., 2007). Las secuencias determinadas en este estudio aparecen en negro. Los valores de bootstrap (Felsenstein, 1985) para los análisis de NJ/MP/ML se determinaron para 1000 replicas y se muestran sólo los valores mayores de 65%. I-Genotipo I; II-Genotipo II; III-Genotipo III. Los n° de acceso de las secuencias empleadas para la construcción de este árbol filogenético se indican después del nombre del taxón →



El grupo C comprende secuencias de los géneros *Calothrix* y *Rivularia*, e incluye la secuencia de *Rivularia biasolettiana* del río Alhárabe correspondiente al genotipo III de este estudio. Esta secuencia de *Rivularia* presenta la similitud máxima del 99.9% (1384 bp) con *R. atra* BIRKRIVI, un 99.2% con la otra secuencia de *R. atra*, y una similitud mínima del 97.3% con *Rivularia* PCC7116. La especie más divergente en este grupo C fue *Rivularia* PCC 7116 variando entre una similitud del 96% al 97.5%.

II.1.3. Empleo de la secuencia *cpcBA*-IGS en la caracterización de *Calothrix* y *Tolypothrix*.

II.1.3.1. Análisis de la secuencia *cpcBA*-IGS por PCR y posterior secuenciación.

Para completar el estudio se determinó la secuencia nucleotídica de *cpcBA*-IGS en especies cianobacterianas (**tabla 20**) aisladas de ríos síliceos o calizos donde no crecía *Rivularia*, que presentaron morfotipos *Calothrix* y *Tolypothrix*, mediante amplificación por PCR de esta región y posterior secuenciación.

El alineamiento completo de las secuencias de *cpcBA*-IGS obtenidas en los cultivos morfotipo *Calothrix* con respecto a una secuencia consenso (**ANEXO**) mostró que las secuencias obtenidas en los aislados presentaron regiones codificantes con la misma longitud (**tabla 25**): 283 nucleótidos (nt) del *cpcB* y 314 nt del *cpcA*. La longitud de la región IGS varió en gran medida, desde los 90 bp de TJ16 UAM-374 hasta las 119 bp de A1 UAM-342. La longitud total del fragmento *cpcBA*-IGS varió desde los 687 nucleótidos correspondientes a la cepa TJ16 UAM-374 hasta los 716 nt de A1 UAM-342. En la **figura 45**, se muestra el alineamiento de la región IGS, como representativo de los genotipos encontrados.

Con respecto a la secuencia nucleotídica, las secuencias tuvieron generalmente un bajo porcentaje de similitud entre ellas, variando desde el 69,7% (entre A1 UAM-342 y A2 UAM-345) hasta el 80,4% (entre A1 UAM-342 y TJ16 UAM-374) (**tabla 26**), excepto TJ12 UAM-372 y TJ15 UAM-373 con una similitud del 100%.

La comparación de las secuencias obtenidas con secuencias publicadas en el GenBank mostró una similitud del 77-75 % con especies de los géneros *Anabaena* y *Nodularia*, debido a que hasta el momento no existen disponibles en las bases de datos secuencias del operon de la ficocianina para el género *Calothrix*. Además, algunas de ellas como TJ16 UAM-374 y TJ15 UAM-373 presentaron una similitud

Resultados

parcial del 78% con las regiones codificantes *cpcB* y *cpcA* de la cepa *Tolypothrix* sp. PCC7601.

| | | | | | |
|--------------|------------------------|-------------|-------------|-------------|-------------|
| | 280 | 290 | 300 | 310 | 320 |
| CONSENSO | | | | | |
| TJ12 UAM-372 | TGCTGTTGCA TAATTTT--- | ---T-C-AGT | TTAAAT---- | -C--ACC--G | |
| TJ15 UAM-373 |AT.. ..GC.G--- | ---,----- |C.AC-- | -.GC....- | |
| TJ14 UAM-352 |AT.. ..GC.G--- | ---,----- |C.AC-- | -.GC....- | |
| TJ16 UAM-374 |A.--- | ---.T.GCTC |GC--- | -----A | |
| A1 UAM-342 | A..A..... | -----TA..C | AA..GC---- | ----- | |
| A2 UAM-345 | A..A..... | ..G...AAT | CTT.T.A... | ..G...TTTT | T.AA...AA. |
| | | ..G.AGAA-- | ---CA.TGTC | GC.G.AC--- | -----GTC |
| | 330 | 340 | 350 | 360 | 370 |
| CONSENSO | | | | | |
| TJ12 UAM-372 | -AA----CTG AC-AT---T- | GTCAGTTAGA | CATAAA-AAC | TTT--AAACA | |
| TJ15 UAM-373 | C..TCG-... ..T..ATA.A |C.. |CT.. | ---..... | |
| TJ14 UAM-352 | C..TCG-... ..T..ATA.A |C.. |CT.. | ---..... | |
| TJ16 UAM-374 | TG..TTAA... ..-GATTT.G | A.....A. | ...CCC.T | .A.CA..CA. | |
| A1 UAM-342 | C..GCAC... ..G..TGT-- | ---C.... | ---...T.G. | ...TC.... | |
| A2 UAM-345 | T..GTGA... ..AG.TGT.G |A..... | A...T.G. | ...G-..... | |
| | T..GTAGAGA | TAA.AAGACC | CGG.ACCGA. | A..C.GT.T. | CAGGC...A. |
| | 380 | 390 | 400 | 410 | 420 |
| CONSENSO | | | | | |
| TJ12 UAM-372 | AAATTTTGT- ---AAAAGGG | AGATAC-AAA | CC-ATGAAAA | CTCCTCTTAC | |
| TJ15 UAM-373 |- ---..... |TGG. | ..G..... | | |
| TJ14 UAM-352 |- ---..... |TGG. | ..G..... | | |
| TJ16 UAM-374 | ...C.....- ---...C.. |CT.. | TC..... |A.. | |
| A1 UAM-342 | ..G...T.T TGT..T.... |C... | ..A..... | ..C.....A.. | |
| A2 UAM-345 | ..AGAACAA | GAC.T..A... |TGT..G | A-.....G. | ..A..AA.... |

Figura 45. Alineamiento múltiple de las secuencias de la región IGS (120 bp) de cianobacterias con morfotipo *Calothrix*. Las rayas (-) representan un gap en el alineamiento, los puntos (.) representan secuencias idénticas a la secuencia consenso y las líneas perpendiculares (|) indican secciones de 10 bp. La secuencia nucleotídica de la región IGS aparece en color negro mientras que secuencias parciales de las regiones codificantes de *cpcB* y *cpcA* aparecen en color gris.

Tabla 25. Resumen de la longitud de las secuencias del locus *cpcBA*-IGS de los cultivos tipo *Calothrix* analizados.

| Cepas | Fragmento PC-IGS (nt) | <i>cpcB</i> (nt) | <i>cpcA</i> (nt) | IGS(nt) |
|--------------|-----------------------|------------------|------------------|---------|
| A1 UAM-342 | 716 | 283 | 314 | 119 |
| A2 UAM-345 | 704 | 283 | 314 | 107 |
| TJ12 UAM-372 | 696 | 283 | 314 | 99 |
| TJ14 UAM-352 | 692 | 283 | 314 | 95 |
| TJ15 UAM-373 | 696 | 283 | 314 | 99 |
| TJ16 UAM-374 | 687 | 283 | 314 | 90 |

Posteriormente, se determinó la secuencia nucleotídica de la región *cpcBA*-IGS en aislados con morfotipo *Tolypothrix* (CR1 UAM-332, TJ1 UAM-333, TJ6 UAM-

334, TJ7 UAM-335, TJ10 UAM-337, TJ11 UAM-371 y TJ13 UAM-340) y en muestras naturales del río Muga identificadas como *Tolypothrix distorta* var. *penicillata*. Se obtuvieron secuencias completamente idénticas en los aislados TJ7 UAM-335, TJ11 UAM-371 y TJ13 UAM-340, con una similitud del 86% con *Tolypothrix* sp. PCC7601 *cpc*-1, de manera que sólo una de las secuencias obtenidas se empleó en el alineamiento mostrado en la **figura 46**.

Tabla 26. Matriz del % de similitud generada a partir de aplicar el algoritmo de identidad del programa BioEdit (Hall, 1999) al alineamiento de las secuencias de la región *cpcBA*-IGS de los cultivos tipo *Calothrix* analizados.

| Tipo de secuencia | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 |
|-------------------|------|------|------|------|------|
| A1 UAM-342 | | | | | |
| A2 UAM-345 | 69,7 | | | | |
| TJ12 UAM-372 | 78,5 | 70,4 | | | |
| TJ14 UAM-352 | 76 | 70,3 | 79,2 | | |
| TJ15 UAM-373 | 78,5 | 70,4 | 100 | 79,2 | |
| TJ16 UAM-374 | 80,4 | 71,9 | 80,3 | 78,3 | 80,3 |

Los dos genotipos encontrados mostraron la misma longitud de las regiones codificantes: 271 nucleótidos (nt) del *cpcB* y 323 nt del *cpcA*, pero difirieron en la longitud de la región IGS (99 nt para las muestras de campo y 87 nt para los aislados), de manera que la longitud total del fragmento *cpcBA*-IGS varió desde los 693 nucleótidos correspondientes a la secuencia de las poblaciones de *Tolypothrix* hasta los 680 nt de los cultivos. Con respecto a la secuencia nucleotídica, el porcentaje de similitud fue bajo (71,5%) mientras que los porcentajes de sustitución nucleotídica fueron muy similares a lo largo de todo el segmento (del 25,6% y del 25,5% en *cpcB* y *cpcA* respectivamente y del 45,7% en IGS).

II.1.3.2. Análisis mediante TGGE de la región *cpcBA*-IGS amplificada.

La secuencia nucleotídica de la región *cpcBA*-IGS de dos aislados morfotipo *Calothrix* (TJ9 UAM-336 y A1 UAM-342) y de cuatro aislados morfotipo *Tolypothrix* (TJ10 UAM-337, TJ1 UAM-333, CR1 UAM-332 y TJ6 UAM-334), no pudo ser determinada sin ambigüedades mediante secuenciación directa de los productos de PCR, lo que sugiere que estos aislados podrían tener más de un copia distinta del operon de la ficocianina, como ya se había descrito previamente (Mazel y

Resultados

col., 1988; Dubbs y Bryant, 1993). Con el fin de confirmar esta posibilidad, los amplicones de *cpcBA*-IGS de estas especies se separaron mediante electroforesis en geles desnaturalizantes por gradiente térmico. Se emplearon los mismos marcadores que se describieron anteriormente para los geles de TGGE de muestras de ríos calizos con dominancia de *Rivularia*, correspondientes a los genotipos I, II y III. Además, se incluyó en este estudio el cultivo ALB3 UAM-225, identificado como *Calothrix elenkinii* a partir de sus características morfológicas por Perona y col. (2003), así como las cepas A2 UAM-345, TJ13 UAM-340 y TJ14 UAM-352.

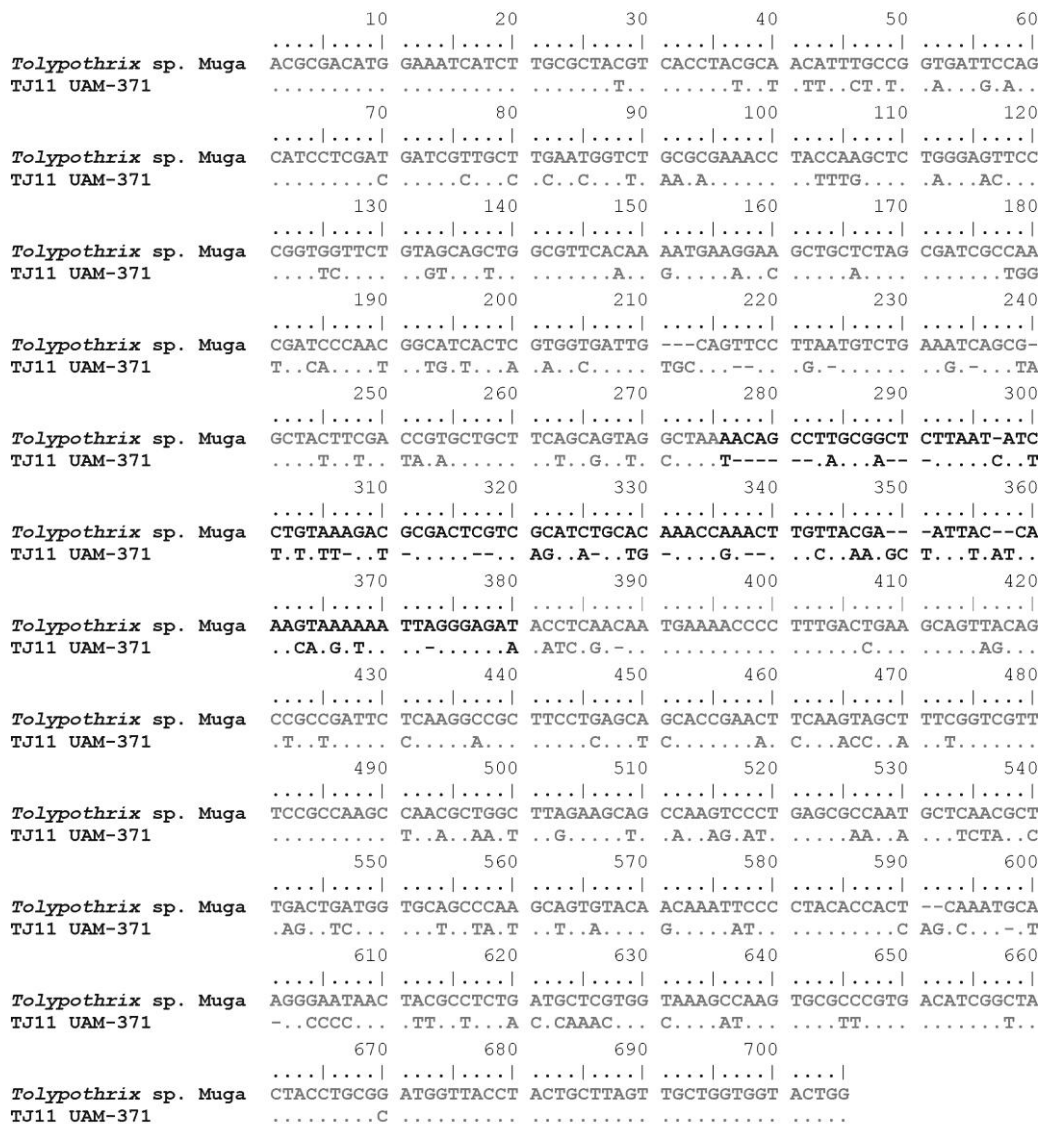


Figura 46. Alineamiento de los dos tipos de secuencias de la región *cpcBA*-IGS (706 bp) encontradas en las cepas aisladas y muestras naturales examinadas en este estudio. Las rayas (-) representan un gap en el alineamiento, los puntos (.) representan secuencias idénticas a la secuencia consenso y las líneas perpendiculares (|) indican secciones de 10 bp. Las secuencias parciales de las regiones codificantes de *cpcB* y *cpcA* flanqueantes al espacio intergénico (IGS) se muestra en color gris.

El análisis por TGGE de las cepas aisladas tipo *Calothrix* de ríos silíceos o calizos sin *Rivularia* (**figura 47**), mostró una única banda para los cultivos TJ14 UAM-352 (banda 1) y ALB3 UAM-225 (banda 21), demostrando el hecho de que estas cepas disponen de una sola copia del operon o bien que los operones duplicados son casi idénticos. Por el contrario, los cultivos A1 UAM-342, A2 UAM-345 y TJ9 UAM-336 presentaron un patrón formado por más de una banda. Todas las bandas marcadas en la **figura 47**, se escindieron del gel, se amplificaron y posteriormente se secuenciaron. Algunos de estos fragmentos no pudieron ser reamplificados satisfactoriamente después de ser escindidos del gel de TGGE. Así, de las 12 bandas seleccionadas sólo seis de ellas se amplificaron con éxito (bandas 1, 6, 7, 16, 19, 21).

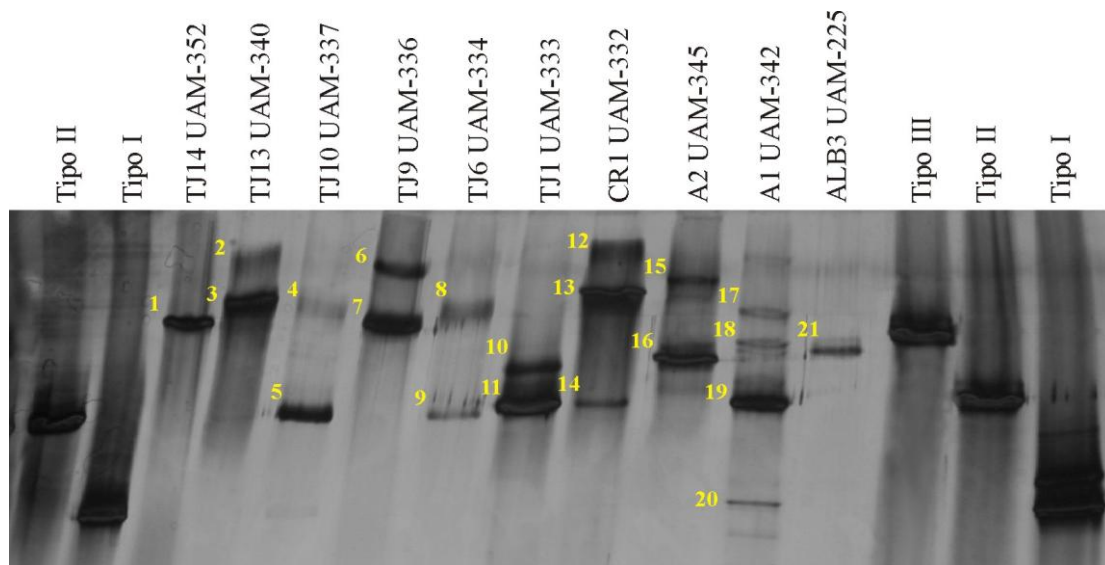


Figura 47. Análisis mediante electroferesis en geles desnaturalizantes por gradiente térmico (TGGE) de los productos amplificados por PCR de la región *cpcBA*-IGS de distintos representantes de cepas aisladas. Tipo I, II y III corresponden a los productos de PCR clonados de la región PC-IGS de los genotipos I, II, III respectivamente, previamente secuenciados. Los números en color amarillo indican las bandas escindidas del gel.

El análisis de las secuencias obtenidas, basado en la búsqueda a través del BLAST, mostró para la secuencia TJ9 UAM-336 *cpc*-1 (banda 6) una similitud del 79% con *Anabaena* y una similitud parcial del 84 % con la región codificante *cpcB* del género *Nodularia* y, para TJ9 UAM-336 *cpc*-2 (banda 7) una similitud del 80% con la región *cpcB* de *Synechococcus*. La longitud génica de los operones duplicados fue casi idéntica, sin embargo, existieron diferencias significativas en la longitud de la región IGS. Respecto a la secuencia obtenida de A1 UAM-342 (A1 UAM-342 *cpc*-2; banda 19), presentó una similitud del 78% con la cepa *Tolypothrix* sp. PCC7601 *cpc*-2

y del 100% con las secuencias pertenecientes al genotipo tipo II (por ejemplo, MU27 UAM-314) obtenido en el análisis de las cepas tipo Rivulariaceae de ríos calizos, tal y como se apreciaba previamente en el gel de TGGE, que dicha banda presentaba la misma movilidad electroforética que dicho genotipo. En el caso de la A2 UAM-345, la secuencia obtenida (banda 16) coincidió con la obtenida mediante amplificación por PCR y secuenciación directa.

En el análisis por TGGE de los cultivos clonales con morfotipo *Tolypothrix* se visualizaron al menos dos bandas (**figura 47**), mostrando que los aislados TJ10 UAM-337, TJ1 UAM-333, CR1 UAM-332 y TJ6 UAM-334 contenían más de una copia distinta del operon de la ficocianina. Además, algunos de los cultivos presentaron una banda con igual movilidad electroforética que la banda correspondiente al genotipo Tipo II, obtenido en los análisis de las muestras tipo Rivulariaceae de ríos calizos con *Rivularia*. Para confirmar estos resultados, las bandas se escindieron del gel, se reamplificaron y finalmente se secuenciaron. De las 13 bandas seleccionadas sólo seis de ellas se amplificaron con éxito (bandas 3, 4, 5, 8, 11, 13).

Los resultados han mostrado que TJ10 UAM-337 presentó dos secuencias distintas: la denominada TJ10 UAM-337 *cpc-2* (banda 5) que coincide con las secuencias de genotipo II, se correspondió con la banda más intensa, mientras que la banda número 4 (TJ10 UAM-337 *cpc-1*), presentó una variabilidad alta, con una similitud del 86% con *Tolypothrix* sp. PCC7601. En el caso de las cepas TJ6 UAM-334 (banda 8) y CR1 UAM-332 (banda 13) las secuencias obtenidas fueron idénticas, con un 84% de similitud con la especie *Tolypothrix* sp. PCC7601. Por último, de la cepa TJ1 UAM-333 se amplificó sólo la banda más intensa (banda 11), cuya secuencia correspondió con el genotipo tipo II.

II.1.3.3. Análisis filogenético de las secuencias obtenidas.

Para estudiar las relaciones filogenéticas de las catorce cianobacterias con tricomas atenuados aisladas de ríos silíceos o calizos sin *Rivularia*, junto con el resto de Rivulariaceas previamente caracterizadas, se compararon las secuencias nucleotídicas de *cpcBA*-IGS obtenidas en el estudio con representantes de otros géneros de Nostocales (géneros *Tolypothrix*, *Nostoc*, *Nodularia*, *Cylindrospermopsis*, *Anabaena* y *Aphanizomenon*). Tanto los análisis de parsimonia (MP) como los de distancia (NJ) y de maximum likelihood (ML), generaron árboles filogenéticos con topologías muy similares, por lo que se muestra sólo uno de ellos (NJ, **figura 48**). En

conjunto, hubo un buen soporte de bootstrap para los principales grupos y para muchas de las ramas próximas a las ramas terminales.

Las cepas de *Calothrix* incluidas en el estudio fueron muy heterogéneas, confirmándose las diferencias observadas en el análisis de la región *cpcBA*-IGS de las secuencias obtenidas. Así, el cultivo A1 UAM-342 presentó dos copias distintas del operon de la ficocianina, una de las cuales se situó junto con TJ16 UAM-374 en un mismo grupo, aunque el porcentaje de divergencia fue del 19,8% a lo largo del filamento y del 45,3% en la IGS (datos no mostrados), mientras que la otra secuencia fue similar a cepas como MU27 UAM-314 y E17 UAM-313, pertenecientes al grupo con genotipo II descrito previamente. Estrechamente relacionadas con A1 UAM-342 *cpc-2* estuvieron TJ1 UAM-333, TJ10 UAM-337, TJ12 UAM-372 y TJ15 UAM-373, cepas aisladas de ríos síliceos. Todas ellas formaron el grupo A, grupo bien sustentado por valores de bootstrap altos (100/99/100 para los análisis de NJ, MP y ML, respectivamente).

TJ9 UAM-336 fue otra de las cepas en donde se detectó la presencia de más de un copia distinta del operon de la ficocianina. Una de las secuencias obtenidas fue similar a TJ14 UAM-352 (99,5% similares) que junto con ALB3 UAM-225, especie identificada como *Calothrix elenkinii*, constituyeron un grupo sustentado por valores de bootstrap altos pero con una divergencia del 15,7% a lo largo del filamento y del 23% en la IGS (datos no mostrados). La segunda secuencia de TJ9 UAM-336 (*cpc-2*) fue más distante (31,4% de divergencia), encontrándose en el árbol entre los grupos H e I, formados por cianobacterias de los géneros *Nodularia* y *Nostoc*, respectivamente. Por otro lado, A2 UAM-345 apareció relacionada con las cepas tipo Rivulariaceae aisladas de ríos calizos que presentaron genotipo III en el análisis de la región *cpcBA*-IGS (grupo F), mostrando una similitud cercana al 94%.

Las mayoría de las cepas de *Tolypothrix* (CR1 UAM-332, TJ6 UAM-334, TJ7 UAM-335 y TJ11 UAM-371) incluidas en el estudio, formaron un grupo monofilético (grupo D) junto con la primera copia del operon de la ficocianina de *Tolypothrix* PCC7106 (*cpc-1*), con valores de bootstrap próximos al 100%. Estos resultados indicaron que nuestros datos moleculares fueron congruentes con la caracterización morfológica realizada previamente.

El cultivo TJ10 UAM-337 presentó dos copias distintas del operon de la ficocianina. Una de ellas formó parte del grupo D junto con otros cultivos de *Tolypothrix* aislados del río Tejada, mientras que la otra secuencia, se agrupó con

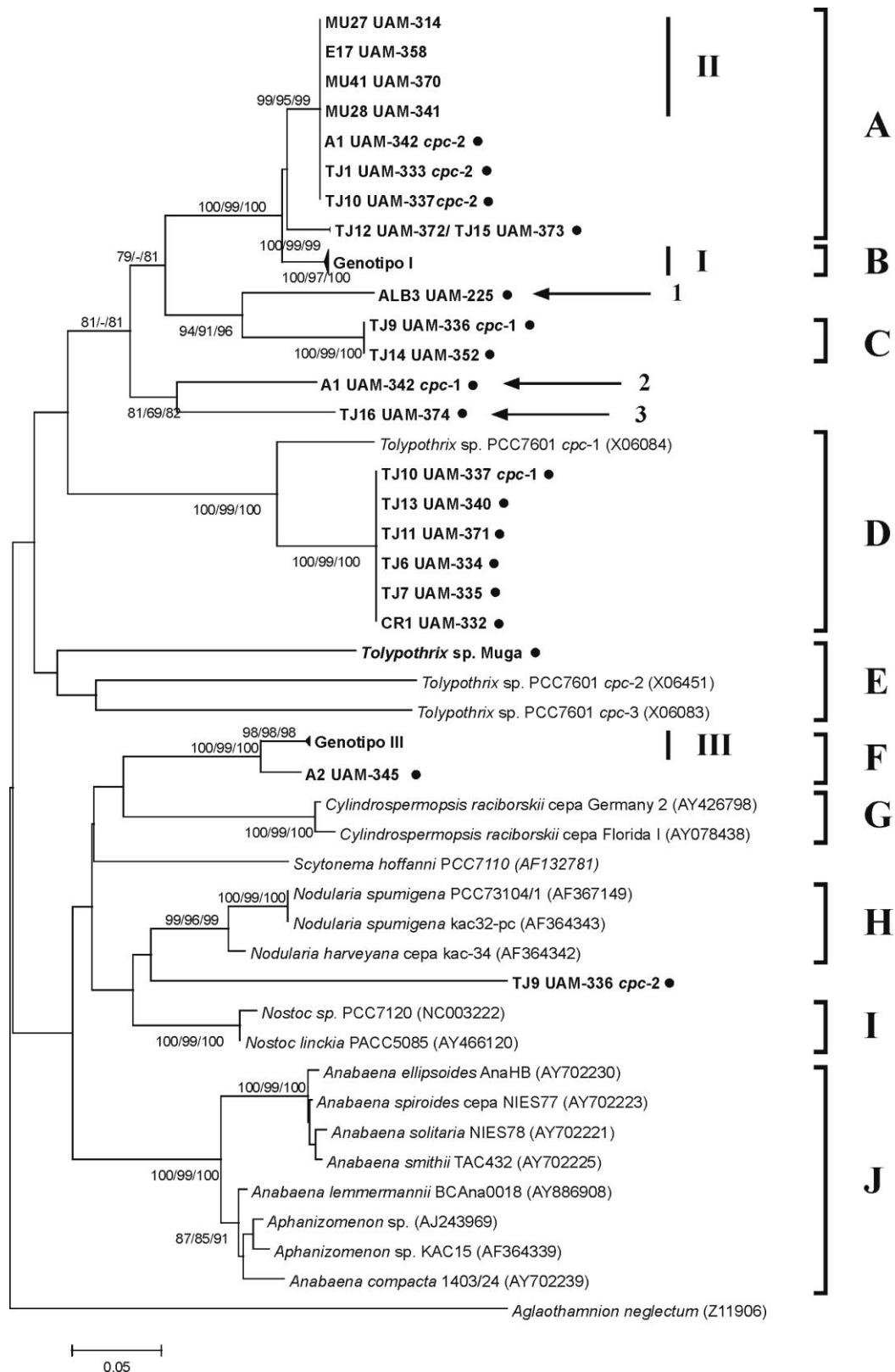


Figura 48. Árbol filogenético de las secuencias de la región *cpcBA-IGS* (706 bp) de cianobacterias atenuadas de ríos síliceos o calizos sin *Rivularia* (●) creado mediante el método de neighbour-joining del programa MEGA v.4 (Tamura y col., 2007). Las secuencias obtenidas durante este estudio aparecen en negrita. Los valores de bootstrap (Felsenstein, 1985) para los análisis de NJ/MP/ML se determinaron para 1000 replicas y sólo se mostraron los valores de bootstrap mayores de 65%. I- Genotipo I; II- Genotipo II; III- Genotipo III. Los números de acceso de las secuencias empleadas para la generación de este árbol filogenético se indican después del nombre del taxón.

secuencias pertenecientes al genotipo II, descrito previamente dentro del grupo A. Se incluyó también dentro de este grupo la secuencia de uno de los operones de otro cultivo de *Tolypothrix*, designado como TJ1 UAM-333. La similitud entre las secuencias que componen el grupo A varió entre el 95,8% y el 100%.

La muestra de campo del río Muga identificada como *T. distorta* var. *penicillata* se situó junto con el segundo y tercer operón de *cpcBA*-IGS (*cpc-2* y *cpc-3*) de *Tolypothrix* PCC7106, aunque con valores del bootstrap muy bajos, por lo que no se puede considerar un grupo bien definido

Próximo al grupo A se sitúa el grupo B, compuesto por colonias de campo de *Rivularia* y aislamientos tipo Rivulariaceae de ríos calizos con genotipo I y sustentado por valores de bootstrap muy altos (100/97/100 para los análisis de NJ, MP y ML, respectivamente). Sin embargo, el genotipo III se encuadra dentro de otro grupo más distanciado (Grupo F), pero igualmente soportado por valores de bootstrap muy altos, de este modo, se mantiene la distribución diferencial hallada previamente de los tres genotipos definidos.

Finalmente, los grupos G, H e I, formados por cianobacterias pertenecientes a los géneros *Cylindrospermopsis*, *Nodularia* y *Nostoc*, respectivamente, se agruparon junto con especies de los géneros *Anabaena* y *Aphanizomenon* del grupo J.

II.1.4. Empleo de los genes que codifican para el ARNr 16S en la caracterización de *Calothrix* y *Tolypothrix*.

Se determinó la secuencia nucleotídica del gen ARNr 16S (660-1445bp) de especies cianobacterianas (**tabla 20**) aisladas de ríos síliceos o calizos donde no crecía *Rivularia*, que presentaron características morfológicas similares a *Calothrix* y *Tolypothrix*, mediante amplificación por PCR y posterior secuenciación.

Para discutir la posición filogenética de estas cianobacterias atenuadas dentro de la radiación cianobacteriana, las secuencias de ADNr 16S de 6 aislados de *Calothrix*, 6 aislados de *Tolypothrix*, y de una muestra natural de *Tolypothrix* del río Muga, se compararon con cianobacterias con heterocistos disponibles en la base de datos, que mostraban tricomas atenuados, por ejemplo los géneros *Calothrix*, *Rivularia* y *Tolypothrix*, además de algunas cianobacterias relacionadas lejanamente, como cepas de *Chroococidiopsis* y *Oscillatoria*. Las topologías de los árboles generados por los análisis de parsimonia, de distancia y de maximum likelihood fueron similares, por eso se representó sólo el árbol filogenético de distancia (**NJ, figura 49**).

Las secuencias de ADNr 16S de *Tolypothrix* obtenidas junto con otras secuencias de las bases de datos formaron un grupo (grupo A) separado de otras cianobacterias (los valores de bootstrap de este grupo son próximos al 62% para los tres análisis empleados). Este grupo estaba formado por 6 secuencias idénticas correspondientes a los cultivos CR1 UAM-332, TJ7 UAM-337, TJ10 UAM-337, TJ11 UAM-371 y TJ13 UAM-340, aislados de los arroyos Cereal y Tejada y, a la cepa *Tolypothrix* PCC7415, aislada de un suelo de invernadero. También se incluyeron en el grupo A otro aislado de un suelo de invernadero (*Tolypothrix* TOL328) y las cepas *Tolypothrix* PCC7504 y *Tolypothrix* IAM M-259, presentando una similitud entre 97,7-99,4%, además de las secuencias de ADNr 16S de GU1 UAM-315, aislado del río silíceo Guadarrama y MA11 UAM-357, aislado del río calizo Muga. La muestra natural de *T. distorta* var. *penicillata* del río Muga obtenida durante el estudio formó también parte del grupo A, presentando una similitud del 98,3 % con dos cepas de *T. distorta* de la base de datos. Se encuentran dentro de este grupo la cepa *C. membranacea*, que muestra una identidad del 100% con varias secuencias de *Tolypothrix* de la base de datos y, *C. brevíssima* IAM M-229 (96,6-97,3% de similitud con las demás secuencias del grupo A). Estos resultados filogenéticos indicaron que nuestros datos moleculares fueron congruentes con la caracterización morfológica realizada.

Por el contrario, las cepas con características similares a *Calothrix* de este estudio fueron muy heterogéneas, distribuyéndose las secuencias de ADNr 16S obtenidas en diferentes grupos (**figura 49**). Así, se distinguió el grupo B, que comprende secuencias de los géneros *Calothrix* y *Rivularia* entremezcladas. En este grupo, se incluyen 8 aislados del Mar Báltico, dos muestras naturales de *Rivularia atra* (BIR MGR1 y BIR KRIV1), *Rivularia* PCC7116 y la secuencia de *Rivularia biasoletiana* del río Alhárabe correspondiente al genotipo III de este estudio, además de dos aislados de un sustrato silíceo de aguas termales poco profundas y calientes del Yellowstone National Park (*Calothrix* CCME 5085 y CCME 5093) y un aislado de sustratos calizos (*Calothrix* B002). La similitud entre las secuencias que componen el grupo B se sitúa dentro del rango del 96-99,9 %.

El grupo C contiene al aislado TJ14 UAM-352 del río silíceo Tejada de este estudio así como otras secuencias de *Calothrix* de las bases de datos, entre las que se incluyen 10 aislados del Mar Báltico, *Calothrix* PCC8909 y una cepa de *Calothrix* aislada de agua dulce (*Calothrix* CAL3361). La similitud entre las secuencias que

componen este grupo varió entre el 98,8 y el 100%. El grupo D compuesto por cinco aislados del Mar Báltico, mostró una similitud de 97,5-99,8% en la secuencia.

El grupo E altamente soportado, contiene las secuencias correspondientes al genotipo I descrito previamente, el cual mostró una similitud alta en la secuencia del gen ARNr 16S (98.8% al 100 %).

El grupo F estaba formado por tres secuencias idénticas correspondientes al genotipo II de este estudio (MU27 UAM-314, MU28 UAM-341 y MU41 UAM-370) del río calizo Muga, y dos secuencias de *Calothrix*, TJ12 UAM-372 (100% similares) y TJ15 UAM-373 del río silíceo Tejada (98% similares), además de otras secuencias de *Calothrix* de las bases de datos. Estas incluyeron dos secuencias de *C. parietina*, dos cepas de *C. desertica*, *Calothrix* D253, originalmente clasificado como *C. vigueri*, y *Calothrix* PCC7714, originalmente clasificado como *C. marchica*. Un tercer clon de *C. parietina* fue también incluido en el grupo pero sólo tuvo un 93,5% de similitud. TJ12 UAM-372 al igual que las cepas correspondientes al genotipo II tuvieron un 98,8% de similitud con *C. parietina*, una especie también encontrada frecuentemente en muestras de campo, mientras que para TJ15 UAM-373 fue del 93,4 %.

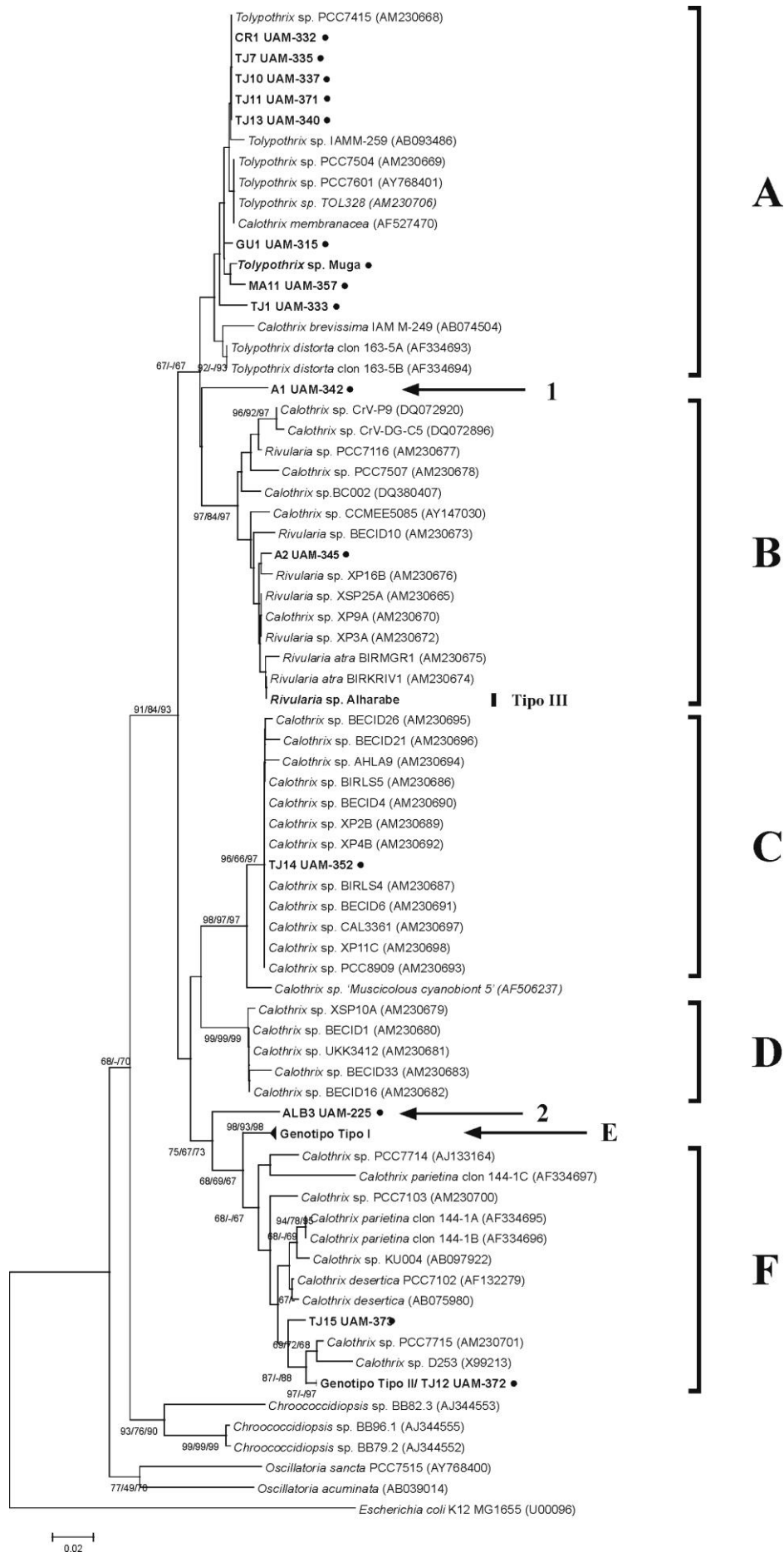
Al final, las cepas A1 UAM-342 (rama 1) y ALB3 UAM-225 (rama 2) no se agruparon con ninguna otra cepa, presentando una divergencia alta con las secuencias de *Calothrix* de la base de datos.

II.2. Caracterización genética de cianobacterias pertenecientes al género *Nostoc*.

II.2.1. Empleo de la secuencia *cpcBA*-IGS en la identificación de muestras naturales de *Nostoc* .

Se determinó la secuencia nucleotídica parcial del operon de la ficocianina (*cpcBA*-IGS) en dos muestras de campo de *Nostoc* del río Muga. La amplificación por PCR, inserción de los fragmentos amplificados en un vector de expresión y

Figura 49. Árbol filogenético de las secuencias del gen de 16S ARNr (709 bp) de cianobacterias atenuadas de los géneros *Calothrix* y *Tolypothrix* aislados durante este estudio (●). Este árbol se construyó por el método de neighbour-joining mediante el programa MEGA versión 4 (Tamura y col., 2007). Las secuencias determinadas en este estudio aparecen en negro. Los valores de bootstrap (Felsenstein, 1985) para los análisis de NJ/MP/ML se determinaron para 1000 replicas y se muestran sólo los valores de bootstrap mayores de 65%. I- Genotipo tipo I; II-Genotipo tipo II; II-Genotipo tipo III. Los números de acceso de las secuencias empleadas para la construcción de este árbol filogenético se indican después del nombre del taxón. →



posterior secuenciación de la región *cpcBA*-IGS, se realizó satisfactoriamente en ambas muestras, obteniéndose un fragmento de aproximadamente 687 bp. Las secuencias obtenidas contuvieron 279 nucleótidos (nt) de la región codificante *cpcB*, 85 nt representando la región IGS y 323 nt de *cpcA*. Con respecto a la secuencia nucleotídica, las secuencias tuvieron un porcentaje de similitud del 98,5%. La comparación de estas secuencias con otras publicadas en el GenBank reveló una similitud del 85% con *Nostoc punctiforme* PACC8646.

Las identidades taxonómicas de estas muestras se confirmaron mediante los análisis filogenéticos de la región *cpcBA*-IGS de las secuencias obtenidas. En este sentido, las secuencias de *cpcBA*-IGS de las dos muestras naturales de *Nostoc* se compararon con representantes de otros géneros de Nostocales de las bases de datos (*Tolypothrix*, *Cylindrospermopsis*, *Anabaena* y *Aphanizomenon*), además de 4 cultivos aislados de *Nostoc* pertenecientes a la colección de cianobacterias de la Universidad Autónoma de Madrid (A8 UAM-308, MU2 UAM-376, MU8 UAM-368 y ALB2 UAM-220) obtenidas durante el desarrollo de este estudio.

La topología del árbol deducido por el método de neighbor-joining difiere ligeramente del determinado por los análisis de maximum parsimony, especialmente en las divisiones definidas por las ramas más profundas cuando los valores de bootstrap en el árbol de neighbor-joining fueron pequeños. Sin embargo, los dos árboles realizados mostraron 7 grupos idénticos fuertemente soportados por valores de bootstrap muy altos, mostrándose el obtenido mediante NJ (**figura 50**).

El grupo A es un grupo bien sustentado por valores de bootstrap altos (99/96/100 para los análisis de NJ/MP/ML respectivamente) que contiene secuencias de los géneros *Anabaena* y *Aphanizomenon*. Se pueden distinguir dos subgrupos, el subgrupo A1, formado por cepas de *Anabaena* y *Aphanizomenon*, con una similitud entre el 89,6-100% y, el subgrupo A2, formado únicamente por especies del género *Anabaena*, presentan un rango de similitud entre 97,9 y 99,5%.

El grupo B altamente soportado contiene las secuencias de las cepas *Nostoc* PCC7120 y *Nostoc linckia* PACC5085, las cuales mostraron una similitud alta en la secuencia de *cpcBA*-IGS (99%).

Los grupos C y D agruparon especies de los géneros *Nodularia* y *Cylindrospermopsis* respectivamente, mostrando el grupo C una similitud entre el 94,7% y el 96,9% en la secuencia de *cpcBA*-IGS y el grupo E del 99%.

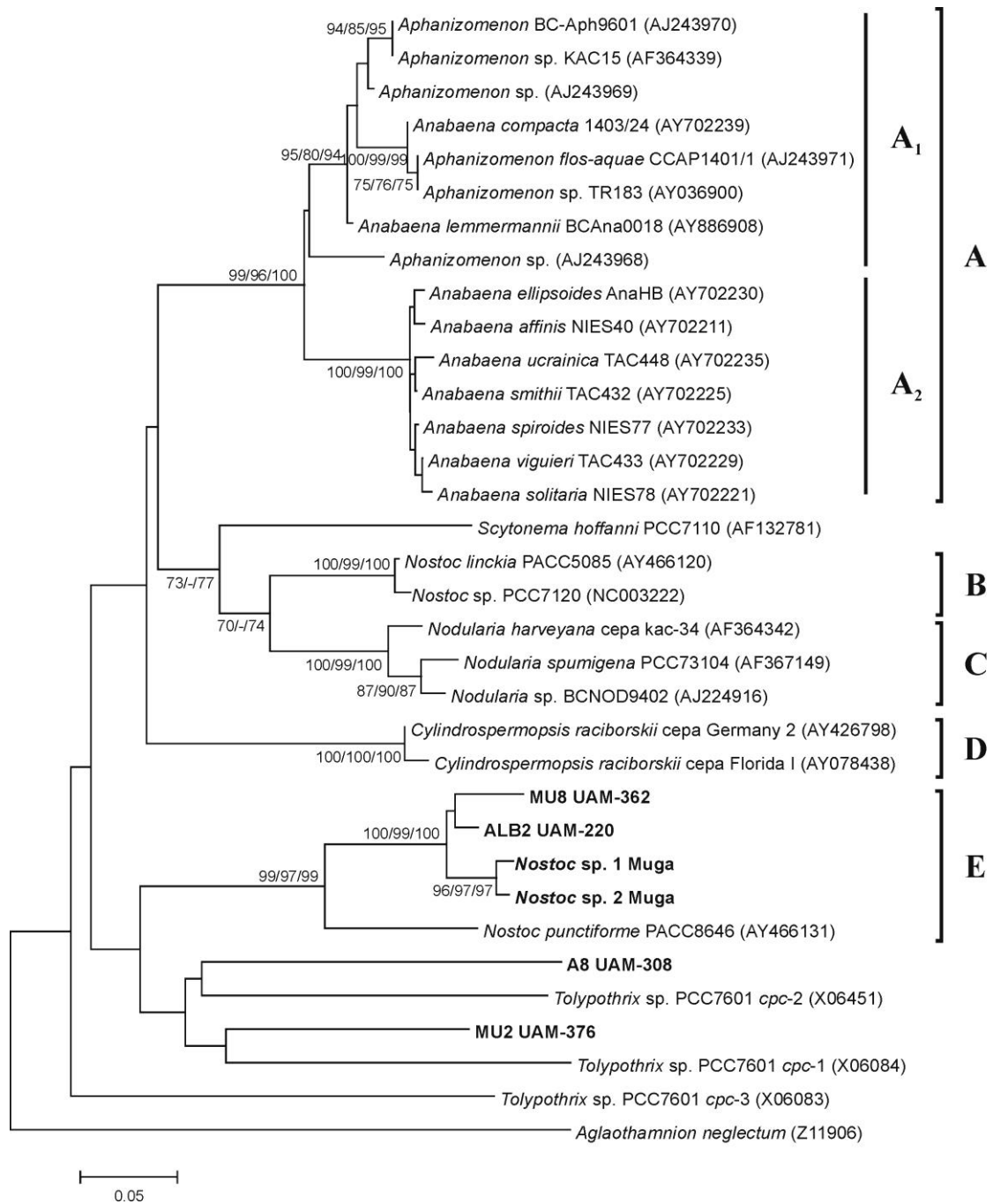


Figura 50. Árbol filogenético de las secuencias de región *cpcBA*-IGS construido por el método de neighbour-joining, empleando la matriz para el cálculo de la distancia establecida por el modelo de Tajima-Nei (Tajima y Nei, 1982) del programa MEGA versión 4 (Tamura y col., 2007). Las secuencias determinadas en este estudio aparecen en negro. Los valores de bootstrap (Felsenstein, 1985) para los análisis de NJ/MP/ML se determinaron para 1000 replicas y se mostraron sólo los valores de bootstrap mayores de 65%. Los números de acceso de las secuencias empleadas para la construcción de este árbol filogenético son indicados después del nombre del taxón.

El grupo E comprende dos secuencias de *Nostoc* de campo del río Muga y dos cultivos de *Nostoc*: ALB2 UAM-220 aislado del río Alberche e identificada morfológicamente como *N. punctiforme* por Perona y col. (2003) y MU8 UAM-362 identificado por sus caracteres morfológicos como *N. calcicola* (Perona y col., 2007), y que fue aislado del río Muga (96,5% similares). También se incluye en este grupo a *N. punctiforme* PACC8646 pero sólo tuvo una similitud entre 83,9% y 85,8%.

Finalmente, los cultivos A8 UAM-308, aislada del río Amir e identificada morfológicamente como *N. calcicola*, y el aislado del río Muga MU2 UAM-376, clasificado como *N. verrucosum* (Perona y col., 2007), se incluyeron en un último grupo con dos de los tres operones de *cpcBA*-IGS encontrados en *Tolypothrix* PCC7106. Este grupo se encuentra sustentado por valores de bootstrap bajos, siendo la similitud entre las secuencias que lo constituyen también muy bajos (61%), por lo que no se estableció como un grupo bien definido.

II.2.2. Empleo del gen ARNr 16S en la identificación de muestras naturales de *Nostoc*.

Las secuencias parciales del gen ARNr 16S (660 bp) se determinaron en 9 aislados de *Nostoc* (A8 UAM-308; ALB2 UAM-220; MU2 UAM-376; MU8 UAM-362; MU21 UAM-367; ME1 UAM-360; MA4 UAM-307 y MA7 UAM-304) así como en poblaciones de *Nostoc* de los ríos Matarraña y Muga, y sobre la corteza de una palmera, en Las Palmas de Gran Canaria.

Los árboles filogenéticos se generaron a partir del alineamiento de las secuencias de ADNr 16S obtenidas en este estudio junto con secuencias de *Nostoc* de las bases de datos y, se compararon con representantes de otros géneros de Nostocales (*Nodularia*, *Anabaena* y *Aphanizomenon*), además de algunas cianobacterias relacionadas lejanamente, como cepas de *Chroococidiopsis* y *Oscillatoria*. Las tres aproximaciones filogenéticas empleadas (neighbour-joining, maximum parsimony y maximum likelihood) produjeron topologías muy similares, representándose sólo el de NJ (**figura 51**).

Las secuencias de *Nostoc* obtenidas junto con otras de las bases de datos formaron cinco grupos (A, D, E y F) separados de otras cianobacterias (**figura 51**). Los grupos B y C contuvieron especies de los géneros *Anabaena*-*Aphanizomenon* y *Nodularia*, respectivamente y, estuvieron soportados por valores de bootstrap altos.

El grupo A está formado por 18 cepas aisladas y cuatro muestras naturales de *Nostoc*, con una similitud entre las secuencias del 96,4 % al 99,2%. Se pudieron distinguir cuatro subgrupos: A1, A2, A3 y A4, siendo la similitud en la secuencia entre los subgrupos de un 98,4-99,2 % entre los subgrupos A1 y A2, de un 97,1-98,4% entre los subgrupos A1 y A3, del 98,4 % entre los subgrupos A2 y A3 y, del 96,6% entre A1 y A3 con A4 y del 97,7% entre A2 y A4.

El subgrupo A1, que contiene a los cultivos ALB2 UAM-220, aislado del río Alberche e identificado morfológicamente como *N. punctiforme* (Perona y col., 2003), *N. punctiforme* PCC73102, *N. punctiforme* SAG71.79 y *Nostoc* ATCC53789, mostrando una similitud entre el 98,3-98,8 %, además de la cepa simbiótica con el líquen *Peltifera membranacea*, *Nostoc* TDI#AR94 (99,1 % similares). Se incluyó también dentro de este grupo a dos muestras naturales del río Muga, *Nostoc* sp. Muga 1 y *Nostoc* sp. Muga 2, que presentaron un 99,2 % de similitud entre ellas. La secuencia correspondiente a *Nostoc* sp. Muga 1 mostró una identidad del 100% con la secuencia de *N. punctiforme* SAG71.79 y con dos secuencias de *N. commune*.

El subgrupo A2 está compuesto por 5 secuencias idénticas correspondientes a A8 UAM-308 y MU8 UAM-367, dos aislados de los ríos Amir y Muga identificados morfológicamente como *N. calcicola* (Perona y col., 2007), además de las secuencias de ADNr 16S de la cepa simbiótica aislada de un líquen *Nostoc* PCC9709 y dos aislados de suelo, *N. calcicola* III y *N. calcicola* VI.

El subgrupo A3, comprende dos secuencias idénticas: MU2 UAM-376, aislado río Muga y la muestra natural de *Nostoc* del río Matarraña, identificadas morfológicamente como *N. verrucosum* [Vaucher] Borner. Además, se incluyeron dentro de este grupo las secuencias de *N. verrucosum*, *Nostoc* SV1-VF6 (aislado de un suelo desértico) y *N. flagelliforme*. Las similitudes dentro del grupo B estuvieron dentro del rango de 97,9-100%.

Y en el subgrupo A4 están incluidas cinco secuencias idénticas que se corresponden con: una muestra natural de *Nostoc* (encontrado en la corteza de una palmera), el aislado MA4 UAM-307 del río Matarraña identificado por sus caracteres morfológicos como *N. muscorum* (Perona y col., 2007), dos cepas aisladas de hábitats terrestres *N. muscorum* II y I y la cepa *Nostoc* 8916, especie simbiótica aislada de una especie de *Gunnera* (Svenning y col., 2005).

Formando parte del grupo D se encuentran los aislados MA7 UAM-304 y MU21 UAM-367 de los ríos calizos Matarraña y Muga respectivamente (99,7% similares),

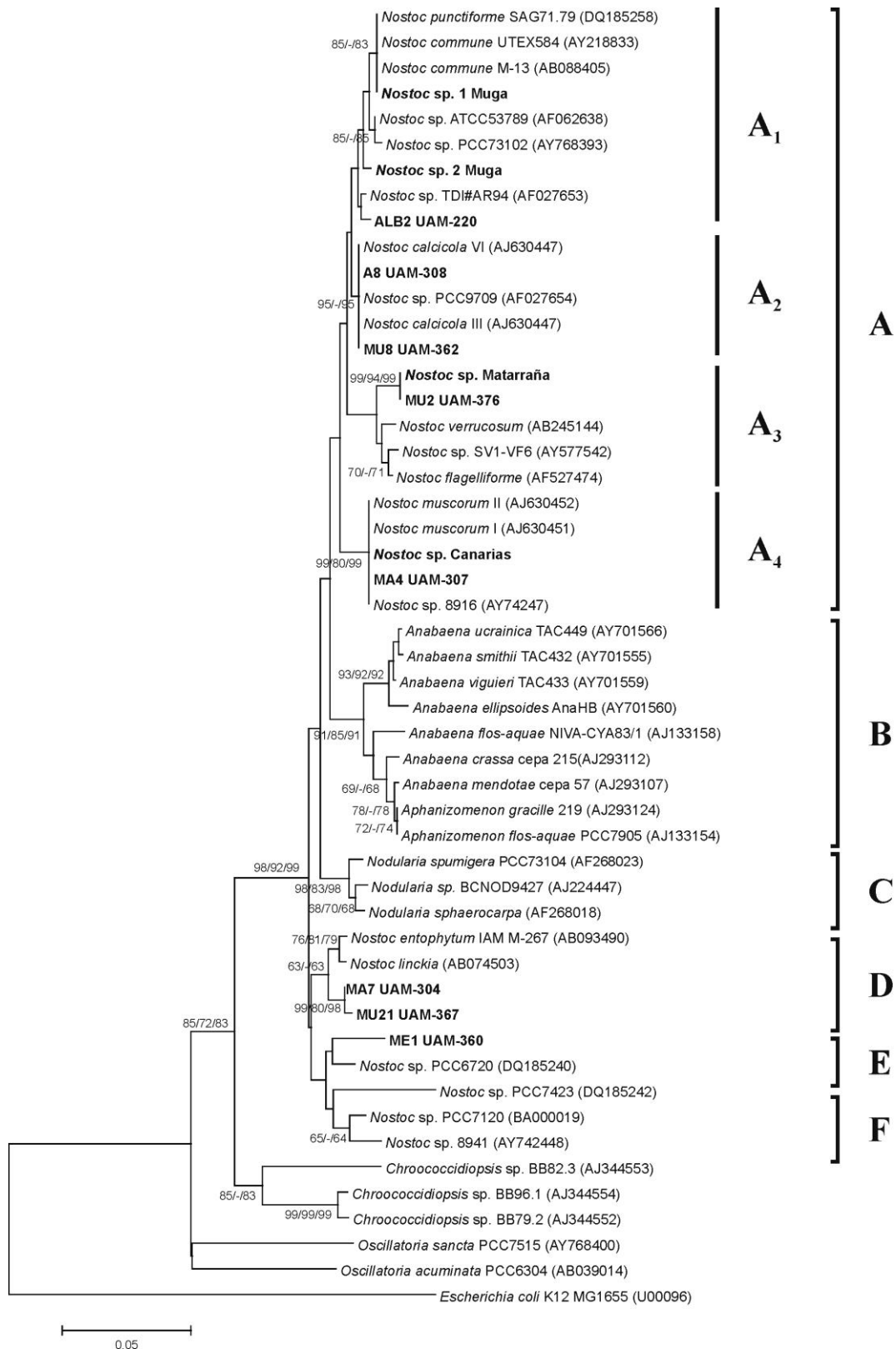


Figura 51. Árbol filogenético de las secuencias del gen ARNr 16S (684 bp) obtenidas de poblaciones naturales y diferentes cultivos de *Nostoc*. Este árbol se construyó por el método de neighbour-joining, mediante el programa MEGA v.4 (Tamura y col., 2007). Las secuencias determinadas en este estudio aparecen en negro. Los valores de bootstrap (Felsenstein, 1985) para los análisis de NJ/MP/ML se determinaron para 1000 replicas y sólo los valores de bootstrap mayores de 65% se mostraron. Los números de acceso de las secuencias empleadas para la construcción de este árbol filogenético son indicados después del nombre del taxón.

identificados por su morfología como *N linckia* (Perona y col., 2007), que mostraron una similitud del 98,5 % con las cepas *N. entophytum* IAM M-267 y *N. linckia*.

El cuarto grupo de *Nostoc* obtenido, es el grupo E, compuesto por la cepa ME1 UAM-360 aislada del arroyo Mediano e identificada como *N. carneum* (Serrano y col., 2003) y, el aislado de un ambiente terrestre *Nostoc* PCC6720. La similitud existente entre las dos secuencias fue del 97,1%.

Finalmente, el grupo F estuvo constituido por las cepas *Nostoc* PCC7120 y *Nostoc* 8941 (98,2 % similares), junto con *Nostoc* PCC7423, aislado de un suelo en Senegal. La secuencia de ésta última cepa fue más divergente, presentando una similitud entre el 94,3 y 94,6 % con respecto a las secuencias de *Nostoc* PCC7120 y *Nostoc* PCC8941, respectivamente.

II.3. Caracterización genética de tapetes microbianos.

II.3.1. Empleo de la secuencia *cpcBA*-IGS en la caracterización de tapetes microbianos.

Se caracterizaron molecularmente diferentes muestras de un tapete microbiano recogidas del río Muga en la campaña de julio de 2006 (denominadas tapete A seco o SSTA y tapetes tipo A sumergidos denominados SPTA y SNTA recogidos en distintos puntos de la zona de estudio, cuya descripción morfológica se realizó anteriormente y un tapete de *Phormidium*. Para ello, se amplificó la región *cpcBA*-IGS mediante PCR, se clonaron los fragmentos obtenidos en un vector de expresión y posteriormente se secuenciación diferentes clones seleccionados.

El alineamiento de las secuencias de *cpcBA*-IGS obtenidas con respecto a una secuencia consenso (**ANEXO**), mostró que todas ellas cayeron dentro de tres genotipos distintos, designados como: *cpcBA*-IGS tipo 1, *cpcBA* -IGS tipo 2 y *cpcBA* -IGS tipo 3. El genotipo 1 se encontró en las tres muestras del tapete microbiano analizadas (SNTAJL3, SPTAJL1, SSTAJL7), el genotipo 2 se halló solo en el tapete seco (SSTAJL1) y el genotipo 3 en la muestra natural de *Phormidium*.

Los tres genotipos mostraron la misma longitud de las regiones codificantes: 283 nucleótidos (nt) del *cpcB* y 314 nt del *cpcA*, pero difirieron en la longitud de la región IGS (78 nt en el tipo 1, 85 en el tipo 2, y 106 en el tipo 3), de manera que la longitud total del fragmento *cpcBA*-IGS varió desde los 675 nucleótidos correspondientes al genotipo 1 hasta los 703 nt del genotipo 2. Con respecto a la

secuencia nucleotídica, las secuencias dentro del genotipo 1 presentaron un alto porcentaje de similitud (99,7%).

La divergencia en la secuencia entre los genotipos encontrados fueron del 29,7% entre los genotipos 1 y 2, del 26,3% entre los genotipos 1 y 3 y del 29,6 % entre los genotipos 2 y 3. Los porcentajes de sustitución nucleotídica a lo largo de todo el segmento fueron en general muy altos (**tabla 27**), siendo las variaciones del genotipo 1 con respecto al tipo 2 y tipo 3 del 23,2% y 24,5% en *cpcB*, del 52,2% y 56,1% en IGS respectivamente, y del 30,9% y 19% en *cpcA*. Las diferencias entre las secuencias del genotipo 2 y 3 fueron del 24,6% para *cpcB*, 48,1% IGS, y 29,6% en *cpcA*.

Tabla 27. Sustituciones variables determinadas en la secuencia nucleotídica de los genotipos 1, 2 y 3.

| | Fragmento <i>cpcBA</i> -IGS | <i>cpcB</i> | <i>cpcA</i> | IGS |
|--------------------------|-----------------------------|-------------|-------------|------|
| % divergencia 1-2 | 29,7 | 23,2 | 52,2 | 30,9 |
| % divergencia 1-3 | 26,3 | 24,5 | 56,1 | 19 |
| % divergencia 2-3 | 29,6 | 24,6 | 48,1 | 29,6 |

Las secuencias de la región *cpcBA*-IGS obtenidas se alinearon con secuencias pertenecientes al orden Oscillatoriales (Subsección III según la sistemática bacteriológica), además de algunas cianobacterias relacionadas lejanamente, como cepas pertenecientes al orden Nostocales (o Subsección IV). Los tres análisis filogenéticos empleados (parsimonia, de distancia y de maximum likelihood), mostraron una topología muy similar, de manera que sólo uno de los árboles obtenidos se muestra en el estudio (**NJ, figura 52**).

Tres de las secuencias de los tapetes microbianos obtenidas constituyeron un grupo monofilético separado del resto de cianobacterias (grupo E), fuertemente soportado por valores de bootstrap muy altos. La segunda secuencia obtenida del tapete seco (SSTAJL1) se agruparon con la cepa *Oscillatoria sancta* NIER10027 observándose, sin embargo, un bajo valor de similitud (71,9%), por lo que no se estableció como un grupo definido.

El grupo A está formado por dos secuencias idénticas de *Arthrospira* junto con *Arthrospira fusiformis* AB2002/02, con un 96% de similitud.

El grupo B está formado por dos cepas de *Planktothrix* con una similitud del 97,5%. Relacionada con este grupo se encuentra *Oscillatoria* PCC6304 pero sólo con una similitud próxima al 70%.

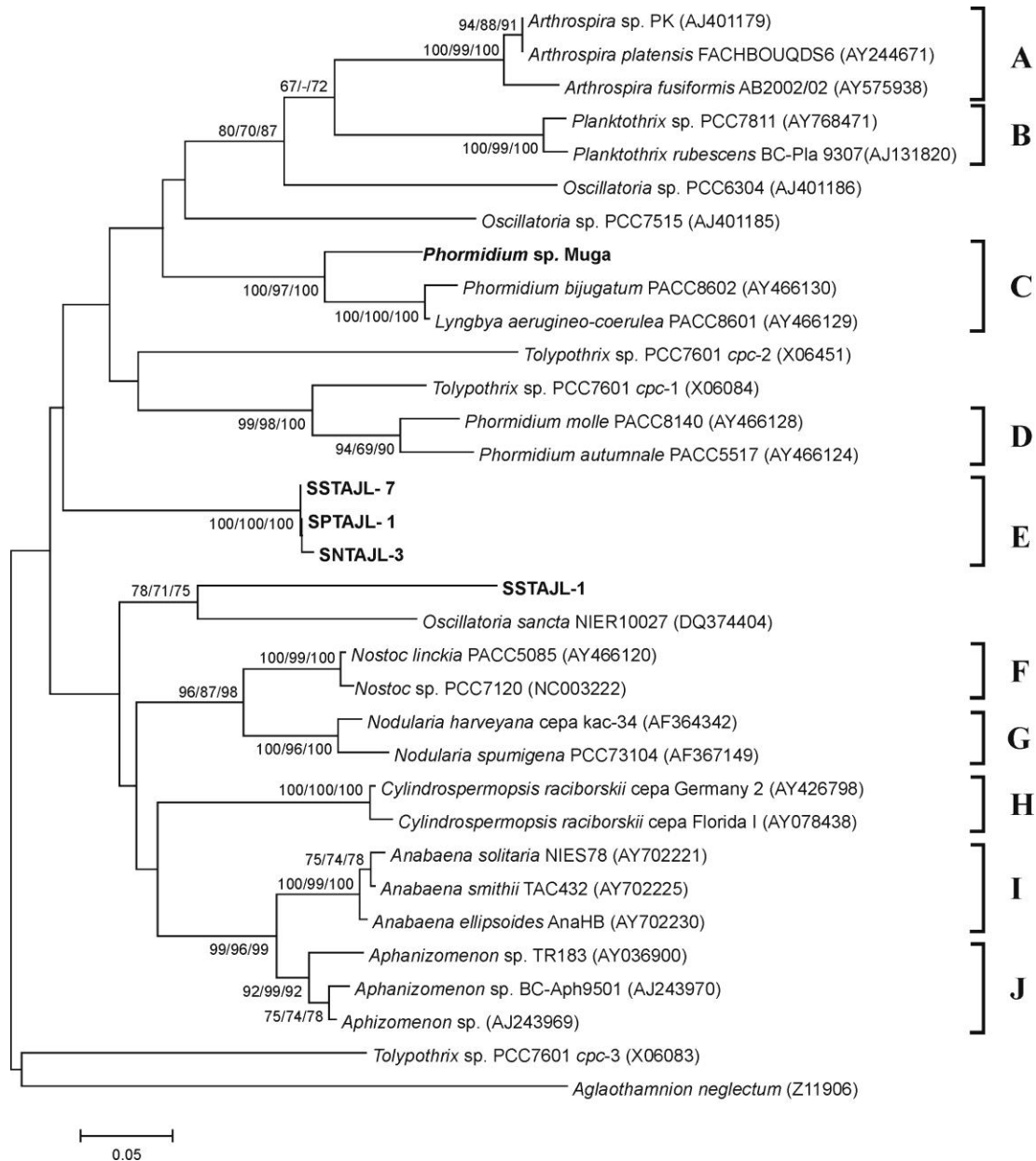


Figura 52. Árbol filogenético de las secuencias de la región *cpcBA-IGS* construido por el método de neighbour-joining, empleando la matriz para el cálculo de la distancia establecida por el modelo de Tajima-Nei (Tajima y Nei, 1982) del programa MEGA versión 4 (Tamura y col., 2007). Las cianobacterias de las que se han determinado sus secuencias en este estudio aparecen en negro. El número que aparece en los internados de las ramas indica el valor de bootstrap (Felsenstein, 1985) obtenido para 1000 replicas. Sólo los valores de bootstrap mayores de 65% son indicados. Los números de acceso de las secuencias empleadas para la construcción de este árbol filogenético son indicados después del nombre del taxón.

Las especies de *Phormidium* aparecieron distribuidas en los grupos C y D. El Grupo C formado por una muestra natural de *Phormidium* del río Muga, la cepa *Phormidium bijugatum* PACC8602 con un 88% de similitud y la cepa *Lyngbya aerogineo-coerulea* PACC8601 (87,2% al 98%). Por otro lado, el Grupo D estuvo compuesto por dos cultivos, *Phormidium molle* PACC8140 y *Phormidium autumnale* PACC5517, con una similitud del 92,9 %.

Las cianobacterias con heterocistos (excepto *Tolypothrix* PCC7601) se agruparon por separado en otra rama, constituyendo los grupos F, G, H, I y J, sustentados por valores de bootstrap muy altos, compuesto por representantes de los géneros *Nostoc*, *Nodularia*, *Cylindrospermopsis*, *Anabaena* y *Aphanizomenon*, respectivamente.

II.3.2. Empleo del gen que codifica para el ARNr 16S en la caracterización de tapetes microbianos.

Se caracterizaron molecularmente diferentes muestras del tapete empleado en los ensayos de actividad fosfatasa y nitrogenásica y de un tapete de *Phormidium* mediante el análisis del gen ARNr 16S mediante un doble abordaje (TGGE y clonación de los fragmentos amplificados).

Se separaron mediante TGGE los fragmentos amplificados por PCR de las muestras analizadas según su composición nucleotídica, produciéndose un patrón de bandas que mostró la diversidad genética de dicho tapete. Los análisis realizados revelaron un patrón de bandas similar en las diferentes muestras examinadas (resultados no mostrados). Para identificar los miembros de las poblaciones detectadas en estos análisis, se llevó a cabo la secuenciación de las principales bandas obtenidas. Las bandas apreciables de los geles pudieron ser escindidas satisfactoriamente y reamplificadas. La longitud de estas secuencias varió desde los 430 a 556 nucleótidos y, la mayor parte de ellas estuvieron relacionadas con secuencias de cepas de cultivo de las bases de datos identificadas como *Leptolyngbya* (91,9-98,2 % de similitud).

Paralelamente, se amplificaron, clonaron y posteriormente se secuenciaron, fragmentos más largos del gen ARNr 16S (660 bp). Se obtuvieron cuatro secuencias distintas, denominadas SSTAJL8, SSTAJL9, SPTAJL1 y SNTAMY4.

Todas las secuencias de ADNr 16S obtenidas (secuencias de clones y de bandas de TGGE) junto con secuencias publicadas de *Schizothrix* de las bases de datos, se compararon con cianobacterias estrechamente relacionadas pertenecientes a otros

géneros de Oscillatoriales (*Arthrospira*, *Microcoleus*, *Leptolyngbya*, *Lyngbya*, *Oscillatoriales*, *Phormidium*, *Planktothrix* y *Trichodesmium*). Las tres aproximaciones filogenéticas empleadas (neighbour-joining, maximum parsimony y maximum likelihood) produjeron árboles filogenéticos con topologías muy similares, por eso sólo se muestra el árbol de distancia (NJ, figura 53)

La secuencia de ADNr 16S obtenida de un tapete de *Phormidium* del río Muga se localizó junto a secuencias de *Phormidium* y *Microcoleus* de las bases de datos (grupo A). Presentó una similitud del 98,5% con la cepa *Phormidium autumnale* 0BU32S1, mientras que con las secuencias de *Microcoleus* la similitud fue del 97,4%.

Las secuencias de ADNr 16S obtenidas de diferentes muestras de un tapete microbiano mediante amplificación por PCR y posterior clonación de los fragmentos obtenidos, se localizaron en diferente ramas del árbol filogenético (grupo B y C, ramas 1 y 2). En el grupo B se situaron los clones SSTAJL-8 y SSTAJL-9 obtenidos de un tapete seco (99,4 % similares), mientras que el clon SPTAJL-1, se situó en una rama distinta (rama 1), mostrando una similitud del 92,7 y 93,5% con los clones SSTAJL-9 y SSTAJL-8, respectivamente. La cuarta secuencia obtenida (clon SNTAMY4) fue más distante, estando relacionado con la cepa *Schizothrix* CCMEE6130 (89,4% similares).

Por otro lado, las secuencias obtenidas en los análisis del gen ARNr 16S mediante TGGE, se distribuyen de manera diferente, agrupándose en dos grupos (grupo C y D). El grupo C está formado por las secuencias del gen ARNr 16S obtenidas de muestras recogidas en Mayo del 2005 (SNTAMY2-banda2b y SNTAMY1-banda2b) y Marzo (SPTAMZ1-banda1b, SPTAMZ1-banda2b, SNTAMZ2-banda1b y SNTAMZ2-banda2b) y Julio de 2006 (SSTAJL-banda1b), con una similitud entre el 97,4-99,6%. El grupo D constó de 3 secuencias recuperadas de los geles de TGGE de tres tapetes microbianos distintos recogidos en Abril (SNTAAB12-banda2b y SNTAAB13-banda2b) y en Julio de 2006 (SPTAJL-banda2B) (99,3 % similares). Además en este grupo D se incluyeron 3 secuencias de ADNr 16S de los aislados *Leptolyngbya* VRUC135, *Leptolyngbya* CNP1-B3-C9 y *Leptolyngbya* Hindak 1982/12 con una similitud en la secuencia entre el 97,1-98,2%. Las similitudes encontradas entre estos grupos variaron en el rango de 91,9-95,1%.

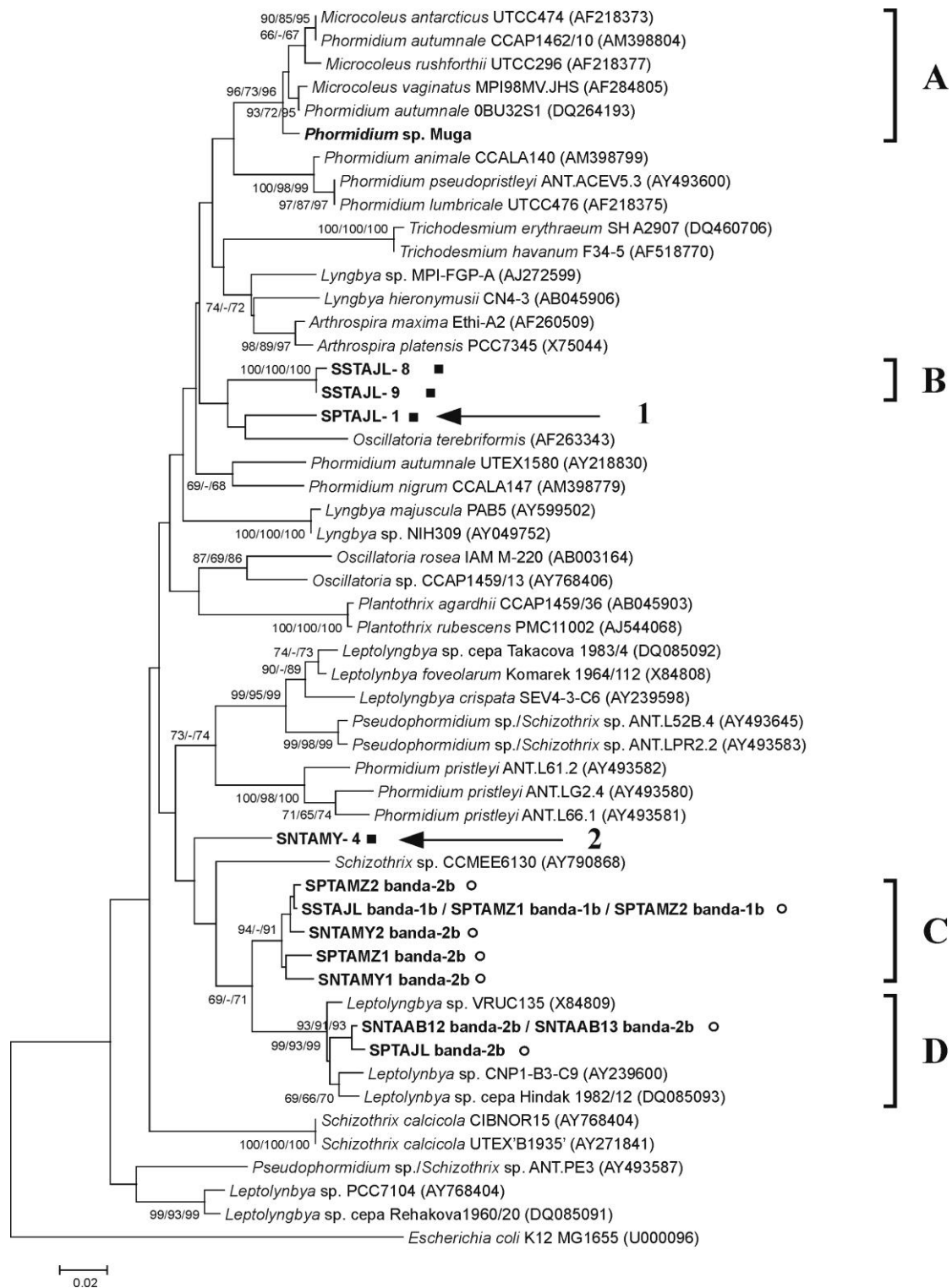


Figura 53. Árbol filogenético de las secuencias del gen ARNr 16S de muestras naturales de diferentes tapetes de *Schizothrix* empleados durante este estudio. Las secuencias determinadas en este estudio aparecen en negro. Diferentes símbolos diferencian las secuencias de clones de ARNr 16S de los tapetes microbianos (■), de las secuencias de ARNr 16S obtenidas mediante TGGE (○). Los valores de bootstrap (Felsenstein, 1985) para los análisis de NJ/MP/ML se determinaron para 1000 replicas y sólo se mostraron los valores de bootstrap mayores de 65%. Los números de acceso de las secuencias empleadas para la construcción de este árbol filogenético se indican después del nombre del taxón.

III. ESTUDIO FISIOLÓGICO DE LAS CIANOBACTERIAS DOMINANTES EN EL RIO MUGA.

El conocimiento de las características ecofisiológicas de las cianobacterias es de vital importancia para comprender los factores que determinan su presencia o ausencia en distintas condiciones ambientales y, por tanto, permite conocer las distribuciones diferenciales de las poblaciones en los ecosistemas acuáticos; contribuyendo por otra parte, al análisis taxonómico de los organismos, basándose en el clásico concepto ecológico: un nicho - una especie (Komárek y col., 2005). Por este motivo, se estudió la actividad fosfatasa y actividad nitrogenásica en las cianobacterias dominantes del río Muga, seleccionado como modelo.

III.1.1. Evolución de la actividad fosfatasa a lo largo del tiempo.

La variación de la actividad fosfatasa a lo largo del tiempo se estudió en las cuatro cianobacterias seleccionadas, para evaluar la validez del tiempo de incubación (30 min) utilizado en la metodología descrita (Whitton y col., 1999). Se emplearon colonias individuales y colonias fragmentadas de *Rivularia*, con el fin de determinar la existencia o no de diferencias en los resultados, al utilizar un tipo u otro de material biológico. Además, se emplearon cantidades pequeñas de tapetes tipo A, que denominaremos de aquí en adelante como tapetes de *Schizothrix* y fragmentos de colonias de *Nostoc* y *Tolypothrix*.

Como puede observarse en la **figura 54**, las actividades fosfomonoesterasa y fosfodiesterasa fueron siempre detectables a lo largo del tiempo, aunque algunas veces, los valores para la actividad fosfodiesterasa estuvieron cerca del límite de detección, como ocurrió en *Rivularia*.

Los ensayos realizados mostraron que la actividad fosfomonoesterasa fue mayor que la actividad fosfodiesterasa en todas las cianobacterias, exceptuando *Nostoc*, cuyos valores fueron muy similares. Además, se observó una tendencia general de la actividad fosfomonoesterasa a aumentar de forma lineal. Las mayores actividades al cabo de 1 h de incubación se encontraron en las cianobacterias *Tolypothrix* y *Nostoc* con 6,37 y 8,76 $\mu\text{mol } p\text{NP } \text{mg}^{-1} \text{ Chl a } \text{h}^{-1}$ respectivamente, mientras que las menores estuvieron en *Rivularia* y *Schizothrix* (3,63 y 1.48 $\mu\text{mol } p\text{NP } \text{mg}^{-1} \text{ Chl a } \text{h}^{-1}$ respectivamente).

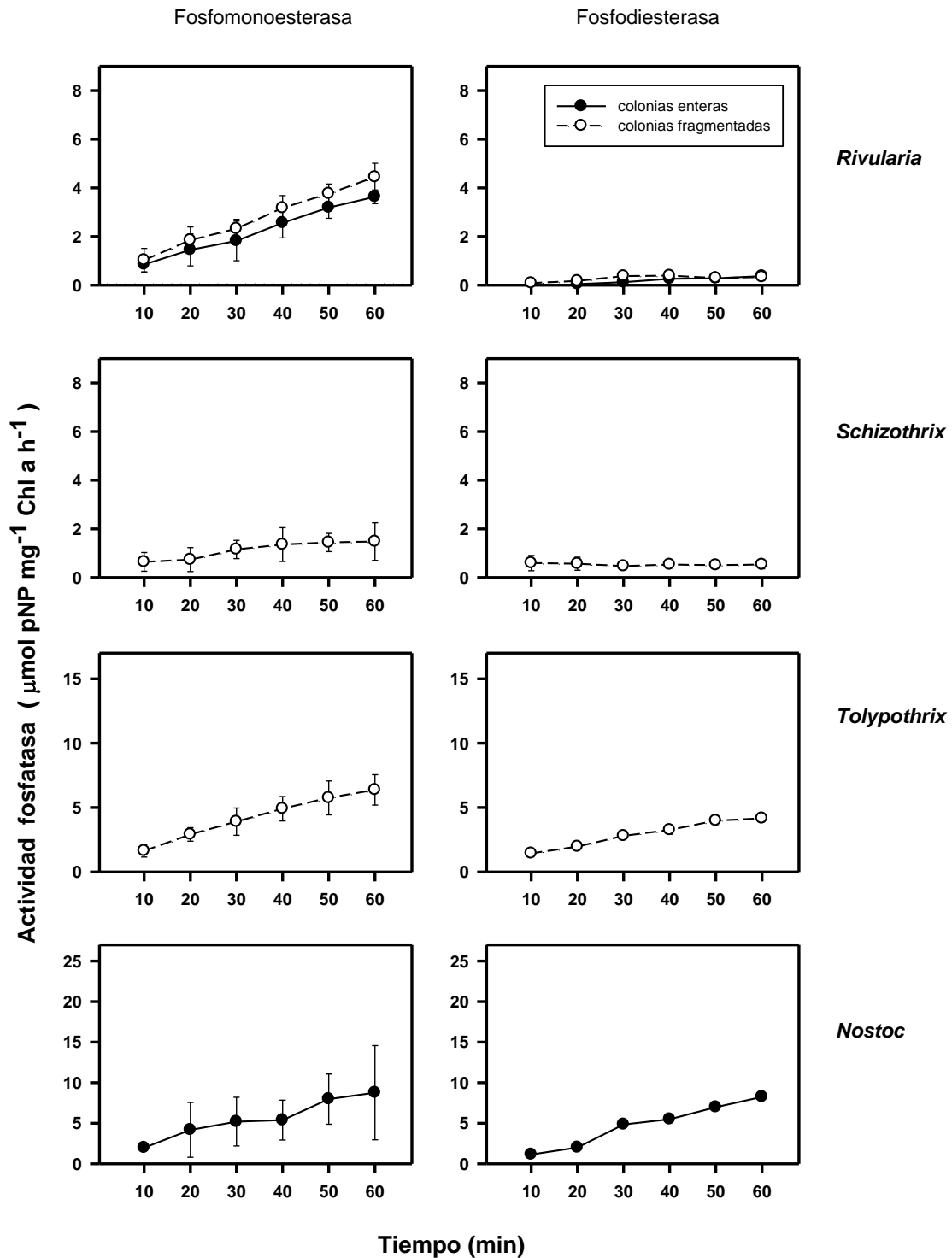


Figura 54. Efecto del incremento del periodo de incubación en la actividad fosfatasa de *Rivularia*, *Schizothrix*, *Tolypothrix* y *Nostoc* observados en ensayos realizados en el laboratorio a 20 °C durante 1 h. Las muestras fueron recogidas en noviembre de 2005, excepto *Rivularia*, recogida en mayo de 2005. Abreviaturas: PMEasa, fosfomonoesterasa; PDEasa, fosfodiesterasa. Los resultados se muestran para colonias individuales (●) o muestras fragmentadas (○) como media y desviación estándar.

Respecto a la actividad fosfodiesterasa, se obtuvieron algunas veces resultados variables. A pesar de ello, se puede interpretar que la actividad fosfodiesterasa aumentó de manera lineal, si bien los valores encontrados en *Rivularia* y *Schizothrix* fueron tan bajos que no se pudo apreciar esta tendencia claramente.

En el caso de *Rivularia*, se observa que la actividad fosfatasa de las colonias fragmentadas fue ligeramente superior a la obtenida en las colonias enteras, pero estadísticamente estas diferencias no fueron significativas ($P > 0.05$).

A partir de los resultados obtenidos se puede concluir que el tiempo de incubación de 30 minutos era un periodo de tiempo válido para los ensayos, que nos permitiría comparar los resultados obtenidos en todas las muestras, así como con otros experimentos encontrados en la bibliografía.

Para evaluar si el poco volumen que iba quedando en el matraz durante este ensayo influía en la actividad fosfatasa, se realizó de forma paralela el análisis de la actividad fosfatasa con diferentes matraces, cuyas incubaciones fueron llevadas hasta diferentes tiempos (10, 20, 30, 40, 50 y 60 minutos). Los resultados obtenidos mostraron la misma tendencia observada anteriormente (datos no mostrados).

III.1.2. Estudio de la actividad fosfatasa *in situ*.

Se realizaron ensayos de actividad fosfatasa en campo durante durante cinco campañas, con las tres formas macroscópicas cianobacterianas más abundantes del río Muga: *Rivularia*, *Tolypothrix* y tapetes de *Schizothrix*. Además, se incluyó en el estudio el análisis de la actividad fosfatasa de *Nostoc*, cianobacteria que estuvo presente sólo en noviembre de 2005 y marzo de 2006, aunque no en cantidades suficientes en noviembre para poder llevar a cabo ensayos.

Los resultados de los ensayos de actividad fosfatasa realizados *in situ* durante las diferentes campañas se muestran en la **figura 55**. En ella se observa que tanto la actividad fosfomonoesterasa como la fosfodiesterasa fueron detectables en todas las ocasiones. Por lo general, los valores más bajos se obtuvieron en marzo, siendo muy similares para *Rivularia*, *Schizothrix* y *Tolypothrix*. Sin embargo, los valores máximos de actividad fosfatasa fueron detectados en noviembre para *Rivularia*, y en mayo para *Tolypothrix* y *Schizothrix*, pero hay que tener en cuenta que estos experimentos se realizaron en el laboratorio y no en campo, pudiendo afectar el tiempo transcurrido a las muestras.

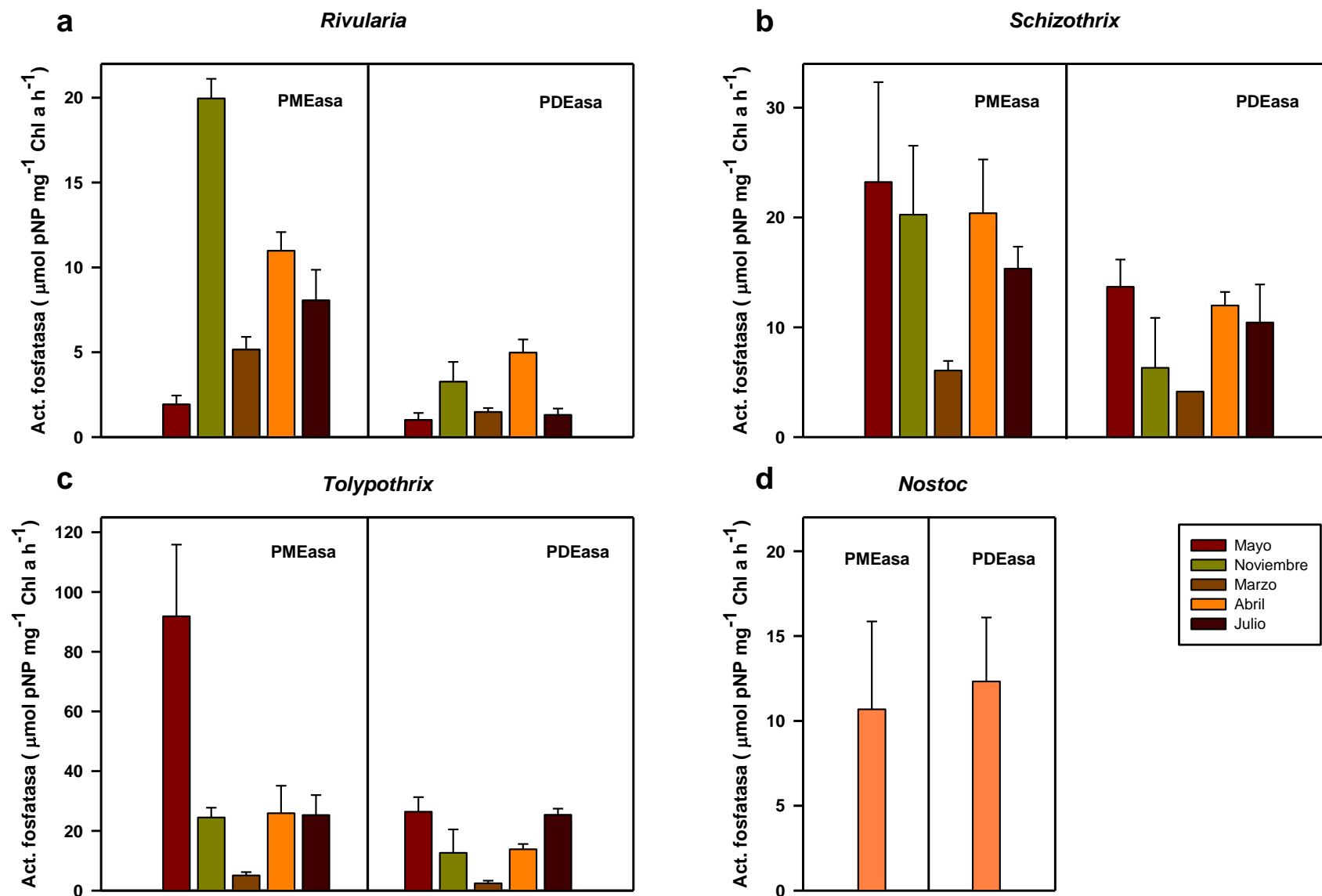


Figura 55. Actividades fosfatasas: (a) *Rivularia*, (b) *Schizothrix* y (c) *Tolypothrix* del Río Muga medidas *in situ* durante las cinco campañas de muestreo realizadas en el período 2005-6, junto con (d) *Nostoc* del 26 Abril 2006. (Los valores para *Schizothrix* y *Tolypothrix* del 27 Mayo 2005 fueron obtenidos de los ensayos en el laboratorio)

Existieron algunas diferencias en la actividad fosfatasa entre las especies. Así, las actividades para *Rivularia* fueron casi siempre más pequeñas que las actividades de las otras cianobacterias analizadas al mismo tiempo. Además, se observó una mayor variabilidad en *Rivularia* que en *Schizothrix* y *Tolypothrix*. Tanto la actividad fosfomonoesterasa como fosfodiesterasa en *Rivularia* presentó valores más altos en noviembre y en abril (19,48 y 10,99 $\mu\text{mol pNP mg}^{-1} \text{Chl a h}^{-1}$ para la actividad fosfomonoesterasa y 3,27 y 4,98 $\mu\text{mol pNP mg}^{-1} \text{Chl a h}^{-1}$ para la actividad fosfodiesterasa), pero generalmente la actividad fosfomonoesterasa fue dos veces mayor que la actividad fosfodiesterasa.

Las actividades de *Tolypothrix* fueron normalmente las más altas, excepto en marzo, cuyos valores fueron ligeramente más bajos que los obtenidos en *Schizothrix* en esa campaña. La proporción entre actividad fosfomonoesterasa y fosfodiesterasa fue mayor en *Tolypothrix* que en *Rivularia*, llegando en algunas ocasiones a ser la actividad fosfomonoesterasa cuatro veces mayor que la actividad fosfodiesterasa.

Respecto a los tapetes de *Schizothrix*, se observa que los valores de actividad fosfomonoesterasa fueron generalmente muy similares durante todo el estudio, con valores entre 23,23 y 17,64 $\mu\text{mol pNP mg}^{-1} \text{Chl a h}^{-1}$, excepto en marzo cuando *Schizothrix* presentó el valor más bajo (6,05 $\mu\text{mol pNP mg}^{-1} \text{Chl a h}^{-1}$). La misma tendencia se puede observar en la actividad fosfodiesterasa, con valores altos entre 13,69 y 10,43 $\mu\text{mol pNP mg}^{-1} \text{Chl a h}^{-1}$ y el valor más bajo de 5,60 $\mu\text{mol pNP mg}^{-1} \text{Chl a h}^{-1}$.

Por último, *Nostoc* mostró valores muy similares en ambas actividades, siendo incluso algo mayor la actividad fosfodiesterasa que fosfomonoesterasa durante la única campaña en que se analizó su actividad fosfatasa en campo, siendo la única cianobacteria en la que se observó este fenómeno durante el período de estudio.

Por otra parte, se determinó la razón actividad fosfodiesterasa/actividad fosfomonoesterasa (PDEasa/PMEasa). Esta relación fue relativamente variable durante el ciclo estacional, especialmente en *Tolypothrix*. El valor medio de esta razón fue menor en *Rivularia* (0,34) y mayor en *Schizothrix* (0,61) y *Tolypothrix* (0,60). Hay que tener en cuenta que los valores de *Nostoc* se calcularon a partir de los datos obtenidos en una sola campaña (abril de 2005) y no durante todo el periodo de estudio como sucedió en las otras cianobacterias.

III.1.3. Respuesta de la actividad fosfatasa ante diferentes concentraciones de sustrato: Cinética enzimática.

La cinética de la enzima fosfatasa se investigó en todas las cianobacterias estudiadas. Como puede observarse en la **figura 56**, las actividades fosfomonoesterasa y fosfodiesterasa de las cuatro cianobacterias analizadas, mostraron una relación hiperbólica con respecto a la concentración de sustrato, siguiendo de este modo, cinéticas de Michaelis-Menten claras.

Para determinar los parámetros cinéticos de K_M y V_{max} de las actividades fosfomonoesterasa y fosfodiesterasa en cada una de estas cianobacterias, se realizaron las tres transformaciones lineales de la ecuación de Michaelis-Menten descritas en materiales y métodos. En la **tabla 28**, se muestran los valores de los parámetros cinéticos obtenidos con las distintas transformaciones lineales así como la media de estos valores para cada una de las especies.

Las tres transformaciones lineales dieron resultados ligeramente diferentes, aunque las tendencias se conservaron, en general, para las especies. En el caso de la actividad fosfomonoesterasa, los valores correspondientes a K_M variaron entre 34,4 y 85,5 μM para *Rivularia*, 34,8 y 80,7 μM para *Schizothrix*, 52 y 88 μM para *Tolypothrix* y por último, en *Nostoc* fue donde se encontró una gran variabilidad en los valores, encontrándose éstos entre 10,7 y 112 μM . En cuanto a V_{max} , los valores obtenidos en cada una de las transformaciones para las cianobacterias individuales fueron más similares, encontrándose dentro de los rangos de 6,25-10,8 $\mu\text{mol pNP mg}^{-1} \text{ Chl a h}^{-1}$ para *Rivularia*, 10,6-21,4 $\mu\text{mol pNP mg}^{-1} \text{ Chl a h}^{-1}$ para *Schizothrix*, 75,1-100 $\mu\text{mol pNP mg}^{-1} \text{ Chl a h}^{-1}$ para *Tolypothrix* y en el caso de *Nostoc*, entre 28,6 y 50 $\mu\text{mol pNP mg}^{-1} \text{ Chl a h}^{-1}$.

Los valores medios de K_M de la fosfomonoesterasa fueron representativos de las tendencias observadas en las distintas transformaciones, con valores similares de K_M para todas las especies, lo que indica que tienen una afinidad por el sustrato también similar, si bien, la K_M fue algo más alta en *Nostoc*. En cuanto a V_{max} , *Tolypothrix* presentó el valor medio máximo con 82,7 $\mu\text{mol pNP mg}^{-1} \text{ Chl a h}^{-1}$, mientras el mínimo lo tuvo *Rivularia* con 8,4 $\mu\text{mol pNP mg}^{-1} \text{ Chl a h}^{-1}$.

Respecto a la actividad fosfodiesterasa, se encontró una gran variabilidad según la transformación empleada, aunque los valores medios también fueron representativos de las tendencias observadas en las distintas especies. Los valores de K_M fueron generalmente más altos que los obtenidos para la fosfomonoesterasa, encontrándose

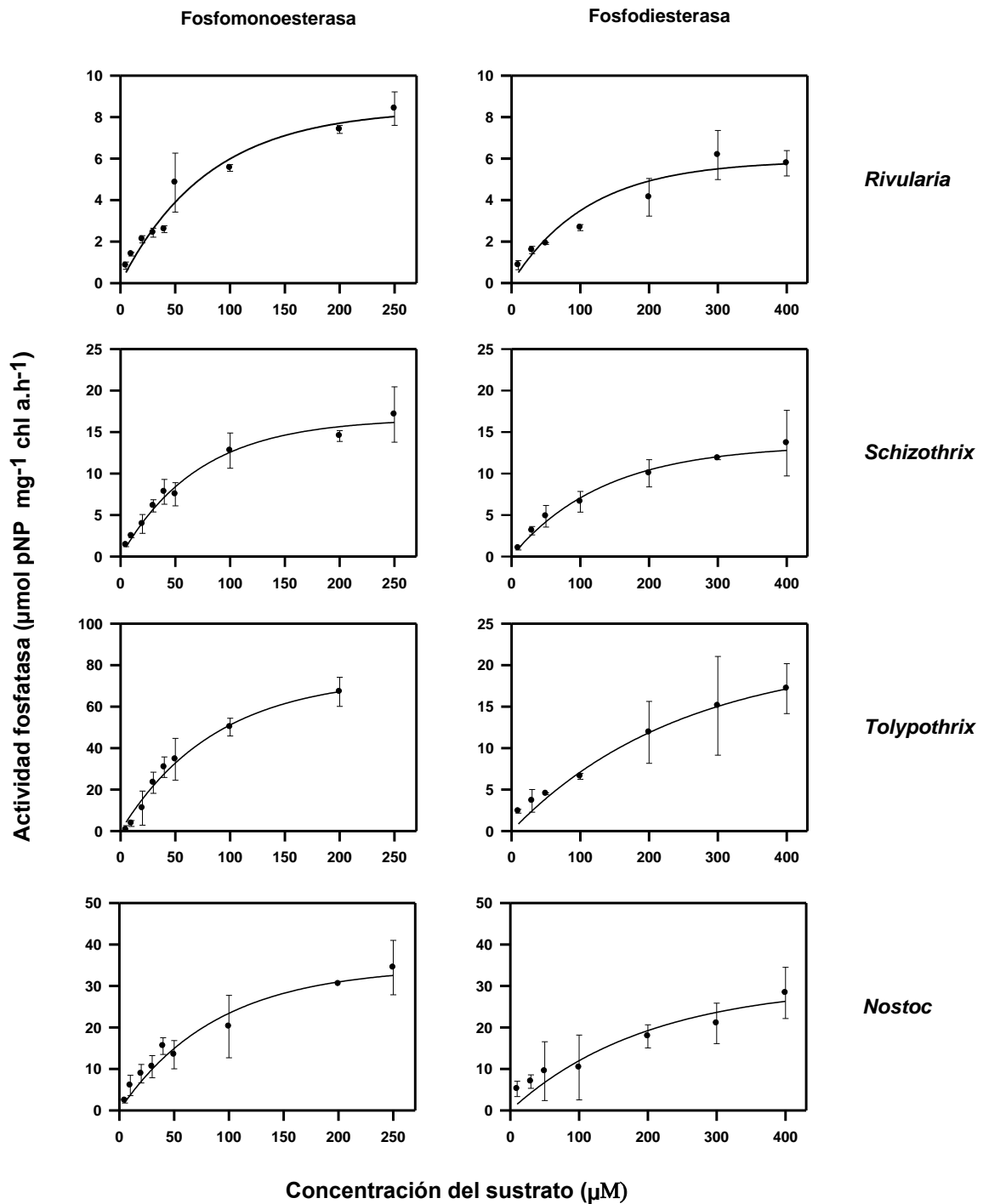


Figura 56. Efecto de la concentración de sustrato en las actividades PMEasa y PDEasa de muestras de *Rivularia*, *Schizothrix*, *Tolypothrix* y *Nostoc* del río Muga recogidas el 26 Abril de 2006. Los valores son la media \pm desviación estandar (barras verticales); n=3. Las líneas indican las cinéticas de Michaelis-Menten obtenidas por análisis de regresión no lineal.

Tabla 28. Parámetros cinéticos de PMEasa y PDEasa determinados a partir de las tres regresiones lineales de la ecuación de Michaelis-Menten de muestras de *Rivularia*, *Schizothrix*, *Tolypothrix* y *Nostoc* recogidas el 25 Abril 2006. Las unidades de K_M son μM , las de V_{max} son $\mu\text{mol pNP mg}^{-1} \text{Chl a h}^{-1}$ y T_t en horas. Los valores de R^2 se refieren al ajuste de la recta de las transformaciones de la ecuación de Michaelis-Menten e indican el mejor ajuste de los datos a esa transformación. Abreviaturas: K_M - constante de Michaelis-Menten; PMEasa – fosfomonoesterasa; PDEasa- fosfomonoesterasa, V_{max} - velocidad máxima, T_t - Tiempo de recambio.

| Organismo | Actividad | Lineweaver-Burk | | | Eadie-Hofstee | | | Hanes-Woolf | | | media | | T_t |
|--------------------|-----------|-----------------|------------------|-------|---------------|------------------|-------|-------------|------------------|-------|-------|------------------|-------|
| | | K_M | V_{max} | R^2 | K_M | V_{max} | R^2 | K_M | V_{max} | R^2 | K_M | V_{max} | |
| <i>Rivularia</i> | PMEasa | 34,4 | 6,25 | 0,93 | 48,9 | 8,29 | 0,70 | 85,5 | 10,8 | 0,92 | 56,2 | 8,4 | 6,69 |
| | PDEasa | 57,2 | 4,76 | 0,95 | 67,8 | 5,80 | 0,67 | 134,7 | 7,6 | 0,92 | 92,8 | 6,2 | 14,97 |
| <i>Schizothrix</i> | PMEasa | 34,8 | 10,6 | 0,92 | 73,2 | 20,6 | 0,92 | 80,7 | 21,4 | 0,91 | 59,5 | 17,3 | 3,44 |
| | PDEasa | 210,8 | 22,2 | 0,94 | 151,6 | 17,9 | 0,93 | 151,4 | 17,2 | 0,80 | 146,8 | 17,5 | 8,39 |
| <i>Tolypothrix</i> | PMEasa | 63,0 | 80,0 | 0,96 | 52,0 | 75,1 | 0,75 | 88,7 | 100 | 0,90 | 66,1 | 82,7 | 0,8 |
| | PDEasa | 35,0 | 10,0 | 0,76 | 47,6 | 13,4 | 0,26 | 104,3 | 16,6 | 0,56 | 85,0 | 15,1 | 5,63 |
| <i>Nostoc</i> | PMEasa | 112,1 | 55,5 | 0,91 | 30,65 | 28,6 | 0,12 | 10,7 | 50,0 | 0,55 | 77,9 | 42,2 | 1,85 |
| | PDEasa | 101,5 | 50,0 | 0,90 | 22,2 | 17,4 | 0,11 | 106,7 | 25,0 | 0,51 | 88,5 | 30,2 | 2,93 |

entre 57,2 y 134,7 μM para *Rivularia*, 151,5 y 210,8 μM para *Schizothrix*, 35 y 104,3 μM para *Tolypothrix* y finalmente *Nostoc* con 22,2 y 106,7 μM . Los valores medios de todas las transformaciones fueron 92,8, 146,8, 85 y 88,5 μM para *Rivularia*, *Schizothrix*, *Tolypothrix* y *Nostoc*, respectivamente.

Por otro lado, los valores de V_{max} fueron generalmente más bajos que los obtenidos para la actividad fosfomonoesterasa, excepto en *Schizothrix* que fueron muy similares. Estos valores variaron entre 4,76 y 7,6 $\mu\text{mol pNP mg}^{-1} \text{ Chl a h}^{-1}$ para *Rivularia*, 17,2 y 22,2 $\mu\text{mol pNP mg}^{-1} \text{ Chl a h}^{-1}$ para *Schizothrix*, 10 y 16,6 $\mu\text{mol pNP mg}^{-1} \text{ Chl a h}^{-1}$ para *Tolypothrix* y 17,4 y 50 $\mu\text{mol pNP mg}^{-1} \text{ Chl a h}^{-1}$ para *Nostoc*, correspondiendo el valor medio máximo a *Nostoc* (30,2 $\mu\text{mol pNP mg}^{-1} \text{ Chl a h}^{-1}$) y el mínimo a *Rivularia* (6,2 $\mu\text{mol pNP mg}^{-1} \text{ Chl a h}^{-1}$).

Por último, se observó que el tiempo de recambio o tiempo empleado en la transformación del sustrato, fue menor en *Tolypothrix* (0,8h) para la actividad fosfomonoesterasa y en *Nostoc* (2,93h) para la fosfodiesterasa, mientras que *Rivularia* presentó los valores más altos en ambos casos (6,69 y 14,97 horas respectivamente).

III.1.4. Determinación de la actividad fosfatasa extracelular.

Se realizó en el laboratorio un experimento para determinar la actividad fosfatasa extracelular. Para ello, se mantuvieron en agitación matraces con colonias de *Rivularia* y medio de ensayo sin sustrato durante 2 horas a 20 °C. Pasado este tiempo, se filtró la solución de ensayo, se añadió sustrato y se mantuvo esta solución una hora en estas mismas condiciones sin muestra biológica. A partir de los resultados obtenidos se puede extraer que la actividad extracelular fosfomonoesterasa y fosfodiesterasa durante las 2 horas fue del 5,3 % respecto a los valores medios (0,22 $\mu\text{mol pNP mg}^{-1} \text{ Chl a h}^{-1}$ de 4,16 $\mu\text{mol pNP mg}^{-1} \text{ Chl a h}^{-1}$ actividad celular) y 10,4% (0,11 $\mu\text{mol pNP mg}^{-1} \text{ Chl a h}^{-1}$ de 1,06 $\mu\text{mol pNP mg}^{-1} \text{ Chl a h}^{-1}$ actividad celular), respectivamente.

III.1.5. Efecto de la luz vs oscuridad en la actividad fosfatasa.

Se llevaron a cabo varios estudios para establecer la influencia de factores ambientales en la actividad fosfatasa. Entre ellos se encuentran los diferentes ensayos realizados en el laboratorio en los que se determinó la diferencia de la actividad fosfatasa en luz vs oscuridad.

Como puede observarse en la **tabla 29**, las medidas obtenidas dieron resultados muy similares para la actividad fosfomonoesterasa, tanto en condiciones de luz como en oscuridad, aunque con pequeñas variaciones [en el caso de *Tolypothrix* fue mayor la actividad en oscuridad ($38,9 \mu\text{mol } p\text{NP mg}^{-1} \text{ Chl a h}^{-1}$) que en condiciones de iluminación ($26,4 \mu\text{mol } p\text{NP mg}^{-1} \text{ Chl a h}^{-1}$), mientras en *Nostoc* el valor medio de la

Tabla 29. Actividad fosfatasa en luz vs oscuridad de *Rivularia*, *Schizothrix* *Tolypothrix* y *Nostoc*. Ensayo realizado en el laboratorio a 20°C durante 30 minutos. Los valores se expresan como las medias de los datos obtenidos para las distintas replicas que consta el experimento ($n=4$).

| | Actividad fosfatasa ($\mu\text{mol } p\text{NP mg}^{-1} \text{ Chl a h}^{-1}$) | | | |
|--------------------|--|-----------------|-----------------|-----------------|
| | PMEasa | | PDEasa | |
| | Luz | Oscuridad | Luz | Oscuridad |
| <i>Rivularia</i> | $3,38 \pm 0,52$ | $3,33 \pm 0,25$ | $1,06 \pm 0,16$ | - |
| <i>Schizothrix</i> | $3,05 \pm 0,84$ | $2,45 \pm 0,26$ | $2,02 \pm 0,26$ | $3,34 \pm 1,59$ |
| <i>Tolypothrix</i> | $26,4 \pm 8,21$ | $38,9 \pm 8,22$ | $8,11 \pm 0,67$ | $8,88 \pm 2,58$ |
| <i>Nostoc</i> | $15,9 \pm 3,06$ | $13,7 \pm 2,19$ | $11,9 \pm 2,28$ | $14 \pm 1,64$ |

actividad fosfomonoesterasa fue mayor con luz que en oscuridad ($15,9$ frente a $13,7 \mu\text{mol } p\text{NP mg}^{-1} \text{ Chl a h}^{-1}$), pero estas diferencias no fueron significativas ($P > 0,001$). En el caso de la actividad fosfodiesterasa las diferencias encontradas en dicha actividad luz vs oscuridad, tampoco fueron significativas ($P > 0,001$).

Asimismo, se amplió el tiempo de incubación a una hora con el fin de determinar si el periodo de incubación puede incidir en los resultados obtenidos. Estos resultados no mostraron diferencias significativas entre las actividades medidas en oscuridad y las medidas en condiciones de iluminación ($P > 0,001$; datos no mostrados).

III.1.6. Influencia de la temperatura en la actividad fosfatasa.

Se estudió el efecto de la temperatura de incubación en la actividad enzimática en poblaciones naturales de *Rivularia*. Para ello, se realizaron distintos ensayos en el laboratorio a diferentes temperaturas de incubación, empleando el rango desde 10°C hasta 35°C .

Como puede observarse en la **figura 57**, se produce un incremento del 36% en la actividad fosfomonoesterasa en *Rivularia* por cada 10°C de aumento de la temperatura en el rango de $10-35^\circ\text{C}$. Respecto a los resultados obtenidos para la

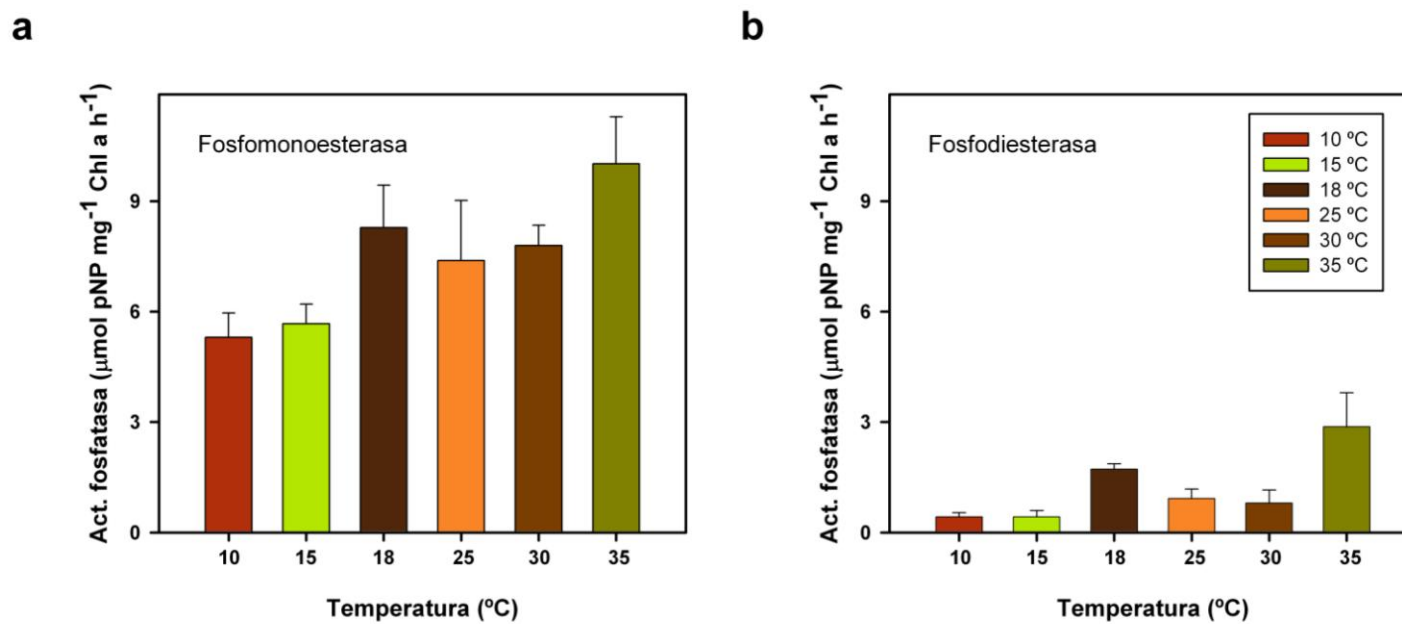


Figura 57. Influencia de la temperatura en la actividad fosfatasa de superficie de muestras de *Rivularia* recogidas el 27 de Mayo del 2005. Ensayos realizados en el laboratorio. (a) realizado con el sustrato pNPP (b) realizado con el sustrato bis-pNPP.

actividad fosfodiesterasa, se observa que los valores son más erráticos. La variación de los valores de Q_{10} para la fosfomonoesterasa (1,71-2,63) fueron similares a los obtenidos para la fosfodiesterasa (1,95-2,19), indicando que ambas se encuentran influenciadas por la temperatura de la misma manera.

III.2. Análisis de la capacidad de fijación de N_2 de las cianobacterias dominantes.

La capacidad de fijación de nitrógeno se estudió *in situ*, en primer lugar en las cianobacterias con heterocistos *Rivularia*, *Tolypothrix* y *Nostoc*. El ensayo se realizó durante las horas de máxima irradiancia ($2200-430 \mu E m^{-2} s^{-1}$), comenzando a las 11:30 y finalizando a las 17:30, tras 6 horas de incubación.

Los valores medios de la actividad nitrogenásica de estas cianobacterias se muestran en la **tabla 30**. Estos resultados indicaron que dicha actividad fue variable, encontrándose en el rango de 105,6 y 508,8 $nmol C_2H_4 mg^{-1} chl a h^{-1}$, correspondientes a *Tolypothrix* y *Nostoc* respectivamente. *Rivularia* presentó una actividad nitrogenasa similar a la obtenida en *Tolypothrix*.

Tabla 30. Actividad nitrogenásica de muestras de *Rivularia*, *Tolypothrix* y *Nostoc* del río Muga. El tiempo de incubación fue de 6 horas. Los valores se muestran como la media de los datos obtenidos para las diferentes replicas (n=3) que consta el experimento.

| Actividad nitrogenásica ($nmol C_2H_4 mg^{-1} chl a h^{-1}$) | |
|--|------------------|
| <i>Rivularia</i> | $117,0 \pm 29,3$ |
| <i>Tolypothrix</i> | $105,6 \pm 20,6$ |
| <i>Nostoc</i> | $508,8 \pm 21,3$ |

Se analizó también la actividad de la nitrogenasa en dos tapetes de *Schizothrix*, denominados Tapete Ay Tapete B, que se describen a continuación:

En la **figura 58**, se muestra los lugares donde se recogieron estos dos tapetes, situados en la margen derecha y en la parte inicial del tramo estudiado del río Muga. El Tapete A, se corresponde con el tapete empleado en los estudios de actividad fosfatasa (**figura 58 b-d**), fue un tapete plano de unos 2 mm de grosor, formado sobre la superficie de la roca, que en ocasiones alcanzó los 2 cm. Presentó un aspecto

curtido, con fuertes incrustaciones de carbonato cálcico y, una parte externa, expuesta a la luz diaria de color rojizo. Por otro lado, el Tapete B formó una fina película sobre la superficie de la roca de 0,5-1 mm de grosor (**figura 58 f-g**), de la que sobresalían filamentos de *Schizothrix* a modo de penachos. Este tapete estaba ligeramente carbonatado y era algo quebradizo.

La composición de cada uno de estos tapetes fue analizada por microscopía, observándose que el Tapete A estaba compuesto por un 55-60% de *S. coriacea*, 39-45% de la segunda forma identificada de *Schizothrix* y un 0-0,5% de *Tolypothrix* (**figura 58 j-k**), mientras que el Tapete B presentó un 28-32% de *S. coriacea*, 40-43% segunda forma de *Schizothrix*, 20-22% *Phormidium retzii*, 5-7 % *Tolypothrix*, 0-0.5 % *Rivularia* y diatomeas (**figura 58 l-m**).

En estudios previos se había visto actividad nitrogenásica en cianobacterias sin heterocistos en oscuridad (**Berman-Frank y col., 1997**). Así, el experimento se realizó por una parte en luz, en condiciones similares a las llevadas a cabo con las cianobacterias con heterocistos, incubándolas durante las 6 horas de máxima irradiancia ($1800-260 \mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$), comenzando el ensayo a las 12:58 h y finalizando al atardecer y por otro lado y en paralelo, tres de las replicas se cubrieron con papel opaco el fin de analizar dicha actividad, en oscuridad, durante el mismo tiempo.

Asimismo, para determinar si la actividad nitrogenásica en estos tapetes podría estar relacionada con un aumento o aparición de actividad en el periodo del atardecer o amanecer, se llevó a cabo un ensayo de la nitrogenasa *in situ* durante las horas de menor intensidad lumínica y durante la noche. El ensayo comenzó al atardecer ($t_0 = 19:45 \text{ h}$) y finalizó al amanecer ($t_f = 8:45 \text{ h}$), tras 13 horas de incubación y en él también se mantuvieron 3 replicas tapadas y otras tres sin tapar (**tabla 31**).

En el tapete A, se observaron los valores mayores de actividad nitrogenásica en el ensayo que se llevó desde el anochecer hasta el amanecer, en oscuridad (**tabla 31**), si bien las diferencias no fueron estadísticamente significativas ($P > 0.001$), con respecto al resto de los ensayos realizados, indicando que dicha actividad nitrogenásica se da tanto a la luz como en oscuridad, en dichos tapetes. Los valores de actividad nitrogenásica en el Tapete B fueron mayores en condiciones de iluminación que en oscuridad, tanto en las muestras que eran tapadas, a las horas de máxima irradiancia, como en los ensayos realizados desde el anochecer hasta el amanecer, siendo las diferencias significativas ($P < 0.001$). Estos resultados indican que la actividad nitrogenásica de este tapete se ve afectada por la luz. Estas diferencias observadas en



Figura 58. Fotografías de los dos tapetes de *Schizothrix* empleados en los experimentos de actividad nitrogenasa. (a - d) localización y detalle del tapete de *Schizothrix* Tipo A; (e - h) localización y detalle del tapete de *Schizothrix* Tipo B; (i) vista general de la zona donde se encontraron los tapetes de *Schizothrix* empleados en el experimento de nitrogenasa realizado “*in situ*” en abril del 2006; (j, k y l) microfotografías de los filamentos de *Schizothrix* (j y k) del Tapete A y (l y m) del Tapete B [Escala barra sólida = 20 mm; escala barra discontinua = 100 μ m; escala barra de puntos = 20 μ m]. Las flechas amarillas indican los lugares donde se encontraron los tapetes de *Schizothrix*.

Resultados

la actividad nitrogenasa pueden ser atribuidas a la diferente composición cianobacteriana de los tapetes empleados.

Tabla 31. Actividad nitrogenásica de muestras de distintos tapetes microbianos del río Muga; ensayos realizados *in situ* en la campaña de muestreo realizada en Abril de 2006. Los valores se muestran como las medias de los datos obtenidos para las diferentes replicas (n=3) que consta el experimento. El experimento de 6 horas fue realizado durante las horas de máxima irradiancia (12.45-18.45) mientras que el de 13 horas ocupó la franja desde el atardecer hasta el amanecer (19.45-8.45).

| | Actividad nitrogenásica (nmol C ₂ H ₄ mg ⁻¹ Chl a h ⁻¹) | | | |
|----------|--|-------------|--|-------------|
| | horas de máxima irradiancia (12.45h – 18.45h) | | atardecer-amanecer (19.45h - 8.45h) | |
| | Luz | Oscuridad | Luz | Oscuridad |
| Tapete A | 63.5 ± 40.7 | 28.1 ± 10.1 | 45.7 ± 18.4 | 78.7 ± 23.2 |
| Tapete B | 304.01 ± 54.1 | 57.0 ± 29.1 | 27.5 ± 12.8 | 24.6 ± 7.6 |

En general, de los resultados obtenidos puede extraerse que *Nostoc* fue la cianobacteria con mayor actividad nitrogenásica a la luz con 508,8 nmol C₂H₄ mg⁻¹ Chl a h⁻¹, mientras que los valores menores de actividad se detectaron en el Tapete B, en condiciones de oscuridad (24,6 nmol C₂H₄ mg⁻¹ Chl a h⁻¹). Es de destacar que el Tapete B presentó, a la luz, una actividad muy superior (cerca de 3 veces más) a la observada en las colonias de *Rivularia* y *Tolypothrix*.

DISCUSIÓN

El tratamiento sistemático de las Cianobacterias se encuentra actualmente guiado por dos Códigos de Nomenclatura, que se derivaron de tradiciones históricamente separadas. Ambas tradiciones emplean propiedades fenotípicas para clasificar a las cianobacterias, pero las aproximaciones, reglas de nomenclatura e incluso conceptos de especie son diferentes. Así, cuando se aplican las reglas de los Códigos Botánico y Bacteriológico al mismo grupo de organismos, las confusiones son inevitables (Oren, 2004). Además, ambos códigos se han encontrado con numerosas dificultades a la hora de definir y separar las especies (Castenholz, 1992, Komárek, 1994,1996).

Los avances en biología molecular, que han posibilitado la secuenciación molecular y la lectura directa del código genético (Woese, 1987), han proporcionado una nueva percepción de las relaciones filogenéticas entre microorganismos, incluyendo a las cianobacterias. Los trabajos comenzaron con los análisis de cultivos axénicos (Giovannoni y col., 1988) y han generado un esquema filogenético factible, basado en las secuencias del gen ARNr 16S (Wilmotte y Herdman, 2001), contribuyendo significativamente a la taxonomía de las cianobacterias. Sin embargo, la nueva tecnología cuando se aplica a los sistemas naturales, ha destapado una diversidad abrumadora de microorganismos en la naturaleza (Hugenholtz et al., 1998), entre los que se incluye un gran número de taxones cianobacterianos previamente no reconocidos (Giovannoni et al., 1990). El procedimiento de aislamiento en cultivo, ha resultado ser un proceso selectivo que excluye a una gran proporción de microorganismos no cultivables (Amann y col., 1995) y, favorece otros genotipos aparte de los que dominan las poblaciones naturales (Ward y col., 1997).

En estos momentos, se recomienda una aproximación polifásica, integrando datos e información de morfología, filogenia, fisiología y ecología (Wilmotte y Herdman, 2001; Stackebrandt, 2001), para resolver la controversia planteada sobre la taxonomía, evolución y el concepto de especie (Wilmotte, 1994), proporcionando una aplicación fuerte para la clasificación y definición de grupos de microorganismos coherentes (Wilmotte, 1994; Vandamme y col., 1996).

I. Análisis de muestras naturales de *Rivularia* y aislados tipo-Rivulariaceae de diferentes ríos calizos con dominancia de *Rivularia*.

Las cianobacterias con heterocistos son morfológicamente muy diversas y, forman un grupo monofilético entre las cianobacterias, en base a las secuencias del gen ARNr 16S (Giovannoni y col., 1988; Wilmotte y Herdman, 2001; Lyra y col., 2001; Gugger y Hoffmann, 2004). Sin embargo, las relaciones entre las diferentes cianobacterias con heterocistos están en su mayor parte sin resolver. Esto es lo que sucede con los géneros *Rivularia* y *Calothrix*, clasificados en el orden Nostocales, familia Rivulariaceae en el código botánico y, dentro de la Subsección IV.II en el código bacteriológico propuesto (Rippka y col., 1979; Castenholz, 2001).

Se piensa que la familia Rivulariaceae puede ser uno de los linajes cianobacterianos más diversos (Lachance, 1981; Whitton, 1987), pero debido a la escasez de secuencias pertenecientes a este grupo, no se ha podido todavía probar esta hipótesis. Análisis filogenéticos previos de las secuencias génicas del ARNr 16S en cultivos axénicos de la colección Pasteur, mostraron que *Calothrix* forma al menos tres grupos diferentes (Wilmotte y Herdman, 2001), uno de los cuales, se puede subdividir en otros cuatro, en base a los estudios de hibridación ADN-ADN y composición de pigmentos (Lachance, 1981; Rippka y col., 2001b). También han demostrado que *Rivularia* constituía un grupo separado, compuesto por cianobacterias con un requerimiento elevado de sal (especies de ambientes salinos) sin la capacidad de diferenciar acinetos (Rippka y col., 2001a). Sihvonen y col. (2007), basándose también en los análisis filogenéticos del gen ARNr 16S, mostraron una gran diversidad genética en cepas con morfotipo *Calothrix* aisladas del Mar Báltico, sugiriendo que podrían pertenecer al menos a cinco géneros diferentes. Además, al igual que Rippka y col., (2001a), separaron el género *Rivularia* del de *Calothrix*, aunque, dentro del grupo *Rivularia* incluyeron también a cepas de *Rivularia* del Mar Báltico que no requerían una concentración de sal elevada para su crecimiento.

En este trabajo, se han identificado por microscopía y secuenciado la región *cpcBA*-IGS y el gen de ARNr 16S de varias colonias naturales de *Rivularia* y, 13 aislados tipo Rivulariaceae de diferentes ríos calizos con dominancia de *Rivularia*. Al estudiar poblaciones de este género, se encontraron colonias como las del río Alhárabe, identificadas como *R. biasolettiana*, mostrando caracteres típicos de este taxón. También se encontraron pequeñas colonias del río Endrinales, hemiesféricas altamente calcificadas, mostrando una zonación clara, que fueron del tipo *R.*

haematites. Ambos tipos de *Rivularia* se han descrito previamente en rocas de arroyos o manantiales calizos (Whitton, 2002) y, fueron dominantes en la mayoría de los ríos españoles estudiados (Aboal y col., 2002; Aboal y col., 2005). Sin embargo, algunas de las colonias analizadas tuvieron una morfología ambigua, encontrándose heterogeneidad entre los tricomas de *Rivularia*, incluso dentro de los tricomas de una misma colonia. Sinclair y Whitton (1977) describieron observaciones similares. Estos autores encontraron tres tipos distintos de morfología de Rivulariaceae liberados durante la incubación de colonias de *Rivularia* de un estanque, mientras que los tricomas liberados de colonias de *Rivularia* de arroyos parecían ser de *Calothrix*.

Cuando se cultivaron bajo condiciones de laboratorio las cepas tipo Rivulariaceae aisladas de ríos calizos donde *Rivularia* era dominante y, se examinaron morfológicamente, todas ellas presentaron características desde el punto de vista fenotípico muy similares a las características morfológicas de *Calothrix*, no mostrando características típicas del género *Rivularia*. Como previamente se registró para aislados de colonias naturales identificadas como *Rivularia*, el hecho de que no produjeran colonias gelatinosas en cultivo, les convertía en indistinguibles de *Calothrix* (Rippka y col., 1979).

Con el fin de estudiar la variabilidad morfológica de nuestros aislados tipo Rivulariaceae en detalle, y ya que los primeros aislados se realizaron en medio rico en nutrientes, los cultivos se transfirieron a un medio con un nivel de nutrientes bajo, más similar a las características de los ríos con colonias de *Rivularia*. Los resultados mostraron que algunos aislados fueron capaces de adoptaron características morfológicas típicas de *Rivularia* (por ejemplo, tricomas secundarios permaneciendo dentro de la vaina ‘materna’, vaina lamelada y tricomas confluentes) cuando se cambiaron las condiciones de cultivo. Sin embargo, otras cepas, mantuvieron características morfológicas similares a *Calothrix*. Además, cuando se evaluó la influencia del medio en la variabilidad morfológica de colonias de *Rivularia* en placas de agar, con tres medios de diferentes rangos de concentración de nutrientes, se observaron diferencias en el crecimiento y en la morfología de esta cianobacteria.

Se ha resaltado durante mucho tiempo la importancia de la elección del medio de cultivo empleado en el laboratorio (Whitton, 1992; Whitton y Potts, 2000). Whitton (2002) señaló que la mayoría de los investigadores son conscientes de la necesidad de crecer un organismo en un medio libre de N si se trata de un organismo fijador de nitrógeno, pero con menos frecuencia, los organismos se han crecido en bajas

concentraciones de fósforo y, sólo en raras ocasiones, se ha hecho en estudios taxonómicos. Además, la mayor parte de los estudios taxonómicos y el mantenimiento de las colecciones de cultivo, han sido llevados a cabo normalmente en un medio con demasiado fosfato. Esto significa que las características morfológicas influenciadas por la limitación del fósforo, nunca son vistas y, en el caso de algunas de las cepas en las colecciones de cultivo, se pueden perder genéticamente (Whitton, 2002). Muchos autores están de acuerdo en que la flexibilidad fenotípica extrema de muchas especies cianobacterianas en cultivo, produce morfologías atípicas o anomalías que se diferencian de las típicamente encontradas en la naturaleza (Golubic, 1979; Komárek y Anagnostidis, 1999; Pomati y col., 2000). Se ha sugerido que la baja correlación de los caracteres fenotípicos y la caracterización genotípica basada en *cpcBA*-IGS (Barrer y col., 1999; Bittencourt-Oliveira y col., 2001), es un resultado de la variación inducida por los medios de cultivo. En nuestro estudio, las altas concentraciones de nutrientes del medio BG11 y, todavía mayores del AA, parecen ser responsables de las variaciones morfológicas y del crecimiento diferencial observado. Numerosos estudios han indicado que la concentración de fósforo del ambiente puede ser un factor particularmente importante en el crecimiento de Rivulariaceae (Whitton, 1987).

Los análisis genéticos del *cpcBA*-IGS de todas las secuencias de poblaciones de *Rivularia* y aislados tipo Rivulariaceae han mostrado la existencia de tres genotipos distintos. El genotipo I, encontrado en dos colonias naturales de *Rivularia* (del río Matarraña y Endrinales) y ocho cultivos aislados; el genotipo II, hallado en cuatro cepas aisladas y, el genotipo III, presente en tres colonias de *Rivularia* (del río Alhárabe, Muga y del arroyo Red) y una cepa aislada. El alineamiento de estas secuencias reveló un 100% de similitud de algunas cepas aisladas (*cpcBA*-IGS Tipo I y *cpcBA*-IGS Tipo III) con las secuencias encontradas en algunas colonias de *Rivularia*, sugiriendo que ellas podrían pertenecer al género *Rivularia*.

A pesar de la separación geográfica (sureste y noreste de España y norte de Inglaterra), la casi identidad genética de los genotipos de *cpcBA*-IGS recuperados, sugiere que al menos algunas cianobacterias tienen una distribución muy amplia, como propusieron Hayes y Barrer (1997). Sin embargo, Bittencourt-Oliveira y col., (2001) señalaron que los genotipos de *cpcBA*-IGS idénticos de *Microcystis* encontrados en Brasil, Japón, Escocia y Norte América, representaban más bien poblaciones clonales relacionadas entre sí con una historia filogenética común, en vez de un mismo clon genético.

El alineamiento múltiple de las secuencias de la región IGS de las muestras de este estudio con diferentes entradas de la base de datos, indicó que la secuencia nucleotídica se encuentra altamente conservada dentro de cada genotipo, pero difiere claramente entre ellos. También se observó una gran divergencia entre los genotipos de *cpcBA*-IGS encontrados, indicando una clara separación taxonómica. Así, los análisis de dicha secuencia dentro de los géneros *Microcystis* y *Nodularia* revelaron una variación intragénica a lo largo del *cpcBA*-IGS del 6,4% y 6,7%, respectivamente. Los porcentajes de sustituciones nucleotídicas fueron 6,9% para *cpcB*, 13,7% para *cpcA* y 7,6% para IGS en el género *Microcystis* (Bittencourt-Oliveira y col., 2001), y 8,2%, 8,4% para las regiones codificantes y 11,7% para la IGS en el género *Nodularia* (Bolch y col., 1999). Manen y Falquet (2002) encontraron un 5% de posiciones variables dentro del locus *cpcBA*-IGS en el género *Arthrospira*, y Barker y col. (2000) registró un valor del 5,4% en *Aphanizomenon*. Sin embargo, Teneva y col. (2005) mostraron una gran divergencia (16,5%) en *Phormidium*. Robertson y col. (2001), también encontró un nivel alto de divergencia en el género *Synechococcus*. Ahora bien, basándose en las secuencias tanto de ADNr 16S como de *cpcBA*-IGS de un gran número de aislados, los autores sugirieron que el género *Synechococcus* debería ser revisado a fondo.

Todos estos resultados parecen indicar que las cepas aisladas de BL1, BL2, E1, E7, E8, MA8, MU15 y MU24, pertenecerían al género tradicional *Rivularia*, y las cepas E17, MU27, MU28, MU41 pertenecerían al género tradicional *Calothrix*. Sin embargo, se ha registrado que algunas cianobacterias poseen dos o tres operones de la ficocianina (Mazel y col., 1988; Dubbs y Bryant, 1993; Golden, 1995) que pueden ser expresados diferencialmente bajo distintas condiciones de crecimiento. En este sentido, era posible que nuestras cepas pudieran poseer dos o tres operones, que se habrían secuenciado. Esto podría aumentar las conclusiones engañosas sobre la taxonomía. Sin embargo, mediante los análisis por RFLP y TGGE comprobamos que las cepas aisladas, presentaron una única copia del operon de la ficocianina, o bien las copias eran muy similares, al igual que la cepa *Planktothrix* sp. FP1 (Pomati y col., 2000). Al estudiar las poblaciones de *Rivularia*, se encontraron colonias como las recogidas del arroyo Red y del río Alhárabe, claramente del tipo *R. biasolettiana*, que presentaron un perfil genético correspondiente con el genotipo III. Otras colonias, por ejemplo, del río Endrinales, típicamente *R. haematites*, mostraron principalmente un perfil genético correspondiente con el genotipo I, aunque otra banda correspondiente

con el genotipo II se pudo también encontrar. En muchas muestras, las colonias presentaron al menos dos bandas distintas, como por ejemplo, las colonias del río Matarraña, que en unos casos presentaron los genotipos I y III y en otros, los genotipos II y III. Estos resultados indican que puede haber diversidad genética incluso dentro de una colonia. Además, no podemos descartar la posibilidad de que otros tricomas que a veces son encontrados en las colonias, como esos *Calothrix*, puedan ser amplificados por PCR. Estos deberían corresponderse con el genotipo II, que aparece como bandas difusas en los geles. De este modo, la heterogeneidad observada tanto en la estructura como en las características de los tricomas de las colonias de *Rivularia*, se vio reflejada en la correspondiente diversidad genética en los análisis de RFLP y TGGE

Se encontraron resultados similares en los análisis filogenéticos de las secuencias del operon de la ficocianina, en los que los tres genotipos encontrados se separaron en tres grupos claros. En el árbol de *cpcBA*-IGS nueve secuencias de colonias naturales de *Rivularia* y cepas aisladas correspondientes al genotipo I formaron un grupo, las cinco secuencias de cepas aisladas correspondientes al genotipo II formaron un segundo grupo, y tres secuencias de colonias de *Rivularia* y un aislado formaron un tercer grupo. Las secuencias de las cepas y muestras de campo correspondientes a los genotipos I y II de este estudio siempre se situaron juntas en un mismo grupo, que se encuentra bien soportado por valores de bootstrap altos, independientemente de los tres métodos empleados, sugiriendo que se encuentran estrechamente relacionados. Sin embargo, el genotipo III estuvo alejado, siendo coherente con los porcentajes de variabilidad más altos respecto a los otros dos genotipos. Todos estos resultados parecen indicar que los tres genotipos se corresponden con tres géneros diferentes. Sin embargo, se ha señalado que la filogenia de los organismos usando el locus *cpcBA*-IGS, debe ser tratada con mucho cuidado debido a que este locus muestra un complejo patrón evolutivo (Manen y Falquet, 2002; Janson y Granéli, 2002).

En los análisis del gen ARNr 16S las secuencias tipo Rivulariaceae de este estudio y las de la base de datos (excepto algunas cepas de *Calothrix* de la base de datos) formaron un grupo, separado de otras cianobacterias. Este grupo se dividió en tres subgrupos (A, B, C) en los cuales se incluyeron los genotipos II, I y III, respectivamente, de este modo, en nuestro estudio los datos del ADNr 16S y del *cpcBA*-IGS concuerdan claramente.

Los estudios de homología ADN-ADN se han empleado para medir el grado de relaciones entre los organismos con una similitud alta en la secuencia de ADNr 16S. Los organismos con más de un 70% de homología en el ADN, el cual es el valor límite para el reconocimiento de una especie (Wayne y col., 1987), comparten normalmente más del 97% de similitud del gen ARNr 16S (Stackebrandt y Goebel, 1994). Así, cuando las cepas tienen menos del 97,5% de similitud, los datos de la secuencia proporcionan una fuerte evidencia de que las cepas son especies separadas.

Sin embargo, se ha señalado que en las cepas con más del 97,5% de similitud, los datos moleculares no son suficientes como para tomar decisiones a nivel de especie (Casamatta y col., 2005). Aquí, las cepas correspondientes al genotipo II (Grupo A) tuvieron una similitud del 98,8% con *C. parietina* de la base de datos, una especie cuyos tricomas se observaron frecuentemente en los análisis de nuestras muestras ambientales, sugiriendo la posibilidad de que este genotipo II se corresponda con *C. parietina* tradicional. Los estudios de hibridación ADN-ADN con poblaciones de campo de *C. parietina* podrían confirmar esta identidad. El grupo B, altamente soportado, contiene sólo secuencias de cepas encontradas en el presente estudio aisladas de distintos ríos y, una colonia de campo de *Rivularia* del arroyo Red, correspondiente con el genotipo I, que mostraron un alto porcentaje de similitud (98,8% a 100%). Estos hallazgos sugieren que el grupo B representa una rama evolutiva nueva que no ha sido caracterizada previamente. Por otro lado, el grupo C comprende a secuencias del género *Calothrix* y *Rivularia*, e incluye a la secuencia de la colonia tipo *Rivularia biasolettiana* del río Alhárabe correspondiente al genotipo III de este estudio, presentado un similitud de secuencia del 99,9% con *R. atra* BIRKRIVI, y del 99,2% con otra secuencia de *R. atra*.

En el análisis filogenético del gen ARNr 16S la similitud de la secuencia entre los genotipos I y II varió desde el 93,3% al 94,3%. Basándose en el umbral del 95% de similitud en la secuencia génica del ARNr 16S sugerido como definición de género (Ludwig y col., 1998), las distancias evolutivas de este estudio confirmaron que los genotipos son géneros separados, como previamente habían sugerido los análisis del operon de la ficocianina. Considerando los resultados morfológicos, filogenéticos y los de perfiles genéticos se puede concluir que el genotipo I correspondió con el género tradicional *Rivularia* y el genotipo II con el género tradicional *Calothrix*.

Respecto al género *Rivularia*, las secuencias de este estudio y las de la base de datos mostraron una gran variabilidad y claramente no fueron monofiléticas. Los

análisis morfológicos, de secuenciación y el perfil genético obtenido por RFLP y TGGE mostraron que las colonias ambientales de *Rivularia* fueron fenotípica y genéticamente heterogéneas. Se ha discutido si *R. haematites* y *R. biasolettiana* son ecoformas de la misma especie o son diferentes taxones (Kann, 1977). En contra, Zehnder (1985), quien trabajó con cultivos de *Rivularia*, concluyó que *R. biasolettiana*, aislada del Lago Erken en Suecia, y *R. haematites*, aislada de un pequeño riachuelo en Suiza, eran dos especies distintas. Whitton (2002) señaló que *R. haematites* se fusiona con *R. biasolettiana*, de la cual solo difiere en la alta calcificación y en la distinción de zonas.

Nuestros resultados sugieren que el genotipo I se corresponde con la tradicional *R. haematites* y el genotipo III con la tradicional *R. biasolettiana*, y que algunas veces, se puede encontrar los tipos fenotípicos tradicionales claros en la naturaleza, que se corresponden con esos genotipos. Sin embargo, normalmente se puede observar una morfología ambigua, que probablemente se corresponde con la diversidad genética encontrada dentro de una única colonia, como Whitton (1987) sugirió previamente. Se ha señalado que las colonias de algunos géneros, como *Rivularia*, se forman generalmente por la agregación de numerosos hormogonios (Whitton, 1987; Whitton y Potts, 2000). Darley (1967) en un estudio de laboratorio de Rivulariaceae marinas encontró que los hormogonios desarrollaban una colonia sólo si se inoculaba simultáneamente una gran cantidad. En nuestro estudio, los análisis morfológicos y genéticos sugirieron que ambos genotipos podrían encontrarse en el mismo lugar. Así, si los hormogonios involucrados en la agregación son genéticamente homogéneos, la colonia resultante estará dominada por un solo genotipo, como el genotipo III en el caso de *R. biasolettiana*, o genotipo I en el tipo *R. haematites*. Sin embargo, colonias formadas por la agregación de hormogonios genéticamente heterogéneos desarrollarán la diversidad genética encontrada en este estudio. Esto también explica por qué colonias fenotípicamente similares recogidas al mismo tiempo del mismo lugar tienen genotipos diferentes (por ejemplo, colonias de *Rivularia* del arroyo Red mostrando genotipo III en el árbol del operon de la ficocianina pero genotipo I en el análisis de la secuencia génica del ARNr 16S), y por qué tanto el genotipo I como III pueden ser encontrados en una única colonia en los análisis de perfiles genéticos (por ejemplo, colonias de los ríos Blanco y Matarraña) mientras que otros sólo mostraron una única banda, que se correspondió con el genotipo III (por ejemplo, otra colonia del río Matarraña). Estos resultados arrojan la duda de la validez del empleo de la

morfología de la colonia para identificar y diferenciar estas especies de *Rivularia* y, sugieren que la clasificación requiere claramente el empleo de otros criterios más, que solamente el de morfología.

Por otro lado, se debe resaltar que aunque a veces se observa una morfología similar en colonias naturales de *Rivularia*, los resultados de este estudio demuestran una clara divergencia genética. Los genotipos I y III se diferencian con claridad en ambos árboles filogenéticos. Sólo se encontró un 90,6–91,1% de similitud en la secuencia del gen de ARNr 16S entre los genotipos I y III, indicando que las secuencias de *Rivularia* estudiadas pueden actualmente representar dos géneros diferentes. Rippka y col. (2001a, b, c), en la clasificación taxonómica actual del *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology* incluye solo a cepas aisladas de ambientes salinos (zona intersticial, zona del supralitoral, acuarios de agua salada) en el género *Rivularia*, de modo que lo separa del de *Calothrix* por su requerimiento o tolerancia a la sal más alta. Sihvonen y col. (2007), encontró que de los 16 aislados de *Rivularia* que disponía, solo la cepa realmente marina *Rivularia* PCC 7116 fue capaz de crecer en un medio con concentraciones elevadas de sal, mientras que las cepas de *Rivularia* del Mar Báltico no requirieron una concentración de sal elevada, en relación con las características del agua salobre del Golfo de Finlandia (de donde se aislaron la mayor parte de las cepas), que tenían una salinidad aproximada del 5‰. Sin embargo, *Calothrix* CCME 5085 y *Calothrix* CCME 5093, que también se incluyeron en el grupo C con todas las secuencias de *Rivularia*, se aislaron de efluentes de aguas templadas (<35°C) con sustrato silíceo en el Yellowstone National Park con una salinidad entorno al 1‰ (Dillon y Castenholz, 2003). En este grupo, nuestra secuencia se corresponde con una *Rivularia* de agua dulce, aunque como sólo aparece en ríos calizos, podrían tener un requerimiento de Ca^{2+} elevado para su crecimiento. También es posible que estas colonias de *Rivularia* sean eurihalinas, ya que se ha observado tolerancia a la desecación. Por lo tanto, si se mantiene al genotipo III como *Rivularia*, se debería definir un nuevo género para los representantes de *Rivularia* del genotipo I en el grupo B de nuestro estudio. Estos resultados sugieren que las cianobacterias clasificadas en el género tradicional *Rivularia* se diversificó a lo largo de la evolución. Una posible explicación es que la morfología similar a *Rivularia* representa un tipo de morfología ancestral de la cual se han podido desarrollar otras morfologías, como las de *Calothrix*. Otra posibilidad es que los filamentos atenuados puedan haberse desarrollado en mas de una ocasión durante la diversificación de las cianobacterias

formadoras de heterocistos, como se ha sugerido anteriormente (Sihvonen y col., 2007).

II. Análisis de cianobacterias pertenecientes a los géneros *Calothrix* y *Tolypothrix*

Se ha discutido ampliamente la situación taxonómica de los géneros *Calothrix* y *Tolypothrix* (Whitton, 1989; Rippka y col., 1979; Komárek y Anagnostidis, 1989; Wilmotte y Herdman, 2001; Rippka y col., 2001b, 2001c; Herdman y col., 2001). Como ya se ha introducido anteriormente, ambos géneros, junto con el de *Rivularia*, forman parte del orden *Nostocales* en el código botánico (familias Rivulariaceae y Microchaetae) o de la subsección IV.II en la clasificación bacteriológica propuesta (Castenholz, 2001). Esta subsección está compuesta por cianobacterias que tienen tricomas atenuados (polaridad basal-apical) y heterocistos localizados en su extremo basal (Castenholz, 2001). Los géneros *Calothrix*, *Rivularia* y *Tolypothrix* presentan morfologías similares en cultivo, por eso, algunos autores incluyeron en el género *Calothrix*, a todas las cianobacterias con heterocistos, con un grado de atenuación bajo o alto, sin tener en cuenta su ecología (Rippka y col., 1979). Posteriormente, Rippka y Herdman (1992) basándose en los análisis de similitud del ADN (Lachance, 1981), transfirieron al género *Tolypothrix*, un gran número de cepas de agua dulce con un grado de atenuación bajo, asignadas previamente al género *Calothrix*. Las diferencias principales propuestas entre ambos géneros, fueron la diferenciación de acinetos en *Calothrix* y el desarrollo de falsas ramificaciones en *Tolypothrix* (Rippka y col., 2001b). Otro rasgo distintivo del género *Tolypothrix*, es el bajo grado de atenuación que muestran los tricomas maduros, no superando la relación de la anchura celular de las células basales con las apicales, el valor de 1,5 (Herdman y col., 2001). Esta relación fue menor a la encontrada en cepas de *Calothrix*, que generalmente presentan una relación basal-apical, que variaba entre 3 y 5 (Rippka y col., 2001 a).

Aunque las cepas del género *Calothrix* muestran tricomas maduros con una relación basal-apical similar al de las cepas de *Rivularia* (Rippka y col., 2001a), se distinguieron de este género, como ya se comentaba anteriormente, por no requerir concentraciones de sal elevadas y, por el desarrollo de acinetos (Rippka y col., 2001a). Análisis filogenéticos de las secuencias génicas del ARNr 16S y, estudios de hibridación ADN-ADN (Lachance, 1981), en cultivos axénicos de la colección Pasteur, demostraron una diversidad genética alta en el género *Calothrix* (Wilmotte y

Herdman, 2001; Rippka y col., 2001c). También se ha encontrado una gran variabilidad en cepas de *Calothrix* del Mar Báltico (Sihvonen y col., 2007), sugiriendo que podrían pertenecer al menos a cinco géneros diferentes en las secuencias de ADNr 16S. Además, Hongmei y col. (2005), mostraron que un solo morfotipo de *Calothrix* en tapetes cianobacterianos termófilos, se correspondía con cinco genotipos distintos de ADNr 16S.

En esta parte del trabajo, se amplió el estudio a 14 aislados tipo Rivulariaceae de diversos ríos silíceos o calizos, donde no crecía *Rivularia* y varias colonias de *Tolypothrix* del río Muga. Todas las muestras de *Tolypothrix* recogidas en el río, se identificaron como *T. distorta* var. *penicillata*, mostrando características típicas de este taxón. Se ha descrito previamente esta especie creciendo sobre rocas en ríos de aguas duras y corrientes rápidas, en arroyos largos y en la parte alta de pequeños ríos (Whitton, 2002) y, se ha visto en varios ríos españoles estudiados, pudiendo encontrarse entre las dominantes, durante algunas estaciones del año (Aboal y col., 2002; Aboal y col., 2005).

Cuando se cultivaron bajo condiciones de laboratorio cianobacterias tipo Rivulariaceae aisladas de ríos silíceos o calizos sin *Rivularia* y, se examinaron morfológicamente, todas ellas presentaron características desde el punto de vista fenotípico muy similares a las características morfológicas de *Calothrix*. Con el fin de evaluar si el medio rico en nutrientes empleado para el aislamiento de estas cepas, podía afectar a su morfología, se transfirieron los cultivos a un medio con un nivel de nutrientes bajo. Los resultados mostraron que algunos aislados fueron capaces de adoptar características morfológicas típicas de *Tolypothrix* (por ejemplo, ligera atenuación de los tricomas y desarrollo de falsas ramificaciones) cuando se cambiaron las condiciones de cultivo. Sin embargo, otras cepas mantuvieron características morfológicas similares a *Calothrix*. Como se ha comentado previamente, la elección del medio de cultivo empleado en el laboratorio es muy importante, debido a que las condiciones de cultivo pueden afectar al desarrollo de caracteres morfológicos importantes desde el punto de vista taxonómico, e incluso, las cepas durante el cultivo prolongado pueden llegar a perderlos genéticamente (Whitton, 2002; Lehtimäki y col., 2000; Gugger y col., 2002b). Así, Komárek y Anagnostidis (1989) estimaron que más del 50% de las cepas de las colecciones en cultivo están mal identificadas. De hecho, la única cepa de *Tolypothrix* en la que se ha secuenciado el operón de la ficocianina (*Tolypothrix* PCC7106), usada en este estudio, fue originalmente identificada como

Calothrix PCC7106, nombre con el que se encuentra publicado el estudio (Mazel y col., 1988)

El grado de atenuación de los tricomas se ha empleado para separar los géneros *Calothrix* y *Tolypothrix*. Los organismos con una relación de la anchura celular de las células basales a las apicales menor de 1,5 (Herdman y col., 2001) se asignaron al género *Tolypothrix*, mientras que las cepas del género *Calothrix* mostraron una atenuación de los tricomas que variaba entre 3 y 5 (Rippka y col., 2001a). En este estudio, las cepas con características similares a *Calothrix* tuvieron una relación basal-apical entre 1,9 y 2,6, con un valor medio de 2,1. Estos valores fueron algo más bajos que el rango establecido en cultivos axénicos de *Calothrix* pertenecientes a la colección Pasteur (Rippka y col., 2001a), sin embargo, similares resultados se obtuvieron en cepas de *Calothrix* del Mar Báltico (Sihvonen y col., 2007). Por otro lado, las cepas que presentaron características morfológicas típicas de *Tolypothrix*, exhibieron una relación basal-apical menor de 1,5, coincidiendo con el rango establecido por Herman y col. (2001) para este género, lo que sugiere que estas cepas podrían pertenecer al género *Tolypothrix*. Sin embargo, Sihvonen y col. (2007) encontraron dos cepas (TOL328 y BECID4) con una atenuación baja ($<1,5$), que por los análisis filogenéticos del gen ARNr 16S, se asignaron a géneros diferentes (TOL328 al género *Tolypothrix* mientras que BECID4 al género *Calothrix*), sugirieron que la relación basal-apical no puede ser empleada por si sola para la identificación de cepas.

Así los resultados morfológicos indicaban que las cepas de A1, A2, TJ9, TJ12, TJ14, TJ15 y TJ16, pertenecerían al género tradicional *Calothrix*, y las cepas CR1, TJ1, TJ6, TJ7, TJ10, TJ11 y TJ13, pertenecerían al género tradicional *Tolypothrix*. Sin embargo, dentro del grupo de cepas con características similares a *Calothrix* se han observado variaciones en la morfología del filamento y en el tamaño celular de los aislados, pudiendo distinguirse varios morfotipos distintos. Además, se encontró que la morfología de las cepas con características típicas de *Tolypothrix* difería de la presentada por las muestras naturales de *Tolypothrix* analizadas.

Los resultados obtenidos en los análisis genéticos, tanto los de *cpcBA*-IGS, como los del gen ARNr 16S concuerdan claramente con los morfológicos, en los que las secuencias obtenidas en las cepas con morfotipo *Tolypothrix* se separaron claramente de las obtenidas en las cepas con morfotipo *Calothrix*.

El alineamiento de las secuencias nucleotídicas de la región *cpcBA*-IGS obtenidas en ambos morfotipos reveló grandes diferencias en las secuencias analizadas y variaciones en su longitud debidas tanto a las regiones codificantes, como a la región intergénica. De este modo, la gran divergencia observada entre los genotipos encontrados indicaba una clara separación taxonómica. Además, los porcentajes de sustitución nucleotídica hallados en estos genotipos fueron mucho más altos que los registrados en otros géneros cianobacterianos (Bolch y col., 1999; Bittencourt-Oliveira y col., 2001; Manen y Falquet, 2002; Teneva y col., 2005), lo que indicaba que estos genotipos podrían pertenecer a géneros diferentes.

Cuando se analizó la posibilidad de que nuestras cepas pudieran poseer dos o tres operones y solo uno de las cuales se habría secuenciado, se comprobó, mediante TGGE, que algunas de las cepas analizadas (TJ14, ALB3), tuvieron una única copia del operon de la ficocianina, o bien las copias eran muy similares. Sin embargo, la mayoría de los aislados presentaron varias operones diferentes en composición nucleotídica.

Todos los aislados con morfotipo *Tolypothrix* que fueron sometidos al análisis de TGGE (CR1, TJ1, TJ6, TJ10 y TJ13) presentaron varias copias del operón de la ficocianina y en todos los que se pudieron analizar dichas copias, una de las bandas presentó la misma movilidad electroforética, se correspondió siempre con un mismo genotipo, que hemos considerado como el “genotipo *Tolypothrix* “ y la otra presentó un perfil diferente dependiendo de la cepa, habiéndose podido secuenciar en algunas de ellas y se correspondió con el genotipo II descrito anteriormente. En los aislados morfotipo *Calothrix* hubo muchas más variabilidad en la presencia de varios operones y en los genotipos encontrados.

Se ha descrito una identidad del 78-79% en los dos operones de la ficocianina hallados en *Pseudanabaena* PCC7409 (Dubbs y Bryant, 1993). En nuestro estudio, se encontraron porcentajes similares en los dos operones secuenciados de las cepas Al, TJ9 y TJ10 (75,7, 68,6 y del 73,8%, respectivamente). La gran divergencia genética encontrada entre los operones de algunas cepas analizadas, sugiere que uno de los alelos *cpcBA*-IGS hallados, pudo haberse conseguido a través del intercambio de material genético entre cianobacterias relacionadas (Rudi y col., 1998; Manen y Falquet, 2002) o bien, la selección natural pudo haber impulsado rápidamente sustituciones nucleotídicas en una o en ambas copias del operon (Rudi y col., 1998; Hayes y col., 1999) que no se habían transmitido al resto de copias del operon.

En los análisis filogenéticos de las secuencias del operon de la ficocianina los genotipos encontrados se separaron en siete grupos claros. El primer grupo (A), formado por las cepas TJ12 y TJ15, uno de los dos operones de las cepas TJ10 (TJ10 *cpc-2*), TJ1 (TJ1 *cpc-2*) y A1 (A1 *cpc-2*) y cuatro cepas aisladas de ríos calizos con genotipo II. Muy cercano a éste (grupo B) se sigue encontrando el genotipo I descrito anteriormente. En el siguiente grupo (C) se situaron TJ14 y uno de los operones de la cepa TJ9 (TJ9 *cpc-1*). El grupo F, compuesto por la cepa A2 aislada de un río calizo sin *Rivularia* y muestras naturales de *Rivularia* que presentaron genotipo III. En el grupo D se sitúan seis cepas con morfotipo *Tolypothrix* de este estudio y *Tolypothrix* PCC7106 *cpc-1*, mientras que las poblaciones de *Tolypothrix* se localizaron en otro grupo diferente, junto con los otros dos operones encontrados en la cepa *Tolypothrix* PCC7106 (*cpc-2* y *cpc-3*), lo que nos hizo pensar que probablemente también había sido secuenciado un segundo o tercer operón en ésta. Finalmente, las cepas *C. elenkinii* ALB3 (rama 1), A1 *cpc-1* (rama 2) y TJ16 (rama 3), presentaron una distancia genética grande, con porcentajes de sustitución nucleotídica del 23% entre ALB3 y TJ14 y del 45,3% entre A1 y TJ6 para la región IGS, lo que sugiere que estas genotipos podrían considerarse géneros nuevos.

Los resultados obtenidos de los análisis del gen ARNr 16S concuerdan claramente con los de *cpcBA*-IGS, en los que las secuencias tipo Rivulariaceae de este estudio y las de la base de datos formaron siete grupos claros y se separaron claramente las cepas y colonias de campo de *Tolypothrix* de las de *Calothrix*.

En los árboles de ARNr 16S, las secuencias de poblaciones y aislados de *Tolypothrix* obtenidas en este estudio formaron un grupo monofilético (96,6-99,4% similitud) que puede subdividirse en dos grupos. Uno primero formado por todas las secuencias de *Tolypothrix* de este estudio y un segundo grupo formado por 2 cepas de *T. distorta* y *C. brevísima*. Las porcentajes de similitud entre ambos subgrupos son inferiores al 97,5%, sugiriendo que podrían corresponderse a especies distintas. Herdman y col. (2001), basándose en los estudios de hibridación ADN-ADN (Lachance, 1981) y en la composición de pigmentos, también dividió al género *Tolypothrix* en dos grupos principales. El grupo 1 está formado por seis cepas PCC7101, PCC7504, PCC7601, PCC7708, PCC7710 y PCC7712, de diferentes orígenes geográficos, en el que podría incluirse la cepa TJ1 UAM-333 de nuestro estudio (97,8% similares) y, el grupo 2 formado por tres cepas PCC7415, PCC6305 y PCC6601. Se trata de un grupo heterogéneo y alejado de los miembros del grupo 1,

pero muestra suficiente homología del ADN como para ser incluido en el mismo género.

Respecto al género *Calothrix* fue un grupo muy heterogéneo y claramente polifilético. La secuencia obtenida correspondiente a la cepa A2 se situó en el grupo B junto con otras secuencias de *Calothrix* y *Rivularia* de las bases de datos y la muestra natural de *Rivularia* de este estudio (98% de similitud). Se ha descrito la presencia de *Rivularia* en cabeceras de ríos o arroyos de aguas corrientes, sobre rocas o plantas que pueden quedar emergidas (Whitton, 2002), siendo características de ambientes en las que existe una limitación de nutrientes, tanto de nitrógeno como de fósforo. Además, se ha observado que desaparecen rápidamente cuando se eleva el nivel de nutrientes (Whitton, 1987). El río Amir, donde se ha aislada la cepa A2, es un río calizo con alta alcalinidad, similar a los ríos donde se han recogidas las poblaciones de *Rivularia* (ríos Alhárabe y Muga y del arroyo Red), pero con altos niveles de salinidad y además los niveles de nutrientes como nitratos y fosfatos encontrados en él son muy altos (Moreno y col. 1995), de manera que el crecimiento de *Rivularia* no se encuentra favorecido.

La cepa TJ14 formó parte del grupo C junto con cepas de *Calothrix* aisladas del Mar Báltico, que se ajustaban a la descripción de la especie botánica *C. scopulorum*, registrada como especie muy común del Mar Báltico (Hällfors, 1984; Janson, 1995; Lindholm, 1998). Las distancias genéticas del gen ARNr 16S entre este grupo y el resto fueron altas (<95% de similitud). Como ya se ha dicho anteriormente, un umbral del 95% de similitud en la secuencia génica del ARNr 16S se ha sugerido como definición de un género (Ludwig y col., 1998). Basándonos en esta definición, las cepas del grupo C podrían ser miembros de un nuevo género, al igual que A1 y ALB3, como previamente habían sugerido los análisis del operon de la ficocianina. Sihvonen y col. (2007), sugirió que las cepas pertenecientes al genotipo correspondientes a *C. scopulorum* sería probablemente un nuevo taxón relacionado con *Calothrix* pero que no pertenecería a este género.

Las cepas TJ12 y TJ15 se agruparon (grupo F) junto con secuencias con genotipo tipo II y otras secuencias de *Calothrix* publicadas en el GenBank. Todas ellas tuvieron una similitud entre 97,8-98,8% con una secuencia de *C. parietina* de la base de datos, por lo que podría tratarse de la misma especie. Sin embargo, ha sido advertido de que en las cepas con más del 97,5% de similitud, los datos moleculares no son suficientes para decidir si se trata o no de la misma especie (Casamatta y col., 2005). Por esta

razón y como se había comentado anteriormente, los estudios de hibridación con poblaciones de *C. parietina* podrían servir para confirmar la identidad de estas especies.

Hay que resaltar que aunque se puede encontrar una morfología similar y a veces superpuesta en los aislados de *Calothrix*, se ha demostrado una clara divergencia genética en ambos marcadores taxonómicos. Los genotipos hallados fueron diferenciados con claridad en ambos árboles filogenéticos, encontrándose sólo un 89–94% de similitud en la secuencia del gen de ARNr 16S entre los distintos genotipos, indicando que las secuencias de *Calothrix* estudiadas pueden representar al menos cinco géneros diferentes. Rippka y col. (2001a, b, c) encontraron una diversidad genética menor, subdividiendo al género *Calothrix* en dos grupos, uno de los cuales formado por ocho cepas aisladas de ambientes terrestres y de agua dulce de diferentes orígenes geográficos (*Calothrix* PCC7715, PCC7102, PCC7103 y PCC7714) se correspondería con el grupo A de este estudio.

Los resultados de este estudio apoyan los resultados de Sihvonen y col. (2007) que mostraban una gran diversidad genética en el género *Calothrix* y proponían su división en géneros diferentes.

III. Análisis de muestras naturales y aislados de *Nostoc* de diferentes localizaciones geográficas.

Actualmente, el género *Nostoc* pertenece al orden Nostocales, familia Nostocaceae según la clasificación tradicional (Komárek y Anagnostidis, 1989) y la Subsección IV.I según la clasificación bacteriológica (Rippka y col., 2001d). La identificación de este género se ha basado principalmente en características morfológicas como por ejemplo la forma y tamaño de los filamentos, células vegetativas, heterocistos y acinetos (Geitler, 1932; Desikachari, 1959; Komárek y Anagnostidis, 1989). Otras características adicionales empleadas son la existencia y formación de colonias gelatinosas, así como el ciclo celular y la formación de hormogonios (Rippka y col., 1979; Potts, 2000; Hrouzek y col., 2003). Aunque durante mucho tiempo este grupo se ha citado y discutido en la literatura (Geitler, 1932; Starmach, 1966; Kondrateva, 1968; Drouet, 1978; Komárek y Anagnostidis, 1988), muchas especies tradicionales, principalmente de suelos y especies simbióticas, están muy poco caracterizadas. A pesar de ello, se ha visto que el género *Nostoc* representa un grupo de cianobacterias morfológicamente muy diverso.

El género *Nostoc* ha mostrado propiedades estructurales muy similares al género *Anabaena*. Algunos autores (Komárek y Anagnostidis, 1989) han empleado la ausencia/presencia de hormogonios o la situación de los acinetos en los tricomas para distinguirlos. Sin embargo, la formación de hormogonios puede no ser detectada en algunos aislados, debido a que es una característica que depende de las condiciones de crecimiento (Wright y col., 2001). Además, recientemente se ha descrito el desarrollo de hormogonios en especies simbióticas de *Anabena* (Svenning y col., 2005). En los últimos años, se han empleado los análisis filogenéticos para discutir la separación de ambos géneros (Henson y col., 2002; Tamas y col., 2000; Rajaniemi y col., 2005), obteniéndose opiniones contradictorias al respecto. Los análisis filogenéticos también se han empleado para esclarecer la taxonomía dentro del género *Nostoc*. Así, Herdman y col. (2001), basándose en las secuencias génicas del ARNr 16S, mostraron una gran diversidad genética en dicho género, distinguiéndose al menos cinco grupos diferentes. Resultados similares encontraron Rajaniemi y col. (2007), basándose en los análisis filogenéticos del gen ARNr 16S y las secuencias *rpoB* y *rbcLX*.

En este trabajo, se identificaron por microscopía y, se secuenció la región *cpcBA-IGS* y el gen ARNr 16S, de varias colonias naturales y distintos aislados de *Nostoc* de diferentes localizaciones geográficas. Las poblaciones de *Nostoc* analizadas procedentes de diversos ríos mediterráneos (ríos Matarraña y Muga), se identificaron como *N. verrucosum*. Esta especie se ha descrito previamente creciendo sobre rocas en arroyos o ríos calizos pequeños, con corrientes rápidas (West y Fritsche, 1927). La mayoría de los registros conocidos se localizan en tramos pocos profundos de arroyos con aguas moderadamente duras aunque también se ha encontrado en aguas estancadas (Geitler, 1932a). En España, su presencia se ha observado en distintos ríos mediterráneos de la región noreste (Sabater y Muñoz, 2000; Aboal y col., 2005).

Los análisis filogenéticos de las secuencias del operón de la ficocianina obtenidas junto con secuencias de las bases de datos han mostrado una separación clara entre los géneros *Nostoc* y *Anabaena*, como se había observado anteriormente en estudios filogenéticos basados en el gen ARNr 16S (Wilmotte y Herdman, 2001; Rajaniemi y col., 2005) y en el gen *nifD* (Henson y col., 2002). Sin embargo, estos resultados contradicen los obtenidos por Tamas y col. (2000) basados en la secuencia parcial del gen *nifH* (primeros 359 nt). Respecto al género *Nostoc*, en este estudio se ha encontrado que las secuencias analizadas no formaban un grupo monofilético. Así, se distinguieron dos grupos claros: uno formado por dos cepas de las bases de datos y el

segundo formado por dos poblaciones de *Nostoc* del río Muga y tres cepas aisladas, dos de las cuales pertenecen a este estudio. Los otros dos cultivos de *Nostoc* analizados (MU2 y A8) se relacionaron con dos de los tres operones de *cpcBA*-IGS encontrados en *Tolypothrix* PCC7601, formando un grupo soportado por valores de bootstrap muy bajos, sugiriendo que estas cepas pertenecerían a géneros diferentes.

En los análisis del gen ARNr 16S de las secuencias de *Nostoc* de este estudio y de las bases de datos formaron cuatro grupos claros (A, C, D y E) separados del resto de cianobacterias. El primer grupo (grupo A) formado por 18 cepas aisladas y cuatro muestras naturales de *Nostoc* (del río Matarraña y Muga, y de la corteza de una palmera), puede ser subdividido en otros cuatro (A1, A2, A3, A4), en los cuales se incluyeron la mayor parte de las secuencias obtenidas en este estudio. Los porcentajes de similitud que existe entre estos subgrupos son inferiores al 97,5%, indicando que cada uno de ellos se corresponde con una especie distinta.

Las poblaciones de *Nostoc* del río Muga analizadas se identificaron morfológicamente como *N. verrucosum*, sin embargo, sus secuencias mostraron una identidad del 100% con dos secuencias de *N. commune* (*N. commune* IAM M-13 y UTEX584) de las bases de datos. Según Mollenhauer y col., (1999), *N. commune* [Vauche] Born et Flahault forma colonias expandidas y lobuladas, fácilmente distinguibles en la naturaleza, que pueden llegar a alcanzar los 20 cm de ancho, sin embargo, cuando las colonias son jóvenes adoptan una morfología esférica y gelatinosa, que pueden ser identificadas erróneamente como *N. verrucosum*. Además, se han observado diferencias morfológicas, citológicas y químicas en dos colonias de *N. commune*, mostrando que dentro de esta especie se incluyen formas muy diversas (Briones-Nagata y col., 2007).

En este subgrupo (subgrupo A1) se incluyeron también secuencias de *N. punctiforme* de las bases de datos y de un cultivo (*N. punctiforme* ALB2) aislado del río Alberche. Herman y col. (2001), agrupó en el grupo I secuencias de *N. commune* y *N. punctiforme*, si bien también indicó que la distancia genética existente entre ellas (basadas en los análisis de hibridación ADN-ADN de Lachance, 1981) era lo suficientemente grande para poder ser consideradas especies distintas. La alta similitud encontrada en el gen ARNr 16S puede deberse al hecho de que este gen se encuentra muy conservado, no pudiendo ser empleado para discriminar algunos organismos estrechamente relacionados (Fox y col., 1992). Así, cuando es necesario diferenciar cianobacterias pertenecientes al mismo género se emplean otros

marcadores moleculares como el operon de la ficocianina, que posee una región intergénica con una alta variabilidad (Neilan y col., 1995). En nuestro estudio, a pesar de haber empleado este marcador molecular, no pudimos comparar con un número representativo de cepas de *Nostoc*, al no haber tantas secuencias disponibles en las bases de datos. Sin embargo, la distancia genética encontrada en *Nostoc punctiforme* PACC 8646 en el árbol filogenético, parece confirmar dicha separación entre especies.

Las cepas MU8 y A8 (subgrupo A2) mostraron una identidad del 100% con dos cepas de *N. calcicola* de las bases de datos, coincidiendo con la caracterización morfológica realizada previamente (Perona y col., 2007). Sin embargo, en los análisis de las secuencias de *cpcBA*-IGS, la cepa A8 se situó en una rama alejada del grupo E en donde se localizó MU8. Estos resultados sugieren que A8 podría tener dos o tres operones de la ficocianina distintos, sólo uno de los cuales se habría secuenciado.

La muestra natural de *Nostoc* aislada de la corteza de una palmera en Gran Canaria y la cepa MA4 se situaron en otro subgrupo (subgrupo A3) junto con *Nostoc* sp. 8916 y dos cepas de *N. muscorum* de las bases de datos. Este subgrupo A3 se correspondió con el grupo III identificado por Svenning y col. (2005).

Otra de las poblaciones de *Nostoc* analizada, recogida del río Matarraña se agrupó junto con MU2 y tres secuencias de las bases de datos, una de ellas identificada como *N verrucosum*. Los porcentajes de similitud existente entre ellas (> 97,5%) indican que podría tratarse de las mismas especies.

En este estudio se distinguieron otros tres grupos más: el grupo D formado por las cepas MA7 y MU21 de este estudio junto con *N linckia* y *N entophytum*; el grupo E, en el que se situaron ME1 y *Nostoc* PCC6720, y por último, el grupo F formado por *Nostoc* PCC7423, PCC7120 y 8941. Los porcentajes de similitud obtenidos entre las cepas que componen estos grupos (< 97,5%) han mostrado que pueden dividirse en varios subgrupos, formados por especies distintas.

Los resultados obtenidos en los análisis comparativos de ARNr 16S han mostrado heterogeneidad en el género *Nostoc*, distinguiéndose cuatro grupos distintos que pueden ser considerados géneros distintos en base a los porcentajes de similitud obtenidos (inferiores al 95%, valor sugerido como definición de género por (Ludwig y col., 1998)). Estos resultados apoyan los hallazgos de Herdman y col. (2001), Rajaniemi y col. (2005) y Svenning y col., (2005) que sugieren que el género *Nostoc* puede separarse en varios géneros, siendo necesaria una revisión en profundidad.

En nuestro estudio, las principales relaciones filogenéticas obtenidas a partir de los análisis de la región *cpcBA*-IGS y del gen ARNr 16S concuerdan ampliamente con otras filogenias de cianobacterias con heterocistos (Wilmotte y Herdman, 2001; Rajaniemi y col., 2005; Svenning y col., 2005), observándose que las cepas de los *Anabaena* y *Aphanizomenon* aparecen entremezcladas. Similares resultados encontraron Gugger y col. (2002) en los análisis de las secuencias de ADNr 16S y *rbcLX* de una gran selección de cepas pertenecientes a estos géneros. Además, los resultados obtenidos han apoyado la distinción entre los géneros *Nostoc* y *Anabaena*, observada por otros autores (Wilmotte y Herdman, 2001; Henson y col., 2002; Rajaniemi y col., 2005) y han mostrado una gran diversidad en el género *Nostoc*, pudiéndose distinguir al menos cuatro grupos distintos, que en base a los porcentajes de similitud pueden ser considerados géneros distintos, como se había sugerido por otros investigadores en base a las secuencias del gen 16S ARNr y a los análisis de hibridación ADN-ADN (Herdman y col., 2001; Rajaniemi y col., 2005; Svenning y col., 2005).

IV. Análisis de diferentes tapetes microbianos del río Muga.

Los microorganismos generalmente se encuentran formando asociaciones (Paerl y col., 2000) en los que grupos metablicamente diferentes actúan juntos para funcionar como una comunidad. Los tapetes microbianos y los estromatolitos son ejemplos de comunidades microbianas que tienen un gran dinamismo taxonómico y metabólico (Stal, 1995; Des Marais, 2003; Sabater y col., 2000). Estas comunidades constituyen un componente principal de los ecosistemas al jugar un papel crítico en el metabolismo de la materia orgánica y en las transformaciones biogeoquímicas de los elementos, incluyendo la fijación de N₂ (Atlas y Batha, 1998; Madigan y col., 2000).

Los tapetes microbianos están generalmente dominados por cianobacterias (Ward y col., 1998; Stal, 2000; Kompong y col., 2005) y se han descrito en gran variedad de ambientes, incluyendo marinos costeros, lagos hipersalinos, fuentes termales, desiertos y lagos antárticos (Omeregíe y col., 2004; Taton y col., 2006; Bauer y col., 2008; McGregor y Rasmussen, 2008). La morfología, estructura y color de estos tapetes microbianos viene determinado por las especies dominantes, las características sedimentarias y otros factores ambientales (Stal, 2000).

Una de las dificultades que surge a la hora de examinar la diversidad de dichas poblaciones naturales es que las comunidades microbianas están formando parte de

mezclas complejas de bacterias y cianobacterias. Se ha abordado esta cuestión mediante un estudio multidisciplinar en el que se ha combinado observaciones microscópicas de las características morfológicas, caracterización ultraestructural y métodos moleculares independientes del cultivo de cianobacterias (Casamatta y col., 2005; Komárek y col., 2005; Taton y col., 2006a; Bauer y col., 2007; McGregor y Rasmussen, 2008). Estos trabajos han mostrado que los tapetes microbianos están formados mayoritariamente por cianobacterias de filamentos estrechos del orden Oscillatoriales, sin embargo, la determinación de los géneros es muy variable (Comte y col., 2007). En muchos casos, dichos organismos se han identificado como *Phormidium*. (Stal y Krumbein, 1985) o bien se han clasificado en el género *Leptolyngbya* (Nandau y col., 2001), *Schizothrix* (Sage y Sullivan, 1978) o en menor frecuencia como *Oscillatoria* y *Lyngbya*.

La distinción de grupos dentro del orden Oscillatoriales ha preocupado durante mucho tiempo a los taxonomistas, especialmente cuando se dieron cuenta que los caracteres empleados para distinguir estos géneros (por ejemplo la presencia o ausencia de vainas, vacuolas de gas, tricomas atenuados hacia el final, forma de las células terminales) están normalmente influenciados por las condiciones ambientales (Whitton, 2002). Así, la separación de algunos géneros dentro del orden, como *Lyngbya*, *Plectonema* y *Schizothrix* o entre *Oscillatoria*, *Lyngbya* y *Phormidium* es difícil. Se han realizado numerosos intentos empleando criterios morfológicos, ultraestructurales, contenido de pigmentos o análisis de las secuencias de ADNr 16S para solucionarlo (Casamatta y col., 2005; Porta y Hernández-Mariné, 2005; Marquardt y Palinska, 2007). Komárek y Anagnostidis (2005) basándose en criterios morfológicos, citológicos y ultraestructurales realizaron una profunda revisión del grupo y definieron nuevos géneros, algunos de los cuales también se han aceptado en la última versión del *Bergey's Manual* (2001), sin embargo, otros como *Schizothrix* y *Phormidium* no fueron reconocidos. Castenholz y col. (2001) basándose en los análisis de las secuencias de ADNr 16S mostró que el grupo de Oscillatoriales no es coherente filogenéticamente, habiendo géneros polifiléticos como el de *Oscillatoria*.

En este estudio, se evaluó la diversidad de los tapetes microbianos del río Muga mediante criterios fenotípicos y análisis genéticos, que incluyeron la región *cpcBA-IGS*, la secuencia del gen ARNr 16S y TGGE. Los tapetes microbianos analizados fueron muy abundantes en el área de experimentación, apareciendo adherido al sustrato rocoso del lecho del río en las áreas sumergidas, aunque dependiendo de la

estación, a veces, quedaban al descubierto. En los meses de verano cubrió prácticamente la totalidad de dicha área y apareció completamente seco en las orillas. Ocasionalmente, se han observado colonias macroscópicas de *Rivularia* en la superficie de los tapetes en la campaña de verano. Resultados similares encontraron Rejmánková y col. (2005) en tapetes microbianos alcalinos de un humedal en Belice, donde cianobacterias con heterocistos fueron visibles microscópicamente sobre la superficie de dichos tapetes durante los meses de mayo a julio antes de secarse.

Macroscópicamente, las muestras recogidas fueron muy similares en color y consistencia, sin embargo, al microscopio se observaron diferencias en la composición de las comunidades microbianas, distinguiéndose tres tipos distintos: Tipo 1, tapete seco (SSTA) que contenía prácticamente *Schizothrix coriacea* [Kützing] Gomon; Tipo 2 se trataba de un tapete sumergido (SPTA), formado mayoritariamente por *S. coriacea* y en menor proporción por otro morfotipo *Schizothrix*, que se ha empleado en los ensayos de actividad fosfatasa y, el Tapete 3, utilizado en los ensayos de actividad nitrogenásica (SNTA) fue más heterogéneo, distinguiéndose los dos morfotipos *Schizothrix* en similares proporciones y, en menor medida, se observaron tricomas de *Calothrix* y *Rivularia*, además de diatomeas. Según Whitton (2002), *S. coriacea* es una especie epilítica que aparece en rocas calizas húmedas de pequeños arroyos con flujo variable, que a veces forma parte de la cobertura general de arroyos en los que se han descrito la presencia de *Rivularia*, apareciendo entremezclada con filamentos de *Rivularia* en el borde de colonias viejas de ésta última. En ríos mediterráneos se han descrito la dominancia de tapetes microbianos, compuestos por, *Phormidium fragile*, *Phormidium foveolarum* y *Schizothrix lateritia* (Aboal y col., 2002). Esta especie es muy similar a *S. coriacea*, diferenciándose únicamente en la forma de la célula terminal, lo que puede inducir a confusiones en la identificación (Whitton, 2002).

Además, durante la campaña de verano se observaron crecimientos macroscópicos de *Phormidium* sobre las rocas en forma de tapete.

En los análisis de diversidad genética de la región *cpcBA*-IGS realizados en las muestras recogidas durante la campaña de verano, se obtuvieron tres genotipos distintos: el genotipo 1 formado por las secuencias SNTAJL3, SPTAJL1 y SSTAJL7, el genotipo 2 por SSTAJL1 y el genotipo 3 por la muestra natural de *Phormidium*. El alineamiento múltiple de las secuencias de la región IGS de las muestras de este estudio, indicó que la secuencia nucleotídica se encuentra altamente conservada

dentro de cada genotipo, pero difiere claramente entre ellos, indicando una clara separación taxonómica.

Se encontraron resultados similares en los análisis filogenéticos de las secuencias del operon de la ficocianina, en los que los tres genotipos hallados se separaron en tres grupos claros. En el árbol de *cpcBA*-IGS, los genotipos 1 y 2 de este estudio siempre se situaron en ramas distintas, independientemente de los métodos empleados, siendo coherente con los porcentajes de variabilidad más altos respecto a los otros dos genotipos. Por otro lado, el genotipo 3 correspondiente a la muestra natural de *Phormidium* se situó junto *Phormidium bijugatum* PACC8602 y *Lyngbya aerugineo-coerulea* PACC8601, recientemente reclasificada por Komárek y Anagnostidis (2005) como *Phormidium aerugineo-caeruleum*, formando un grupo soportado por valores de bootstrap muy altos. Todos estos resultados parecen indicar que los tres genotipos pueden corresponderse con tres géneros diferentes.

Al comparar estos resultados con los obtenidos en las observaciones microscópicas de las muestras se puede sugerir que el genotipo 1 se correspondería con *S. coriacea*, Oscillatorial con tricomas de menos de 3 μm de ancho mientras que el genotipo 2 al estar relacionada con Oscillatoriales de tricomas de más de 3 μm de ancho podría corresponderse con el segundo morfotipo de *Schizothrix* observado.

Se observaron resultados similares en los análisis filogenéticos del gen de ARNr 16S, en los que la secuencia obtenida en la muestra natural de *Phormidium* se situó junto a cepas de *Phormidium* de las bases de datos. Se incluyeron también en este grupo (grupo A) secuencias de *Microcoleus* de las bases de datos, coincidiendo con los resultados obtenidos por Comte y col., (2007) en cianobacterias de ambientes polares basados en observaciones fenotípicas y análisis genéticos del gen ARNr 16S y el espacio transcrito interno entre el gen ARNr 16S y 23S (ITS1). Algunas de estas cepas de *Microcoleus*, fueron originalmente identificadas como *Phormidium* por Casamatta y col. (2005) basándose en análisis de microscopía electrónica y filogenéticos. Este es el caso por ejemplo de *Microcoleus rushforthii*, anteriormente clasificada como *Phormidium subfuscum* UTCC474. Comte y col. (2007) sugirieron que el género *Phormidium* (según Komárek y Anagnostidis, 2005) es todavía muy heterogéneo, siendo necesaria una revisión de los taxones *Phormidium* y *Microcoleus* en un futuro.

Respecto al análisis filogenético de las secuencias de ADNr 16S obtenidas de las muestras del tapete microbiano analizado, se obtuvieron distintas secuencias según el

método utilizado (clonación o TGGE), lo que nos permitió aumentar la diversidad de las cianobacterias analizadas.

Se obtuvieron tres genotipos distintos en el análisis de los clones, que se localizaron en diferentes ramas. Los clones SSTAJL-8 y SSTJLA-9 obtenidos de un tapete seco (grupo B) presentaron una similitud alta (99,4 %), indicando que se trataba de la misma especie, mientras que el clon SPTAJL-1, hallado en otra muestra, se situó en otra rama distinta (rama 1), mostrando una similitud del 92,7-93,5% con el grupo B. El cuarto clon encontrado (clon SNTAMY-4) fue más distante, estando relacionado con la cepa *Schizothrix* CCMEE6130 (89,4% similares). Los porcentajes de similitud entre los genotipos encontrados fueron menores del 95%, indicando que se trata de géneros distintos.

Por otro lado, las secuencias obtenidas en los análisis del gen ARNr 16S mediante TGGE se agruparon en dos grupos distintos (grupo C y D), separado del resto de cianobacterias. El grupo C estuvo formado por las secuencias del gen ARNr 16S obtenidas de muestras de Mayo del 2005 (SNTAMY2 banda-2b y SNTAMY1 banda2b), Marzo (SPTAMZ1 banda-1b, SPTAMZ1 banda-2b, SPTAMZ2 banda-1b y SPTAMZ2 banda-2b) y Julio de 2006 (SSTAJL banda-1b), y mostraron una similitud entre el 97,4-99,6%, sugiriendo que podían tratarse de la misma especie. Por otro lado en el grupo D se encuentran 3 secuencias recuperadas de los geles de TGGE de muestras recogidas en Abril (SNTAAB12 banda-2b y SNTAAB13 banda-2b) y en Julio de 2006 (SPTAJLB banda-2b) con una similitud del 99,3 %. Se incluyeron también en este grupo 3 secuencias de ADNr 16S de aislados pertenecientes al género *Leptolyngbya*. La similitud entre las secuencias que constituyen este grupo varió desde el 97,1 al 98,2%, indicando que las secuencias obtenidas se corresponden con el género *Leptolyngbya*.

No se encontró en la base de datos ninguna secuencia del gen ARNr 16S estrechamente relacionada con el grupo C. Además, las distancias genéticas entre este grupo y el resto fueron grandes. Basándonos en esta definición de un género (Ludwig y col., 1998), las cepas del grupo C podrían ser miembros de un nuevo género. En la misma situación se encuentra el grupo B.

A partir de los análisis morfológicos y de las secuencias de ADNr 16S, se puede sugerir que el grupo C, el cual aparece relacionado con cepas identificadas como *Leptolyngbya* y *Schizothrix* con tricomas estrechos (< 3µm), se correspondería con la especie identificada por los análisis morfológicos como *S. coriacea*, mientras que el

grupo B, el cual aparece relacionado con Oscillatoriales de tricomas más anchos ($> 3\mu\text{m}$) como *O. terebriformis*, se podría corresponder con el segundo morfotipo *Schizothrix* observado, que presentaba tricomas más anchos.

Todos los resultados morfológicos, de secuenciación y del perfil genético de TGGE han mostrado que las muestras analizadas de un tapete microbiano están dominadas por especies filamentosas sin heterocistos. Similares resultados se han encontrado en los análisis de otros tapetes microbianos (Komárek y col., 2005; Comte y col., 2007; McGregor y Rasmussen, 2008). Los resultados moleculares han mostrado una mayor diversidad que las observaciones morfológicas realizadas a través de microscopía como ya se había observado anteriormente (Wilmotte y Golubic, 1991; Nübel y col., 1997; Taton y col., 2003; Ver Bauer y col., 2008). Además, se ha observado que cianobacterias pertenecientes a un mismo género aparece dispersas en los árboles filogenéticos, apoyando la idea de que estos morfotipos han tenido múltiples orígenes evolutivos (Nelissen y col., 1994; Giovannoni y col., 1988; Komarek y Kaštovský 2003; Tomitiani y col., 2006). Así, las clasificaciones basadas principalmente en la morfología no reflejan necesariamente las relaciones filogenéticas.

V. Estudio de la actividad fosfatasa y nitrogenásica en las cianobacterias dominantes en el río Muga

Los principales nutrientes limitantes en ambientes acuáticos son el fósforo y el nitrógeno, influyendo claramente sobre el crecimiento y desarrollo de la biomasa de los productores primarios, siendo además los responsables, cuando aumentan considerablemente, de los procesos de eutrofización (Paerl y col., 2003).

En los tramos de cabecera de ríos y arroyos, en especial en zonas calcáreas, la comunidad epilítica está dominada por cianobacterias, las cuales pueden llegar a formar crecimientos macroscópicos, en forma de grandes extensiones de tapetes y colonias, como ocurre en el río estudiado. Los organismos que viven en estos medios, desarrollan distintas estrategias para sobrevivir en un ambiente en el que las concentraciones de nutrientes son limitantes, como son la actividad fosfatasa en respuesta a condiciones limitantes de P (Whitton y col., 2005) y la actividad nitrogenásica en respuesta a condiciones limitantes de N (Paerl, 1990).

A partir de los datos de la química del agua y de la comunidad fototrófica, se puede considerar al río Muga, en el sitio estudiado, como un río que realmente no se encuentra perturbado por alguna actividad humana, mostrando marcadas características oligotróficas. Los valores para el fósforo reactivo soluble (PRS) fueron muy bajos, variando desde 0,3 a 4,3 $\mu\text{g L}^{-1}$ P- PO_4 . El N inorgánico disuelto (NID: $\text{NO}_2\text{-N} + \text{NO}_3\text{-N} + \text{NH}_4\text{-N}$), aunque mostró valores ocasionalmente altos (252 $\mu\text{g L}^{-1}$ $\text{NH}_4\text{-N}$ y 368 $\mu\text{g L}^{-1}$ $\text{NO}_3\text{-N}$) se puede decir, que en general los valores fueron bajos, como indica la dominancia de especies con heterocistos en el río. La relación NID/PRS fue en general superior a la proporción (molar) de 16 a 1 detectada en Redfield (Feuillade y col., 1991) indicando que probablemente la limitación de P es un factor más acuciante en el río. En relación con estas bajas concentraciones de nutrientes, PRS y NID, se han encontrado valores considerables de actividad fosfatasa y actividad nitrogenásica en todas las muestras estudiadas.

Las cianobacterias analizadas mostraron una marcada actividad fosfomonoesterasa (PMEasa) y fosfodiesterasa (PDEasa) a lo largo del período de estudio, si bien se encontraron variaciones estacionales y entre las cianobacterias. En general fué mayor la actividad PMEasa que la PDEasa, con valores, en muchas ocasiones, de hasta tres veces más. La presencia de actividad PDEasa contrasta con las observaciones en otras cianobacterias y en la mayoría de los restantes fotótrofos acuáticos, donde sólo se suele encontrar actividad PMEasa (Whitton y col., 2005).

Las tres cianobacterias estudiadas durante las cinco campañas realizadas: *Rivularia*, *Tolypothrix* y *Schizotrix*, presentaron valores similares de PMEasa en Noviembre (valores de 20-25 $\mu\text{mol pNP mg}^{-1}$ Chl a h^{-1}) que fué el valor máximo encontrado en el estudio, a excepción del alto valor encontrado en *Tolypotrix* en Mayo, si bien este ensayo no fué realizado *in situ*, si no que fué realizado posteriormente en el laboratorio y las diferencia podrían deberse a las condiciones diferentes del ensayo. Livingstone y Whitton (1984) determinaron la actividad fosfatasa de colonias de *Rivularia* en el arroyo Red (Upper Teesdale, Reino Unido), y obtuvieron valores muy cercanos a los valores máximos encontrados en el río Muga (29-32 $\mu\text{mol pNP mg}^{-1}$ Chl a h^{-1}). Existen muchos datos de actividad fosfatasa en ríos mediterráneos (Romaní y Sabater, 1998; Romaní, 2000; Sabater y col., 2000; Sabater y col., 2003), si bien los valores absolutos no se pueden comparar, al haber sido realizados los estudios utilizando otro análogo como sustrato (MUF-

metilumbeliferona). Aún así, se podría generalizar que en estos estudios encontraron altas actividades de fosfatasa, en relación con condiciones limitantes de P en el medio.

Volvieron a presentar valores similares de PMEasa las cianobacterias estudiadas en Marzo, pero en esta ocasión los valores fueron de 5-6 $\mu\text{mol } p\text{NP mg}^{-1} \text{ Chl a h}^{-1}$, valores mínimos encontrado en el estudio. Se encontraron resultados similares en *Rivularia* de un río calcáreo alpino (río Isar, Austria), con valores medios de 5.7 $\mu\text{mol } p\text{NP mg}^{-1} \text{ Chl a h}^{-1}$ (Rott y col., 2000). Cuando se estudió el efecto de la temperatura en la actividad fosfatasa, sorprendentemente los resultados indicaron una baja tasa de incremento en la actividad fosfomonoesterasa con el aumento de la temperatura, en el rango de 10-35°C, lo que sugiere una adaptación a los cambios de temperatura frecuentes en la zona de estudio y explicarían la ausencia de relación entre la temperatura del agua en el río y los valores mínimos y máximos encontrados, en los que en ambos casos la temperatura del agua era de alrededor de 10°C. La diferencia entre luz y oscuridad en la actividad fosfatasa tampoco tuvo una incidencia clara, como previamente ya se había encontrado en estudios en *Rivularia* (Banerjee y John, 2006).

En general, las actividades encontradas en *Rivularia* fueron casi siempre más pequeñas que las actividades de las otras cianobacterias analizadas y además, se observó una mayor estacionalidad en *Rivularia* que en *Schizothrix* y *Tolypothrix*.

Los resultados de la cinética enzimática mostraron valores de K_M similares, tanto para la actividad PMEasa como para la PDEasa, si bien en esta última fueron mayores. Estos resultados indican que las diferencias en los valores de actividad fosfatasa entre las distintas cianobacterias no se puede explicar en base a diferencias en la afinidad por los sustratos, si no que dichas variaciones se deberán explicar en base a diferencias en otras características fisiológicas entre las cianobacterias estudiadas. Las condiciones ambientales y las diferencias en desarrollo vital de cada cianobacteria podría incidir en la actividad fosfatasa. Rott y col. (2000) proponían que podría haber diferencias entre las cianobacterias de crecimiento rápido, que siguen la estrategia de la r, frente a aquellas de crecimiento más lento, pero más persistentes, que siguen la estrategia de la k (Andrews y Harris, 1986), entre las que se encontraban *Rivularia* y *Schizothrix* en su estudio. En el río Muga, especies con un crecimiento rápido, con una estrategia de la r, como *Tolypothrix*, tendrían un requerimiento mayor de P y desarrollarían un déficit interno de las reservas de P, potenciándose así la actividad fosfatasa. Sin embargo, especies de crecimiento más lento, con estrategia de

la *k*, como *Rivularia*, dispondrían por mucho más tiempo de las reservas de polifosfato, generadas durante los pulsos de P en el río, por lo que la utilización de compuestos de P orgánico, a través de la actividad fosfatasa, no serían tan importantes, en determinadas épocas del año. Estudios realizados con otra Rivulariaceae (*Calothrix elenkinii*) mostraron una lenta utilización de las reservas de P, en forma de gránulos de polifosfato, lo que le confería una ventaja adaptativa para encontrarse en un río generalmente con bajas concentraciones de nutrientes, pero con episódicos aportes de P (Mateo y col., 2006).

Aunque se han encontrado diferencias estacionales y entre cianobacterias, se puede decir que, en general, la actividad fosfatasa de las cianobacterias del Muga, hace que estos organismos estén bien adaptados para emplear el fósforo orgánico del ambiente, explicando su dominancia en un río con episodios de limitación de fosfato. *Rivularia* normalmente se encuentra como cianobacteria dominante cerca del nacimiento de los arroyos calizos o en las partes altas de las cuencas en regiones templadas (Casanova y LaFont, 1985; Whitton, 1987; Sabater, 1989; Sabater y col., 2000) y los tapetes de *Schizothrix* también se han encontrado dominando sistemas fluviales con limitación de nutrientes (Rott y col., 2000; Sabater y col., 2000). El ciclo de vida de *Rivularia* depende de la existencia de periodos cortos en los que los filamentos son ricos en P y por tanto, producen hormogonios que se unen a la superficie de las rocas para formar nuevas colonias (Whitton, 1987; Whitton y col., 1998). La mayoría de las colonias en Mayo parecían haberse desarrollado en las semanas previas, por lo que parece probable que hubiera un periodo con concentración de fosfato alta en el agua durante el mes de Abril. Se han descrito pulsos de P en elevada concentración, mayoritariamente orgánico, en arroyos dominados por *Rivularia* en el norte de Inglaterra durante la primavera temprana (Livingstone y Whitton, 1984; Turner y col., 2003a, b), de manera que quizás la situación podría ser similar en la cuenca del Muga.

Por otra parte, la capacidad de fijación de N₂ les confiere a los organismos que la pueden llevar a cabo una ventaja adaptativa en medios pobres en N. Se ha demostrado una relación entre la proporción de cianobacterias con heterocistos y la concentración de N en las aguas fluviales, aumentando su número en condiciones limitantes de N y disminuyendo su proporción al aumentar la concentración de NID en las aguas (Fisher y col., 1982; Peterson y Grimm, 1992; Perona y col., 1998; Douterelo y col., 2004).

En el presente estudio todas las muestras ensayadas mostraron actividad nitrogenásica, aunque variaron en gran medida los valores, dependiendo de la cianobacteria y en algunos casos las condiciones del ensayo.

El proceso de fijación de nitrógeno atmosférico es un proceso importante ecológicamente, como aporte de nitrógeno fijado en muchos ambientes acuáticos y terrestres (Vitousek y Howart, 1991), especialmente en ambientes marinos y en arrozales. Se ha descrito que las cianobacterias fijadoras de N₂ (diazotróficas) constituyen un componente dominante de la microflora de los arrozales, contribuyendo significativamente a la fertilización de los suelos (Roger, 1996; Fernández-Valiente y col, 2000). En arrozales españoles se ha encontrado que, a pesar de que la idea generalizada era que la mayor parte del N incorporado provenía de la fijación de N₂ debida a las cianobacterias de dichos suelos, en realidad sólo alrededor del 33% se podía relacionar con dicha capacidad fijadora (Ariosa y col., 2006).

Los estudios sobre actividad nitrogenásica en ambientes acuáticos han sido llevados a cabo fundamentalmente en sistemas marinos, basándose en gran medida en cianobacterias planctónicas, como *Thrichodesmium* (Oscillatoriales) y más recientemente también en unicelulares (Capone y col., 1997; Zehr y col., 2001; Falcón y col., 2004). Ahora bien, son muchos menos los estudios en tapetes microbianos marinos y menos aún en ecosistemas de agua dulce (ver Stal., 2000).

Las cianobacterias diazotróficas han desarrollado diferentes estrategias para proteger a la nitrogenasa de la inactivación del oxígeno (Berman-Frank y col., 2003). Así, en tapetes microbianos marinos Bebout y col. (1987) encontraron tasas altas de fijación de nitrógeno durante la noche. Sin embargo, se han registrado niveles bajos de fijación de nitrógeno durante la noche en arrozales (Alimagno y Yoshida, 1997). Esta variación en los patrones de fijación de nitrógeno puede responder a los microorganismos diferentes involucrados en cada comunidad. Así, las cianobacterias sin heterocistos pueden mostrar tasas de fijación de nitrógeno altas en la oscuridad (empleando la energía fotosintética generada durante el día) o a intensidades de luz moderadas (Lundgren y col., 2003), cuando las concentraciones de O₂ son bajas y es poco probable que dañen o inhiban a la nitrogenasa. Sin embargo, las cianobacterias con heterocistos pueden tener tasas altas de fijación de nitrógeno a un amplio rango de intensidades, gracias a que son capaces de proteger a la enzima nitrogenasa del O₂ producido en la fotosíntesis (Gallon, 1992).

En nuestro estudio, mostraron actividad nitrogenásica tanto las colonias de *Rivularia*, *Tolypothrix* *Nostoc*, como dos tapetes microbianos compuestos mayoritariamente por *Schizothrix*. Los ensayos realizados durante las horas de máxima irradiancia, en las especies con heterocistos, indicaron que la actividad de la nitrogenasa fue variable, encontrándose los valores más altos en *Nostoc* (508,8 nmol C₂H₄ mg⁻¹ Chl a h⁻¹), frente a unos valores similares en *Rivularia* (117,0 nmol C₂H₄ mg⁻¹ Chl a h⁻¹) y *Tolypothrix* (105,6 nmol C₂H₄ mg⁻¹ Chl a h⁻¹), probablemente en relación con un mayor número de heterocistos en los tricomas de dicha especie.

La mayoría de los datos que existen sobre cianobacterias con heterocistos son realizados con cultivos en el laboratorio (Fernández-Valiente y Leganés, 1989; Leganés y Fernández-Valiente, 1991; Teaumroong y col., 2002; Hrozek y col., 2003), además los valores de fijación de nitrógeno obtenidos en experimentos en campo generalmente son realizados en tapetes microbianos y expresados por metro cuadrado de sustrato más que por unidad de Chl a, de manera que es difícil comparar los valores obtenidos en nuestro estudio con los valores de la bibliografía.

Fernández-Valiente y col. (2001) encontraron en estanques de McMurdo Ice Shelf (Antártida) tres morfologías diferentes de colonias de *Nostoc*, que presentaron diferente actividad nitrogenásica. Los valores obtenidos fueron 260, 1110 y 3480 nmol C₂H₄ mg⁻¹ Chl a h⁻¹ para las colonias cilíndricas gruesas, colonias esféricas y colonias planas, respectivamente. Los datos obtenidos en este estudio en *Nostoc* estuvieron dentro del rango de los valores encontrados en dichas colonias de *Nostoc* de la Antártida.

Con respecto a la fijación de nitrógeno en los tapetes microbianos estudiados, denominados Tapete A y Tapete B, ambos tapetes mostraron actividad nitrogenásica, aunque los valores variaron según el tapete y las condiciones analizadas. En el tapete A con una clara dominancia de *Schizothrix* (≥95%), aunque los valores (entre 28,1 y 78,7 nmol C₂H₄ mg⁻¹ Chl a h⁻¹) fueron más bajos que los encontrados en las especies con heterocistos, se situaron dentro del rango de los obtenidos en algunos tapetes microbianos de la Antártida (tapetes en Mc Murdo con valores de 52, 90 y 91 nmol C₂H₄ mg⁻¹ Chl a h⁻¹) (Fernández-Valiente y col., 2001). Por otra parte, no hubo diferencias significativas entre los resultados encontrados a la luz, frente a oscuridad, ya fuera a las horas de máxima irradiancia, como en el período de tiempo entre el anochecer y el amanecer ($P > 0.001$). Diversos estudios realizados indican que los

tapetes con tasas de fijación de N₂ más altas durante el día, siguen un patrón marcado por cianobacterias heterocistas, mientras que tasas altas desde el atardecer hasta el amanecer, señalan a las cianobacterias no filamentosas como responsables (Van Gemerden, 1993; Stal, 1995; Paerl y col., 2000; Des Marais, 2003; Tomitani y col., 2006). Nuestros resultados indican que dichos tapetes fijan N₂ tanto a la luz, como en oscuridad, lo que podría ser debido a que las cianobacterias sin heterocistos, claramente mayoritarias en estos tapetes llevan a cabo dicho proceso tanto en luz, como en oscuridad. Estudios en la cianobacteria marina sin heterocistos *Lyngbya majuscula* han mostrado que dicha cianobacteria fija N₂ tanto en luz, como en oscuridad (Jones, 1992). Otra posibilidad se basaría en una actividad nitrogenásica, a la luz, llevada a cabo por las cianobacterias con heterocistos incluidas dentro el tapete, y, en las horas de oscuridad, sin embargo, las cianobacterias sin heterocistos serían las responsables de este proceso. En las cianobacterias con heterocistos, el proceso de fijación de N₂, llevado a cabo en dichas células especializadas, requiere ATP, fundamentalmente generado en las células vegetativas, al carecer éstos de PSII, como respuesta adaptativa hacia la eliminación de O₂ generado en dicho fotosistema (Gallon, 1992). Inhibidores del PS II, como el DCMU (3-(3,4-Dichlorophenyl)-1,1-dimethylurea), inhibirán la actividad nitrogenásica, en estas cianobacterias, al inhibir la actividad de dicho fotosistema en las células vegetativas, bloqueando por tanto los productos energéticos requeridos para el proceso de fijación de N₂ (Berman-Frank y col., 2001; 2003). Así tapetes microbianos de una poza de un arroyo (Poza Azul, México), mostraron un descenso de un 90% de su actividad nitrogenásica en presencia de DCMU, apuntando a las cianobacterias con heterocistos como las responsables de la fijación de N₂ en dichos tapetes (Falcón y col., 2007). Sin embargo, tapetes del mismo tipo que los empleados en este estudio, con la misma dominancia de *Schizothrix* y del mismo río, en otra época de estudio (verano) mostraron la misma actividad en luz, oscuridad y presencia de DCMU (datos no publicados, E. Perona, comunicación personal). Todos estos resultados parecen indicar que en estos tapetes las cianobacterias responsables de la fijación de N₂ serían cianobacterias sin heterocistos, si bien serán necesarios experimentos posteriores que confirmen esta hipótesis.

El Tapete B que presentó también una clara dominancia de cianobacterias filamentosas sin heterocistos, aunque en este caso se observó una presencia mayor de cianobacterias con heterocistos (entre un 5 y un 7,5%), mostró unos valores

considerablemente mayores de actividad nitrogenásica a los del otro tapete, en las horas de mayor irradiancia ($304,01 \text{ nmol C}_2\text{H}_4 \text{ mg}^{-1} \text{ Chl a h}^{-1}$), disminuyendo significativamente ($P < 0.001$) en oscuridad. Tapetes de la Península de Byers, en la Antártida mostraron también valores de $301 \text{ nmol C}_2\text{H}_4 \text{ mg}^{-1} \text{ Chl a h}^{-1}$ a la luz, disminuyendo a valores similares a los encontrados en nuestro estudio, en oscuridad, ($25 \text{ nmol C}_2\text{H}_4 \text{ mg}^{-1} \text{ Chl a h}^{-1}$), sugiriendo los autores del estudio que la actividad nitrogenásica se debía principalmente a cianobacterias con heterocistos (Fernández-Valiente y col., 2006). De este modo, las tasas de fijación de N_2 más altas registradas en el Tapete B durante el día, sugerían que la actividad nitrogenásica había sido llevada a cabo principalmente por las cianobacterias con heterocistos que formaban parte de este tapete (*Tolypothrix* y *Rivularia*). Ahora bien, el hecho de que dicha actividad sea casi el triple de las que presentan las colonias aisladas de dichas cianobacterias, nos lleva a pensar que otras cianobacterias sin heterocistos en este tapete puedan contribuir, en gran medida, a la fijación de N_2 encontrada. La cianobacteria marina, filamentosa, *Trichodesmium*, fijadora de N_2 , con una contribución importante a la producción primaria en océanos oligotróficos, presenta actividad nitrogenásica a la luz, descendiendo gradualmente cuando se le expone a períodos de oscuridad (Staal y col., 2007).

Los resultados obtenidos en el presente estudio, en los que las cianobacterias estudiadas mostraron claramente respuestas fisiológicas relacionadas con condiciones limitantes de P y N, como son la actividad fosfatasa y nitrogenásica, explicarían en gran medida su dominancia en un río de marcadas características oligotróficas. Por otra parte, tal y como se ha indicado anteriormente, la caracterización fisiológica de estas cianobacterias puede contribuir a la taxonomía de las mismas, como un rasgo identificativo añadido.

CONCLUSIONES

1 Los géneros *Rivularia*, *Calothrix* y *Tolypothrix* fácilmente identificables en la naturaleza, sin embargo, difícilmente indistinguibles en cultivos de laboratorio, se consiguieron diferenciar tanto por técnicas genéticas como morfológicas. Así, de las 29 cepas analizadas, 11 pertenecieron al género *Rivularia*, 11 pertenecieron al género *Calothrix* y 7 cepas pertenecieron al género *Tolypothrix*.

2 Para poder llevar a cabo una correcta identificación taxonómica de cepas pertenecientes a estos tres géneros basada en la morfología, es necesaria la utilización de un medio nutritivo pobre en nutrientes y con una concentración de fósforo baja, así como condiciones de luz y temperatura semejantes a las del medio natural.

3 El género *Rivularia* mostró gran diversidad morfológica y genética, que permite separar a este en otros géneros. Además, las colonias de *Rivularia* en el medio natural no son monoclonales como ha demostrado la heterogeneidad tanto morfológica como genética de las mismas.

4 El género *Tolypothrix* formó un grupo monofilético, sin embargo, el género *Calothrix*, basándonos en las distancias genéticas obtenidas puede ser separado en varios géneros.

5 Todas las cepas analizadas del género *Rivularia* presentaron una sola copia del operón de la ficocianina, sin embargo, todas las cepas estudiadas pertenecientes al género *Tolypothrix* presentaron varios operones. Por otro lado, el género *Calothrix* presentó más heterogeneidad, habiéndose encontrado desde cepas con un solo operon hasta tres operones en algunos casos. A pesar de ello, el operón de la ficocianina ha resultado ser un buen marcador genético con gran especificidad para identificar y comparar distintas cepas de los géneros *Calothrix*, *Rivularia* y *Tolypothrix*.

6 El género *Nostoc* es un género muy heterogéneo, tanto a nivel morfológico como genético, cuyas relaciones filogenéticas mostraron que es un grupo polifilético, pudiendo ser dividido en géneros distintos, requiriendo una nueva revisión del grupo.

7 Los análisis moleculares nos han permitido detectar una mayor diversidad que la observada en los análisis morfológicos. La combinación de los resultados morfológicos, de secuenciación y del perfil genético de TGGE obtenidos han mostrado que los tapetes microbianos analizados se encuentran dominados por especies filamentosas sin heterocistos, pertenecientes en su mayor parte a los géneros *Schizothrix* y *Leptolyngbya*, aunque algunos tipos de cianobacterias con heterocistos (*Tolypothrix* y *Rivularia*), también estuvieron presentes.

8 Los estudios ecofisiológicos llevados a cabo en el río Muga, de marcadas características oligotróficas, mostraron que las colonias de *Rivularia*, *Tolypothrix*, *Nostoc* y tapetes microbianos, presentaron actividad fosfatasa a lo largo de todo el año estudiado, lo que indica que poseen una gran eficiencia en la utilización del fósforo orgánico del medio y, por tanto, están bien adaptadas a habitar en medios pobres en fosfato.

9 La capacidad de fijación de nitrógeno de dichas colonias y tapetes microbianos, se pudo demostrar también en experimentos fisiológicos *in situ*. Dentro de las especies con heterocistos, fue *Nostoc* el que presentó mayor actividad frente a *Rivularia* y *Tolypothrix*, que presentaron valores de actividad muy similares. Con respecto a los tapetes microbianos analizados, se detectó actividad tanto a la luz como en oscuridad, si bien estos valores fueron menores que los obtenidos en las especies con heterocistos. Sin embargo, el otro tapete estudiado mostró valores de casi tres veces el obtenido en *Rivularia* y *Tolypothrix*, en relación con la diferente composición de dichos tapetes.

10 Las diferencias entre las estirpes observadas en los estudios morfológicos se corresponden con las obtenidas en los estudios genéticos, por lo que queda evidente la complementariedad de ambos tipos de estudios. De este modo, el empleo en el campo de la taxonomía de los estudios polifásicos en los que se combinan una caracterización morfológica, genética y fisiológica han resultado ser una herramienta valiosa en la identificación de las cianobacterias.

BIBLIOGRAFÍA

- Abed, R. M. M., Schönhuber, W., Amann, R. y Garcia-Pichel, F. (2002c)** Picobenthic cyanobacterial populations revealed by 16S rRNA-targeted *in situ* hybridization. *Environ Microbiol* **4**(7), 375–382.
- Aboal, M., Puig, M. A., Mateo, P. y Perona, E. (2002)** Implications of cyanophyte toxicity on biological monitoring of calcareous streams in north-east Spain. *J Appl Phycol* **14**, 49-56.
- Aboal, M., Puig, M.A. y Asensio, A. D. (2005)** Production of microcystins in calcareous Mediterranean streams: Alharabe River, Segura River basin in south-east Spain. *J App Phycol* **17**, 231-243.
- Adams, D.G. y Duggan, P. S. (1999)** Heterocyst and akinete differentiation in cyanobacteria. *New Phytol* **144**, 3–33.
- Andrews, J. H. y Harris, R. F. (1986)** *r*- and *K*-selection and microbial ecology. *Adv Microb Ecol* **9**, 99-147.
- Akpan, E.B. y Farrow, G.E. (1984)** Shell-boring algae on the Scottish continental shelf: identification, distribution, bathymetric zonation. *Trans R Soc Earth Sci* **75**, 1– 12.
- Allen, M. M. y Smith, A. J. (1969)** Nitrogen chlorosis in the blue-green algae. *Arch Microbiol* **69**, 11-120.
- Al-Sheri, A. M. (1992)** An ecophysiological study of the moss *Hydrogonium fontanum* from the Asir Mountains, Saudi Arabia. Ph. D. Thesis, University of Durham, UK.
- Altschul, S.F., Gish, W., Miller, W., Myers, E.W. y Lipman, D.J. (1990)** Basic local alignment search tool. *J Mol Biol* **215** (3), 403-10.
- Amann, R. I. , Ludwig, W. y Schleifer, H. (1995)** Phylogenetic identification and *in situ* detection of individual microbial cells without cultivation. *Microbiol Rev* **59**, 143-169.
- Anagnostidis, K. (1989)** *Geitlerinema*, a new genus of oscillatorian cyanophytes. *Plant Syst Evol* **164**, 33–46.
- Anagnostidis, K. y Komárek, J. (1985)** Modern approach to the classification system of cyanophytes .1.Introduction. *Arch Hydrobiol* Suppl. **71** *Algological Studies* **38/39**, 291-302.
- Anagnostidis, K. y Komárek, J. (1988)** Modern approach to the classification system of cyanophytes. 3. Oscillatoriales. *Archiv Hydrobiol* Suppl. **80** (1-4) *Algological Studies* **50-53**, 327-472.
- Anagnostidis, K. y Komárek, J. (1990)** Modern approach to the classification-system of cyanophytes .5. Stigonematales. *Archiv Hydrobiol* Suppl. **86** *Algological Studies* **59**, 1-73.
- Antón, A. I., Martínez-Murcia, A. J. y Rodríguez-Valera, F. (1998)**. Sequence diversity in the 16S-23S intergenic spacer region (ISR) of the rRNA operons in representatives of the *Escherichia coli* ECOR collection. *J Mol Evol* **47**, 62–72.
- APHA (1995)** Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater (Ed. A. E. Greenberg) *American Public Health Association*, Washington, págs. 106-115.
- Apte, S. K. y Thomas, J. (1987)** Nitrogen fixation genes (*nifK*, *D*, *H*) in the filamentous nonheterocystous cyanobacterium *Plectonema boryanum* do not rearrange. *J Genet* **66**, 101-110.
- Ashelford, K. E. (2005)** At least one in twenty 16S rRNA sequence records currently held in public repositories estimated to contain substantial anomalies. *Appl Environ Microbiol* **71** (12), 7724-7736.
- Ashelford, K. E. (2006)** New screening software shows that most recent large 16S rRNA gene clone libraries contain chimeras. *Appl Environ Microbiol* **72** (9), 5734-5741. Distribuido por los autores en <http://www.cardiff.ac.uk/biosi/research/biosoft/>

- Atkins, R., Rose, T., Brown, R. S. y Robb, M. (2001)** The *Microcystis* cyanobacteria bloom in the Swan River - February 2000. *Water Sci Tech* **43**, 107-114.
- Avilés, J., Gonzalez, M. E., Toro, M., Burguillo, J., Cobo, G. y García, F. (1990)** Indicaciones biológicas de la cuenca del Tajo. Memoria, anejo I y anejo II. C.E.D.E.X. Centro de Estudios Hidrográficos. Madrid.
- Badger, M. R. y Price, G. D. (1990)** Carbon oxysulfide is an inhibitor of both CO₂ and HCO₃⁻ uptake in the cyanobacterium *Synechococcus* PCC 7942. *Plant Physiol* **94**, 35-39.
- Ballot, A., Dadheech, P. K. y Krienitz, L. (2004)** Phylogenetic relationship of *Arthrospira*, *Phormidium* and *Spirulina* strains from Kenyan and Indian waterbodies. *Arch Hydrobiol Suppl.* **153**, 5 *Algological Studies* **113**, 37-56.
- Banerjee, M., Whitton, B. A. y Wynn-Williams, D. D. (2000b)** Phosphatase activities of endolithic communities in rocks of the Antarctic Dry Valleys. *Microbial Ecol* **39** (1), 80-81.
- Banerjee, M. y Sharma, D. (2004)** Regulation of phosphatase activity in *Chroococcidiopsis* isolates from two diverse habitats: effect of light, pH and temperature. *Appl Ecol Environ Res* **2** (1), 71-82.
- Banerjee, M. y John, J. (2006)** Phosphatase activity of non-hair forming cyanobacterium *Rivularia* and its role in phosphorus dynamics in deepwater rice-fields. *App Environ Res* **3** (1), 55-60.
- Barker, G. L. A., Handley, B. A., Vacharapiyasophon, P., Stevens, J. R. y Hayes, P. K. (2000a)** Allele-specific PCR shows that genetic exchange occurs among genetically diverse *Nodularia* (cyanobacteria) filaments in the Baltic Sea. *Microbiology* **146**, 2865-2875.
- Barker, G. L. A., Konopka, A., Handley, B. A. y Hayes, P. K. (2000b)** Genetic variation in *Aphanizomenon* (Cyanobacteria) colonies from the Baltic Sea and North America. *J Phycol* **36**, 947-950.
- Bauer, C. C. y Haselkorn, R. (1995)** Vectors for determining the differential expression of genes in heterocysts and vegetative cells of *Anabaena* sp. strain PCC7120. *J Bacteriol* **177**, 3332-3336.
- Beard, S. J., Handley, B. A., Hayes, P. K. y Walsby, A. E. (1999)** The diversity of gas vesicle genes in *Planktothrix rubescens* from Lake Zurich. *Microbiology* **145**, 2757-2768.
- Belknap, W. R. y Hazelkorn, R. (1987)** Cloning and expression of the phycocyanin operon of the cyanobacterium *Nodularia spumigena* Mertens from Australian waters. *Phycologia* **35**, 511-522.
- Beltrán, E. C. y Neilan, B. A. (2000)** Geographical Segregation of the Neurotoxin-Producing Cyanobacterium *Anabaena circinalis*. *Appl Environ Microbiol* **66** (10), 4468-4474.
- Bergman, B., Gallon, J. R., Rai, A. N. Y Stal, L. J. (1997)** N₂ Fixation by non-heterocystous cyanobacteria. *FEMS Microbiol Ecol* **19**, 139-185.
- Berman-Frank, I., Lundgren, P., Chen, Y., Küpper, H., Kolber, Z., Bergman, B. y Falkowski, P. (2001)** Segregation of nitrogen fixation and oxygenic photosynthesis in the marine cyanobacterium *Trichodesmium*. *Science* **294**, 1534-1537.
- Berman-Frank, I., Lundgren, P. y Falkowski, P. (2003)** Nitrogen fixation and photosynthetic oxygen evolution in cyanobacteria. *Res Microbiol* **154**, 157-164.
- Bertani, G. (1951)** Studies on lysogenesis. 1. The mode of phage liberation by lisogenic *Escherichia coli*. *J Bacteriol* **62** (3), 293-300.
- Bertilsson, D., Berglund, O., Karl, D. M. y Chisholm, S. W. (2003)** Elemental composition of marine *Prochlorococcus* and *Synechococcus*: Implications for the ecological stoichiometry of the sea. *Limnol Oceanogr* **48** (5), 1721-1731.

- Bittencourt-Oliveira, M. D., De Oliveira, M. C. y Bolch, C. J. S. (2001)** Genetic variability of Brazilian strains of the *Microcystis aeruginosa* complex (Cyanobacteria/Cyanophyceae) using the phycocyanin intergenic spacer and flanking regions (*cpcBA*). *J Phycol* **37**, 810-818.
- Boavida, M. J. y Wetzel, R. G. (1998)** Inhibition of phosphatase activity by dissolved humic substances and hydrolytic reactivation by natural ultraviolet light. *Freshwater Biol* **40** (2), 285-293.
- Böhme, H. (1998)** Regulation of nitrogen fixation in heterocyst-forming cyanobacteria. *Trends Plant Sci* **3** (9), 346-351.
- Bolch, C. J. S., Orr, P. T., Jones, G. J. y Blackburn, S. I. (1999)** Genetic, morphological, and toxicological variation among globally distributed strains of *Nodularia* (cyanobacteria). *J Phycol* **35** (2), 339-355.
- Boon, P. I. (1993)** Organic matter degradation and nutrient regeneration in Australian fresh waters: III. Size fractionation of phosphatase activity. *Arch Hydrobiol* **126**, 339-360.
- Boone, D. N. y Castenholz, R. W. (1989)** Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, 2^a ed, vol. 3 (Eds.) Springer-Verlag, New York.
- Boone, D. N. y Castenholz, R. W. (2001)** Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, 2^a ed, vol. 1 Springer-Verlag, New York.
- Borneman, J. y Triplett, E. W. (1997)** Molecular microbial diversity in soils from Eastern Amazonia: evidence for unusual microorganisms and microbial population shifts associated with deforestation. *Appl Environ Microbiol* **63**, 2647-2653.
- Bornet, E. y Flahault, C. (1886-1888)** Revision des Nostocaceas heterocystés. *Ann Sci Nat Bot.* **7**, ser, 3: 323-381, 4: 343-373, 5: 51-129, 7: 171-262.
- Bothe, H. (1982)** Nitrogen fixation. En: *The Biology of Cyanobacteria*, vol. 19, págs 87-104 (Eds. N. G. Carr y B. A. Whitton) Blackwell Scientific Publications, Oxford.
- Bourrelly, P. (1970a)** Les algues d'eau douce, vol. III, 512 págs. N. Boubée & Cie., Paris.
- Bourrelly, P. (1970b)** Note sur la famille des Oscillatoriacées-Schweiz. *Z. Hydrol* **32**, 519-522.
- Bourrelly, P. (1985)** Les algues d'eau douce, vol. III-2ed, 606 págs. N. Boubée & Cie., Paris.
- Boyer, S. L., Flechtner, V. R. y Johansen, J. R. (2001)** Is the 16S-23S rRNA internal transcribed spacer region a good tool for use in molecular systematics and population genetics? A case study in cyanobacteria. *Mol Biol Evol* **18**, 1057-1069.
- Boyer, S. L., Johansen, J. R., Flechtner, V. R. y Howard, G. L. (2002)** Phylogeny and genetic variance in terrestrial *Microcoleus* (cyanophyceae) species based on sequence analysis of the 16S rRNA gene and associated 16S-23S ITS region. *J Phycol* **38**, 1222-1235.
- Brümmer, I. H. M., Felske, A. y Wagner-Dobler, I. (2003)** Diversity and seasonal variability of beta-proteobacteria in biofilms of polluted rivers: analysis by temperature gradient gel electrophoresis and cloning. *Appl Environ Microbiol* **69**, 4463-4473.
- Bryant, D. A. (1991)** Cyanobacterial phycobilisomes: progress towards a complete structural and functional analysis via molecular genetics. En: *The Photosynthetic Apparatus: Molecular Biology and Operation* (eds. L. Bogorad y I. K. Vasil) Academic Press, 257 págs.
- Budd, D.A. y Perkins, R.D. (1980)** Bathymetric zonation and paleoecological significance of microborings in Puerto Rican shelf and slope sediments. *J Sediment Petrol* **50**, 881-904.
- Burgess, B. K. y Lowe, D. J. (1996)** Mechanism of molybdenum nitrogenase. *Chem Rev* **96**, 2983-3011.

Burns, R. G. (1983) Extracellular enzyme-substrate interactions in soil. En: *Microbes in their Natural Environments, Symposium 24*. Págs. 249-298. (Eds. J. H. Slater, R. Whitterbury y J. W. T. Wimpenny) *The Society for General Microbiology*, Cambridge University Press, Cambridge.

Campbell, S.E. (1983) The modern distribution and geological history of calcium carbonate boring microorganisms. En: *Biomining and Biological metal accumulation*. (Eds. P. Westbroek y P. de Jong), Reidel Publishing, Boston, págs. 99– 104.

Cardemil, L. y Wolk, L. P. (1981) Isolated heterocysts of *Anabaena variabilis* synthesize envelope polysaccharide. *Biochem Biophys Acta* **671**, 265-276.

Carlsson, P. y Graneli, E. (1993) Availability of humic bound nitrogen for coastal phytoplankton. *Estua Coast Shelf Sci* **36**, 433–447.

Carrasco, D., Moreno, E., Sánchis, D., Wormer, L., Paniagua, T., Del Cueto, A. y Quesada, A. (2006) Cyanobacterial abundante and microcystin occurrence in Mediterranean water reservoirs in Central Spain: microcystins in the Madrid area. *Eur J Phycol* **41** (3), 281-291.

Casamatta, D. A., Vis, M. L. y Sheath, R. G. (2003) Cryptic species in cyanobacterial systematics: a case study of *Phormidium retzii* (Oscillatoriales) using RAPD molecular markers and 16S rDNA sequence data. *Aquatic Bot* **77**, 295-309.

Casamatta, D., Johansen, J. R., Vis, M. L. y Broadwater, S. T. (2005) Molecular and morphological characterization of ten polar and Near-polar strains within the oscillatoriales (cyanobacteria). *J Phycol* **41**, 421–438.

Casanova, J. y Lafont, R. (1985). Les cyanophycées encroûtantes des eaux courantes du Var. *Verh Int Verein Limnol* **22**, 2805-2810.

Castenholz, R. W. (1969) Thermophilic cyanophytes of iceland and upper temperature limit. *J Phycol* **5** (4), 360-368.

Castenholz, R. W. (1989a) General characteristics of the cyanobacteria. En: *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, 2ª ed, vol. 3, págs. 582-585. (Eds. D. R. Boone & R. W. Castenholz) *Springer*, New York.

Castenholz, R. W. (1989b) Subsection IV. Order *Nostocales*. En: *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, 2ª ed, vol. 3, págs. 1780-1793. (Eds. D. R. Boone & R. W. Castenholz) *Springer*, New York.

Castenholz, R. W. y Waterbury, J. B. (1989) Group 1. Cyanobacteria. Preface. En: *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, 2ª ed, vol. 3, págs. 1710-1727. (Eds. D. R. Boone & R. W. Castenholz) *Springer*, New York.

Castenholz, R. W. (2001) General characteristics of the Cyanobacteria. En: *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. (Eds. E. Garrity, D.R. Booner y R.W. Castenholz), *Springer*, New York, vol. 1, págs. 474-487.

CEDEX (Centro de Estudios y Experimentación de Obras Públicas) (1990) Estudio de índices bióticos en los ríos Segura, Alberche y Piedra. M.O.P.U. Madrid.

Cembella, A. D., Antia, N. J. y Harrison, P. J. (1984) The utilization of inorganic and organic phosphorous compounds as nutrients by eukaryotic microalgae: a multidisciplinary perspectiva. Part 1. *CRC Crit Rev Microbiol* **10**, 317-391.

Chacón, E., Berrendero, E. y García-Pichel, F. (2006) Biogeological signatures of microboring cyanobacterial communities in marine carbonates from Cabo Rojo, Puerto Rico. *Sed Geol* **185**, 215–228.

Chen, X. y Widger, W. R. (1993) Physical genome map of the unicellular cyanobacterium *Synechococcus* sp. strain PCC7002. *J Bacteriol* **175**, 5106-5116.

- Chen, Y. B., Dominic, B., Mellon, M. T. y Zehr, J. P. (1998)** Circadian rhythm of nitrogenase gene expression in the diazotrophic filamentous nonheterocystous cyanobacterium *Trichodesmium* sp. strain IMS101. *J Bacteriol* **180**, 3598–3605.
- Chen, Y. B., Dominic, B., Zani, S., Mellon, M. T. y Zehr, J. P. (1999)** Expression of photosynthesis genes in relation to nitrogen fixation in the diazotrophic filamentous nonheterocystous cyanobacterium *Trichodesmium* sp. IMS 101. *Plant Mol Biol* **41**, 89–104.
- Christmas, M. y Whitton, B. A. (1998a)** Phosphorous and aquatic bryophytes in the Swale-Ouse river system, North-East England. 1. Relationship between ambient phosphate, internal N:P ratio and surface phosphatase activity. *Sci Total Environ* **210/211**, 389-399.
- Chróst, R. J. y Krambeck, H. J. (1986)** Fluorescence correction for measurements of enzyme activity in natural waters using methylumbelliferyl substrates. *Arch Hydrobiol* **106**, 79-90.
- Chróst, R. J. y Overbeck, J. (1987)** Kinetics of alkaline phosphatase activity and phosphorous availability for phytoplankton and bacterioplankton in Lake Plußsee (north German eutrophic lake). *Microbiol Ecol* **13**, 229-248.
- Chróst, R. J. (1990)** Microbial ectoenzymes in aquatic environments. En: *Aquatic Microbial Ecology: Biochemical and Molecular Approaches*. Págs. 118-179. (Eds. J. Overbeck y R. J. Chróst) Springer, New York.
- Chróst, R. J. y Siuda, A. (2002)** Ecology of microbial enzymes in lake ecosystems. En: *Enzymes in the environment: activity, ecology and applications*. Págs. 35-72. (Eds. R. G. Burn y R. P. Dick) Marcel Dekker, New York.
- Chu, S. P. (1942)** The influence of the mineral composition of the media on the growth of planktonic algae. 1. Methods and culture media. *J Ecol* **30**, 284-325.
- Cohen-Bazire, G. y Bryant, D. A. (1982)** Phycobilisomes: composition and structure. En: *The Biology of Cyanobacteria*. Vol. 19, págs. 143-191. (Eds. N. G. Carr y B. A. Whitton). Blackwell Scientific Publications, Oxford.
- Colon-López, M., Sherman, D. M. y Sherman, L. A. (1997)** Transcriptional and translational regulation of nitrogenase in light-dark- and continuouslight-grown cultures of the unicellular cyanobacterium *Cyanothece* sp. strain ATCC 51142. *J Bacteriol* **179**, 4319–4327.
- Comte, K., Sabacka, M., Carré-Mlouka, A., Elster, J. y Komárek, J. (2007)** Relationship between the Arctic and Antarctic cyanobacteria; three *Phormidium*-like strains evaluated by a polyphasic approach. *FEMS Microbiol Ecol* **59**, 366-376.
- Compère, P. (2005)** The nomenclature of the Cyanophyta under the Botanical Code. *Arch Hydrobiol. Algological Studies* **117** (Cyanobacterial Research 6): 31-37.
- Confederación Hidrográfica del Tajo (1960)** Comisión interministerial de planes hidráulicos: Río Alberche. Ministerio de Medio Ambiente. Madrid.
- Confederación Hidrográfica del Tajo (1999)** La cuenca del Tajo en cifras. Ministerio de Medio Ambiente. Madrid. 1010 págs.
- Costa, J. L., Paulsrud, P. y Lindblad, P. (1999)** Cyanobiont diversity within coralloid roots of selected cycad species. *FEMS Microbiol Ecol* **28**, 85-91.
- Costa, J. L., Paulsrud, P. y Lindblad, P. (2002)** The cyanobacterial tRNA(Leu) (UAA) intron: evolutionary patterns in a genetic marker. *Mol Biol Evol* **19**, 850-857.

- Cox, E. J. (1991)** What is the basis for using diatoms as monitors of river quality? En: *Use for Monitoring Rivers*. (Eds. B.A. Whitton y G. Friedrich). *Institut für Botanik Universität*. Innsbruck, Austria. págs. 33-40.
- Crosbie, N. D., Pöckl, M. y Weisse, T. (2003)** Dispersal and phylogenetic diversity of nonmarine picocyanobacteria, inferred from 16S rRNA gene and *cpcBA*-intergenic spacer sequence analyses. *Appl Environ Microbiol* **69** (9), 5716–5721.
- Dasey, M., Ryan, N., Wilson, J., McGregor, G., Fabbro, L., Neilan, B. A., Burns, B. P., Kankaanpää, J., Morrison, L. F., Codd, G. A., Rissik, D. y Bouling, L. (2005)** Investigations into the taxonomy, toxicity accumulations in the Myall lake, Australia. *Mar Freshwater Res* **56**, 45-55.
- Davey, A. (1983)** Effects of abiotic factors on nitrogen fixation by blue-green algae in Antarctica. *Polar Biol* **2**, 95–100.
- De Lorimer, R., Bryant, D. A., Porter, R. D., Liu, W. Y., Jay, E. y Stevens, S. E. Jr. (1984)** Genes for the α and β subunits of phycocyanin. *Pro Natl Acad Sci USA* **81**, 7946-7950.
- De Philippis, R., Faraloni, C., Margheri, M. C., Sili, C., Herdman, M. y Vincenzini, M. (2000)** Morphological and biochemical characterization of the exocellular investments of polysaccharide-producing *Nostoc* strains from the Pasteur Culture Collection. *World J Microbiol Biotech* **16** (7), 655-661.
- Degerhold, J., Gundersen, K., Bergman, B. y Söderbäck, E. (2006)** Phosphorous-limited growth dynamics in two Baltic Sea cyanobacteria, *Nodularia* sp. and *Aphanizomenon* sp. *FEMS Microbiol Ecol* **58**, 323-332.
- Desikachary, T.V. (1959)** Cyanophyta. *Indian Council of Agricultural Research*. New Delhi. 686 págs.
- Dillon, J. G. y Castenholz, R. W. (2003)** The synthesis of the UV-screening pigment, scytonemin, and photosynthetic performance in isolates from closely related natural populations of cyanobacteria (*Calothrix* sp.) *Environ Microbiol* **5** (6), 484-491.
- Dodds, W. K., Gudder, D. A. y Mollenhauer, D. (1995)** The ecology of *Nostoc*. *J Phycol* **31** (1), 2-18.
- Douglas, D., Peat, A., Whitton, B. A. y Wood, P. (1986)** Influence of iron status on structure of the cyanobacterium (blue-green alga) *Calothrix parietina*. *Cytobios* **47**, 155-165.
- Douterelo, I. (2000)** Estudio de la calidad del agua en los ríos Guadalix, Jarama, Manzanares y arroyo Tejada mediante el uso de bioindicadores (cianobacterias) Proyecto de fin de carrera. Universidad Autónoma de Madrid.
- Douterelo, I., Perona, E., Mateo, P. (2004)** Use of cyanobacteria to assess water quality in running waters. *Environ Pollution* **127** (3), 377-384.
- Doyle, J. J. y Doyle, J. L. (1990)**. Isolation of plant DNA from fresh tissue. *Focus* **12**, 13-15.
- Drews, G. y Weckesser, J. (1982)** Function, structure and composition of cell walls and external layers. Vol. 19, págs 333-357. En: *The Biology of Cyanobacteria* (Eds. N. G. Carr y B. A. Whitton). *Blackwell Scientific Publications*, Oxford.
- Drout (1968)** Revision of the classification of the Oscillatoriaceae. *Acad Nat Sci Philadelphia*, Monogr **15**, págs 370.
- Drout (1981)** Summary of the classification of the blue-green algae. *Beih N Hedwigia* **66**, 133-209.
- Dupraz, C., Visscher, P.T., Baumgartner, L.K. y Reid, R.P. (2004)** Microbe–mineral interactions: early carbonate precipitation in a hypersaline lake (Eleuthera Island, Bahamas). *Sedimentology* **51**, 745–765.

- Dvornyk, V. y Nevo, E. (2003)** Genetic polymorphism of Cyanobacteria under permanent natural stress: a lesson from the "Evolution Canyons". *Res Microbiol* **154**, 79-84.
- Dyble, J., Paerl, H. W. y Neilan, B. A. (2002)** Genetic characterization of *Cylindrospermopsis raciborskii* (Cyanobacteria) isolates from diverse geographic origins based on *nifH* and *cpcBA*-IGS nucleotide sequence analysis. *Appl Environ Microbiol* **68**, 2567-2571.
- Dyhrman, S. T. y Palenik, B. P. (1999)** Phosphate stress in cultures and field populations of the dinoflagellate *Prorocentrum minimum* detected using a single-cell alkaline phosphatase activity assay. *Appl Environ Microbiol* **65**, 3205-3212.
- Eady, R. R. (1996)** Structure function relationships of alternative nitrogenases. *Chem Rev* **96**, 3013-3030.
- Economou-Amilli, A., Anagnostidis, K. y Roussomoustakaki, M. (1984)** Structural aspects of the adaptation of some blue-green algae and diatoms to desiccation. En: *Being alive on lands*. Págs. 103-114 (Eds. N. S. Margaris, M. Arianoutsou-Faraggitaki y W. C. Oechel). *The Hague-Boston-Lancaster*.
- Eichner, C. A., Erb, R. W., Timmis, K. N. y Wagner-Dobler, I. (1999)** Thermal gradient gel electrophoresis analysis of bioprotection from pollutant shocks in the activated sludge microbial community. *Appl Environ Microbiol* **65**, 102-109.
- Elenkin, A. A. (1934)** Ob osnovnykh principakh sistemy Cyanophyceae. [About the main principles of the system of Cyanophyceae] *Sov Bot* **5**, 51-83.
- Elenkin, A. A. (1936-1949)** Monographia algarum Cyanophycearum aquidulcium et terrestrium in finibus URSS inventarum. *I et II*, *Izd.Akad. Nauk SSSR, Moskva-Leningrad*. **I**: 684pags, **II**: 1908 pags.
- Elia, J. y Wolk, C. P. (1990)** Developmental regulation and spatial pattern of expression of the structural genes for nitrogenase in the cyanobacterium *Plectonema* sp. PCC6903. *Mol Microbiol* **30**, 1101-112.
- Elias, R.J. y Lee, D.J. (1993)** Microborings and growth in Late Ordovician Halysitids and other corals. *J Paleontol* **67**, 922-934.
- Ernst, A., Black, T., Cai, Y., Panoff, J. M., Tiwari, D. N. y Wolk, C.P. (1992)** Synthesis of nitrogenase in mutants of the cyanobacterium *Anabaena* sp. strain PCC 7120 affected in heterocyst development or metabolism. *J Bacteriol* **174**, 6025-6032.
- Falconer, I. R. (2001)** Toxic cyanobacterial bloom problems in Australian waters: risks and impacts on human health. *Phycologia* **40**, 228-233.
- Fay, P. (1983)** *The Blue-greens* (Cyanophyta-Cyanobacteria). The Institute of Biology's Studies in Biology nº 160. (Ed. E. Arnold) Ltd. London.
- Felsenstein, J. (1985)** Confidence limits on phylogenies: An approach using the bootstrap. *Evolution* **39**, 783-791.
- Fernández-Piñas, F., Leganés, F., Mateo, P. y Bonilla, I. (1991)** Blue-green algae (cyanobacteria) as indicators of water quality in two Spanish rivers. En: *Use of Algae for Monitoring Rivers* (Eds. B.A. Whitton, E. Rott y G. Friedrich). Institut für Notanik Universität. Innsbruck, Austria. págs. 151-156.
- Fernández-Valiente, E., Ucha, A., Quesada, A., Leganés, F., y Carreres, R. (2000)** Contribution of N₂ fixing cyanobacteria to rice production: availability of nitrogen from ¹⁵N-labelled cyanobacteria and ammonium sulphate to rice. *Plant Soil* **221**, 107-112.
- Fernández-Valiente, E., Quesada, A., Howard-Williams, C. y Hawes, I. (2001)** N₂-Fixation in cyanobacterial mats from ponds on the McMurdo Ice Shelf, Antarctica. *Microb Ecol* **42**, 338-349.

- Fernández-Valiente, E., Camacho, A., Rochera, C., Rico, E., Warwick, F. V. y Quesada, A. (2007)** Community structure and physiological characterization of microbial mats in Byers Peninsula, Livingston Island (South Shetland Islands, Antarctica) *FEMS Microbiol Ecol* **59**, 377–385.
- Feuillade, J., Feuillade, M. y Blanc, P. (1990)** Alkaline phosphatase activity fluctuations and associated factors in a eutrophic lake dominated by *Oscillatoria rubescens*. *Hydrobiologia* **207**, 233-240.
- Fisher, S. G., Gray, L. J., Grimm, N. B. & Busch, D. E. (1982)** Temporal succession in a desert stream ecosystem following flash flooding. *Ecol Monogr* **52**, 93–110.
- Fitzgerald, G. P. y Nelson, C. (1966)** Extractive and enzymatic analyses for limiting or surplus phosphorous in algae. *J Phycol* **2**, 32 – 37.
- Flecker, A. S. y Taylor, B. W. (2004)** Tropical fishes as biological bulldozers: density effects on spatial heterogeneity and species diversity. *Ecology* **85**, 2267–2278.
- Flores, E. y Herrero, A. (1994)** Assimilatory nitrogen metabolism and its regulation, págs. 487-517. En: *The Molecular Biology of Cyanobacteria*. (Ed. D. A. Bryant) *Kluwer Academic Publishers*, The Netherlands.
- Font, I. (1983)** Climatología de España y Portugal. *Instituto Nacional de Metereología*. España. 296 págs.
- Foster, R. A. y Zehr, J. P. (2006)** Characterization of diatom–cyanobacteria symbioses on the basis of *nifH*, *hetR* and 16S rRNA sequences. *Environ Microbiol* **8**(11), 1913–1925.
- Francko, D. A. y Heath, R. T. (1982)** UV-sensitive complex phosphorous: Association with dissolved humic material and iron in a bog lake. *Limnol Oceanogr* **27** (3), 564-569.
- Freiwald, A. (1995)** Bacteria-induced carbonate degradation—a taphonomic case-study of *Cibicides* *Lobatulus* from a high-boreal carbonate setting. *Palaios* **10**, 337–346.
- Friedman, E. I. (1980)** Endolithic microbial life in hot and cold deserts. *Orig Life Evol Biosph* **10** (3), 223-235
- Fumanti, B., Alfinito, S. y Cavacini, P. (1995)** Floristic studies on freshwater algae of lake Gondwana, northern Victoria land (Antarctica). *Hydrobiologia* **316**, 81–90.
- Gallon, J. R. (1990)** Oxygen and nitrogenase in non-heterocystous cyanobacteria. En: *Inorganic nitrogen in plants and microorganisms*, págs. 241-247 (Eds. W. R. Ullrich, C. Rigaro, A. Fuggi y P. I. Aparicio) *Springer*, Berlín.
- Gallon, J. R. (2001)** N₂ fixation in phototrophs: Adaptation to a specialized way of life. *Plant Soil* **230**, 39–48.
- Gantt, E. (1994)** Supramolecular membrana organization. En: *The Molecular Biology of Cyanobacteria*. Págs 119-138. (Ed. A. Bryant). *Kluwer Academic Publishers*, Netherlands.
- García-Pichel, F. y Castenholz, R. W. (1991)** Characterization and biological implications of scytonemin, a cyanobacterial sheath pigment. *J Phycol* **27**, 395–409.
- García-Pichel, F., Johnson, S. L., Youngkin, D. y Belnap, J. (2003)** Small-Scale vertical distribution of bacterial biomass and diversity in biological soil crusts from arid lands in the Colorado Plateau. *Microb Ecol* **46**, 312–321.
- García-Pichel (2006)** Plausible mechanisms for the boring on carbonates by microbial phototrophs. *Sed Geol* **185**, 205–213.
- Garde, K. y Gustavson, K. (1999)** The impact of UV-B radiation on alkaline phosphatase activity in phosphorus-depleted marine ecosystems. *J Exp Mar Biol Ecol* **238**, 93–105.

- Geitler, L. (1932)** Cyanophyceae. En: *Kryptogamenflora von Deutschland, Österreich und der Schweiz*, vol. 14. (Eds. L. Rabenhorst) Leipzig: *Akademische Verlagsgesellschaft*. 1196 págs.
- Gentili, F., Nilsson, M. C., Zackrisson, O., De Luca, T. H. y Sellstedt, A. (2005)** Physiological and molecular diversity of feather moss associative N₂-fixing cyanobacteria. *J Exp Bot* **56** (422), 3121–3127.
- Gentile, G., Giuliano, L., D'Auria, G., Smedile, F., Azzaro, M., De Domenico, M. y Yakimov, M. M. (2006)** Study of bacterial communities in Antarctic coastal waters by a combination of 16S rRNA and 16S rDNA sequencing. *Environ Microbiol* **8** (12), 2150–2161.
- Gibson, M. T. y Whitton, B. A. (1987)** Influence of phosphorous on morphology and physiology of freshwater *Chaetophora*, *Draparnaldia* and *Stigeoclonium* (Chaetophorales, Chlorophyta). *Phycologia* **26**, 59-69.
- Giovannoni, S. J., Turner, S., Olsen, G. J., Barns, S., Lane, D. J. y Pace, N. R. (1988)** Evolutionary relationships among cyanobacteria and green chloroplasts. *J Bacteriol* **170**, 3584-3592.
- Gkelis, S., Rajaniemi, P., Vardaka, E., Moustaka-Gouni, M., Lanaras, T. y Sivonen, K. (2005)** *Limnothrix redekei* (Van Goor) Meffert (Cyanobacteria) Strains from Lake Kastoria, Greece Form a Separate Phylogenetic Group. *Microbial Ecol* **49**, 176–182.
- Glazer, A. N., Lundell, D. J., Yamanaka, G. y Williams, R. C. (1983)** The structure of a simple phycobilisome. *Ann Microbiol* **B134**, 159-180.
- Golubic, S., 1969.** Distribution, taxonomy and boring patterns of marine endolithic algae. *Am Zool* **9**, 747–751.
- Golubic, S., Perkins, R.D., Lukas, K.J. (Eds.), 1975.** *Boring Microorganisms and Borings in Carbonate Substrates. The study of Trace Fossils.* Springer-Verlag, Berlin, pp. 229– 259.
- Golubic, S., Friedmann, I.E., Schneider, J. (1981)** The lithobiontic ecological niche, with special reference to microorganisms. *J Sediment Petrol* **51**, 475–478.
- Golubic, S., Campbell, S., Drobne, K., Cameron, B., Balsman, W.L., Cimmerman, F., Dubois, L. (1984)** Microbial endoliths—a benthic overprint in the sedimentary record, and a paleobathymetric crossreference with foraminifera. *J Paleonto.* **58**, 351– 361.
- Golubic, S., Seong-Joo, L., Browne, K.M. (2000)** Cyanobacteria: architects of sedimentary structures. En: *Microbial Sediments*. (Eds. R.E. Riding y S.M. Awramik), Springer-Verlag, Heidelberg, págs. 57–67.
- Gomont, M. (1982a)** Monographie des Oscillatoriées (Nostocacées homocystées). *Ann Sci Nat Bot* **15**, 263-368, **16**, 91-264. Cramer, Germany.
- Gomont, M. (1882b).** Monographie des Oscillatoriées (Nostocacées homocystées). *Ann Sci Nat Bot* **16**, 91–264. Cramer, Germany.
- Grainger, S. L. J., Peat, A., Tiwari, D. N. y Whitton, B. A. (1989)** Phosphatase activity of the cyanobacterium (blue-green algae) *Calothrix parietina*. *Microbios* **59**, 7-17.
- Greuter, W., McNeill, J., Barbie, F. R., Burdet, H. M., Demoulin, V., Filgueiras, T. S., Nicolson, D. H., Silva, P. C., Skog, J. E., Trehae, P., Turland, N. J. y Hawksworth, D. L. (2000)** International Code of Botanical Nomenclature (Saint Louis Code) adopted by the Sixteenth International Botanical Congress St. Louis, Missouri, July-August 1999. Koeltz Scientific Books, Königstein. (Regnum Vegetabile 138), XVIII, págs. 474.
- Grossman, A. R., Schaefer, M. R., Chiang, G. G. y Collier, J. L. (1994)** The responses of cyanobacteria to environmental conditions: light and nutrients. En: *The Molecular Biology of Cyanobacteria*. Págs 641-675. (Ed. A. Bryant) *Kluwer Academic Publishers*, Netherlands.

- Guerrero, M. G. y Lara, C. (1987)** Assimilation of organic nitrogen. En: *The Cyanobacteria*. Págs. 163-186. (Eds. P. Fay y C. Van Baalen). *Elsevier Science Publisher*, Oxford.
- Gugger, M., Lyra, C., Henriksen, P., Coute, A., Humbert, J. F. y Sivonen, K. (2002a)** Phylogenetic comparison of the cyanobacterial genera *Anabaena* and *Aphanizomenon*. *Int J Syst Evol Microbiol* **52**, 1867-1880.
- Gugger, M., Lyra, C., Suominen, I., Tsitko, I., Humbert, J. F., Salkinoja-Salonen, M. S. y Sivonen, K. (2002b)** Cellular fatty acids as chemotaxonomic markers of the genera *Anabaena*, *Aphanizomenon*, *Microcystis*, *Nostoc* and *Planktothrix* (Cyanobacteria). *Int J Syst Evol Microbiol* **52**, 1007-1015.
- Gugger, M. y Hoffman, L. (2004)** Polyphyly of true branching cyanobacteria (Stigonematales). *Int J Syst Evol Microbiol* **54**, 349-357.
- Hall, T.A. (1999)** BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucl Acid. Symp Ser* **41**, 95-98.
- Hanahan, D. (1983)** Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *J Mol Ecol* **166** (4), 557-580.
- Hayes, P. K. (1988)** Gas vesicles: Chemical and physical properties. En: *Methods in Enzymology*. Vol. 167. *Cyanobacteria*, págs 213-221. (Eds. L. Packer y A. N. Glazer). *Academic Press*, Inc, New York.
- Hayes, P. K. y Barker, G. L. A. (1997)** Genetic diversity within Baltic Sea populations of *Nodularia* (Cyanobacteria). *J Phycol* **33**, 919-923.
- Hayes, P. K., Barker, G. L. A., Batley, J., Beard, S. J., Handley, B. A., Vacharapiyasophon, P. y Walsby, A. E. (2002)** Genetic Diversity Within Populations of Cyanobacteria Assessed by Analysis of Single Filaments. *Ant Lee Int J Gen Mol Microbiol* **81**, 197-202.
- Healey, F. P. (1973)** Characteristics of phosphorous deficiency in *Anabaena*. *J Phycol* **9**, 383-394.
- Healey, F. P. (1982)** Phosphate. En: *The Biology of Cyanobacteria*, vol. 19, págs. 105-124. (Eds. N. G. Carr y B. A. Whitton) *Blackwell Scientific Publisher*, Oxford.
- Heath, R. T. y Cooke, G. D. (1975)** The significance of alkaline phosphatase in a eutrophic lake. *Verh Internat Verein Limnol* **19**, 959-965.
- Heldal, M., Scanlal, D. J., Norland, S., Thingstad, F. y Mann, N. H. (2003)** Elemental composition of single cells of various strains of marine Prochlorococcus and Synechococcus using X-ray microanalysis. *Limnol Oceanogr* **48**, 1732-1743.
- Hense, I. y Beckmann, A. (2006)** Towards a model of cyanobacteria life cycle: effects of growing and resting stages on bloom formation of N₂-fixing species. *Ecol Modelling* **195**, 205-218.
- Henson, B. J., Watson, L. E. y Barnum, S. R. (2004)** The evolutionary history of nitrogen fixation, as assessed by *nifD*. *J Mol Evol* **58**, 390-399.
- Herdman, M., Castenholz, R. W. y Rippka, R. (2001a)** Form-genus VIII. *Nostoc* Vaucher 1803. En: *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, (Eds. E. Garrity, D.R. Boone y R.W. Castenholz), *Springer*, New York, vol. 1, págs. 575-580.
- Herdman, M., Castenholz, R. W. y Rippka, R. (2001b)** Form-genus III. *Tolypothrix* Kützing 1843 (sensu Rippka y Herdman, 1992). En: *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, (Eds. E. Garrity, D.R. Boone y R.W. Castenholz), *Springer*, New York, vol. 1, págs. 587-589.
- Hernández, I., Hwang, S. J. y Heath, R. T. (1996a)** Measurement of phosphomonoesterase activity with a radiolabelled glucose-6-fosfato. Role in the phosphorous requirement of phytoplankton and bacterioplankton in a temperate mesotrophic lake. *Arch Hydrobiol* **137**, 265-280.

- Hernández, I., Niell, F. X. y Whitton, B. A. (2002)** Phosphatase activity of benthic marine algae. An overview. *J Appl Phycol* **14**, 475-485.
- Herndl, G. L., Müller-Niklas, G. y Frick, J. (1993)** Major role of ultraviolet-B in controlling bacterioplankton growth in the surface of the ocean. *Nature* **361**, 717-719.
- Herrero, A., Muro-Pastor, A. M. y Flores, E. (2001)** Nitrogen control in cianobacteria. *J Bacteriol* **411**-425.
- Highsmith, R.C. (1981)** Coral Bioerosion: damage relative to skeletal density. *Am Nat* **117**, 193– 198.
- Hoffman, L. y Demoulin, V. (1985)** Morphological variability of some species of Scytonemataceae (Cyanophyceae) uncer different culture conditions. *Bull Soc Roy Bot Belg* **118**, 189-197.
- Hoffmann, L. (1988a)** Algae of terrestrial habitats. *Bot Rev* **55**, 77-105.
- Hoffmann, L. (1988b)** Criteria for the classification of the blue-green algae (cyanobacteria) at the genus and at the species level. *Arch Hydrobiol Supl.* **80**, 1-4 *Algological Studies* **50/53**, 131-139.
- Hoffman, L., Komárek, J. y Kaštovský, J. (2005)** System of cyanoprokaryotes (cyanobacteria)-state in 2004)
- Holl y Montoya, 2005** Interactions between nitrate uptake and nitrogen fixation in continuous cultures of the marine diazotroph *Trichodesmium* (cyanobacteria) *J Phycol* **41**, 1178–1183.
- Holmes, D.S. y Quigley, M. (1981)** A rapid boiling method for the preparation of bacterial plasmids. *Anal Biochem* **114**, 193-197.
- Holmes, N. T. H. y Whitton, B. A. (1981)** Phytoplankton of four rivers, the Tyne, Wear, Tees and Swale. *Hydrobiologia* **80**, 110-127.
- Honda, D., Yokota, A. y Sugiyama, J. (1999)** Detection of seven major evolutionary lineages in cyanobacteria based on the 16S rRNA gene sequence analysis with new sequences of five marine *Synechococcus* strains. *J Mol Evol* **48**, 723-739.
- Hook, J.E. y Golubic, S. (1993)** Microbial shell destruction in deep-sea mussels, Florida Escarpment. *Mar Ecol-Pubbl Sm Zool Napoli* **I 14**, 81–89.
- Hoppe, G. H. (1991)** Microbial extraellular enzyme activity: A new key parameter in auatic ecology. En: *Microbial Enzymes in Aquatic Environments*. (Ed. R. J. Chróst) *Springer-Verlag*, New York.
- Hoppe, G. H. (2003)** Phosphatase activity in the sea. *Hydrobiologia* **493**, 187-200.
- Howard, J. B., Rees, D. C. (2000)** Structure of the nitrogenase protein components. En: *Prokaryotic Nitrogen Fixation: A Model System for the Analysis of a Biological Process*. (Ed. E. W. Triplett) *Horizon Scientific Press*, Norfolk. 800 págs.
- Huang, Z., Terpetschnig, E., You, W. y Haugland, R. P. (1992)** 2-(2'-phosphoryloxyphenyl)-4(3H)-quinazolinone derivates as fluorogenic precipitating substrates of phosphatases. *AnalBiochem* **207**, 32-39.
- Huang TC & Chow TJ (1992)** Characterization of the *Calothrix* isolates from rice fields. *Botanical Bull Acad Sinica* **33**, 23–31.
- Huang, B. y Hong, H. (1999)** Alkaline phosphatase activity and utilization of dissolved organic phosphorous by algae un subtropical coastal waters. *Mar Pollut Bull* **39**, 205-211.
- Huang, T. C., Lin, R. F., Chu, M. K. y Chen, H. M. (1999)** Organization and expression of nitrogen-fixation genes in the aerobic nitrogen-fixing unicellular cyanobacterium *Synechococcus* sp. strain RF-1. *Microbiology* **145**, 743-753.

- Huber, A. L. y Kidby, D. K. (1984)** An examination of the factors involved in determining phosphatase activities in estuarine waters. 1: Analytical procedures. *Hydrobiologia* **111**, 3-11.
- Huber, A. L. y Habel, K. S. (1985)** Phosphatase activities in relation to phosphorous nutrition in *Nodularia spumigena* (Cyanobacteriaceae). 2. Laboratory studies. *Hydrobiologia* **123**, 81-88.
- Inlenfeldt, M. J. A. y Gibson, J. (1975)** Phosphatase utilization and alkaline phosphatase activity in *Anacystis nidulans* (Cyanobacteriaceae) *Arch Hydrobiol* **102**, 23-28.
- Ishida, T., Watanabe, M. M., Sugiyama, J. y Yokota, A. (2001)** Evidence for polyphyletic origin of the members of the orders of Oscillatoriales and Pleurocapsales as determined by 16S rDNA analysis. *FEMS Microbiol Lett.* **201**, 79–82.
- Islam, M. R. y Whitton, B. A. (1992)** Phosphorous content and phosphatase activity of the deepwater rice-field cyanobacterium (blue-green alga) *Calothrix* D764. *Microbios* **69**, 7-16.
- Iteman, I., Rippka, R., De Marsac, N. T. y Herdman, M. (2000)** Comparison of conserved structural and regulatory domains within divergent 16S rRNA-23S rRNA spacer sequences of cyanobacteria. *Microbiology* **146**, 1275-1286.
- Janse, I., Kardinaal, W. E. A., Meima, M., Fastner, J., Visser, P. M. y Zwart, G. (2004a)** Toxic and nontoxic *microcystis* colonies in natural populations can be differentiated on the basis of rRNA gene internal transcribed spacer diversity. *Appl Environ Microbiol* **70**, 3979-3987.
- Janse, I., Bok, J. y Zwart, G. (2004b)** A simple remedy against artifactual double bands in denaturing gradient gel electrophoresis. *J Microbiol Met* **57**, 279-281.
- Janson, S., Rai, A. N. y Bergman, B. (1993)** The Marine lichen *Lichina–Confinis* (of-Mull) C-Ag – ultrastructure and localization of nitrogenase, glutamine-synthetase, phycoerythrin and ribulose 1,5-bisphosphate carboxylase/ oxygenase in the cyanobiont. *New Phytol* **124**, 149–160.
- Janson, S., Carpenter, E. J. y Bergman, B. (1994)** Compartmentalization of nitrogenase in a non-heterocystous cyanobacterium *Trichodesmium contortum*. *FEMS Microbiol Lett* **118**, 9–14.
- Janson, S. y Graneli, E. (2002)** Phylogenetic analyses of nitrogen-fixing cyanobacteria from the Baltic Sea reveal sequence anomalies in the phycocyanin operon. *Int J Syst Evo Microbiol* **52**, 1397-1404.
- Jansson, M., Olsson, H. y Pettersson, K. (1988)** Phosphatases; origin, characteristics and function in lakes. *Hydrobiologia* **170**, 157-175.
- Jha, M. N. y Prasad, A. N. (2005)** Useful carriers for cyanobacteria: their response to cyanobacterial growth, acetylene-reductase activity, cyanobacterial grazers and paddy yield in calcareous soil. *World J Microbiol Biotech* **21**, 1521–1527.
- John, D. M., Whitton, B. A. y Brook, A. J. (ed.) (2002)** *The Freshwater Algal Flora of the British Isles*. Cambridge University Press, Cambridge.
- Kaerberlein, T., Lewis, K. y Epstein, S. S. (2002)** Isolating "uncultivable" microorganisms in pure culture in a simulated natural environment. *Science* **296**, 1127-1129.
- Kaebnick, M. y Neilan, B. A. (2001)** Ecological and molecular investigations of cyanotoxin production. *FEMS Microbiol Ecol* **35**, 1-9.
- Kaehler, S. (1999)** Incidence and distribution of phototrophic shelldegrading endoliths of the brown mussel *Perna perna*. *Mar Biol* **135**, 505– 514.
- Kaneko, T., Sato, S., Kotani, H., Tanaka, A., Asamizu, E., Nakamura, T., Miyajima, N., Hirose, M., Sugiura, M., Sasamoto, S., Kimura, T., Hosouchi, T., Matsuno, A., Muraki, A., Nakazaki, N., Naruo, K., Okumura, S., Shimpo, S., Takeuchi, C., Wada, T., Watanabe, A., Yamada, M., Yasuda, M. y Tabata, S. (1996)** Sequence analysis of the genome of the unicellular cyanobacterium

Synechocystis sp. strain PCC 6803. II. Sequence determination of the entire genome and assignment of potential protein coding regions. *DNA Res* **3**, 109-136.

Kaneko, T., Nakamura, Y., Wolk, C. P., Kuritz, T., Sasamoto, S., Watanabe, A., Iriguchi, M., Ishikawa, A., Kawashima, K., Kimura, T., Kishida, Y., Kohara, M., Matsumoto, M., Matsuno, A. y Muraki, A. (2001) Complete genomic sequence of the filamentous nitrogen-fixing cyanobacterium *Anabaena* sp. strain PCC7120. *DNA Res* **8**, 205-213.

Keswani, J. y Whitman, W. B. (2001) Relationship of 16S rRNA sequence similarity to DNA hybridization in prokaryotes. *Int J Syst Evol Microbiol* **51**, 667-678.

Kim, S. G., Ban, S. H., Ahn, C. Y., Oh, H. M., Cheng, H., Cho, S. H., Park, Y. M. y Liu, J. R. (2006a) Taxonomic discrimination of cyanobacteria by metabolic fingerprinting using proton nuclear magnetic resonance spectra and multivariate statistical analysis. *J Plant Biol* **49** (4), 271-275.

Kim, S. G., Rhee, S. K., Ahn, C. Y., Ko, S. R., Choi, G. G., Bae, J. W., Park, Y. H. y Oh, H. M. (2006b) Determination of cyanobacterial diversity during algal blooms in daechung reservoir, Korea, on the basis of *cpca* intergenic spacer region analysis. *Appl Environ Microbiol* **72** (5), 3252-3258.

Klotz, R. L. (1985) Factors influencing alkaline phosphatase activity of *Selenastrum capricornutum* (Chlorophyceae) in streams. *Can J Fish Aquat Sci* **42**, 384-388.

Knoll, A. H. (1985) The distribution and evolution of microbial life in the late Proterozoic era. *Annu Rev Microbiol* **39**, 391-417.

Komárek, J. y Anagnostidis, K. (1989) Modern approach to the classification system of Cyanophytes 4 Nostocales. *Arch Hydrobiol Suppl* **82**, 3 *Algological Studies* **36**, 247-345.

Komárek, J. y Anagnostidis, K. (1999) Cyanoprokariota: Chroococcales. En: *Süßwasserflora von Mitteleuropa* 1ª edición vol. 19/1 (Ed. G. Fischer), Jena Stuttgart Lübeck Ulm, Germany. Págs. 545.

Komárek, J. (2003) Areas of distribution in Cyanobacteria; specificity of the cyanoprokaryotic microflora in the Mediterranean region. *Bocconeia* **16**, 341-354.

Komárek, J. y Kaštovský, J. (2003) Coincidences of structural and molecular characters in evolutionary lines of cyanobacteria. *Arch Hydrobiol* **148**, 4 *Algological Studies* **109**, 305-325.

Komárek, J. y Anagnostidis, K. (2005) Cyanoprokariota: Oscillatoriales. En: *Süßwasserflora von Mitteleuropa* 1ª edición vol. 19/2 (Eds. B. Büdel, L. Krienitz, G. Gärtner y M. Schagerl), Elsevier, München, págs. 759.

Kornberg, A. (1994) Inorganic polyphosphate: A molecular fossil come to life. En: *Phosphatase in Microorganisms*. Págs. 204-209. (Eds. A. Torriani-Gorini, E. Yagil y S. Silver) ASM Press, Washington, DC.

Kumar, S., Tamura, K. y Nei, M. (2004) MEGA3: Integrated software for Molecular Evolutionary Genetics Analysis and sequence alignment. *Bioinformatics* **5**, 150-163.

Kumazawa, S., Yumura, S., Yoshisuji, H. (2001) Photoautotrophic growth of a recently isolated N₂-fixing marine non-heterocystous filamentous cyanobacterium, *Symploca* sp. (Cyanobacteria). *J Phycol* **37**, 482-487.

Laamanen, M. J., Gugger, M. F., Lehtimäki, J. M., Haukka, K. y Sivonen, K. (2001) Diversity of toxic and nontoxic *Nodularia* isolates (cyanobacteria) and filaments from the Baltic Sea. *Appl Environ Microbiol* **67**(10), 4638-47.

Laamanen, M. J., Forsström, L. y Sivonen, K. (2002) Diversity of *Aphanizomenon flos-aquae* (cyanobacterium) populations along a Baltic Sea salinity gradient. *Appl Environ Microbiol* **68**, 5296-5303.

- Lachance, M. A. (1981)** Genetic relatedness of heterocystous cyanobacteria by acid-deoxyribonucleic acid reassociation. *Int J Syst Bacteriol* **31**, 139-147.
- Ladha, J. K. y Reddy, P.M. (2003)** Nitrogen fixation in rice systems: state of knowledge and future prospects. *Plant Soil* **252**, 151-167.
- Laizer, D. B., Turpin, D. H. y Elrifi, I. R. (1985)** Effect of N source on the steady state growth and N assimilation of P-limited *Anabaena flos-aquae*. *Plant Physiol* **78**, 739-745.
- Lammers, P. J. y Haselkorn, R. (1984)** Sequence of *nifD* gene coding for the alpha subunit of dinitrogenase from the cyanobacterium *Anabaena*. *Cell* **44**, 905-911.
- Lane, D. J., Pace, B., Olsen, G. J., Stahl, D. A., Sogin, M. L. y Pace, N. R. (1985)** Rapid Determination of 16S Ribosomal RNA Sequences for Phylogenetic Analyses. *Proc Natl Acad Sci USA* **82**, 6955-6959.
- Lapage, S. P., Sneath, P. H. A., Lessel, E. F., Skerman, V. B. D., Seeliger, H. P. R. y Clark, W. A. (editors) (1992)**. International Code of Nomenclature of Bacteria (1990 Revision). Bacteriological Code. Washington, DC: *American Society for Microbiology*.
- Le Campion-Alsumard, T., Golubic, S. y Hutchings, P. (1995)** Microbial endoliths in skeletons of live and dead corals: *Porites lobata* (Moorea, French Polynesia). *Mar Ecol Prog Ser* **117**, 149-157.
- Lehtimäki, J., Lyra, C., Suomalainen, S., Sundman, P., Rouhiainen, L., Paulin, L., Salkinoja-Salonen, M. y Sivonen, K. (2000)** Characterization of *Nodularia* strains, cyanobacteria from brackish waters, by genotypic and phenotypic methods. *Int J Syst Evol Microbio* **50**, 1043-1053.
- Lennihan, R., Chapin, D. M. y Dickson, L. G. (1994)** Nitrogen fixation and photosynthesis in high arctic forms of *Nostoc commune*. *Can J Bot* **72**, 940-945.
- Ligon, P. J. B., Meyer, K. G., Martin, J. A. y Curtis, S. E. (1991)** Nucleotide sequence of a 16S rRNA gene from *Anabaena* sp. strain PCC7120. *Nucleic Acids Res* **19**, 4553.
- Lin, S. J., Henze, S., Lundgren, P. Bergman, B. y Carpenter, E. J. (1998)** Whole-cell immunolocalization of nitrogenase in marine diazotrophic cyanobacteria, *Trichodesmium* spp. *Appl Environ Microbiol* **64**, 3052-3058.
- Litvaitis, M. K. (2002)** A molecular test of cyanobacterial phylogeny: inferences from constraint analyses. *Hydrobiologia* **468**, 135-145.
- Liu, J., Zhang, X., Sui, Z., Zhang, X. y Mao, Y. (2005)** Cloning and characterization of *c-phycocyanin* operon from the cyanobacterium *Arthrospira platensis* FACHB341. *J Appl Phycol* **17**, 181-185.
- Livingstone, D. y Whitton, B. A. (1984)** Water chemistry and phosphates activity of the blue-green alga *Rivularia* in Upper Teesdale streams. *J Ecol* **72**, 405-421.
- López-Bermúdez, F., Calvo, F. y Morales, A. (1986)** *Geografía de la Región de Murcia*. Ketres ED. Barcelona.
- Lopez-Cortes, A., Garcia-Pichel, F., Nübel, U. y Vázquez-Juarez, R. (2001)** Cyanobacterial diversity in extreme environments in Baja California, México: a polyphasic study. *Int Microbiol* **4** [4], 227-36.
- Loza, V. (2004)** Selección de especies bioindicadoras de calidad de agua en ríos de la Comunidad de Madrid. Proyecto de fin de carrera. Universidad Autónoma de Madrid.
- Lu, W. Q., Evans, E. H., Mccoll, S. M. y Saunders, V. A. (1997)** Identification of cyanobacteria by polymorphisms of PCR-amplified ribosomal DNA apacer region. *FEMS Microbiol Lett* **153**, 141-149.
- Lu, W. (1999)** Application of molecular biological techniques to the identification of cyanobacteria. Master's thesis, Liverpool John Moores University, Liverpool, England.

- Lundgren, P., Carpenter, E. J. y Bergman, B. (2001)** Katagnymene: Characterization of a novel marine diazotroph. *J Phycol* **37**, 1052–1062.
- Lyautey, E., Lacoste, B., Ten-Hage, L., Rols, J. L. y Garabetian, F. (2005)** Analysis of bacterial diversity in river biofilms using 16S rRNA PCR-DGGE: methodological settings and fingerprintings interpretation. *Water Res* **39**, 380-388.
- Lyra, C., Hantula, J., Vainio, E., Rapala, J., Rouhiainen, L. y Sivonen, K. (1997)**. Characterization of cyanobacteria by SDS-PAGE of whole-cell proteins and PCR/RFLP of the 16S rRNA gene. *Arch Microbiol* **168**, 176-184.
- Lyra, C., Suomalainen, S., Gugger, M., Vezie, C., Sundman, P., Paulin, L. y Sivonen, K. (2001)** Molecular characterization of planktic cyanobacteria of *Anabaena*, *Aphanizomenon*, *Microcystis* and *Planktothrix* genera. *Int J Syst Evol Microbiol* **51**, 513-526.
- Lyra, C., Laamanen, M., Lehtimäki, J. M., Surakka, A. y Sivonen, K. (2005)** Benthic cyanobacteria of the genus *Nodularia* are non-toxic, without gas vacuolas, able to glide and genetically more diverse than planktonic *Nodularia*. *Int J Syst Evol Microbiol* **55**, 555-568.
- Mahasneh, I. A., Grainger, S. L. J. y Whitton, B. A. (1990)** Influence of salinity on hair formation and phosphatase activity of the blue-green alga (cyanobacterium) *Calothrix viguieri* D253. *Br Phycol J* **25**, 25-32.
- Makino, F. I. y Tsuzaki, J. (1971)** Absence of histone in the blue-green alga *Anabaena cylindrica*. *Nature* **231**, 446-447.
- Maldener, I., Fiedler, G., Ernst, A., Fernández-Piñas, F. y Wolk, C. P. (1994)** Characterisation of *devA*, a gene required for the maturation of proheterocysts in the cyanobacterium *Anabaena* sp. strain PCC 7120. *J Bacteriol* **176**, 7543-7549.
- Mandel, M. y Higa, A. (1970)** Calcium-dependent bacteriophage DNA infection. *J Mol Biol* **53** (1), 159-162.
- Mandal, B., Vlek, P. G. L. y Mandal, L. N. (1999)** Beneficial effects of blue-green algae and *Azolla*, excluding supplying nitrogen, on wetland rice fields: a review. *Biol Fertil Soils* **28**, 329–342.
- Margalef, R. (1983)** *Limnología*. Ed. Omega. Barcelona. 1010 págs.
- Margheri, M. C., Piccardi, R., Ventura, S., Viti, C. y Giovannetti, L. (2003)** Genotypic diversity of oscillatoriacean strains belonging to the genera *Geitlerinema* and *Spirulina* determined by 16S rDNA restriction analysis. *Curr Opin Microbiol* **46**, 359-364.
- Marker, A. F. M. (1972)** The use of acetone and methanol in the estimation of chlorophyll in the presence of phaeophytin. *Freshwater Biol* **2** (4), 361-365.
- Mateo, P., Douterelo, I., Berrendero, E. y Perona, E. (2006)** Physiological differences between two species of cyanobacteria in relation to phosphorus limitation. *J Phycol* **42**, 61–66.
- Mazel, D., Houmard, J. y De Marsac, N. T. (1988)** A multigene family in *Calothrix* sp. PCC 7601 encodes phycocyanin, the major component of the cyanobacterial light-harvesting antenna. *Mol Gen Genet* **211**, 296-304.
- Mazur, B. J. y Chui, C. F. (1982)** Sequence of the gene coding for the beta-subunit of dinitrogenase from the blue-green alga *Anabaena*. *Proc Natl Acad Sci USA* **79**, 6782-6786.
- McKnight, D. M., Niyogi, D. K., Alger, A. S., Bomblied, A., Conovitz, P. A. & Tate, C. M. 1999.** Dry valley streams in Antarctica: ecosystems waiting for water. *Bioscience* **49**, 985–95.
- Meeks, J. C. y Elhai, J. (2002)** Regulation of cellular differentiation in filamentous cyanobacteria in free-living and plant-associated symbiotic growth states. *Microbiol Mol Biol R* **66**, 94-121.

- Mérida, A., Candau, P. y Florencio, F. J. (1991)** Regulation of glutamine synthetase activity in the unicellular cyanobacterium. *J Bacteriol* **173**, 4095-4100.
- Mevarech, M., Rice, D., Haselkorn, R. (1980)** Nucleotide sequence of cyanobacterial *nifH* gene coding for nitrogenase reductase. *Proc Natl Acad Sci USA* **77**, 6476-6480.
- Miller, A. G., Espie, G. S. y Canvin, D. T. (1990)** Physiological aspects of CO₂ and HCO₃⁻ transport by cyanobacteria: a review. *Can J Bot* **68**, 1291-1302.
- Ministerio de Agricultura (1983)** Mapa de cultivos y aprovechamientos. Dirección General de la Producción Agraria. Madrid.
- Misra, H. S. (1999)** Oxygen implication in the diazotrophic growth of *Plectonema boryanum* in dark-light cycles. *Plant Sci* **143**, 135-142.
- Misra, H. S. y Tuli, R. (2000)** Differential expression of photosynthesis and nitrogen fixation genes in the cyanobacterium *Plectonema boryanum*, *Plant Physiol* **122**, 731-736.
- Mitsui, A., Kumazawa, S., Takahasi, A., Ikemoto, H., Cao, S. y Arai, T. (1986)** Strategy by which nitrogen-fixing unicellular cyanobacteria grow photoautotrophically. *Nature* **323**, 720-722.
- Moffit, M. C., Blackburn, S. I. y Neilan, B. A. (2001)** rRNA sequences reflect the ecophysiology and define the toxic cyanobacteria of the genus *Nodularia*. *Int J Syst Evol Microbiol* **51**, 505-512.
- Montaner, M. E. (1991)** *Recursos y demandas de agua en el territorio de Mazarrón Águilas*. Consejería de Política Territorial, Obras Públicas y Medio Ambiente de la Comunidad Autónoma de la Región Murciana. *Cuadernos Técnicos*, 7.
- Moreno, J. L., Suárez, M. L. y Vidal-Abarca, M. R. (1995)** Hidroquímica de las ramblas litorales de la Región de Murcia: variaciones espacio-temporales. *Limnética* **11** (1), 1-13.
- Mugnai, M. A., Turicchia, S., Margheri, M. C., Sili, C., Gugger, M., Tedioli, G., Komárek, J. Ventura, S. (2003)** Characterization of the cyanobacterial biocoenosis of a freshwater reservoir in Italy. *Arch Hydrobiol Suppl.* **148**, 4 *Algological Studies* **108**, 403-419.
- Muro-Pastor, M. I., Reyes, J. C. y Florencio, F. J. (1996)** The NADP⁺-isocitrate deshydrogenase gene (*icd*) is nitrogen regulated in cyanobacteria. *J Bacteriol* **134**, 597-605.
- Muyzer, G. (1999)** DGGE/TGGE a method for identifying genes from natural ecosystems. *Curr Opin Microbiol* **2**, 317-322.
- Myers y col., 1985** Modification of the melting properties of duplex DNA by attachment of a GC-rich DNA-sequence as determined by denaturing gradient gel-electrophoresis. *Nucleic Acids Res* **13** (9), 3111-3129.
- Myklesstad, S. y Sakshaug, E. (1983)** Alkaline phosphatase activity of *Skeletonema costatum* populations in the Trondheimsfjord. *J Plankton Res* **5**, 557-564.
- Nadeau T. L., Milbrandt E. C. y Castenholtz R. W. (2001)** Evolutionary relationships of cultivated Antarctic Oscillatorians (Cyanobacteria). *J Phycol* **37**, 650-654.
- Nakajima, Y., Fujiwara, S., Sawai, H., Imashimizu, M. y Tsuzuki, M. (2002)** Aphycocyanin-deficient mutant of *Synechocystis* PCC6714 with a single-base substitution upstream of the *cpc* operon. *Plant Cell Physiol* **42**, 992-998.
- Nedema, J., Štrojpsvá, A., Vrba, J., Komárková, J. y Šimek, K. (2003)** Extracellular phosphatase activity of natural plankton studied with ELFP97 phosphatase: fluorescence quantification and labelling kinetics. *Environ Microbiol* **5**, 462-472.

- Neilan, B.A., Jacobs, D. y Goodman, A.E. (1995)** Genetic diversity and phylogeny of toxic cyanobacteria determined by DNA polymorphisms within the phycocyanin locus. *Appl Environ Microbiol* **61** (11), 3875-3883.
- Nelissen, B., Wilmotte, A., Neefs, J. M. y Dewachter, R. (1994)** Phylogenetic-relationships among filamentous helical cyanobacteria investigated on the basis of 16S ribosomal-RNA gene sequence-analysis. *Syst Appl Microbiol* **17**, 206-210.
- Nelissen, B., Debaere, R., Wilmotte, A. y Dewachter, R. (1996)** Phylogenetic relationships of nonaxenic filamentous cyanobacterial strains based on 16S rRNA sequence analysis. *J Mol Evol* **42**, 194-200.
- Nicholas, K. B. y Nicholas, H. B. L. (1997)** GeneDoc: a tool for editing and annotation multiple sequence alignments. Distribuido por los autores en <http://www.psc.edu/biomed/genedoc>.
- Nichols, J. M. y Adams, D. G. (1982)** Akinetes. En: *The Biology of Cyanobacteria*, vol. 19, págs. 387-412. (Eds. N. G. Carr y B. A. Whitton) *Blackwell Scientific Publishers*, Oxford.
- Niemi, Å (1979)** Blue-green algal blooms and N: P ratio in the Baltic Sea. *Acta Bot Fenn* **110**, 57-61.
- Nilsson, M., Bergman, B. y Rasmussen, U. (2000)** Cyanobacterial diversity in geographically related and distant host plants of the genus *Gunnera*. *Arch Microbiol* **173**, 97-102.
- Nollau, P. y Wagnener, C. (1997)** Methods for detection of point mutations: Performance and quality assessment. *Clin Chem* **43** (7), 1114-1128.
- Norris, T. B., Mcdermott, T. R. y Castenholz, R. W. (2002)** The long-term effects of UV exclusion on the microbial composition and photosynthetic competence of bacteria in hot-spring microbial mats. *FEMS Microbiol Ecol* **39** (3), 193-209.
- Nübel, U., Garcia-Pichel, F., y Muyzer, G. (1997)** PCR primers to amplify 16S rRNA genes from cyanobacteria. *Appl Environ Microbiol* **63** (8), 3327-32.
- Omoregie, E.O., Crumbliss, L.L., Bebout, B.M., y Zehr, J.P. (2004)** Determination of nitrogen-fixing phylotypes in *Lyngbia* sp. and *Microcoleus chthonoplastes* cyanobacterial mats from Guerrero Negro, Baja California, Mexico. *Appl Environ Microbiol* **70**, 2119-2128.
- Orita, M., Suzuki, Y., Sekiya, T. y Hayashi, K. (1989)** Rapid and sensitive detection of point mutations and DNA polymorphisms using the polymerase chain-reaction. *Genomics* **5**, 874-879.
- Orús, M. I., Rodríguez-Buey, M. L., Martínez, F. y Marco, E. (1995)** Biogénesis and ultraestructure of carboxysomes from wild type and mutans of *Synechococcus* sp. strain PCC 7942. *Plant Physiol* **107**, 1159-1166.
- O'Sullivan, L. A., Weightman, A. J. y Fry, J. C. (2002)** New degenerate *Cytophaga-Flexibacter-Bacteroides*-specific 16S ribosomal DNA-targeted oligonucleotide probes reveal high bacterial diversity in river Taff epilithon. *Appl Environ Microbiol* **68**, 201-210.
- Otsuka, S., Suda, S., Li, R. H., Watanabe, M., Oyaizu, H., Matsumoto, S. y Watanabe, M. M. (1999)** Phylogenetic relationships between toxic and non-toxic strains of the genus *Microcystis* based on 16S to 23S internal transcribed spacer sequence. *FEMS Microbiol Lett* **172**, 15-21.
- Otsuka, S., Suda, S., Li, R., Matsumoto, S. y Watanabe, M. M. (2000)** Morphological variability of colonies of *Microcystis* morphospecies in culture. *J Gen Appl Microbiol* **46**, 39-50.
- Paasche, E. y Erga, S. R. (1988)** Phosphorous and nitrogen limitation in the Oslofjord (Norway). *Sarsia* **73**, 229-243.
- Paerl, H. W. (1990)** Physiological ecology and regulation of N₂ fixation in natural waters. *Adv Microb Ecol* **8**, 305-344.

- Paerl, H. W., Dyble, J., Moisaner, P. H., Noble, R. T., Piehler, M. F., Pinkney, J. L., Steppe, T. F., Twomey, L. y Valdes, L. M. (2003)** Microbial indicators of aquatic ecosystem change: current applications to eutrophication studies. *FEMS Microbiol Ecol* **46**, 233-246.
- Palenik, B. y Swift, H. (1996)** Cyanobacterial evolution and prochlorophyte diversity as seen in DNA-dependent RNA polymerase gene sequences. *J Phycol* **32**, 638-646.
- Palinska, K. A., Thomasius, C. F., Marquardt, J. y Golubic, S. (2006)** Phylogenetic evaluation of cyanobacteria preserved as historic herbarium exsiccate. *Int J Syst Evol Microbiol* **56**, 2253–2263.
- Pelroy, R. A. y Bassham, J. A. (1972)** Photosynthesis and dark carbon metabolism in intracellular blue-green algae. *Arch Microbiol* **86**, 25-28.
- Pentecost, A. y Whitton, B. A. (2000)** Limestones. En: *The Ecology of Cyanobacteria*, págs. 233-255 (Eds. B. A. Whitton, M. Potts) *Kluwer Academic Publishers*, The Netherlands.
- Perona, E. (1995)** Cianobacterias epilíticas y calidad del agua del río Alberche a su paso por la Comunidad de Madrid. Tesis doctoral, Universidad Autónoma de Madrid.
- Perona, E., Bonilla, I. y Mateo, P. (1998)** Epilithic cyanobacterial communities and water quality: an alternative tool for monitoring eutrophication in the Alberche River (Spain). *J Appl Phycol* **10**, 183-191.
- Perona, E., Bonilla, I. y Mateo, P. (1999)** Spatial and temporal changes in water quality in a Spanish river. *Sci Total Environ* **241**, 75-90.
- Perona, E., Aboal, M., Bonilla, I. y Mateo, P. (2003)** Cyanobacterial diversity in a Spanish river determined by means of isolation of cultures. Morphological variability of isolates in relation to natural populations. *Arch Hydrobiol Algol Stud* **109**, 475–86.
- Perona, E., Loza, V., Diaz, O., Berrendero, E. y Mateo, P. (2007)** Morphological shifts of *Nostoc* strains under different culture conditions. 17th Symposium of the International Association for Cyanophyte Research. Mérida (México) 25-29 Junio. Póster.
- Perry, M. J. (1972)** Alkaline phosphatase activity in subtropical Central North Pacific waters using a sensitive fluorometric method. *Mar Biol* **15**, 113–119.
- Peschek, G. A., Villgrater, K. y Wastyn, M. (1991)** ‘Respiratory protection’ of the nitrogenase in dinitrogen-fixing cyanobacteria. *Plant Soil* **137**, 17–24.
- Peterson, C. G. y Grimm, N. B. (1992)** Temporal variation in enrichment effects during periphyton succession in a nitrogenlimited desert stream ecosystem. *J N Am Benthol Soc* **11**, 20–36.
- Petersson, K. y Jansson, M. (1978)** Determination of phosphatase activity in lake water – a study of methods. *Int Verein Theor Angew Limnol* **20**, 1226-1230.
- Porta, D. y Hernández-Mariné (2005)** Structural and ultrastructural characterization of several culture strains assigned to *Oscillatoria* and *Lyngbya* (Cyanophyta/Cyanoprokaryota/Cyanobacteria) *Algological Studies* **117**, 349-370.
- Potts, M. (2000)** *Nostoc*. En: *The Ecology of Cyanobacteria*, págs. 465-504. (Eds. B. A. Whitton y M. Potts) *Kluwer Academic Publishers*, The Netherlands.
- Quesada, A., Nieva, M., Leganés, F., Ucha, A., Martín, M., Prosperi, C. y Fernández-Valiente, E. (1998)** Acclimation of cyanobacterial communities in rice fields and response of nitrogenase activity to light regime. *Microb Ecol* **35**, 147–155.
- Quesada, A., Moreno, E., Carrasco, D., Paniagua, T., Wormer, L., De Hoyos, C. y Sukenik, A. (2006)** Toxicity of *Aphanizomenon ovalisporum* (Cyanobacteria) in a Spanish water reservoir. *Eur J Phycol* **41** (1), 39-45.

- Rai, A. N., Borthakur, M. y Bergman, B. (1992)** Nitrogenase derepression, its regulation and metabolic changes associated with diazotrophy in the non-heterocystous cyanobacterium, *Plectonema boryanum* PCC73110. *Gen Microbiol* **138**, 481–491.
- Rajaniemi, P., Hrouzek, P., Kaštovská, K., Willame, R., Rantala, A., Hoffmann, L., Komárek, J. y Sivonen, K. (2005)** Phylogenetic and morphological evaluation of the genera *Anabaena*, *Aphanizomenon*, *Trichormus* and *Nostoc* (Nostocales, Cyanobacteria). *Int J Syst Evol Microbiol* **55**, 11–26.
- Rasmussen, U. y Svenning, M. M. (1998)** Fingerprinting of cyanobacteria based on PCR with primers derived from short and long tandemly repeated repetitive sequences. *Appl Environ Microbiol* **64**, 265–272.
- Rasmussen, U. y Svenning, M. M. (2001)** Characterization by genotypic methods of symbiotic *Nostoc* strains isolated from five species of *Gunnera*. *Arch Microbiol* **176**, 204–210.
- Reed, R. H., Warr, S. R. C., Kerby, N. W. y Stewart, W. D. P. (1986)** Osmotic shock-induced release of low molecular weight metabolites from free-living and immobilized cyanobacteria. *Enzyme Microb Technol* **8**, 51–56.
- Rees, D. C. y Howard, J. B. (2000)**. Nitrogenase: Standing at the crossroads. *Curr Opin Chem Biol* **4**, 559–566.
- Rippka, R. y Waterbury, J. B. (1977)** The synthesis of nitrogenase by nonheterocystous cyanobacteria. *FEMS Microbiol Lett* **2**, 83–86.
- Rippka, R., Deruelles, J., Waterbury, J. B. Herdman, M. y Stanier, R. Y. (1979)** Generic assignments, strain histories and properties of pure cultures of cyanobacteria. *J Gen Microbiol* **111**, 1–61.
- Rippka, R. (1988a)** Isolation and purification of cyanobacteria. En: *Methods in Enzimology*. Vol.167. *Cyanobacteria*, págs. 3–27 (Eds. L. Packer y A. N. Glazer). *Academic Press*, New York.
- Rippka, R. (1988b)** Recognition and identification of cyanobacteria. En: *Methods in Enzimology*. Vol. 167. *Cyanobacteria*, págs. 28–67 (Eds. L. Packer y A.N. Glazer). *Academic Press*, New York.
- Rippka, R. y Herdman, M. (1992)** Pasteur Culture Collection of Cyanobacteria Catalog and Taxonomic Handbook: Catalog of Strains, Institut Pasteur, París.
- Rippka, R., Castenholz, R. W. y Herdman, M. (2001a)** Subsection IV. (Formerly Nostocales Castenholz 1989b sensu Rippka, Deruelles, Waterbury, Herdman y Stainer, 1979) En: *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, 2ª ed, vol. 1, págs. 562–566. (Eds. D. R. Boone & R. W. Castenholz) *Springer*, New York.
- Rippka, R., Castenholz, R. W. y Herdman, M. (2001b)** Form-genus I. *Calothrix* Agardh 1824 En: *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, 2ª ed, vol. 1, págs. 582–585. (Eds. D. R. Boone & R. W. Castenholz) *Springer*, New York.
- Rippka, R., Castenholz, R. W. y Herdman, M. (2001c)** Form-genus II. *Rivularia* Agardh 1824 En: *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, 2ª ed, vol. 1, págs. 586–587. (Eds. D. R. Boone & R. W. Castenholz) *Springer*, New York.
- Robertson, B. R., Tezuka, N. y Watanabe, M. M. (2001)** Phylogenetic analyses of *Synechococcus* strains (cyanobacteria) using sequences of 16S rDNA and part of the phycocyanin operon reveal multiple evolutionary lines and reflect phycobilin content. *Int J Syst Evol Microbiol* **51**, 861–871.
- Rodríguez, V., Aguirre de Cárcer, D., Loza, V., Perona, E. y Mateo, P. (2007)** A molecular fingerprint technique to detect pollution-related changes in river cyanobacterial diversity. *J Environ Qual* **36**, 464–468.
- Rodríguez-López, M. y Vázquez, D. (1968)** Comparative studies on cytoplasmic ribosomes from algae. *Life Sci* **7**, 327–336.

- Romaní, A. M. y Sabater, S. (1998)** A stromatolitic cyanobacterial crust in a Mediterranean stream optimizes organic matter use. *Aquatic Microbial Ecology* **16**, 131- 141.
- Romaní, A. M. (2000)** Characterization of extracellular enzyme kinetics in two Mediterranean streams. *Arch Hydrobiol* **148** (1), 99-117.
- Rother, J. A. y Fay, P. (1977)** Sporulation and the development of planktonic blue-green algae into Salopian meres. *Proc R Soc Lond B* **196**, 317-332.
- Rott, E., Walter, L. y Kegele, M. (2000)** Ecophysiological aspects of macroalgal seasonality in a gravel stream in the Alps (River Isar, Austria). *Verth Internat Verein Limnol* **27**, 1622-1625.
- Rudi, K. y Jakobsen, K. S. (1997)** Cyanobacterial tRNA (Leu) (UAA) group I introns have polyphyletic origin. *FEMS Microbiol Lett* **156**, 293-298.
- Rudi, K., Skulberg, O. M. y Jakobsen, K. S. (1998)** Evolution of cyanobacteria by exchange of genetic material among phylogenetically related strains. *J Bacteriol* **180**, 3453-3461.
- Rudi, K., Fossheim, T. y Jakobsen, K. S. (2002)** Nested evolution of a tRNA (Leu)(UAA) Group I intron by both horizontal intron transfer and recombination of the entire tRNA Locus. *J Bacteriol* **184**, 666-671.
- Sabater, S. (1989)**. Encrusting algal communities in a Mediterranean river basin. *Arch. Hydrobiol* **114**, 555-573.
- Sabater, S., A.M. Romaní, H. Guasch, I. Muñoz. I. (2000)** Stromatolitic communities in Mediterranean streams: adaptations to a changing environment. *Biodivers Conserv* **9** (3), 379-392.
- Sabater, S., Buchaca, T., Cambra, J., Catalan, J., Guash, H., Ivorra, N., Muñoz, I., Navarro, E., Real, M. y Romani, A. (2003)** Structure and function of benthic algae communities in an extremely acid river. *J Phycol* **39**, 481-489.
- Saghaimarouf, M.A., Soliman, K. M., Jorgensen , R. A. y Allard, R. W. (1984)** Ribosomal DNA spacer-length polymorphisms in barley - mendelian inheritance, chromosomal location, and population-dynamics. *Proc Natl Acad Sci U.S.A* **81** (24), 8014-8018.
- Saitou, N. y Nei, M. (1987)** The neighbour-joining method: A new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol Biol Evol* **4** (4), 406-425.
- Saker, M. L. y Neilan, B. A. (2001)** Varied diazotrophies, morphologies, and toxicities of genetically similar isolates of *Cylindrospermopsis raciborskii* (Nostocales, Cyanophyceae) from northern Australia. *App Environ Microbiol* **67** (4), 1839-1845.
- Sambrook, J., Fritch, E. F. y Maniatis, T. (1989)** Molecular Cloning: A Laboratory Manual. 2ª edición. *Cold Spring Harbor Laboratory Press*, Cold Spring Harbor, N.Y.
- Sánchez, D., Carrasco, D., Padilla, C., Leganes, F., Fernández-Valiente, E., del Campo, F.F. y Quesada, A. (2002)** Spatial and temporal heterogeneity in succession of cyanobacterial blooms in a Spanish reservoir. *Ann Limnol-Int J Lim.* **38** (3), 173-183.
- Sanger, F., Nicklen, S. y Coulson, A. R. (1977)** DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci U.S.A.* **74** (12), 5463-5467.
- Sanguinetti, C. J., Neto, E. D. y Simpson, A. J. G. (1994)** Rapid silver staining and recovery of PCR products separated on polyacrylamide gels. *Biotechniques* **17**, 914-918.
- Sheffield, V. C., Coxt, D. R., Lerman, L. S. y Myers, R. M. (1989)** Attachment of a 40-base-pair G+C-rich sequence (GC-clamp) to genomic DNA fragments by the polymerase chain reaction results in improved detection of single-base changes. *Proc Nati Acad Sci USA* **86**, 232-236.

- Scheldeman, P., Baurain, D., Bouhy, R., Scott, M., Muhling, M., Whitton, B. A., Belay, A. y Wilmotte, A. (1999)** *Arthrospira* ('spirulina') strains from four continents are resolved into only two clusters, based on amplified ribosomal DNA restriction analysis of the internally transcribed spacer. *FEMS Microbiol Lett* **172**, 213-222.
- Schiefer, W., Schütz, K., Hachtel, W. y Happe, T. (2002)** Molecular cloning and characterization of *hetR* genes from filamentous cyanobacteria, *BBA—Gene Struct Expr* **1577**, 139–143.
- Schmetterer, J. (1994)** Cyanobacterial respiration. En: *The Molecular Biology of Cyanobacteria*. Págs. 409-435. (Ed. A. Bryant). *Kluwer Academic Publishers*, Netherlands.
- Schmidt, A. (1988)** Sulfur metabolism in cyanobacteria. En: *Methods in Enzymology*, vol. 167. *Cyanobacteria*. Págs. 572-583. (Eds. L. Packer y A. N. Glazer). *Academic Press*, Inc. New York.
- Serrano, A. (2000)** Caracterización espacio-temporal de las comunidades de cianobacterias epilíticas de un arroyo de montaña mediterráneo, el arroyo Mediano (Comunidad Autónoma de Madrid). Proyecto fin de carrera. Universidad Autónoma de Madrid.
- Serrano, A., Mateo, P. y Perona, E. (2003)** Estructura y composición de la comunidad de cianobacterias bentónicas de un arroyo de montaña mediterráneo, el arroyo Mediano (Madrid). *Limnética* **23** (1-2), 85-96.
- Serrano, L. y Boon, P. I. (1991)** Effect of polyphenolic compounds on alkaline phosphatase activity: Its implication for phosphorus regeneration in Australian freshwaters. *Arch Hydrobiol* **123**, 1-19.
- Sharma, K., Inglett, P. W., Reddy, K. R. y Ogram, A. V. (2005)** Microscopic examination of photoautotrophic and phosphatase-producing organisms in phosphorous-limited Everglades periphyton mats. *Limnol Oceanogr* **50** (6), 2057-2062.
- Sheath, R. G. y Müller, K. M. (1997)** Distribution of stream macroalgae in four high arctic drainage basins. *Artic* **50** (4), 355-364.
- Shively, J. M. (1988)** Inclusions: granules of polyglucose, polyphosphate, and poli- β -hydroxybutyrate. En: *Methods in Enzimology*. Vol. 167. *Cyanobacteria*. Págs. 195-203. (Eds. L. Packer y A. N. Glazer). *Academic Press*, Inc. New York.
- Sidler, W. A. (1994)** Phycobilisome and phycobiliprotein structures. En: *The Molecular Biology of Cyanobacteria*. Págs. 139-216. (Ed. A. Bryant). *Kluwer Academic Publishers*, Netherlands.
- Sigh, J. B., Prasad, S. M., Rai, L. C. y Kumar, H. D. (2003)** Response of the cyanobacterium *Nostoc commune* to chromide and lead: the effect on phosphorous metabolism. *J Gen Appl Microbiol* **39**, 559-570.
- Sigler, W. V., Bachofen, R. y Zeyer, J. (2003)** Molecular characterization of endolithic cyanobacteria inhabiting exposed dolomite in central Switzerland. *Environ Microbiol* **5**, 618–627.
- Simon, R. D. (1987)** Inclusion bodies in the cyanobacteria: cyanophycin, polyphosphate, polyhedral bodies. En: *The Cyanobacteria*. Págs. 199-225. (Eds. P. Fay y C. Van Baalen). *Elsevier Science Publishers*, Oxford.
- Sinclair, C. y Whitton, B. A. (1977)** Influence of nutrient deficiency on hair formation in *Rivulariaceae*. *Br Phycol J* **12**, 297-313.
- Singh, S. K., Singh, S. S., Pandey, V. D. y Mishra, A. K. (2006)** Factors modulating alkaline phosphatase activity in the diazotrophic rice-field cyanobacterium, *Anabaena oryzae*. *World J Microbiol Biotech* **22**, 927-935.
- Smith, A. J. (1982)** Modes of cyanobacterial carbon metabolism. En: *The Biology of Cyanobacteria*, vol. 19, págs 47-85. (Eds. N. G. Carr y B. A. Whitton). *Blackwell Scientific Publishers*, Oxford.

- Snoeijs, P. y Murasi, L. W. (2004)** Symbiosis between diatoms and cyanobacterial colonies. *Vie Et Milieu-Life Environ* **54**, 163–169.
- Somville, M. (1984)** Measurement and study of substrate specificity of exoglucosidase activity in eutrophic water. *Appl Environ Microbiol* **48**, 1181–1185.
- Staal, M., Rabouille, S. y Stal, L. J. (2007)** On the role of oxygen for nitrogen fixation in the marine cyanobacterium *Trichodesmium* sp. *Environ Microbiol* **9** (3), 727–736.
- Stanier, R. Y., Kunisawa, R., Mendez, M. Y Cohen-Bazire, G. (1971)** Purification and properties of unicellular blue-green algae (Order *Chroococcales*). *Bacteriol Rev* **35**, 225-274.
- Stanier, R. Y. y Cohen-Bazire, G. (1977)** Phototrophic prokaryotes: the cyanobacteria. *Ann Rev Microbiol* **31**, 225-274.
- Starmach, K. (1966).** Flora Slodkowodna Polski. *Cyanophyta Sinice. Glaukophyta-Glaukofity. Polska Akademia Nauk. Paustwawe Yuydawnintwo Nankowe. Warszawa.* 806 pags
- Steunou, A. S., Bhaya, D., Bateson, M. M., Melendrez, M. C., Ward, D. M., Brecht, E., Peters, J. W., Kuhl, M. y Grossman, A. R. (2006)** *In situ* analysis of nitrogen fixation and metabolic switching in unicellular thermophilic cyanobacteria inhabiting hot spring microbial mats. *Proc Natl Acad Sci USA* **103** (7), 2398-2403
- Stewart, W.D.P., Fitzgerald, G.P. y Burris, R.H. (1968)** Acetylene reduction by nitrogen-fixing blue-green algae. *Arch Microbiol* **62** (4), 336-348.
- Stewart, W. D. P. (1978)** Nitrogen-fixing cyanobacteria and their associations with eukariotics plants. *Endeavour* **2**, 170-179.
- Stewart, W. D. P. (1980)** Some aspects of structure and function in N₂-fixing cyanobacteria. *Ann Rev Microbiol* **34**, 497-538.
- Stihl, A., Sommer, U. y Post, A. F. (2001)** Alkaline phosphatase activities among populations of the colony-forming diazotrophic cyanobacterium *Trichodesmium* sp. (Cyanobacteria) in the Red Sea. *J Phycol* **37**, 310-317.
- Štrojsová, A., Vrba, J., Nedoma, J., Komárková, J. y Znachor, P. (2003)** Seasonal study of extracellular phosphatase expression in the phytoplankton of a eutrophic reservoir. *Eur J Phycol* **38**, 295-306.
- Stulp, B. K. y Stam, W. T. (1982)** General morphology and akinete germination of a number of *Anabaena* strains (Cyanophyceae) in culture. *Arch Hydrobiol* **63** *Algological Studies* 30, 35-52.
- Stulp, B. K. y Stam, W. T. (1984a)** Growth and morphology of *Anabaena* strains (Cyanophyceae, Cyanobacteria) in cultures under different salinitites. *Br Phycol J* **19**, 281-286.
- Stulp, B. K. y Stam, W. T. (1984b)** Genotypic relationships between strains of *Anabaena* (Cyanophyceae) and their correlation with morphological affinities *Br Phycol J* **19**, 287-302.
- Sturion, A. (2004)** Abordages moleculares para detector cianobactérias e seus genótipos produtores de microcistinas presentes nas represas Billings e Guarapiranga, São Paulo, Brasil. Tesis, Universidade de São Paulo, Brasil.
- Suda, S., Watanabe, M. M., Otsuka, S., Mahakahant, A., Yongmanitchai, W., Nopartnaraporn, N., Liu, Y. y Day, J. D. (2002)** Taxonomic revision of water-bloom-forming species of oscillatorioid cyanobacteria *Int J Syst Evol Microbiol* **52**, 1577–1595.
- Svenning, M. M., Eriksson, T. y Rasmussen, U. (2005)** Phylogeny of symbiotic cyanobacteria within the genus *Nostoc* based on 16S rDNA sequence analyses. *Arch Microbiol* **183**, 19–26.

- Tajima, F. y Nei, M. (1984)** Estimation of evolutionary distance between nucleotide sequences. *Mol Biol Evol* **1**, 269-285.
- Tamas, I., Svircev Z. y Andersson, S. G. E. (2000)** Determinative value of a portion of the *nifH* sequence for the genera *Nostoc* and *Anabaena* (Cyanobacteria). *Curr Microbiol* **41** (3), 197-200.
- Tandeau de Marsac, N. (1994)** Differentiation of hormogonia and relationships with other biological processes, págs. 825-842. En: *The Molecular Biology of Cyanobacteria*. (Ed. D. A. Bryant) *Kluwer Academic Publishers*, The Netherlands.
- Tang, M., Jensen, T. y Corpe, W. A. (1995)** The occurrence of polyphosphate bodies in polyhedral bodies (carboxysome-s) in *Synechococcus leopoliensis* (Cyanophyceae) *Microbios* **81**, 59-66.
- Taton, A., Grubisic, S., Brambilla, E., de Wit, R. y Wilmotte, A (2003)** Cyanobacterial diversity in natural and artificial microbial mats of lake Fryxell (McMurdo Dry Valleys, Antarctica): a morphological and molecular approach. *Appl Environ Microbiol*, **69** (9), 5157–5169.
- Taton, A., Grubisic, S., Ertz, D., Hodgson, D. A., Piccardi, R., Biondi, N., Tredici, M. R., Mainini, M., Losi, D., Marinelli, F. y Wilmotte, A. (2006a)** Polyphasic study of Antarctic cyanobacterial strains. *J Phycol* **42** (6), 1257-1270.
- Taton, A., Grubisic, S., Balthasart, P., Hodgson, D. A., Laybourn-Parry, J. y Wilmotte, A. (2006b)** *FEMS Microbiol Ecol* **57** (2), 272-289.
- Tautz, D., Arctander, P., Minelli, A., Thomas, R. H. y Vogler, A. P. (2003)** A plea for DNA taxonomy. *Trends Ecol Evol* **18**, 70-74.
- Teaumroong, N., Innok, S., Chunleuchanon, S. y Boonkerd, N. (2002)** Diversity of nitrogen-fixing cyanobacteria under various ecosystems of Thailand: I. Morphology, physiology and genetic diversity. *World J Microbiol Biotech* **18**, 673–682.
- Teneva, I., Dzhabazov, B., Mladenov, R. y Schirmer, K. (2005)** Molecular and phylogenetic characterization of *Phormidium* species (cyanoprokaryota) using the *cpcB*-IGS-*cpcA* locus. *J Phycol* **41** (1), 188-194.
- Thacker, R. W. y Paul, V. J. (2004)** Morphological, chemical, and genetic diversity of tropical marine cyanobacteria *Lyngbya* spp. and *Ssymploca* spp. (*oscillatoriales*). *Appl Environ Microbiol* **70** (6), 3305–3312.
- Thiel, T. (1994)** Genetic analysis of Cyanobacteria. En: *The Molecular Biology of Cyanobacteria*. Págs. 581-611. (Ed. A. Bryant). *Kluwer Academic Publishers*, Netherlands.
- Thiel, T., Lyons, E. M., Erker, J. C. y Ernst, A. (1995)** A 2nd nitrogenase in vegetative cells of a heterocystforming cyanobacterium. *Proc Natl Acad Sci USA* **92**, 9358–9362.
- Thiel, T. y Pratte, B. (2001)** Effect on heterocyst differentiation of nitrogen fixation in vegetative cells of the cyanobacterium *Anabaena variabilis* ATCC 29413. *J Bacteriol* **183**, 280–286.
- Thompson, J. D., Higgins, D. G. y Gibson, T. J. (1994)** CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Res* **11** (22), 4673–4680.
- Tillet, D., Parker, D. y Neilan, B. A. (2001)** Detection of toxigenicity by a probe for the microcystin synthetase a gene (*mcyA*) of the cyanobacterial genus *microcystis*: comparison of toxicities with 16S rRNA and phycocyanin operon (phycocyanin intergenic spacer) phylogenies. *Appl Environ Microbiol* **67** (6), 2810–2818.
- Tomioaka, N. K., Shinozaki, K. y Sugiura, M. (1981)** Molecular cloning and characterization of ribosomal RNA genes from a blue-green algae, *Anacystic nidulans*. *Mol Gen Genet* **184**, 359–363.

- Tomioaka, N. y Sugiura, M. (1984)** Nucleotide sequence of the 16S–23S spacer region in the *rrnA* operon from a bluegreen alga, *Anacystis nidulans*. *Mol Gen Genet* **193**, 427–430.
- Tomitani, A., Knoll, A. H., Cavanaugh, C. M. y Ohno, T. (2006)** The evolutionary diversification of cyanobacteria: Molecular, phylogenetic and paleontological perspectives. *Proc Natl Acad Sci USA* **103** (14), 5442–5447.
- Tucker, D. L., Hirsh, K., Li, H., Boardman, B. y Sherman, L. A. (2001)** The manganese stabilizing protein (MSP) and the control of O₂ evolution in the unicellular, diazotrophic cyanobacterium, *Cyanothece* sp. ATCC 51142. *BBA—Bioenergetics* **1504**, 409–422.
- Turner, S. (1997)** Molecular systematics of oxygenic photosynthetic bacteria. *Plant Syst Evol* **11**, 13–52.
- Turner, S., Pryer, K. M., Miao, V. P. W. Y Palmer, J. D. (1999)** Investigating deep phylogenetic relationships among cyanobacteria and plastids by small subunit rRNA sequence analysis. *J Eukaryot Microbiol* **46**, 327–38.
- Turner, B. L., Baxter, R. y Whitton, B. A. (2003)** Nitrogen and phosphorous in soil solutions and drainage streams in Upper Teesdale, northern England: Implications of organic compounds for biological nutrient limitation. *Sci Total Environ* **314-316C**, 153–170.
- Van Coppenolle, B., McCouch, S. R. y Watanabe, I. (1995)** Genetic diversity and phylogeny analysis of *Anabaena azollae* based on RFLPs detected in *Azolla-Anabena azollae* DNA complexes using *nif* gene probes. *Theor Appl Genet* **91**, 589–597.
- Vandamme, P., Pot, B., Gillis, M., de Vos, P., Kersters, K. y Swings, J. (1996)** Polyphasic taxonomy, a consensus approach to bacterial systematics. *Microbiol Rev*, **60** (2), 407–438.
- Vargas, R. y Novelo, E. (2007)** Seasonal changes in periphyton nitrogen fixation in a protected tropical wetland. *Biol Fertil Soils* **43**, 367–372.
- Veluci, R. M., Neherl, D. A. y Weichtl, T. R. (2006)** Nitrogen fixation and leaching of biological soil crust communities in mesic temperate soils. *Microbial Ecol* **51**, 189–196.
- Ventura, M., Ribas, A. y Saurí, M. (2000)** Gestión del agua y conflictividad social en la cuenca del río Muga (Alt Empordá). *Geographicalia* **38**, 59–75.
- Vincent, W.F., Castenholz, R. W., Downes, M. T. y Howard-Williams, C. (1993)** Antarctic cyanobacteria: light, nutrients, and photosynthesis in the microbial mat environment. *J Phycol* **29**, 745–755.
- Vincent, W.F. (2000)** Cyanobacterial dominance in the polar regions. En: *The Ecology of Cyanobacteria* (eds. B.A. Whitton y M. Potts), *Kluwer Academic Publ.*, págs 321–340.
- Wagner, F. y Falkner, G. (2001)** Phosphatase limitation. En: *Algal adaptation to environmental stresses*. Págs. 65–110. (Eds. L. C. Rai y J. P. Gaur) *Springer*, Heidelberg and New York.
- Walsby, A. E. (1974)** The extracellular products of *Anabaena cylindrical* Lemm. I- Isolation of a macromolecular pigment peptide complex and other components. *Br Phycol J* **9**, 371–381.
- Walsby, A. E. (1975)** Gas vesicles. *Ann Rev Plant Physiol* **26**, 427–439.
- Warwick, F. V. y Quesada, A. (1994)** Ultraviolet radiation effects on cyanobacteria: implications for Antarctic microbial ecosystems. *Antarctic Res Ser* **62**, 111–124.
- Waterbury, J. B. y Stainer, R. Y. (1977)** Two unicellular cyanobacteria which reproduce by budding. *Arch Microbiol* **115**, 249–257.
- West, N. J. y Adams, D. G. (1997)** Phenotypic and genotypic comparison of symbiotic and free-living cyanobacteria from a single field site. *Appl Environ Microbiol* **63**, 4479–4484.

- Wetzel, R. G. (1992)** Gradient-dominated ecosystems: Sources and regulatory functions of dissolved organic matter in freshwater ecosystems. *Hydrobiologia* **229** (1), 181-198.
- Whitton, B. A. y Harding, J. P. G. (1978)** Influence of nutrient deficiency on hair formation in *Stigeoclonium*. *B Phycol J* **13** (1), 65-68 1978
- Whitton, B. A. y Potts, M. (1982)** Marine littoral. En: *The Biology of Cyanobacteria*, págs. 515-542 (Eds. N.G. Carr y B.A. Whitton) Blackwell, Oxford.
- Whitton, B.A. (1987)**. The biology of Rivulariaceae. En: *The Cyanobacteria*. Pág. 513-534 (Eds. P.Fay y C. Van Baalen). *Elsevier*, Oxford.
- Whitton, B. A., Aziz, A. y Rother, J. A. (1988)** Ecology of deepwater rice-fields in Bangladesh. 3. Associated algae and macrophytes. *Hydrobiologia* **169** (1), 31-42.
- Whitton, B. A. (1989)** *Calothrix*. En: *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, 2ª ed, vol. 3, págs. 1791-1794. (Eds. D. R. Boone & R. W. Castenholz) *New York, Springer*.
- Whitton, B. A., Potts, M., Simon, J. W. y Grainger, S. L. J. (1990)** Phosphatase activity of the blue-green alga (cyanobacterium) *Nostoc commune* UTEX 584. *Phycologia* **29**, 139-145.
- Whitton, B. A. (1991)** Use of phosphatase assays with algae to assess phosphorous status of aquatic environments. En: *Bioindicators and environmental management. Proceedings of the 6th Internatinal Bioindicators Symposium*. Págs. 295-310. (Eds. D. W. Jeffrey y B. Madden). *Academic Press, Inc.* New York.
- Whitton, B. A. (1992)** Diversity, ecology and taxonomy of the cyanobacteria. En: *Photosynthetic Prokaryotes*. Vol. 6, págs. 1-51. (Eds. N. H. Mann y N. G. Carr). *Biotechnology Handbooks. Plenum Press*. London.
- Whitton, B.A., Clegg, E., Christmas, M., Gemmell, J.J. y Robinson, P.J. (1999)** Development of phosphatase assay for monitoring nutrients in rivers: Methodology manual for measurement of phosphates activity in mosses and green algae in rivers. *Environment Agency of England and Wales STRE106-E-P* págs 53. WRc, Frankland Road, Swindon, Wilts, UK.
- Whitton, B. A. y Hernández, I. (2000)** Eds. En: *Phosphatases in the Environment. Kluwer Academic Publishers*, The Netherlands.
- Whitton, B. A. (2002)** Phylum Cyanophyta. In: *The freshwater algal flora of the British Isles. An identification guide to freshwater and terrestrial algae*. Págs 25-122. (Eds. D. M. John, B. A. Whitton, A. J. Brook) *Cambridge University Press*, UK
- Whitton, B. A., Al-Shehri, A. M., Ellwood, N. T. W. y Turner, B. L. (2005)** Ecological aspects of phosphatase activity in cyanobacteria, eukaryotic algae and bryophytes. En: *Organic Phosphatase in the Environment*. Capítulo 10, págs. 205-242 (Eds. Turner, B.L., Frossard, E. y Baldwin, D.S.) *CABI*, Wallingford, UK.
- Widmer, F., Shaffer, B. T., Porteos, A. y Seidler, R. J. (2006)** Analysis of *nifH* gene pool complexity in soil and litter at a Douglas Fir Forest Site in the Oregon Cascade Mountain Range. *Appl Environ Microbiol* **65** (2), 374-380.
- Wilkinson, C. R. y Fay, P. (1979)** Nitrogen-Fixation in coral-reef sponges with symbiotic cyanobacteria. *Nature* **279** (5713), 527-529.
- Willame, R., Boutte, C., Brubisic, S, Wilmotte, A., Komárek, J. y Hoffmann, L. (2006)** Morphological and molecular characterization of planktonic cyanobacteria from Belgium and Luxembourg. *J Phycol* **42**, 1312-1332.
- Williamson, S. E. y Doolittle, W. F. (1983)** Genes for tRNA^{Ile} and tRNA^{Ala} in the spacer between the

16S and 23S rRNA genes of a blue-green alga: strong homology to chloroplast tRNA genes and tRNA genes of the *E. coli* *rrmD* gene cluster. *Nucleic Acids Res* **11**, 225–235.

Wilmotte, A., Turner, S., Van de Peer, Y. y Pace, N.R. (1992) Taxonomic study of marine oscillatoriaceas strains (Cyanobacteria) with narrow trichomes. II. Nucleotide sequence analysis of the 16S ribosomal RNA. *J Phycol* **28**, 828-838.

Wilmotte, A., Van der Auwera, G. y de Wachter, R. (1993) Structure of the 16S ribosomal RNA of the thermophilic cyanobacterium *Chlorogloeopsis* HTF (*Mastigocladus laminosus* HTF) strain PCC7518, and phylogenetic analysis. *FEMS Microbiol Lett* **317**, 96-100.

Wilmotte, A. (1994a). Molecular evolution and taxonomy of the cyanobacteria, págs. 1-25. En: *The Molecular Biology of Cyanobacteria*. (Ed. D. A. Bryant) *Kluwe Academic Publishers*, The Netherlands.

Wilmotte, A., Neefs, J. M. y De Wachter, R. (1994b) Evolutionary affiliation of the marine nitrogen-fixing cyanobacterium *Trichodesmium* sp strain NIBB-1067, derived by 16S ribosomal RNA sequence analysis. *Microbiology* **140** (8), 2159-2164.

Wilmotte, A. y Herdman, (2001) Phylogenetic relationships among the cyanobacteria based on 16S rRNA sequences. En: *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, 2ª ed, vol. 1, págs. 487-493. (Eds. D. R. Boone & R. W. Castenholz) *Springer*, New York.

Wilmotte, A., Demonceau, D., Goffart, A., Hecq, J. H., Demoulin, V. y Crossley, A. C. (2002) Molecular and pigment studies of the picophytoplankton in a region of Southern Ocean (42-54° S, 141-144° E) in March 1998. *Deep Sea Res II* **49**, 3351-3363.

Wilson, K. M., Schembri, M. A., Baker, P. D. y Saint, C. P. (2000) Molecular characterization of the toxic cyanobacterium *Cylindrospermopsis raciborskii* and design of a species-specific PCR. *Appl Environ Microbiol* **66**, 332-338.

Woese, C. R. (1987) Bacterial evolution. *Microbiol Rev* **51**, 221–71.

Wolk, C. P., Ernst, A. y Elia, J. (1994) Heterocyst metabolism and development. En: *The Biology of Cyanobacteria*. Págs. 769-823 (Ed. A. Bryant). *Kluwer Academic Publishers*, Netherlands.

Wood, P., Peat, A. y Whitton, B. A. (1986) Influence of phosphorous status on fine structure of the cyanobacterium (blue-green alga) *Calothrix parietina*. *Cytobios* **47**, 89-99.

Wood, A. M., Miller, S. R., Li, W. K. W. y Castenholz, R. W. (2002) Preliminary studies of cyanobacteria, picoplankton, and virioplankton in the Salton Sea with special attention to phylogenetic diversity among eight strains of filamentous cyanobacteria. *Hydrobiologia* **473**, 77-92.

Wright, D., Prickett, T., Helm, R. F. y Potts, M. (2001) Form species *Nostoc commune* (Cyanobacteria) *Int J Syst Evol Microbiol* **51**, 1839–1852.

Xu, M. Q., Kathe, S. D., Goodrich-Blair, H., Nierzwicki-Bauer, S. A. y Shub, D. A. (1990) Bacterial origin of a chloroplast intron: conserved self-splicing group I introns in cyanobacteria. *Science* **250**, 1566-1570.

Yannarell, A. R., Steppe, T.F., Paerl, H. W. (2006) Genetic variance in the composition of two functional groups (diazotrophs and cyanobacteria) from a hypersaline microbial mat. *Appl Environ Microbiol* **72** (2), 1207-1217.

Yeager, C. M., Kornosky, J. L., Morgan, R. E., Cain, E. C., García-Pichel, F., Housman, D. C., Belnap, J. y Kuske, C. R. (2007) Three distinct clades of cultured heterocystous cyanobacteria constitute the dominant N₂-fixing members of biological soil crusts of the Colorado Plateau, USA. *FEMS Microbiol Ecol* **60**, 85–97.

Yelloly, J. M. y Whitton, B. A. (1996) Seasonal changes in ambient phosphate and phosphatase activities of the cyanobacterium *Rivularia atra* in intertidal pools at Tyne Sands, Scotland. *Hydrobiologia*

325, 201-212.

Zehnder, A. (1985). Isolation and cultivation of large cyanophytes for taxonomic purposes. *Arch Hydrobiol Suppl* **71**, 1/2 *Algological Studies* **38/39**, 281-289.

Zehr, J. P., Waterbury, J. B., Turner, P. J., Omoregie, E., Steward, G. F. y col., (2001) Unicellular cyanobacteria fix N₂ in the subtropical North Pacific Ocean. *Nature* **412**, 635–638.

Zehr, J.P., Jenkins, B.D., Short, S.M., y Steward, G.F. (2003) Nitrogenase gene diversity and microbial community structure: a cross-system comparison. *Environ Microbiol* **5**, 539–554.

Zeidner, G. y Béja, O. (2004) The use of DGGE analyses to explore eastern Mediterranean and Red Sea marine picophytoplankton assemblages. *Environ Microbiol* **6** (5), 528–534.

ANEXO

| | 10 | 20 | 30 | 40 | 50 | 60 |
|----------------------------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|--------------|
| Consensus | | | | | | |
| | GGCTGCTTGT | TTACGCGACA | TGGAAATCAT | CTTGCGCTAT | GTAACCTACG | CAATTTTCTC |
| Rivularia sp. E1 UAM-302 | | | | | | |
| Rivularia sp. MU15 UAM-369 | | | | | | |
| Rivularia sp. MU24 UAM-305 | | | | | | |
| Rivularia sp. E8 UAM-319 | | | | | | |
| Rivularia sp. ERIVMA1 | | | | | | |
| Rivularia sp. ERIVE1 | | | | | | |
| Rivularia sp. E7 UAM-313 | | | | | | |
| Rivularia sp. BL2 UAM-347 | | | | | | |
| Rivularia sp. BL1 UAM-346 | | | | | | |
| Rivularia sp. MA8 UAM-355 | | | | | | |
| Calothrix sp. MU27 UMA-315 | | | | | | |
| Calothrix sp. MU28 UAM-341 | | | | | | |
| Calothrix sp. E17 UAM-358 | | | | | | |
| Calothrix sp. MU41 UAM-370 | | | | | | |
| Rivularia sp. ERIVMU1 | | | | | ..T..... | ..T..G..GG. |
| Rivularia sp. MA14 | | | | | ..T..... | ..T..G..GG. |
| Rivularia sp. ERIVALH1 | | | | | ..T..... | ..T..G..GG. |
| Rivularia sp. ERIVRED1 | | | | | ..T..... | ..T..G..GG. |
| | 70 | 80 | 90 | 100 | 110 | 120 |
| Consensus | | | | | | |
| | TGGCGACGCT | AGCGTTCTCG | ATGACCGTTG | TTTAAACGGT | TTGCGCGAAA | CCTACTTGGC |
| Rivularia sp. E1 UAM-302 |A.. | | ..C..... | | | |
| Rivularia sp. MU15 UAM-369 |A.. | | ..C..... | | | |
| Rivularia sp. MU24 UAM-305 |A.. | | ..C..... | | | |
| Rivularia sp. E8 UAM-319 |A.. | | ..C..... | | | |
| Rivularia sp. ERIVMA1 |A.. | | | ...G..... | | |
| Rivularia sp. ERIVE1 |A.. | | | ...G..... | | |
| Rivularia sp. E7 UAM-313 |A.. | | | ...G..... | | |
| Rivularia sp. BL2 UAM-347 | | | ..C..... | | | |
| Rivularia sp. BL1 UAM-346 | | | ..C..... | | | |
| Rivularia sp. MA8 UAM-355 | | | ..C..... | | | |
| Calothrix sp. MU27 UMA-315 | | ..T..... | | ...G..... | ..A..... | |
| Calothrix sp. MU28 UAM-341 | | ..CT..... | | ...G..... | ..A..... | |
| Calothrix sp. E17 UAM-358 | | ..T..... | | ...G..... | ..A..... | |
| Calothrix sp. MU41 UAM-370 | | ..T..... | | ...G..... | ..A..... | |
| Rivularia sp. ERIVMU1 | ...T..... | ...AT.A. | | C..G..T... | | ..T...CAA.. |
| Rivularia sp. MA14 | ...T..... | ...AT.A. | | CC.G..T... | | ..T...CAA.. |
| Rivularia sp. ERIVALH1 | ...T..... | ...AT.A. | | C..G..T... | | ..T...CAA.. |
| Rivularia sp. ERIVRED1 | ...T..... | ...AT.A. | | C..G..T... | | ..T...CAA.. |
| | 130 | 140 | 150 | 160 | 170 | 180 |
| Consensus | | | | | | |
| | TTTAGGAACT | CCTGGAGCTT | CAGTATCAGT | TGGCGTACAA | AAGATGAAAG | AAGCAGCATT |
| Rivularia sp. E1 UAM-302 | | | | | | |
| Rivularia sp. MU15 UAM-369 | | | | | | |
| Rivularia sp. MU24 UAM-305 | | | | | | |
| Rivularia sp. E8 UAM-319 | | | | | | |
| Rivularia sp. ERIVMA1 | | | | | | |
| Rivularia sp. ERIVE1 | | | | | | |
| Rivularia sp. E7 UAM-313 | | | | | | |
| Rivularia sp. BL2 UAM-347 | | | | | | |
| Rivularia sp. BL1 UAM-346 | | | | | | |
| Rivularia sp. MA8 UAM-355 | | | | | | |
| Calothrix sp. MU27 UMA-315 |C | ..C..... | ...G..... | ...T..... | | ...T..... |
| Calothrix sp. MU28 UAM-341 |C | ..C..... | ...G..... | ...T..... | | ...T..... |
| Calothrix sp. E17 UAM-358 |C | ..C..... | ...G..... | ...T..... | | ...T..... |
| Calothrix sp. MU41 UAM-370 |C | ..C..... | ...G..... | ...T..... | | ...T..... |
| Rivularia sp. ERIVMU1 | ...G..T... | ..C..TT... | ..T..G... | ...T... | ..A..... | ..TA..T..TA. |
| Rivularia sp. MA14 | ...G..T... | ..C..TT... | ..T..G... | ...T... | ..A..... | ..TA..T..TA. |
| Rivularia sp. ERIVALH1 | ...G..T... | ..C..TT... | ..T..G... | ...T... | ..A..... | ..TA..T..TA. |
| Rivularia sp. ERIVRED1 | ...G..T... | ..C..TT... | ..T..G... | ...T... | ..A..... | ..TA..T..TA. |

| | 190 | 200 | 210 | 220 | 230 | 240 |
|----------------------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|
| Consensus | AGCAATTGCT | GGCGACCCCA | ACAATATCAC | CAAAGGTGAT | TGCAGTGCAT | TAATGTCTGA |
| Rivularia sp. E1 UAM-302 | | | | | | |
| Rivularia sp. MU15 UAM-369 | | | | | | |
| Rivularia sp. MU24 UAM-305 | | | | | | |
| Rivularia sp. E8 UAM-319 | | | | | | |
| Rivularia sp. ERIVMA1 | | | | | | |
| Rivularia sp. ERIVE1 | | | | | | |
| Rivularia sp. E7 UAM-313 | | | | | | |
| Rivularia sp. BL2 UAM-347 | | | | | | |
| Rivularia sp. BL1 UAM-346 | | | | | | |
| Rivularia sp. MA8 UAM-355 | | | | | | |
| Calothrix sp. MU27 UMA-315 | | .T..... | | | .C.G. | |
| Calothrix sp. MU28 UAM-341 | | .T..... | | | .C.G. | |
| Calothrix sp. E17 UAM-358 | | .T..... | | | .C.G. | |
| Calothrix sp. MU41 UAM-370 | | .T..... | | | .C.G. | |
| Rivularia sp. ERIVMU1 | CAA..G.. | AA..... | .TGGA. | ..G..... | ..CCAG. | |
| Rivularia sp. MA14 | CAA..G.. | AA..... | .TGGA. | ..G..... | ..CCAG. | |
| Rivularia sp. ERIVALH1 | CAA..G.. | AA..... | .TGGA. | ..G..... | ..CCAG. | |
| Rivularia sp. ERIVRED1 | CAA..G.. | AA..... | .TGGA. | ..G..... | ..CCAG. | |

| | 250 | 260 | 270 | 280 | 290 | 300 |
|----------------------------|------------|------------|------------|------------|------------|-------------|
| Consensus | AGTATCTAGC | TACTTCGACC | GTGCAGCATC | AGCTGTAGCA | TAAGTTACCG | CGT-AACATC |
| Rivularia sp. E1 UAM-302 |C... | | | | | ..G..... |
| Rivularia sp. MU15 UAM-369 |C... | | | | | ..G..... |
| Rivularia sp. MU24 UAM-305 |C... | | | | | ..G..... |
| Rivularia sp. E8 UAM-319 |C... | | | | | ..G..... |
| Rivularia sp. ERIVMA1 |C... | | | | | ..G..... |
| Rivularia sp. ERIVE1 |C... | | | | | ..G..... |
| Rivularia sp. E7 UAM-313 |C... | | | | | ..G..... |
| Rivularia sp. BL2 UAM-347 |A... | | | | | ..T..... |
| Rivularia sp. BL1 UAM-346 |A... | | | | | ..T..... |
| Rivularia sp. MA8 UAM-355 |A... | | | | | ..T..... |
| Calothrix sp. MU27 UMA-315 | | | | | ..C.GTA. | ..CCA.CT.C. |
| Calothrix sp. MU28 UAM-341 | | | | | ..C.GTA. | ..CCA.CT.C. |
| Calothrix sp. E17 UAM-358 | | | | | ..C.GTA. | ..CCA.CT.C. |
| Calothrix sp. MU41 UAM-370 | | | | | ..C.GTA. | ..CCA.CT.C. |
| Rivularia sp. ERIVMU1 | .T.GGG.G.T |T.... |T.TG. | T....T.G | ..G--.GAA | ..CTGT.TAA |
| Rivularia sp. MA14 | .T.GGG.G.T |T.... |T.TG. | T....T.G | ..G--.GAA | ..CTGT.TAA |
| Rivularia sp. ERIVALH1 | .T.GGG.G.T |T.... |T.TG. | T....T.G | ..G--.GA. | ..CTGT.TAA |
| Rivularia sp. ERIVRED1 | .T.GGG.G.T |T.... |T.TG. | T....T.G | ..G--.GAA | ..CTGT.TAA |

| | 310 | 320 | 330 | 340 | 350 | 360 |
|----------------------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|
| Consensus | GCCTTGTT-- | --CTGACTTG | G----GTCAG | TTCGACACAA | ACAAC TTCA | AACAAAATTT |
| Rivularia sp. E1 UAM-302 |-- | --..... | ----- | | | |
| Rivularia sp. MU15 UAM-369 |-- | --..... | ----- | | | |
| Rivularia sp. MU24 UAM-305 |-- | --..... | ----- | | | |
| Rivularia sp. E8 UAM-319 |-- | --..... | ----- | | | |
| Rivularia sp. ERIVMA1 |-- | --..... | ----- | | | |
| Rivularia sp. ERIVE1 |-- | --..... | ----- | | | ..G...A.. |
| Rivularia sp. E7 UAM-313 |-- | --..... | ----- | | | ..A...A.. |
| Rivularia sp. BL2 UAM-347 |-- | --..... | ----- | | | |
| Rivularia sp. BL1 UAM-346 |-- | --..... | ----- | | | |
| Rivularia sp. MA8 UAM-355 |-- | --..... | ----- | | | |
| Calothrix sp. MU27 UMA-315 | ..ACC.CAAT | CG.....AT | ATATA..... |T.. | ..T.....- | |
| Calothrix sp. MU28 UAM-341 | ..ACC.CAAT | CG.....AT | ATATA..... |T.. | ..T.....- | |
| Calothrix sp. E17 UAM-358 | ..ACC.CAAT | CG.....AT | ATATA..... |T.. | ..T.....- | |
| Calothrix sp. MU41 UAM-370 | ..ACC.CAAT | CG.....AT | ATATA..... |T.. | ..T.....- | |
| Rivularia sp. ERIVMU1 | .T..AAA.AA | AGA.AGAAAA | AC-CC.GA.C | .AAAT.GGT. | T.C.GGCAA. | ..A.G..CAA |
| Rivularia sp. MA14 | .T..AAA.AA | AGA.AGAAAA | AC-CC.GA.C | .AAAT.GGT. | T.C.GGCAA. | ..A.G..CAA |
| Rivularia sp. ERIVALH1 | .T..AAA.AA | AGA.AGAAAA | AC-CC.GA.C | .AAAT.GGT. | T.C.GGCAA. | ..A.G..CAA |
| Rivularia sp. ERIVRED1 | .T..AAA.AA | AGA.AGAAAA | AC-CC.GA.C | .AAAT.GGT. | T.C.GGCAA. | ..A.G..CAA |

| | 370 | 380 | 390 | 400 | 410 | 420 |
|----------------------------|------------|------------|------------|-----------|-----------|------------|
| Consensus | | | | | | |
| | TGTA | AAAGGG | AGATACCGAG | CCAATG | AAAA | CTCCTCTTAC |
| | CGAAGCAGTA | GCATCTGCTG | | | | |
| Rivularia sp. E1 UAM-302 | | | | | | |
| Rivularia sp. MU15 UAM-369 | | | | | | |
| Rivularia sp. MU24 UAM-305 | | | | | | |
| Rivularia sp. E8 UAM-319 | | | | | | |
| Rivularia sp. ERIVMA1 | | | | | | |
| Rivularia sp. ERIVE1 | | | | | | |
| Rivularia sp. E7 UAM-313 | | | | | | |
| Rivularia sp. BL2 UAM-347 | | | | | | |
| Rivularia sp. BL1 UAM-346 | | | | | | |
| Rivularia sp. MA8 UAM-355 | | | | | | |
| Calothrix sp. MU27 UMA-315 | | | T.GA | ..G..... | | |
| Calothrix sp. MU28 UAM-341 | | | T.GA | ..G..... | | |
| Calothrix sp. E17 UAM-358 | | | T.GA | ..G..... | | |
| Calothrix sp. MU41 UAM-370 | | | T.GA | ..G..... | | |
| Rivularia sp. ERIVMU1 | GAC.T..A.. |TGTA.. | A-.....G. | A..AA.... |A.T |C. |
| Rivularia sp. MA14 | GAC.T..A.. |TGTA.. | A-.....G. | A..AA.... |A.T |C. |
| Rivularia sp. ERIVALH1 | GAC.T..A.. |TGTA.. | A-.....G. | A..AA.... |A.T |C. |
| Rivularia sp. ERIVRED1 | GAC.T..A.. |TGTA.. | A-.....G. | A..AA.... |A.T |C. |

| | 430 | 440 | 450 | 460 | 470 | 480 |
|----------------------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|
| Consensus | | | | | | |
| | ATTCACAAGG | ACGTTTCCTA | AGCAGCACCG | AAATGC | AAAC | CGCTTTTGGT |
| | CGTTACCGTC | | | | | |
| Rivularia sp. E1 UAM-302 | | | | | | |
| Rivularia sp. MU15 UAM-369 | | | | | | |
| Rivularia sp. MU24 UAM-305 | | | | | | |
| Rivularia sp. E8 UAM-319 | | | | | | |
| Rivularia sp. ERIVMA1 | | | | | | |
| Rivularia sp. ERIVE1 | | | | | | |
| Rivularia sp. E7 UAM-313 | | | | | | |
| Rivularia sp. BL2 UAM-347 | | | | | | |
| Rivularia sp. BL1 UAM-346 | | | | | | |
| Rivularia sp. MA8 UAM-355 | | | | | | |
| Calothrix sp. MU27 UMA-315 | | | | | | |
| Calothrix sp. MU28 UAM-341 | | | | | | |
| Calothrix sp. E17 UAM-358 | | | | | | |
| Calothrix sp. MU41 UAM-370 | | | | | | |
| Rivularia sp. ERIVMU1 | ..A.T..... | T.....T.. |A..... | ..T.....G. | T.T.AAC... |TTGA.. |
| Rivularia sp. MA14 | ..A.T..... | T.....T.. |A..... | ..T.....G. | T.T.AAC... |TTGA.. |
| Rivularia sp. ERIVALH1 | ..A.T..... | T.....T.. |A..... | ..T.....G. | T.T.AAC... |TTGA.. |
| Rivularia sp. ERIVRED1 | ..A.T..... | T.....T.. |A..... | ..T.....G. | T.T.AAC... |TTGA.. |

| | 490 | 500 | 510 | 520 | 530 | 540 |
|----------------------------|------------|-------------|------------|------------|------------|-------------|
| Consensus | | | | | | |
| | AAGCAACAGC | TGGTTTAGAA | GCAGCTAAGT | CATTGACAAG | CAACGCACAA | CGTTTAGCAG |
| Rivularia sp. E1 UAM-302 | | | | | | |
| Rivularia sp. MU15 UAM-369 | | | | | | |
| Rivularia sp. MU24 UAM-305 | | | | | | |
| Rivularia sp. E8 UAM-319 | | | | | | |
| Rivularia sp. ERIVMA1 | | | | | | |
| Rivularia sp. ERIVE1 | | | | | | |
| Rivularia sp. E7 UAM-313 | | | | | | |
| Rivularia sp. BL2 UAM-347 | | | | | | |
| Rivularia sp. BL1 UAM-346 | | | | | | |
| Rivularia sp. MA8 UAM-355 | | | | | | |
| Calothrix sp. MU27 UMA-315 | | AA.C..... | ..T....AG |C.. | | |
| Calothrix sp. MU28 UAM-341 | | AA.C..... | ..T....AG |C.. | | |
| Calothrix sp. E17 UAM-358 | | AA.C..... | ..T....AG |C.. | | |
| Calothrix sp. MU41 UAM-370 | | AA.C..... | ..T....AG |C.. | | |
| Rivularia sp. ERIVMU1 | GT..T.GC.. | ..A.CA.G... | ..T...CGTG | ..T....CA | ..A..T..G | ..AG...ATT. |
| Rivularia sp. MA14 | GT..T.GC.. | ..A.CA.G... | ..T...CGTG | ..T....CA | ..G..T..G | ..AG...ATT. |
| Rivularia sp. ERIVALH1 | GT..T.GC.. | ..A.CA.G... | ..T...CGTG | ..T....CA | ..A..T..G | ..AG...ATT. |
| Rivularia sp. ERIVRED1 | GT..T.GC.. | ..A.CA.G... | ..T...CGTG | ..T....CA | ..A..T..G | ..AG...ATT. |

| | 550 | 560 | 570 | 580 | 590 | 600 |
|----------------------------|-------------|-------------|-----------|-------------|-------------|------------|
| Consensus | AAGGTGCAGC | AAACGCTGTA | TACCAAAGT | TTCCCTACAC | CACCCAAATG | CAAGGGCCAA |
| Rivularia sp. E1 UAM-302 | | | |A..... | | |
| Rivularia sp. MU15 UAM-369 | | | |A..... | | |
| Rivularia sp. MU24 UAM-305 | | | |A..... | | |
| Rivularia sp. E8 UAM-319 | | | |A..... | | |
| Rivularia sp. ERIVMA1 | | | |A..... | | |
| Rivularia sp. ERIVE1 | | | |A..... | | |
| Rivularia sp. E7 UAM-313 | | | |A..... | | |
| Rivularia sp. BL2 UAM-347 | | | |A..... | | |
| Rivularia sp. BL1 UAM-346 | | | |A..... | | |
| Rivularia sp. MA8 UAM-355 | | | |A..... | | |
| Calothrix sp. MU27 UMA-315 | |T..... | |C..... |T..... | |
| Calothrix sp. MU28 UAM-341 | |T..... | |C..... |T..... | |
| Calothrix sp. E17 UAM-358 |T..... |T..... | |C..... |T..... | |
| Calothrix sp. MU41 UAM-370 | |T..... | |C..... |T..... | |
| Rivularia sp. ERIVMU1 | .T....G.. | TC.A....T | .T.G.... | |T..... | .G..A..TC |
| Rivularia sp. MA14 | .T....G.. | TC.A....T | .T.G.... | |T..... | .G..A..TC |
| Rivularia sp. ERIVALH1 | .T....G.. | TC.A....T | .T.G.... | |T..... | .G..A..TC |
| Rivularia sp. ERIVRED1 | .T....G.. | TC.A....T | .T.G.... | |T..... | .G..A..TC |

| | 610 | 620 | 630 | 640 | 650 | 660 |
|----------------------------|------------|------------|------------|------------|-------------|------------|
| Consensus | ACTTTGCTTC | TACCCAAACA | GGTAGAGACA | AGTGTGT-CG | TGACGTCGGT | TACTACTTAC |
| Rivularia sp. E1 UAM-302 | |G... | |C.. |T..... | |
| Rivularia sp. MU15 UAM-369 | |G... | |C.. |T..... | |
| Rivularia sp. MU24 UAM-305 | |G... | |C.. |T..... | |
| Rivularia sp. E8 UAM-319 | |G... | |C.. |T..... | |
| Rivularia sp. ERIVMA1 | |G... | |C.. |T..... | |
| Rivularia sp. ERIVE1 | G..... |G... | |C.. |T..... | |
| Rivularia sp. E7 UAM-313 | G..... |G... | |C.. |T..... | |
| Rivularia sp. BL2 UAM-347 | | | |T.. | | |
| Rivularia sp. BL1 UAM-346 | | | |T.. | | |
| Rivularia sp. MA8 UAM-355 | | | |T.. | | |
| Calothrix sp. MU27 UMA-315 |C.... | G..... |AG |A.. |T... |G. |
| Calothrix sp. MU28 UAM-341 |C.... | G..... |A. |A.. |T... |G. |
| Calothrix sp. E17 UAM-358 |C.... | G..... |A. |A.. |T... |G. |
| Calothrix sp. MU41 UAM-370 |C.... | G..... |A. |A.. |T... |G. |
| Rivularia sp. ERIVMU1 | .G.....G. | .GATTCTCGC |AGTC.. |CT.. | C.....A... | C.....C..A |
| Rivularia sp. MA14 | .G.....G. | .GATTCTCTC |AGTC.. |CT.. | C.G...A... | C.....C..A |
| Rivularia sp. ERIVALH1 | .G..C...G. | .GATTCTCGC |AGTC.. |C.CT.. | C.....A... | C.....C..A |
| Rivularia sp. ERIVRED1 | .G.....G. | .GATTCTCGC |AGTC.. |CT.. | C.....A... | C.....C..A |

| | 670 | 680 | 690 | |
|----------------------------|------------|-------------|------------|---------|
| Consensus | GCATGATCAC | ATACTGTTTA | GTTGCTGGTG | GTACTGG |
| Rivularia sp. E1 UAM-302 | | | | |
| Rivularia sp. MU15 UAM-369 | | | | |
| Rivularia sp. MU24 UAM-305 | | | | |
| Rivularia sp. E8 UAM-319 | | | | |
| Rivularia sp. ERIVMA1 | | | | |
| Rivularia sp. ERIVE1 | | | | |
| Rivularia sp. E7 UAM-313 | | | | |
| Rivularia sp. BL2 UAM-347 | | | | |
| Rivularia sp. BL1 UAM-346 | |T..... | | |
| Rivularia sp. MA8 UAM-355 | |T..... | | |
| Calothrix sp. MU27 UMA-315 | .A...G.T.. | C....C... | | |
| Calothrix sp. MU28 UAM-341 | .A...G.T.. | C.... | | |
| Calothrix sp. E17 UAM-358 | .A...G.T.. | C.... | | |
| Calothrix sp. MU41 UAM-370 | .A...G.T.. | C....C... | | |
| Rivularia sp. ERIVMU1 | .A...G.A.. | T..... | | |
| Rivularia sp. MA14 | .A...G.A.. | T..... | | |
| Rivularia sp. ERIVALH1 | .A...G.A.. | T..... | | |
| Rivularia sp. ERIVRED1 | .A...G.A.. | T..... | | |

| | | | | | | |
|--------------|-------------|------------|------------|-------------|------------|------------|
| | 10 | 20 | 30 | 40 | 50 | 60 |
| Consensus | TGGAAATCAT | CTTGCGCTAT | GTAACCTA-G | CAATTTT-TC | TGGCGACGCT | AGTGTT-TAG |
| TJ12 UAM-372 | | |C. |C.. | |C.C. |
| TJ15 UAM-373 | | |C. |C.. | |C.C. |
| TJ14 UAM-352 | | |T.T. | ..G.A.T.. | A..T..T..A |C.T. |
| TJ16 UAM-374 | | ...A..T... | ..G.....C. | .T.....TG. | | ..C...T... |
| A1 UAM-342 | | ...A..T... |T. | .T..C..C.. | ...T..... |AT... |
| A2 | | ...A..T... |TT | .C..GA.TG. | A..... | ..C..AT... |
| | 70 | 80 | 90 | 100 | 110 | 120 |
| Consensus | ATGACCGTTG | CTTGAA-GGT | TTACGCGAAA | C-TACTTGGC | TTT-GGAACT | CC-GG--CTT |
| TJ12 UAM-372 | | T.....C... | | .T..... | ...A.....C | ..C..AG... |
| TJ15 UAM-373 | | T.....C... | | .T..... | ...A.....C | ..C..AG... |
| TJ14 UAM-352 | .C..... | ...A..C..A | | .C..... | A..G.....A | ..T..AT.C. |
| TJ16 UAM-374 | |T... | C.G..... | .C....A.. | .C.A..... | ..T..TG... |
| A1 UAM-342 |C.. |T... | C.T..T... | .C..... | ...G..... | ..T..TT... |
| A2 | |T... | ..G..... | .T..CAA.. | ...G..... | ..C..TT... |
| | 130 | 140 | 150 | 160 | 170 | 180 |
| Consensus | CAGTAGCAGT | TGGCGTTCAA | AA-ATGAAAG | AAGC-GCA-T | -GCAATTGCT | -GCGACCCCA |
| TJ12 UAM-372 | | | ..G..... | ...A..T. | A..... | G..... |
| TJ15 UAM-373 | | | ..G..... | ...A..T. | A..... | G..... |
| TJ14 UAM-352 | .T..TT... | | ..A..... | ...A..T. | G..T..... | G.....T. |
| TJ16 UAM-374 |T.. | A..... | ..G..... | ...T.GA. | T.....T.. | AA..... |
| A1 UAM-342 | .C..... | | ..A..... | ...T.TA. | C..G..... | A...TA... |
| A2 | .T..T.... | | ..A..... | .TA.T..A. | CAA...G... | AA..... |
| | 190 | 200 | 210 | 220 | 230 | 240 |
| Consensus | ACGGTATCAC | CA-AGGTGAT | TGCAGCGCAT | TGATGTCTGA | AGTTGCTAGC | TACTTTGACC |
| TJ12 UAM-372 | ..AA..... | ..A..... | | | ...AT..... | |
| TJ15 UAM-373 | ..AA..... | ..A..... | | | ...AT..... | |
| TJ14 UAM-352 |G.... | ..G..C... |TC | .C..... | .A..... | ..T...T. |
| TJ16 UAM-374 |C.... | ..G..C... |TC |G.... |G.T |C.... |
| A1 UAM-342 | .T..C..T.. | ..G..... |T... |G.... | |C.... |
| A2 | .T..A.... | ..AG..... |TCAG. | | GT.G.G.G.. | ..T..... |
| | 250 | 260 | -IGS 270 | 280 | 290 | 300 |
| Consensus | GTGCAGCATC | TGCTGTTGCA | TAATTTT--- | ---T-C-AGT | TTAAAT---- | -C--ACC--G |
| TJ12 UAM-372 | |AT.. | ...GC.G--- | ---.---.--- | ...C.AC-- | -.GC.--- |
| TJ15 UAM-373 | |AT.. | ...GC.G--- | ---.---.--- | ...C.AC-- | -.GC.--- |
| TJ14 UAM-352 | .C..... | | ...A.--- | ---.T.GCTC | ...GC--- | -----A |
| TJ16 UAM-374 | .C.....TCA | A..A..... |--- | -----TA..C | AA..GC--- | ----- |
| A1 UAM-342 |CA | A..A..... | ..G...AAT | CTT.T.A... | ..G...TTTT | T.AA...AA. |
| A2 |T..TG. | | ..G.AGAA-- | ---CA.TGTC | GC.G.AC--- | -----GTC |
| | 310 | 320 | 330 | 340 | 350 | 360 |
| Consensus | -AA---CTG | AC-AT---T- | GTCAGTTAGA | CATAAA-AAC | TTT--AAACA | AAATTTTGT- |
| TJ12 UAM-372 | C..TCG-... | ..T..ATA.A |C.. |CT.. | ...--..... |- |
| TJ15 UAM-373 | C..TCG-... | ..T..ATA.A |C.. |CT.. | ...--..... |- |
| TJ14 UAM-352 | TG.TTAA... | --GATTT.G | A.....A. | ..-.CCC.T | .A.CA..CA. | ...C.....- |
| TJ16 UAM-374 | C..GCAC... | ..G..TGT-- | --...C.... | ..-...T.G. | ...TC..... | .C.C..C.- |
| A1 UAM-342 | T..GTGA... | ..AG.TGT.G | | A.....T.G. | ...G-..... | ..G...T.T |
| A2 | T..GTAGAGA | TAA.AAGACC | CGG.ACCGA. | A..C.GT.T. | CAGGC...A. | ...AGAACAA |

```

          370          380IGS←  390          400          410          420
Consensus  ---AAAAGGG AGATAC-AAA CC-ATGAAAA CTCCTCTTAC CGAAGCAGTA -CA-CTGCTG
TJ12 UAM-372 ---..... TGG. .G.....
TJ15 UAM-373 ---..... TGG. .G.....
TJ14 UAM-352 ---...C.. ..CT.. .TC.....
TJ16 UAM-374 ---..... C... .A..... .A..... T T..G.A..A.
A1 UAM-342 TGT..T... ..C... .A..... .C.....A.. ..C T.CG.A..A.
A2 GAC.T..A.. ..TGT..G A-.....G. .A..AA.... ..A.T G..T.....

```

```

          430          440          450          460          470          480
Consensus  A-TCTCAAGG ACGTTTCTTA AGCAGCACCG AAATACAAG- -GCTTTTGGT CGTT-TCGTC
TJ12 UAM-372 .C..A..... ..C.. ..G...AC C..... ..A.....
TJ15 UAM-373 .C..A..... ..C.. ..G...AC C..... ..A.....
TJ14 UAM-352 .T..... ..A.. .G...T A..... ..C.TC....
TJ16 UAM-374 .T..... ..C...G ..T... ..T...T T..... ..T.....
A1 UAM-342 .C..... ..G...T A....C... ..C.A.....
A2 .TA..... T..... ..AT... ..T.....C T.T.AA.... ..T.GA..

```

```

          490          500          510          520          530          540
Consensus  AAGC-ACAGC TAGCTTAGAA GCTGCTAAAG CATTGACCAG CAAAGCTCAA CGTTTGGC-G
TJ12 UAM-372 ...A..... A..... ..C..A... ..A.....
TJ15 UAM-373 ...A..... A..... ..C..A... ..A.....
TJ14 UAM-352 ...T..C.. ..GT..A..TTC A..... ..A.C....A.
TJ16 UAM-374 ...T..... ..T..... .A..... .G...TG. T..... TC.....T.
A1 UAM-342 ...AG..... ..A..... ..ATC ..AG.....T.
A2 GC..TG.T.. ..A.G... ..CGT. .T.....A TC.....G .AA..AATT.

```

```

          550          560          570          580          590          600
Consensus  ATGGTGCAGC AAATGCTGTA TACCAAAAAT TCCCTTACAC CAC-CAAATG CAAGGACCTA
TJ12 UAM-372 ..... ..G..... ..T..... ..G..A.
TJ15 UAM-373 ..... ..G..... ..T..... ..G..A.
TJ14 UAM-352 ..... ..G..T..... .T..A.... ..C..... ..TAAC.
TJ16 UAM-374 .A..C.... T..C....G ..C..... ..C.....
A1 UAM-342 .A..... G...T.... ..T..G.... ..C.....
A2 .....G.. T.....T ..T..... ..T..... ..C

```

```

          610          620          630          640          650          660
Consensus  ACTACGCTTC TACT-C-A-C TGGTAAAGCA AAGTG-GTAC GTGACATCGG TTACTACTTG
TJ12 UAM-372 ..... ..C-.A.A. A...G..A. ....T....
TJ15 UAM-373 ..... ..C-.A.A. A...G..A. ....T....
TJ14 UAM-352 ...TT.... C.G.T.T.- ..T..... .T..CT. ....T.... C.....A
TJ16 UAM-374 ..... ..G.T.- ..C..G. ....G.T. C.....
A1 UAM-342 ..... ..G.A.T. ....T.T ..C....
A2 .G.T...G. .GA.T.TC-G .....GT.C .....C.CT. .C...G.A.. .C...T...

```

```

          670          680          690
Consensus  CGAATGGTTA CCTACTGCTT AGTTGCTGGT G
TJ12 UAM-372 .....
TJ15 UAM-373 .....
TJ14 UAM-352 ..C..A... .T...T..
TJ16 UAM-374 .....A...
A1 UAM-342 .....
A2 A.....A. .T...T..

```


| | | | | | | |
|----------------------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|
| | 10 | 20 | 30 | 40 | 50 | 60 |
| Consensus | | | | | | |
| SNTAJL-3 | GGCTGCTTGT | TTACGCGACA | TGGAAATCAT | TTTGCCTAT | GTAACCTACG | CAGTTTTTC-C |
| SPTAJL-1 | | | | | |T. |
| SSTAJL-7 | | | | | |T. |
| SSTAJL-1 | | | | CC..... | ..T..... | ..TAC.C.GG. |
| <i>Phormidum</i> sp. | | | | C.....C | ..C..... | ..ACA..TG. |
| | 70 | 80 | 90 | 100 | 110 | 120 |
| Consensus | | | | | | |
| SNTAJL-3 | TGGCGATGCT | AGCGTTTTGG | ATGACCGTTG | CTTAAACGGT | CTGCGCGAAA | CCTACTTGGC |
| SPTAJL-1 | | | | |G. | |
| SSTAJL-7 | | | | | | |
| SSTAJL-1 | ..T..... |C... | .C..T..... | .C.C..... | ..T..T..G. |TCAA.. |
| <i>Phormidum</i> sp. | C..T...T.C | ...A.CC.C. |T..... | ...G..T... | |CAA.. |
| | 130 | 140 | 150 | 160 | 170 | 180 |
| Consensus | | | | | | |
| SNTAJL-3 | TCTGGGAAct | CCTGGTGCTT | CTGTATCAGT | AGGCGTGCAA | AAGATGAAAG | AAGCTGCGAT |
| SPTAJL-1 | | | | |G. | |
| SSTAJL-7 | | | | | | |
| SSTAJL-1 | ...C..TGTA | T.C....GC. | .C..TG.T.C | T..T..T... |G. | ..T.....G. |
| <i>Phormidum</i> sp. |GT. | ..C....G.. |G...C | T.....T..C | ..A....G. |TC. |
| | 190 | 200 | 210 | 220 | 230 | 240 |
| Consensus | | | | | | |
| SNTAJL-3 | TGCTATTGGT | AATGATACCA | ATGGCATCAC | CAAAGGTGAT | TGCAACGCAT | TAATGGCAGA |
| SPTAJL-1 | | | | | | |
| SSTAJL-7 | | | | | | |
| SSTAJL-1 | .T.AC...C. |C... | | ...G..C... |GT.... | .G...T.T.. |
| <i>Phormidum</i> sp. | A..G..C.CC | ..C...C... | .C..... | TCGT..... |GTT.C. |T.T.. |
| | 250 | 260 | 270 | 280 | 290 | 300 |
| Consensus | | | | | | |
| SNTAJL-3 | AGTAGCTAGC | TACTTTGATC | GTGCCGCAGC | AGCAGTTGCT | TAATTCACCC | CTA--GCT-- |
| SPTAJL-1 | | | | | | |
| SSTAJL-7 | | | | | | |
| SSTAJL-1 | ...G..... |C... |A..... | ...G...G. | ..G..TAGG. | AATTA..CAT |
| <i>Phormidum</i> sp. | .A.CAGCG.. |C..C. |T..TT. |A.GC | ..AA.AG.. | T.GCG...CT |
| | 310 | 320 | 330 | 340 | 350 | 360 |
| Consensus | | | | | | |
| SNTAJL-3 | ----- | -----G | ACATGTATCA | GTTAGAAAAA | ATAAATTTTC- | -----AACCA |
| SPTAJL-1 | ----- | ----- | | | | ----- |
| SSTAJL-7 | ----- | ----- | | | | ----- |
| SSTAJL-1 | CGGCTTT-- | -----A | G.GAAGGG.T | AAC..CT..T | T..CT...A | ACTCA...TT |
| <i>Phormidum</i> sp. | TAATATCCTG | TAAAGACGC. | ..TC..CG.. | TC.GC.C... | CC...C..GT | -TACG..TT. |

| | | | | | | |
|----------------------|------------|------------|------------|-------------|------------|------------|
| | 370 | 380 | 390 | 400 | 410 | 420 |
| Consensus | | | | | | |
| SNTAJL-3 | --AAAGTTTG | TAAAAAGGGA | AATACCAAAC | TAATGAAAAC | ACCTCTCACC | GAAGCAGTAG |
| SPTAJL-1 | --..... | | | .C..... | | |
| SSTAJL-7 | --..... | | | .C..... | | |
| SSTAJL-1 | TTG..CA.CC | ACTTT..... | G.....TGGA | C.....G.. | G..AA.T..G |A.C. |
| <i>Phormidum</i> sp. | CC.....AAA | A..TT..... | G.....TC.A | C..... | C...T.G..T |TA |
| | 430 | 440 | 450 | 460 | 470 | 480 |
| Consensus | | | | | | |
| SNTAJL-3 | CAGCAGCCGA | TTCTCAAGGT | CGCTTCCTCT | CCAGCACC GA | AGTACAAGTC | GCATTTGGTC |
| SPTAJL-1 | | | | | | |
| SSTAJL-7 | | | | | | |
| SSTAJL-1 | .CT...T.. | .A...G... | .T..TT.GA | G..AT..... | .C.G...CA | .T.AAC.... |
| <i>Phormidum</i> sp. |C..... |C |GA | G..... | .C.T....A | ..T..C.... |
| | 490 | 500 | 510 | 520 | 530 | 540 |
| Consensus | | | | | | |
| SNTAJL-3 | GCTTTCGTCA | AGCTTCAGCT | AGCTTGCAAG | CAGCAAAGTC | TTTGAGCGCT | AACGCTCAAC |
| SPTAJL-1 | | | | | | |
| SSTAJL-7 | | | | | | |
| SSTAJL-1 | .T...GAG.G | G...G.T..C | ..A..G... | .T..TCGTG. | ...A.C.AAC | ..T.....GA |
| <i>Phormidum</i> sp. | .T..C..C.. | ...CAAC... | G...AG... |C..... | CC.....C | ..T..... |
| | 550 | 560 | 570 | 580 | 590 | 600 |
| Consensus | | | | | | |
| SNTAJL-3 | GTTTGACAGA | AGGCGCAGCC | CAAGCTGTGT | ACAACAAGTT | CCCTTACACC | ACCCAAATGC |
| SPTAJL-1 | | | | | | |
| SSTAJL-7 | | | | | | |
| SSTAJL-1 | AG..A.TT.. | T..T..T..A | A.T..G..T. | ..C.G..... | T..... | |
| <i>Phormidum</i> sp. | .C.....T.. | T..T..... |A.... |A.. | ...C..... | ..T..... |
| | 610 | 620 | 630 | 640 | 650 | 660 |
| Consensus | | | | | | |
| SNTAJL-3 | AAGGTGCTAA | CTTTGCTTCT | ACCAGCACAG | GTAAAGCAAA | GTGTGCCCGT | GACATTGGTT |
| SPTAJL-1 | | | | | | |
| SSTAJL-7 | | | | | | |
| SSTAJL-1 | .G...T..C. | A.AC..C... | ..TCC.GA.. | .C..GT.T.. | ...C..T..G |C..C. |
| <i>Phormidum</i> sp. |GAA... | ..AC..C... | GATGCTCGT. |C.. | ...C..... |C..C. |
| | 670 | 680 | 690 | 700 | | |
| Consensus | | | | | | |
| SNTAJL-3 | ATTATCTGCG | GATGATCACC | TACTGCTTAG | TTGCTGGTGG | TACTGG | |
| SPTAJL-1 | | | | | | |
| SSTAJL-7 | | | | | | |
| SSTAJL-1 | .C..C..... | T...G.G... |T.... | | | |
| <i>Phormidum</i> sp. | .C..C..... |G.T... | | | | |