

Universidad de Costa Rica
Facultad de Microbiología

**Aislamiento e identificación de cianobacterias en
aguas termales de origen volcánico,
Volcán Miravalles, Costa Rica**

Adriana Rojas González
Carné: 983143

Trabajo final de graduación modalidad Investigación para
optar por el grado de Licenciatura en Microbiología y
Química Clínica

Ciudad Universitaria Rodrigo Facio
San Pedro de Montes de Oca, San José

Julio, 2004

**UNIVERSIDAD DE COSTA RICA
VICERRECTORÍA DE DOCENCIA**

FACULTAD DE MICROBIOLOGÍA
CIUDAD UNIVERSITARIA RODRIGO FACIO

Acta de presentación de Requisito Final de Graduación

Sesión del Tribunal Examinador celebrada el primero de julio del año 2004, con el objeto de recibir el informe oral de la estudiante ADRIANA ROJAS GONZALEZ, carné 983143, quien se acoge al Reglamento de Trabajos Finales de Graduación bajo la modalidad de PRACTICA DE GRADUACIÓN, para optar por el grado académico de LICENCIADA EN MICROBIOLOGÍA Y QUÍMICA CLÍNICA y el título profesional de DOCTORA EN MICROBIOLOGÍA Y QUÍMICA CLÍNICA.

Están presentes los siguientes miembros del tribunal:

Dr. Fernando García Santamaría	PRESIDENTE
Dr. Esteban Chaves Olarte	
Dra. Anna Sittenfeld Appel	
Dr. Marielos Mora López	
Dr. Federico Albertazi	

ARTICULO 1

El presidente informa que el expediente de ADRIANA ROJAS GONZÁLEZ, contiene todos los documentos de rigor, incluyendo el recibo de pago de los derechos de graduación. Declara que la postulante cumplió con todos los demás requisitos del plan de estudios correspondientes, y por lo tanto, se solicita que proceda a hacer la exposición.

ARTICULO 2

La postulante ADRIANA ROJAS GONZALEZ, hace la exposición oral de su trabajo de graduación titulo "AISLAMIENTO E IDENTIFICACION DE CIANOBACTERIAS EN AGUAS TERMALES DE ORIGEN VOLCANICO, MIRAVALLS, COSTA RICA"

ARTICULO 3

Terminada la disertación, los miembros del Tribunal Examinador interrogan a la Postulante durante el tiempo reglamentario y, una vez concluido el interrogatorio, el Tribunal se retira a deliberar.

ARTICULO 4

El tribunal considera el trabajo final de graduación satisfactorio y le confiere la calificación de: 9.5

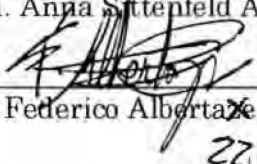
ARTICULO 5

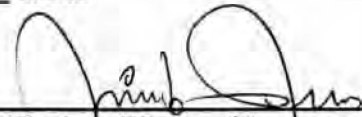
El presidente del Tribunal comunica a la Postulante el resultado de la deliberación y la declara acreedora al grado de Licenciada en Microbiología y Química Clínica y al título profesional de Doctora en Microbiología y Química Clínica.

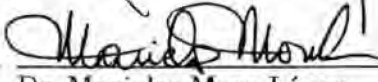
Se le indica la obligación de presentarse al acto público de juramentación al que será oportunamente convocada. Se da lectura al acta que firman los Miembros del Tribunal Examinador y la Postulante, a las 4:10 pm horas.


Dr. Fernando García Santamaría
Presidente


Dra. Anna Sittenfeld Appel


Dr. Federico Albertazzi
221


Dr. Esteban Chaves Olarte


Dr. Marielos Mora López


Adriana Rojas González
Postulante

Dedicatoria

A Jose, por ser mi apoyo incondicional, mi ángel de la guarda, mi fuente de inspiración. Porque en los momentos difíciles me has dado el valor para seguir luchando. Y porque me has regalado los momentos mas hermosos de mi vida.

A mis padres, por enseñarme que cuando se tienen sueños las dificultades son insignificantes. Gracias por creer en mí, por tanto apoyo y tanto amor.

A mis hermanos, que siempre han estado ahí cuando los he necesitado. Por que el éxito de uno es el éxito de todos.

Reconocimientos

A la Dra. Ana Sittenfeld, por tantas enseñanzas, por permitirme aprovechar su experiencia y conocimiento y por ser una guía en este campo de la Microbiología, antes desconocido para mí. Agradezco su confianza y el apoyo que en todo momento me brindó.

A Federico Albertazzi y Heidi Villalobos, por su gran ayuda en la realización de las técnicas moleculares, su aporte fue vital para la llevar a cabo este proyecto. Muchas gracias por su confianza, motivación, tiempo, y sobre todo por su amistad.

Al mis compañeros del laboratorio tres: Lucy, Viviana, Adriana y Ronald. Su amistad y se ayuda hicieron de este trabajo una experiencia muy grata y valiosa.

Índice General

	Pág.
Dedicatoria	ii
Reconocimientos	iii
Índice General	iv
Índice de Figuras	vii
Índice de Cuadros	ix
Objetivos	x
Resumen	xi
1. Introducción	1
1.1 Características generales	1
1.2 Clasificación taxonómica	2
1.2.1 Sección I	2
1.2.1.1 Género <i>Synechococcus</i>	3
1.2.1.2 Género <i>Gleotheca</i>	4
1.2.1.3 Género <i>Gleobacter</i>	5
1.2.1.4 Género <i>Gleocapsa</i>	5
1.2.1.5 Género <i>Synechocystis</i>	6
1.2.1.6 Género <i>Chamaesiphon</i>	7
1.2.2 Sección II	7
1.2.3 Sección III	10
1.2.4 Sección IV	12
1.2.5 Sección V	16
1.3 Reconocimiento de cianobacterias en su ambiente natural	18
1.4 Hábitats típicos de las cianobacterias	19
1.5 Desarrollo evolutivo de la termotolerancia	20
1.6 Actividad volcánica de Costa Rica	20
1.7 Aguas termales	21
1.8 Origen y características de las fuentes termales	21
1.9 Clasificación de las aguas termominerales	22
1.9.1 Temperatura	22
1.9.2 Acidez y composición química	22
1.10 Ejemplos de aguas termales en Costa Rica	23

1.10.1 Aguas cloruradas	23
1.10.2 Aguas bicarbonatadas del Valle Central	24
1.10.3 Aguas sulfatadas de Barranca, San Ramón y Tabacón	25
1.10.4 Aguas sulfurosas	25
1.11 Campo Geotérmico Miravalles	26
1.11.1 Composición química e isotópica de los fluidos del Campo Geotérmico Miravalles	26
1.12 Usos de las fuentes termales	27
1.12.1 Vigilancia volcánica	27
1.12.2 Usos para la salud	27
1.10.2.1 Hidroterapia	28
1.10.2.2 Geoterapia	29
2.10.2.3 Desarrollo turístico	29
1.13 Técnica de amplificación del ADN	29
1.14 Técnica de secuenciación del ADN	30
2. Justificación	32
3. Materiales y métodos	33
3.1 Colecta de las muestras	33
3.1.1 Sitio	33
3.1.2 Sitio 2	34
3.1.3 Sitio 3	35
3.2 Análisis inicial	35
3.3 Caracterización microscópica	36
3.4 Cultivo	36
3.5 Purificación	36
3.5.1 Aislamiento de colonias en agar BG11	36
3.5.2 Tratamiento con cicloheximida	36
3.5.3 Tratamiento con Lysol	37
3.5.4 Tratamiento rápido con ampicilina	37
3.5.5 Cultivo en Agar BG11 con ampicilina	37
3.6 Preparación de las muestras para la descontaminación	38
3.7 Prueba de esterilidad	38
3.8 Extracción de ADN	39
3.9 Amplificación del ADN	39

3.10 Elución de la banda de ADN	41
3.11 Cuantificación del ADN eluido	41
3.12. Secuenciación	42
3.13 Análisis de la secuenciación	42
3.14 Congelación de cianobacterias	43
4. Resultados	44
4.1 Selección de las muestras	44
4.2 Análisis inicial:	44
4.3 Análisis de los cultivos	45
4.4 Identificación de las bacterias contaminantes aisladas	47
4.5 Tratamiento con cicloheximida:	47
4.6 Tratamiento con Lysol:	48
4.7 Tratamiento rápido con ampicilina	48
4.8 Cultivo en Agar BG11 con ampicilina	48
4.9. Análisis microscópico y descripción de las muestras descontaminadas con ampicilina	48
4.10 Extracción de ADN	53
4.11 Amplificación por PCR	54
4.12 Secuenciación	54
5. Discusión	57
6. Conclusiones	62
7. Referencias	64
Anexo 1	68
Anexo 2	71

Índice de Figuras

	Pág
Figura 1 Microfotografía de una especie perteneciente al género <i>Synechococcus</i>	4
Figura 2 Microfotografía de una colonia perteneciente al género <i>Gleotheca</i>	5
Figura 3 Microfotografía de una colonia perteneciente al género <i>Gleobacter</i>	5
Figura 4 Microfotografía de una especie perteneciente al género <i>Gleocapsa</i>	6
Figura 5 Microfotografía de una especie perteneciente al género <i>Synechocystis</i>	6
Figura 6 Microfotografía de una especie perteneciente al género <i>Chamaesiphon</i>	7
Figura 7 Microfotografía de una especie perteneciente al género <i>Dermocarpa</i>	8
Figura 8 Microfotografía de una especie perteneciente al género <i>Myxosarcina</i>	9
Figura 9 Microfotografía de una especie perteneciente al género <i>Chroococcidiopsis</i>	9
Figura 10 Microfotografía de una especie perteneciente al grupo <i>Pleurocapsa</i>	9
Figura 11 Microfotografía de una especie perteneciente al género <i>Oscillatoria</i>	11
Figura 12 Microfotografía de una especie perteneciente al género <i>Spirulina</i>	11
Figura 13 Microfotografía de una especie perteneciente al género <i>Arthrospira</i>	11
Figura 14 Microfotografía de una especie perteneciente al género <i>Lyngbya</i>	12
Figura 15 Microfotografía de una especie perteneciente al género <i>Pseudoanabaena</i>	12
Figura 16 Microfotografía de una especie perteneciente al género <i>Anabaena</i>	14
Figura 17 Microfotografía de una especie perteneciente al género <i>Nodularia</i>	14
Figura 18 Microfotografía de una especie perteneciente al género <i>Nostoc</i>	14
Figura 19 Microfotografía de una especie perteneciente al género <i>Scytonema</i>	15
Figura 20 Microfotografía de una especie perteneciente al género <i>Calothrix</i>	15
Figura 21 Microfotografía de una especie perteneciente al género <i>Cylindrospermum</i>	15
Figura 22 Microfotografía de una especie perteneciente al género <i>Fischerella</i>	17
Figura 23 Microfotografía de una especie perteneciente al género <i>Chlorogloeopsis</i>	17

Figura 24 Microfotografía de una especie perteneciente al género <i>Stigonema</i>	17
Figura 25 Microfotografía de una especie perteneciente al género <i>Hapalosiphon</i>	18
Figura 26. Esquema de los pasos que se dan en una reacción en cadena de la polimerasa.	30
Figura 27 Área de hornillas y fumarolas. Proyecto Geotérmico Miravalles	33
Figura 28 Fuente de aguas termales detrás de Termomania	34
Figura 29 Fuente de aguas termales ubicado detrás de la planta geotérmica	35
Fig. 30 Micro fotografía de la una preparación al fresco de la muestra 2.1 (unicelular) (100x)	50
Fig. 31 Micro fotografía de la una preparación al fresco de la muestra 2.1 (Filamentosa) (100x)	50
Fig. 32 Micro fotografía de la una preparación al fresco de la muestra 2.2. (100x)	50
Fig. 33 Micro fotografía de la una preparación al fresco de la muestra 2.3. (100x)	51
Fig. 34 Micro fotografía de la una preparación al fresco de la muestra 2.4. (100x)	51
Fig. 35 Micro fotografía de la una preparación al fresco de la muestra 2.5. (100x)	51
Fig. 36 Micro fotografía de la una preparación al fresco de la muestra 2.6. (100x)	52
Fig. 37 Micro fotografía de la una preparación al fresco de la muestra 3.1. (100x)	52
Fig. 38 Micro fotografía de la una preparación al fresco de la muestra 3.11 (100x)	52
Fig. 39 Micro fotografía de la una preparación al fresco de la muestra 3.13 (100x)	53
Fig. 40 Fotografía del gel de agarosa donde se corrieron los productos de la extracción del ADN.	53
Fig. 41 Secuencia de 530 pb correspondiente a la muestra 2.4	54
Fig. 42 Comparación de los porcentajes de similitud de la secuencia del fragmento de ADN de la muestra 2.4 con los géneros de cianobacterias seleccionados	55
Fig. 43 Árbol filogenético construido con el método de Kimura NJ, 2 parámetros con 1000 reemplazos	56
Fig. 44 Árbol filogenético construido con el método Máxima Parsimonia con 1000 reemplazos.	56

Índice de Cuadros

	Pág.
Cuadro 1. Características diferenciales de los géneros de cianobacterias ubicadas en la Sección I.	3
Cuadro 2. Características de los géneros de cianobacterias ubicadas en la Sección II.	8
Cuadro 3. Características diferenciales de los géneros de cianobacterias ubicadas en la Sección III.	10
Cuadro 4. Características diferenciales de los géneros de cianobacterias ubicadas en la Sección IV.	13
Cuadro 5. Características diferenciales de los géneros de cianobacterias ubicadas en la Sección V.	16
Cuadro 6 Tipos de aguas en sistemas geotermales según Henley	23
Cuadro 7. Composición química de las fuentes termales N-01, N-02, en ppm, Campo Geotérmico Miravalles, Costa Rica, 1997-1998.	27
Cuadro 8. Principales fuentes termales utilizadas turísticamente en Costa Rica	28
Cuadro 9. Proporción de reactivos por muestra utilizados en la reacción de polimerización para la amplificación del ADN.	40
Cuadro 10. Escalera alélica DNA Quanti-Ladder™, de OriGene	42
Cuadro 11. Características microscópicas de las muestras iniciales colectadas en el Sitio 2	44
Cuadro 12. Características microscópicas de las muestras iniciales colectadas en el Sitio 3	45
Cuadro 13. Características microscópicas de los cultivos en medio BG11 líquido de las muestras colectadas en el Sitio 2	46
Cuadro 14. Identificación de las bacterias contaminantes aisladas de los cultivos en medio líquido BG11, correspondientes a ambos sitios de muestreo	47
Cuadro 15. Características microscópicas y probable clasificación de las muestras descontaminados en medio BG11 líquido	49
Cuadro 16 Porcentaje de similitud de la secuencias de los 11 géneros elegidos con la muestra 2.4	55

Objetivos

Objetivo general

Aislar e identificar las cianobacterias presentes en aguas termales de origen volcánico colectadas en el Volcán Miravalles, Costa Rica.

Objetivos específicos

- Caracterizar las especies aisladas según las condiciones de colecta (temperatura y pH).
- Estandarizar el protocolo de purificación y aislamiento para la obtención de cultivos axénicos y adaptarlos a las condiciones de laboratorio.
- Estandarizar el protocolo de extracción y amplificación de ADN por la técnica de PCR.
- Caracterizar las especies aisladas utilizando regiones específicas amplificadas con secuencias de gen ribosomal 16S (ARNr 16s), y compararlas con bases de datos preexistentes.

Resumen

Debido a su ubicación geográfica, Costa Rica posee una gran cantidad de volcanes activos, y en sus alrededores se originan nacientes de aguas termales que albergan numerosas formas de vida, entre ellas las cianobacterias.

Con el fin de determinar las especies de cianobacterias presentes en diferentes fuentes de aguas termales de origen volcánico, se colectaron un total de 23 muestras. Los sitios de colecta seleccionados se ubican en las fuentes termales localizadas en el Volcán Miravalles, cercanas al complejo de la planta geotérmica Miravalles, del Instituto Costarricense de Electricidad (Guayabo y Fortuna, Guanacaste), e incluyen diversas condiciones de temperatura y pH.

Las muestras recolectadas se caracterizaron por su alta complejidad, dada por la presencia de múltiples especies en una muestra, y la contaminación con otros tipos de microorganismos, por lo cual se hizo necesaria la estandarización de diferentes métodos de purificación y aislamiento para la obtención de cultivos axénicos.

La identificación de las especies presentes en la muestra se realizó en forma general mediante la observación al microscopio, en donde se ubicaron los aislamientos en los distintos grupos de cianobacterias, según las características morfológicas que presentaron.

Por otra parte se llevaron a cabo procedimientos de taxonomía molecular basados en la secuenciación de fragmentos específicos para los genes del ARN ribosomal 16S (regiones conservadas e hipervariables), los cuales requirieron de la estandarización de los protocolos de extracción de ADN y amplificación por PCR.

1. Introducción

La formación de roca sedimentaria más antigua conocida, que data de hace aproximadamente 3700 millones de años, a inicios del Precámbrico, contiene microfósiles de organismos similares a las cianobacterias. Se cree que este tipo de microorganismo tuvo un gran impacto en el ambiente global, ya que al producir grandes cantidades de oxígeno, generó una atmósfera aeróbica que permitió la proliferación de otras formas de vida. El oxígeno produjo cambios en la composición atmosférica, desplazando del ambiente otros gases; esto se puede evidenciar con el hallazgo de bandas de hierro en registros fósiles. Los registros fósiles de las cianobacterias son fáciles de reconocer. Presentan un tamaño mayor al de otras bacterias, y la morfología ha sido bastante conservada a través de la evolución. A este tipo de fósiles se les llama estromatolitos y se formaron cuando la fotosíntesis produjo una disminución en los niveles de dióxido de carbono en el agua circundante propiciando la precipitación de carbonato de calcio y otros minerales sobre la colonia de bacterias. (Palinska *et al.* 2002)

Hoy en día este antiguo grupo de bacterias muestra una gran diversidad de propiedades fisiológicas y morfológicas. Su capacidad de adaptación a amplios rangos de condiciones ambientales, incluyendo las extremas, le han permitido colonizar casi todos los ecosistemas acuáticos y terrestres.

Este grupo de microorganismos posee gran importancia ecológica en los ciclos globales de carbono, oxígeno y nitrógeno y por eso merece especial énfasis.

1.1 Características generales

Todas las cianobacterias cuentan con una pared celular que contiene peptidoglicano y debido a su estructura se clasifican como Gram-negativas. Constituyen uno de los subgrupos más grandes, y se distinguen por realizar fotosíntesis oxigénica en condiciones de aerobiosis. Las cianobacterias incluyen procariotas fototróficos oxigénicos que contienen clorofila *a* y ficobilinas. Aunque, en general las células procarióticas carecen de estructuras internas delimitadas por membrana, las

cianobacterias, contienen un elaborado y altamente organizado sistema de membranas internas llamadas tilacoides, donde almacenan la clorofila y otros pigmentos fotosintéticos como ficoeritrina y ficocianina, que utilizan para la captación luz solar necesaria para la síntesis de azúcares. (Palinska *et al.* 2002)

Algunas cianobacterias (especialmente las de la sección IV y V) son capaces de convertir el nitrógeno atmosférico en amonio, nitratos o nitritos. Esta habilidad de fijar nitrógeno es exclusiva de los procariotas. En algunas especies de plantas, la interacción con la cianobacteria es obligatoria, y la fijación de nitrógeno que se produce da origen a una asociación simbiótica (Schlegel, 1993)

Por casi 150 años, las cianobacterias fueron clasificadas como un grupo especial de algas, llamadas algas verde azuladas. Debido a esto, su clasificación fue desarrollada por ficólogos, bajo las normas del Código Internacional de Nomenclatura Botánica. Muchos nombres han sido propuestos para denominar este grupo de microorganismos, y los sinónimos han sido utilizados libremente por los autores. Hoy día es aceptado que las cianobacterias son parte del dominio Bacteria, sin embargo, entre los ficólogos y botánicos, prevalece el término Cyanophyceae, aunque los bacteriólogos consideran que el término Cianobacteria es más apropiado debido a las propiedades procariotas de estos fototrofos (Rippka, 1988).

En cuanto a su morfología pueden ser unicelulares o formar estructuras coloniales; la mayoría van a estar rodeadas por una envoltura mucilaginosa. Algunas cianobacterias se diferencian en tres tipos de células: vegetativa, akinetos o formas de resistencia y heterocistos que son estructuras de mayor tamaño, de pared gruesa y contenido hialino que contienen las enzimas necesarias para la fijación de nitrógeno libre.

1.2 Clasificación taxonómica

Diferencias en estructura y desarrollo, permiten agrupar las cianobacterias en cinco grandes subgrupos:

1.2.1 Sección I: Organismos unicelulares que se reproducen por fisión binaria o por brotes; estas células pueden ser esféricas, cilíndricas u ovales y desde el punto de vista

estructural, son las cianobacterias más simples. En esta sección encontramos seis géneros *Synechococcus*, *Gleothoece*, *Gleobacter*, *Synechocystis*, *Gleocapsa* y *Chamaesiphon*, que se distinguen por las características morfológicas mostradas en el Cuadro 1. De esta sección, son los tres primeros géneros los más importantes. (Rippka *et al.* 1979).

Cuadro 1. Características diferenciales de los géneros de cianobacterias ubicadas en la Sección I.

		División en un plano	División en dos o tres planos
		Cubierta presente	
Reproducción por fisión binaria	Tilacoides ausentes	<i>Gleobacter</i>	
	Tilacoides presentes	Cubierta presente	Cubierta presente
		<i>Gleothoece</i>	<i>Gleocapsa</i>
		Cubierta ausente	Cubierta ausente
		<i>Synechococcus</i>	<i>Synechocystis</i>
Reproducción por brotes	Tilacoides presentes	<i>Chamaesiphon</i>	

Adaptado de Rippka *et al.* (1979).

1.2.1.1 Género *Synechococcus*

Las células se pueden presentar individuales, en pares o en cadenas cortas y están desprovistas de cubierta. La mayoría de especies pertenecientes a este género, producen en cultivo, cantidades considerables de un material gelatinoso extracelular, sin formar agregados (Fig.1). En 1849, Nageli propone el género *Aphanothece*, para organismos similares a *Synechococcus* que forman agregados irregulares unidos por una capa de material gelatinoso común. Pero la permanencia de este género es cuestionable, particularmente después de que el mismo Nageli sugiriera que debía fusionarse con *Synechococcus*. Más adelante en 1976, Komarek propone la creación de un nuevo género, denominado *Cyanothece*, que contenía algunas especies ya ubicadas en

Synechococcus, cuya característica principal, era que las células se organizaban en pares o individualmente, pero nunca en cadenas (Rippka *et al.* 1979).

Su propuesta fue rechazada basándose en el hecho de que la formación de cadenas es fuertemente dependiente de las condiciones de cultivo. El ADN contiene un porcentaje de GC que va del 39 al 71% y las cepas de referencia para este género están depositadas en la colección del Instituto Pasteur (IP) bajo los números PCC7202, PCC6301 y PCC6307, para bajo, intermedio y alto porcentaje de GC, respectivamente (Rippka *et al.* 1979).

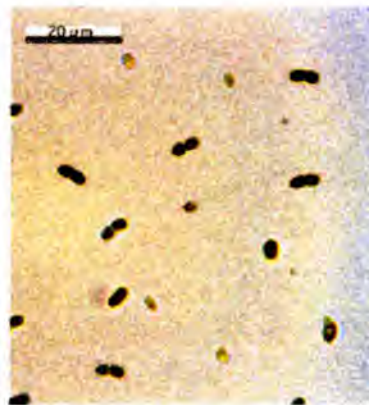


Fig.1 Microfotografía de una especie perteneciente al género *Synechococcus* (tomado de http://www.ibvf.cartuja.csic.es/Cultivos/Seccion_I.htm)

1.2.1.2 Género *Gleothoece*

Se distingue del género *Synechococcus* por la formación de una cubierta bien definida, que rodea tanto células individuales como pequeños grupos celulares, produciendo así los agregados característicos (Fig. 2). El cultivo la formación de cubierta es estable y constante. Además las cepas de este género, comparten una propiedad fisiológica distintiva, que no poseen otras cepas de la sección I, la capacidad de fijar nitrógeno aeróbicamente. El ADN contiene un porcentaje de GC entre 40 y 43% y la cepa de referencia en el IP es la PCC6501. (Rippka *et al.* 1979).

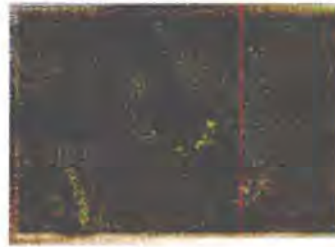


Fig.2 Microfotografía de una colonia perteneciente al género *Gleotheca* (tomado de http://www.ibvf.cartuja.csic.es/Cultivos/Seccion_1.htm)

1. Género *Gleobacter*

Este género fue creado para incluir una especie de cianobacteria, que al microscopio de luz, posee una apariencia similar a una cepa del género *Gleotheca*, pero muestra una ultraestructura diferente a cualquier otra cianobacteria conocida, ya que tanto los tilacoides como los ficobilisomas típicos, están ausentes (Fig.3). Una membrana citoplasmática de contorno simple es el único sistema membranoso dentro de la célula, y esta contiene adherida a su superficie interna una capa de ficobiliproteínas. El ADN contiene un porcentaje de GC de 64% (Rippka *et al.* 1979).

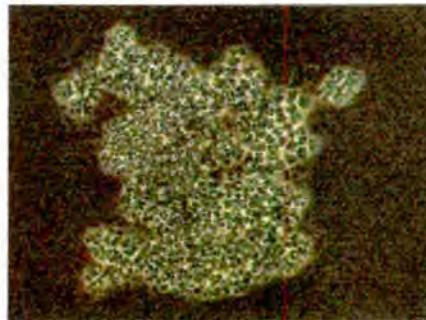


Fig.3 Microfotografía de una colonia perteneciente al género *Gleobacter* (tomado de <http://www-cyanosite.bio.purdue.edu/index.html>)

2. Género *Gleocapsa*

Son cianobacterias unicelulares esféricas, que se dividen regularmente en tres planos sucesivos en ángulo recto. Poseen cubierta (Fig.4). El ADN contiene un

porcentaje de GC que va del 40 al 46% y la cepa de referencia en el IP para este género es la PCC73106 (Rippka *et al.* 1979).



Fig.4 Microfotografía de una especie perteneciente al género *Gleocapsa*
(tomado de <http://www-cyanosite.bio.purdue.edu/index.html>)

3. Género *Synechocystis*

Son cianobacterias unicelulares esféricas, que se dividen en dos o tres planos sucesivos en ángulo recto. No poseen cubierta ni producen agregados, las células se observan individuales o en pares (Fig.5).

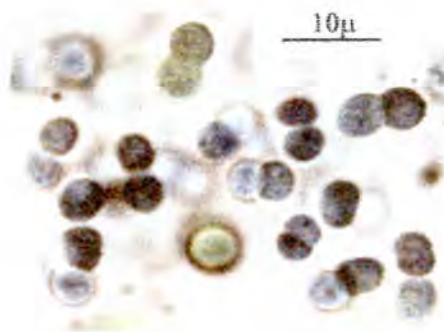


Fig.5 Microfotografía de una especie perteneciente al género *Synechocystis*
(tomado de <http://www-cyanosite.bio.purdue.edu/index.html>)

4. Género *Chamaesiphon*

Se incluyen en este género, dos cepas que se reproducen por la formación sucesiva de brotes esféricos en un polo de la célula ovoide. Este modo de reproducción es distintivo de este género (Fig. 6).



Fig.6 Microfotografía de una especie perteneciente al género *Chamaesiphon*
(tomado de <http://www.plantbio.com/Bio2/Fphytopl/fpp2012.htm>)

1.2.2 Sección II

También son organismos unicelulares, y se caracterizan por un tipo especial de reproducción, la fisión múltiple, que no ha sido reportado en ningún otro grupo procariótico y que genera una célula reproductiva especializada, esférica más pequeña y a veces móvil denominada baeocito. Además, la célula vegetativa está siempre encapsulada por una capa fibrosa adicional. En esta sección se ubican 32 cepas clasificadas en 5 géneros: *Dermocarpa*, *Xenococcus*, *Dermocarpella*, *Myxosarcina* y *Chroococcidiopsis*. Además se incluyó un grupo provisional llamado *Pleurocapsa* (Cuadro. 2) (Rippka *et al.* 1979).

Cuadro 2. Características de los géneros de cianobacterias ubicadas en la Sección II.

Reproducción sólo por fisión múltiple	⊙ Baeocitos sin pared externa fibrosa ● Baeocitos con pared externa fibrosa Baeocitos móviles ⊙ <i>Dermocarpa</i> Baeocitos no móviles ● <i>Xenococcus</i>
	La fisión binaria da origen a una estructura con forma de pera compuesta por una o dos células basales y una apical, luego la fisión múltiple de la célula apical genera baeocitos móviles ⊙ <i>Dermocarpella</i> La fisión binaria produce agregados de células cúbicas, subsecuentemente la fisión múltiple genera Baeocitos móviles ⊙ <i>Myxosarcina</i> Baeocitos no móviles ● <i>Chroococidiopsis</i> La fisión binaria produce agregados de células irregulares (pseudofilamentosas), luego la fisión múltiple genera baeocitos móviles ⊙ <i>Pleurocapsa</i> (grupo)

Adaptado de Rippka *et al.* (1979).

Algunas características de organismos pertenecientes a la Sección II se ejemplifican con las figuras de la 7 a la 10.

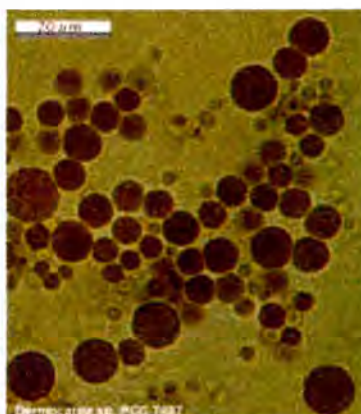


Fig.7 Microfotografía de una especie perteneciente al género *Dermocarpa* (tomado de http://www.ibvf.cartuja.csic.es/Cultivos/Seccion_II.htm)

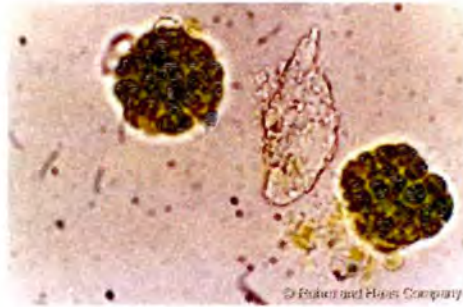


Fig.8 Microfotografía de una especie perteneciente al género *Myxosarcina* (tomado de http://www.autocoat.com/rhcis/markets_and_products/images/myxosarcina.jpg)

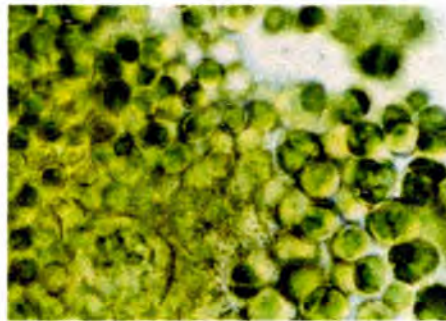


Fig.9 Microfotografía de una especie perteneciente al género *Chroococcidiopsis* (tomado de <http://www.nirgal.net/terraformation.html>)

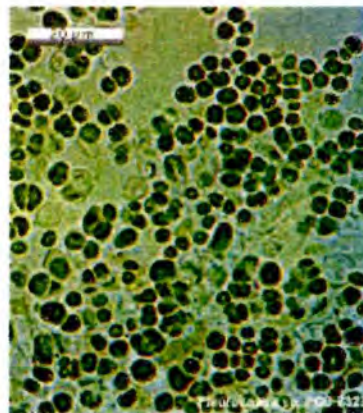


Fig.10 Microfotografía de una especie perteneciente al grupo *Pleurocapsa* (tomado de http://www.ibvf.cartuja.csic.es/Cultivos/Seccion_II.htm)

De la sección III a la V, los organismos van a ser filamentosos, formados por tricomas que crecen por división de células intercalares. La reproducción se da por ruptura de tricomas en secciones mas cortas.

1.2.3 Sección III

Los tricomas están compuestos sólo por células vegetativas, son uniseriados y la división se da por fisión binaria, sólo en un plano. No producen heterocistos. En esta sección se ubican los géneros: *Oscillatoria*, *Spirulina*, *Arthrospira*, *Lynbya*, *Micocoleus* y *Pseudoanabaena* entre otros (Cuadro. 3) (Castenholz, 2001).

Cuadro 3. Características diferenciales de los géneros de cianobacterias ubicadas en la Sección III.

Tricomas helicoidales	Las células que forman los tricomas son isodiamétricas, cilíndricas o en forma de disco; pueden tener o no pequeñas constricciones entre células adyacentes. Reproducción por ruptura transcelular de tricomas.	Tricoma móvil; ya sea sin cubierta o con una cubierta delgada <i>Spirulina</i>
Tricomas rectos	Las células que forman los tricomas en forma de disco y no presentan constricciones profundas entre células adyacentes. Reproducción por ruptura transcelular de tricomas.	Tricoma móvil; ya sea sin cubierta o con una cubierta delgada <i>Oscillatoria</i>
		Tricoma no móvil; rodeado de una cubierta gruesa <i>LPP grupo A</i>
	Las células que forman los tricomas son isodiamétricas o cilíndricas, poseen un grado variable de constricción entre células adyacentes. Reproducción por ruptura transcelular o intercelular de tricomas.	Tricoma móvil; sin cubierta, células contienen tricoma polar y están separadas por constricciones profundas <i>Pseudoanabaena</i>
		Otras, móviles e inmóviles, con o sin cubierta <i>LPP grupo B</i>

Adaptado de Rippka *et al.* (1979).

Algunas características de organismos pertenecientes a la Sección III se ejemplifican con las figuras de la 11 a la 15.

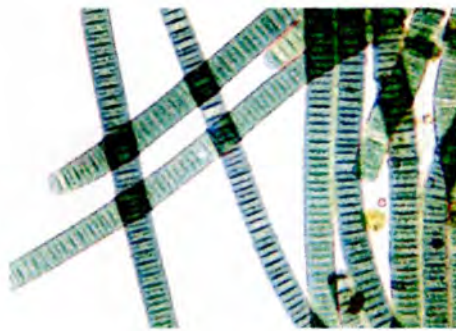


Fig.11 Microfotografía de una especie perteneciente al género *Oscillatoria* (tomado de http://botit.botany.wisc.edu/images/130/Bacteria/Cyanobacteria/Oscillatoria/_MC.html)

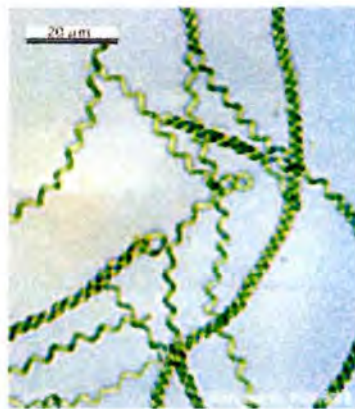


Fig.12 Microfotografía de una especie perteneciente al género *Spirulina* (tomado de http://www.ibvf.cartuja.csic.es/Cultivos/Seccion_III.htm)

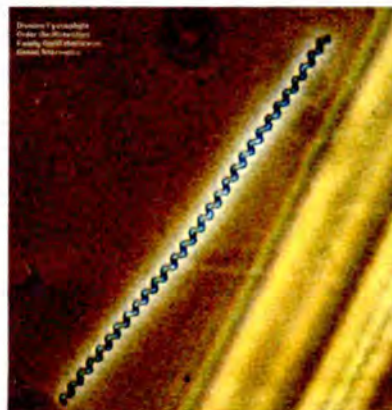


Fig.13 Microfotografía de una especie perteneciente al género *Arthrospira* (tomado de <http://ag.arizona.edu/limnology/Cyanophyta/arthro1.jpg>)

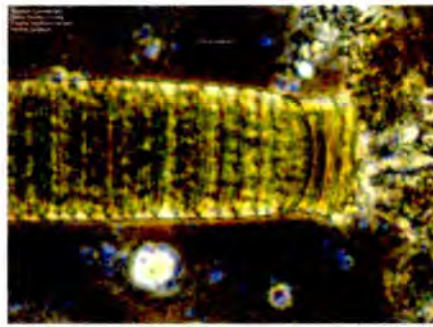


Fig.14 Microfotografía de una especie perteneciente al género *Lyngbya*
(tomado de <http://ag.arizona.edu/limnology/Cyanophyta/lyng2.jpg>)



Fig.15 Microfotografía de una especie perteneciente al género *Pseudoanabaena*
(tomado de <http://www.uwm.edu.pl/wbiol/tablica/glony/index2.htm>)

Los organismos de la sección IV y V tienen la capacidad de diferenciación celular. En ausencia de fuentes de nitrógeno combinado, una pequeña fracción de tricomas se desarrolla a heterocistos que se distinguen por su pared más gruesa, pigmentación débil y presencia de gránulos polares refráctiles.

1.2.4 Sección IV

En este grupo la germinación de un akineto da origen a un nuevo tricoma uniseriado mediante la división en un solo plano. Con estas características ubicamos en este grupo, 36 cepas distribuidas en 6 géneros. Muchos de los géneros en esta sección están definidos y distinguidos por propiedades del desarrollo que no tienen lugar en las definiciones tradicionales (Cuadro 4). Dichas propiedades son difíciles de determinar en el material de campo, pero se hacen evidentes en cultivo puro. Los géneros que se

ubican en esta sección incluyen: *Anabaena*, *Nodularia*, *Cylindrospermum*, *Nostoc*, *Scytonema* y *Calothrix* .(Rippka et al. 1979).

Cuadro 4. Características diferenciales de los géneros de cianobacterias ubicadas en la Sección IV.

Reproducción por ruptura de tricomas al azar, y algunos por germinación de akinetos para producir tricomas indistinguibles de las células vegetativas maduras	Heterocistos intercalares o terminales, posición de los akinetos variable	Células vegetativas esféricas ovoides o cilíndricas Anabaena
		Células vegetativas con forma de disco Nodularia
	Heterocistos exclusivamente terminales, en ambos extremos del tricoma, akinetos siempre adyacentes al heterocisto	Células vegetativas son isodiamétricas o cilíndricas Cylindrospermum
Reproducción similar a la anterior pero también con formación de hormogonia distinguible de los tricomas maduros por la ausencia de heterocistos y por la presencia de más de una de las siguientes características: deslizamiento rápido, movilidad, células pequeñas, vacuolas con gas.	Hormogonia da origen a los filamentos jóvenes que poseen un heterocisto terminal en ambos extremos de la cadena celular	Células vegetativas esféricas, ovoides, o cilíndricas, akinetos no adyacentes los heterocistos, a menudo en cadenas Nostoc
	Hormogonia da origen a los filamentos jóvenes que poseen un heterocisto terminal en un solo extremo de la cadena celular	Tricomas maduros compuestos de células de diámetro regular, heterocistos intercalares, células vegetativas con forma de disco, isodiamétricas o cilíndricas Scytonema
		Tricomas maduros se estrechan en la base, que posee un heterocisto terminal en el ápice, células vegetativas con forma de disco, isodiamétricas o cilíndricas Calothrix

Adaptado de Rippka et al. (1979).

Algunas características de organismos pertenecientes a la Sección IV se ejemplifican con las figuras de la 16 a la 21.



Fig.16 Microfotografía de una especie perteneciente al género *Anabaena*
(tomado de http://www.ibvf.cartuja.csic.es/Cultivos/Seccion_IV.htm)

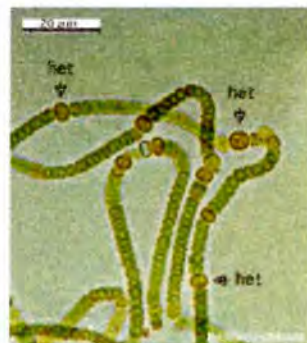


Fig.17 Microfotografía de una especie perteneciente al género *Nodularia*
(tomado de http://www.ibvf.cartuja.csic.es/Cultivos/Seccion_IV.htm)



Fig.18 Microfotografía de una especie perteneciente al género *Nostoc*
(tomado de http://www.ibvf.cartuja.csic.es/Cultivos/Seccion_IV.htm)



Fig.19 Microfotografía de una especie perteneciente al género *Scytonema*
(tomado de http://www.ibvf.cartuja.csic.es/Cultivos/Seccion_IV.htm)

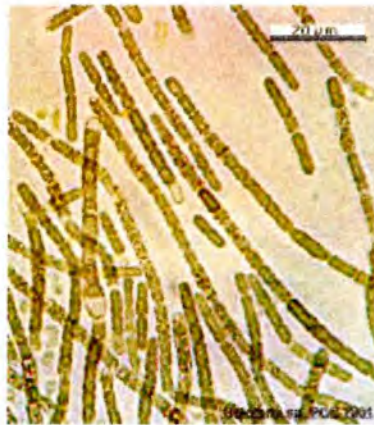


Fig.20 Microfotografía de una especie perteneciente al género *Calothrix*
(tomado de http://www.ibvf.cartuja.csic.es/Cultivos/Seccion_IV.htm)



Fig.21 Microfotografía de una especie perteneciente al género *Cylindrospermum*
(tomado de <http://www.isis.de/members/~ralfwagner/Bilder/Cylindrospermum.jpg>)

1.2.5 Sección V

Las cianobacterias agrupadas en esta sección, se caracterizan por la germinación de un akineto da origen a un agregado multicelular mediante la división en muchos planos. Los géneros son: *Fischerella*, *Chlorogloeopsis*, *Stigonema* y *Hapalosiphon*. El género *Fischerella* contiene siete cepas filamentosas y ramificadas, todas termofilicas (Rippka *et al.* 1979). Las características de los géneros *Fischerella* y *Chlorogloeopsis* se describen en el cuadro 5:

Cuadro 5. Características diferenciales de los géneros *Fischerella* y *Chlorogloeopsis* ubicados en la Sección V.

Reproducción por ruptura de tricomas al azar, por formación de hormogonia y germinación de akinetos	Hormogonia compuesta de pequeñas células cilíndricas, que se alargan y se convierten en esféricas, desarrollo de heterocistos en posición terminal e intercalar	Células del tricoma maduro se dividen en mas de un plano, forma agregados irregulares que contienen heterocistos terminales, en donde se produce la hormogonia <i>Chlorogloeopsis</i>
	Hormogonia compuesta de pequeñas células cilíndricas, que se alargan y se redondean, desarrollo de heterocistos casi exclusivamente en posición intercalar	Células del tricoma maduro se dividen en mas de un plano, para producir un tricoma multiseriado con ramas laterales uniseriadas, los heterocistos son terminales o laterales en el tricoma primario, la hormogonia es producida en el final de los tricomas o en las ramificaciones laterales <i>Fischerella</i>

Adaptado de Rippka *et al.* (1979).

Algunas características de organismos pertenecientes a la Sección V se ejemplifican con las figuras de la 22 a la 25.



Fig.22 Microfotografía de una especie perteneciente al género *Fischerella*
(tomado de http://www.ibvf.cartuja.csic.es/Cultivos/Seccion_V.htm)

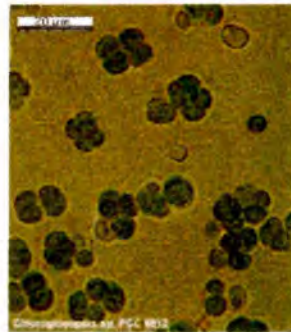


Fig.23 Microfotografía de una especie perteneciente al género *Chlorogloeopsis*
(tomado de http://www.ibvf.cartuja.csic.es/Cultivos/Seccion_V.htm)



Fig.24 Microfotografía de una especie perteneciente al género *Stigonema*
(tomado de http://www.cobra.ac.uk/introduction/html/why_cobra_important.cfm)



Fig.25 Microfotografía de una especie perteneciente al género *Hapalosiphon*
(tomado de http://forest.mtu.edu/students/jlmusolf/hapalosiphon_Mc.jpg)

1.3 Reconocimiento de cianobacterias en su ambiente natural

Este aspecto constituye un requisito para su aislamiento. Las cianobacterias ocupan un rango bastante amplio de nichos en tierra, ríos, océanos y ambientes hipersalinos en donde crecen de forma abundante, al grado de ser perceptibles a simple vista. La identificación tentativa a la hora de la colecta, se ve facilitada por el color característico de estos microorganismos que va de verde a verde azulado y verde olivo. También se han descrito variantes de color rojo a púrpura e inclusive especies de color negro. El color es principalmente determinado por la concentración relativa de los pigmentos solubles ficocianina y ficoeritrina y en menor grado por la clorofila a y los carotenoides. (Glazer, 1998)

Aunque el color sea indicativo, la prueba final de que el espécimen pertenece al grupo de las cianobacterias consiste en: 1. La examinación minuciosa de la muestra al microscopio, que demuestre que se trata de microorganismos procariotas, 2. La caracterización de requerimientos para su crecimiento y 3. Un análisis del contenido de pigmentos, que excluye la posibilidad de que sean Proclorales, que al igual que las cianobacterias son procariotas fotosintéticos oxigénicos, pero no contienen ficobilinas; su color se debe únicamente a la clorofila a y b. El color de la cianobacteria en el medio ambiente puede ser engañoso, la falta de nitrógeno o sulfuro, así como condiciones que lleven a la fotooxidación (como alta intensidad de luz, combinada con bajas concentraciones de CO₂) producen una disminución en el contenido de ficobilinas, así la

cianobacteria puede mostrar un color verde-amarillento. Incluso, hay cianobacterias que parecen ser de color café oscuro, pero esto es debido a la formación masiva de akinetos o a la producción de cubiertas color café que enmascaran la coloración típica de los filamentos. El patrón de crecimiento de las cianobacterias es variable, y la apariencia macroscópica en el ambiente natural es generalmente determinada por la especie predominante: puede ser una capa lisa o aterciopelada, una masa floculante poco compacta, un agregado parecido a una cáscara, o colonias gelatinosas o con apariencia peluda (Glazer, 1998).

1.4 Hábitat típicos de las cianobacterias

Para el aislamiento de tipos específicos de cianobacterias, es importante conocer su distribución ecológica. Esta información está disponible principalmente en descripciones taxonómicas hechas en el pasado por ficólogos y ecólogos, que identificaron especies, no sólo por sus propiedades morfológicas sino también por su apariencia en el ambiente natural (Rippka, 1988).

Para quienes nunca han aislado cianobacterias, se han citado algunos habitats típicos. Por ejemplo un buen sitio para encontrar cianobacterias de la sección I como *Gleothoece* y *Gleocapsa* son cavernas oscuras de roca calcárea. Las aguas termales, según su temperatura, pH y concentración de nitrógeno combinado, están dominadas por cianobacterias termofilicas como *Synechococcus lividus*, *Mastigocladus laminosus* o *Chlorogleopsis* sp. En ciertos periodo del año, los lagos pueden formar floraciones masivas de *Microcystis aeruginosa*, *Aphanizomenon flos-aquae* u *Oscillatoria agardhii*, que permanecen flotando en el agua utilizando una vacuola de gas. Los lagos, alcalinos e hipersalinos, son dominados por *Spirulina platenses*, que por centurias ha sido utilizado como suplemento alimenticio en muchas partes del mundo (Schlegel, 1993).

Sorprendentemente, considerando la preferencia general de las cianobacterias por ambientes neutros y alcalinos, las pozas medianamente ácidas (con pH no inferior a 4), muestran una cantidad inimaginable de especies unicelulares y filamentosas, algunas de las cuales nunca antes habían sido aisladas y se ubicaron en los géneros *Synechococcus*, *Merismopedia*, *Chroococcus* y *Gleothoece* (Rippka, 1988).

1.5 Desarrollo evolutivo de la termotolerancia

La adaptación a nuevos ambientes mediante la extensión de los límites de tolerancia, ha sido históricamente un mecanismo importante por el cual los requerimientos ecológicos de los microorganismos han divergido aunque esto puede venir con el costo evolutivo de disminuir el rendimiento bajo condiciones ancestrales.

Según Miller (2000), diferencias en la termotolerancia fueron observadas en clones de la bacteria del género *Synechococcus*, en las que se encontraron 4 diferentes secuencias de ARNr 16S que al parecer definen esta termotolerancia. La comparación de estas evidencias fisiológicas, dentro de un marco filogenético, provee la evidencia de que las líneas termotolerantes de *Synechococcus* evolucionaron de ancestros menos termotolerantes. La extensión del límite termal en estas bacterias, fue correlacionada con una reducción en el rango de temperatura para el crecimiento lo cual provee evidencia de que el aumento en la termotolerancia vino con el costo evolutivo de un aumento en la especialización termal.

1.6 Actividad volcánica de Costa Rica

En nuestro país, la abundante actividad volcánica, se originó de la subyección de la placa Cocos sobre la placa Caribe, en dirección noreste. Este proceso genera una línea de presión que comprime la cara interna del arco y causa alta actividad sísmica y volcánica. Los productos de este arco son lava basáltica-andesítica y material piroclástico que han dado origen a estratovolcanes (Paniagua, 2000).

Más de 200 centros volcánicos han sido reconocidos en Costa Rica, distribuidos entre la Cordillera de Guanacaste, Cordillera de Tilarán y Montes del Aguacate, Cordillera Central, Cordillera de Talamanca, Llanuras de San Carlos y Caribe e Isla del Coco. De estos 200 centros volcánicos, sólo 20 son volcanes "jóvenes" y sólo 5 son activos: Rincón de la Vieja, Arenal, Poás, Irazú y Turrialba. El resto presentan actividad residual, exhalación de sulfuro, aguas termales entre otros hallazgos, que permiten considerarlos como volcanes no extintos (Paniagua, 2000).

El arco volcánico de Costa Rica se subdivide en dos secciones, el Rango Volcánico Guanacaste (RVG) y el Rango Volcánico Central (RVC). El RVG comprende una cadena de estratovolcanes andesíticos que contiene al Volcán Orosi, Tenorio, Rincón de la Vieja y Miravalles. El RVC cuenta con los volcanes Poás, Irazú, Turrialba y Barva; en donde este último no es considerado activo por no presentar erupciones en los últimos 300 años. Entre el RVG y el RVC se encuentra el Volcán Arenal, que es el más activo de Costa Rica, ya que lleva emitiendo flujos de lava desde 1968, cuando entró en un fuerte ciclo eruptivo (Paniagua, 2000).

1.7 Aguas termales

Las manifestaciones termales son una expresión de la energía endógena del planeta. Investigaciones isotópicas han demostrado que en la mayoría de las aguas termales, incluso aquellas directamente asociadas con la actividad volcánica, el agua es predominantemente de origen meteórico, es decir, que proviene de la atmósfera por algún tipo de precipitación, y que en ningún caso el agua magmática supera el 5% de la masa total de agua presente. Asimismo, se ha demostrado que los constituyentes químicos de las aguas termales, fueron extraídos de los minerales de las rocas atravesadas (Paniagua & Van der Bilt, 1979).

1.8 Origen y características de las fuentes termales

El agua meteórica se infiltra, y en su flujo subterráneo es calentada por el efecto del gradiente geotérmico (un promedio de 30 °C / km de profundidad), o por alguna fuente secundaria de calor, por ejemplo un cuerpo magmático en vías de enfriamiento. El agua caliente es capaz de disolver algunos componentes de las rocas atravesadas, se carga de sales minerales disueltas, y regresa luego a la superficie aprovechando algunas zonas de debilidad de la corteza como fallas o fracturas (Paniagua, 2000).

De acuerdo a Mc Donald (1972) una fuente termal es considerada como un manantial que surge apaciblemente por encima de la temperatura media del aire de una región. Se manifiestan en la superficie mediante zonas de alteración hidrotermal, géiser, vertientes calientes, volcanes, y pozas de barro. El manantial a menudo consiste en una poza de barro, comúnmente hirviendo y moderadamente viscoso, formado de arcilla fina

con mezclas de óxido y sulfuro de hierro, además de otras sustancias que generan colores que van del blanco y gris hasta café, rojo o verde. Cuando las temperaturas están por debajo del punto de ebullición, la superficie puede estar constantemente interrumpida por erupciones de burbujas de gas.

1.9 Clasificación de las aguas termominerales

Debido a la diversidad de características físicas y químicas, no es fácil clasificar las aguas mineralizadas; pero algunos de sus caracteres como temperatura, acidez y mineralización pueden utilizarse como criterios de clasificación.

1.9.1 Temperatura

Es la clasificación más sencilla. Ubica como aguas frías las que tienen menos de 20 °C, hipotermas entre 20 y 30 °C, mesotermas entre 30 y 40 °C e hipotermas con más de 40 °C (Armijo & San Martín, 1984).

1.9.2 Acidez y composición química

La acidez depende de la concentración de los iones H y OH. El pH del agua pura a 25 °C es de 7.0. La mayoría de las aguas tienen valores entre 6.5 y 8.5, pero aguas con pH menor se encuentran en fuentes termales, y fuentes que drenan mineralizaciones sulfúricas oxidantes o focos de contaminación. Agua con pH mayor a 9 es inusual, pero se han observado valores de hasta 11.7 en áreas desérticas. En áreas no afectadas por la contaminación, el agua de los ríos tiene un pH entre 6.5 y 8.5, los valores mayores generalmente provienen de áreas con rocas carbonáticas (Paniagua, 2000).

La solubilidad de la mayoría de los elementos y la estabilidad de sus componentes son extremadamente sensitivas al pH del ambiente acuoso. Solo unos pocos elementos, por ejemplo, los metales alcalinos (Na, K y Rb), alcalinotérreos (Ca, Mg y Sr) y algunos elementos que forman radicales ácidos (N y Cl) son solubles a lo largo de todo el rango de pH. La mayoría de los elementos metálicos son solubles sólo en medio ácido, y tienden a precipitar como dióxidos cuando el pH aumenta. En los 0.5 a 2 Km. superiores de los sistemas geotérmicos profundos, ocurre una ebullición y se da una transferencia

de gases (CO_2 , H_2S , CH_4 , etc.) a la fase de vapor. Esta fase gaseosa migra a la superficie para formar fumarolas. Cerca de la superficie puede encontrar agua subterránea fría, dentro de la cual se condensa para formar aguas calentadas por vapor. La oxidación de H_2S en este ambiente produce aguas ácido-sulfúricas con bajo contenido de cloruro y pH entre 0 y 3, las cuales reaccionan rápidamente con las rocas circundantes para formar asociaciones mineralógicas de alteración arcillítica avanzada (caolinita, alunita, etc) (Paniagua, 2000).

Dado que el contenido de calor es alto en relación con el agua normal, esta agua calentada por vapor puede ebullición por sí misma al contacto con el nivel freático, dando lugar a la formación de volcancitos de barro que son una característica común en áreas geotérmicas (volcanes Rincón de la Vieja y Miravalles). En el cuadro 6 se resumen los diferentes tipos de aguas termales según su rango de pH y aniones principales.

Cuadro 6 Tipos de aguas en sistemas geotermiales según Henley (1984)

Tipo de agua	pH aproximado	Aniones principales
Subterránea	6.5 – 7.5	Trazas de HCO_3^-
Clorurada	4.0 – 9.0	Cl^- con menor contenido de HCO_3^-
Clorurada bicarbonatada	7.0 – 8.5	Cl^- , HCO_3^-
Calentadas por vapor	4.5 – 7.0	SO_4^{2-} , HCO_3^- , trazas de Cl^-
Acido-sulfúricas	1.0 – 3.0	SO_4^{2-} y trazas de Cl^-
Ácido-sulfúricas cloruradas	1.0 – 5.0	SO_4^{2-} , Cl^-
Bicarbonatadas	5.0 – 7.0	HCO_3^-
Cloruradas diluidas	6.5 – 7.5	Cl^- con menor contenido de HCO_3^-

Adaptado de Paniagua, S. (2000)

1.10 Ejemplos de aguas termales en Costa Rica

1.10.1 Aguas cloruradas

Predomina el cloruro entre los aniones y el sodio entre los cationes; en menos concentraciones se presentan los iones de sulfato, bicarbonato, calcio y magnesio. Las aguas cloruradas profundas pueden fluir directamente hacia la superficie y producir

nacientes con alto contenido de cloruro en estado de ebullición, con un pH casi neutro a alcalino, o pueden mezclarse con agua subterránea para formar aguas cloruradas diluidas. Dependiendo de la hidrogeología del sistema superficial, cada uno de estos tipos de agua puede interactuar con otro y dar tipos de agua híbrida, por ejemplo la ácido sulfúrica – clorurada (Paniagua, 2000).

La mayoría de las aguas termales de la parte sur del Valle Central son una mezcla de aguas cloruradas con bicarbonatadas, las del río Tabacón y río Barranca, son mezclas de cloruradas con sulfatadas. En el río San Rafael, brotan aguas cloruradas sódicas; en el Hotel Tucano las aguas tienen temperaturas del orden de 58°C y un pH que oscila entre 6.8 y 7.3, mientras que en las Termales del Bosque, las temperaturas son de 45°C y el pH es de 5.9 (Gómez, 1972)

1.10.2 Aguas bicarbonatadas del Valle Central

Esta agua se considera mineromedicinal; predominan los aniones de bicarbonatos y los cationes alcalinotérreos y alcalinos. Constituyen un grupo de gran homogeneidad integrado por aguas que se denominan “carbónicas o aciduladas”, cuando el contenido del gas carbónico libre es considerable y su acidez iónica ligera, o “alcalinas”, cuando administradas al organismo, producen efecto antiácido y tienden a elevar la reserva alcalina (Paniagua, 2000).

Las aguas ricas en bicarbonatos se presentan donde el agua subterránea disuelve CO₂ que proviene de la exsolución del gas en profundidad. En este caso, la acidez debida al CO₂ disuelto (ácido carbónico) es el principal factor que altera a las rocas. Las aguas termales del Valle Central corresponden principalmente a los tipos bicarbonatados y clorurados, aproximadamente neutros, caracterizados por altos contenidos de sulfato, calcio sodio, baja concentración de sílice y valores de pH normalmente de 7.0. Las aguas de la fuente Doris, al NE del Volcán Arenal, también son bicarbonatadas (Gómez, 1972).

En 1962, Kupiec menciona que a mediados del siglo XX las aguas minerales de Salitral de Santa Ana eran muy explotadas, no sólo comercialmente, sino que también con gran uso popular medicinal entre los campesinos de la región. Esta agua no se presenta

caliente (22-23°C) pero sí mineralizada, se ha reportado que contiene hierro en una cantidad superior a 5 mg / L. En este lugar se instaló la primera empresa termomineral que se conoce en el país, una planta embotelladora denominada "Las Piedras", con una construcción de madera en la margen derecha del río Salitral, con un envasado directo de la fuente para el consumo humano (Paniagua, 2000).

1.10.3 Aguas sulfatadas de Barranca, San Ramón y Tabacón

Son aguas amargas, en particular las sódicas, magnésicas y cálcicas; predomina el anión sulfato, pero en Costa Rica prácticamente siempre son mezclas con aguas cloruradas o bicarbonatadas como en los Hervideros, en la margen del río Barranca, cerca de la planta Nagatac (San Ramón – Esparza) y del Tabacón

El agua mineral del Tabacón tiene una temperatura media de 49.6°C, con un pH de 6.4 y un alto contenido en calcio, magnesio y sodio, con aniones de concentración elevada del tricloruro y sulfato. Químicamente no posee toxicidad para el ser humano, exceptuado para las personas con sensibilidad al contenido salino (Cabrera *et al.* 1994).

Las aguas cloruradas-sulfatadas se encuentran al NNO del volcán, mientras que las fuentes calientes situadas en el flanco NNE son más del tipo bicarbonatado. Las composiciones catiónicas del agua reflejan la interacción de esta agua con las rocas pobres en potasio del Arenal (Soto *et al.* 1999).

1.10.4 Aguas sulfurosas

Contienen como mínimo un miligramo de azufre titulable en forma reducida, bivalente, en combinaciones varias con ácido sulfhídrico, sulfhidrato, azufre coloidal, etc. Esta agua se utiliza para efectos terapéuticos, dado su fácil alteración con el contacto del aire y precipitación de compuestos sulfurados. Es característico su olor pútrido y su untuosidad. Ejemplos de esta agua se encuentran en las termas cercanas al Volcán Santa María en Guanacaste (Paniagua, 2000).

1.11 Campo Geotérmico Miravalles

El campo geotérmico Miravalles está localizado en la provincia de Guanacaste; al sureste de uno de los principales volcanes de la Sierra Volcánica de Guanacaste: el Volcán Miravalles, con una altitud que oscila entre los 400 y 800 msnm. Constituye un área confinada a una estructura colapsada tipo caldera, con un diámetro de 15 Km. Esta caldera se formó hace aproximadamente 600 000 años con la erupción y deposición de flujo piroclástico (Yock, 1998).

1.11.1 Composición química e isotópica de los fluidos del Campo Geotérmico Miravalles

Entre los años 1994 y 1998 se recolectaron y analizaron muestras de agua y gas provenientes de distintos sectores del Campo Geotérmico Miravalles con el objetivo de clasificar las fuentes termales, frías y calientes, según el anión predominante. En este estudio se encontraron de forma general tres tipos de aguas; la mayoría de las fuentes termales analizadas, mostraron ser ricas en cloruro de sodio (78 a 80%), con un total de sólidos disueltos de aproximadamente 7000 a 8000 ppm. El pH estuvo cercano a 8 y el contenido de sílica se mantuvo alrededor de 550 – 650 ppm a presión atmosférica (Yock, 1998).

Por otra parte las fuentes de los sitios denominados PGM-02, PGM-09 y PGM-17 mostraron un rango de pH entre 2 y 4 con alta concentración de sulfatos, esto debido a que el agua de estas fuentes se formó por la disolución de HCl y SO₂ en la superficie caliente del magma. Un tercer tipo de agua es la denominada agua calentada por vapor, que proviene de fuentes termales tibias de baja concentración de cloruro, del río Blanco. El contenido de gas no condensado equivale a un 0.6 a 0.9% del peso del vapor, y está compuesto principalmente por CO₂ (97-99% peso), con relativamente alto contenido de nitrógeno (1.4-2% peso) y bajo contenido de H₂S (menos de 1% peso) (Yock, 1998).

El cuadro 7 resume los resultados de los análisis químicos efectuados entre los años 1997 y 1998, para caracterizar los sitios que fueron utilizados en el muestreo realizado en el 2003 para llevar a cabo el presente estudio. Los sitios N01, N02 y N13

corresponden a los sitios de muestreo de cianobacterias 2, 3 y 4 respectivamente en este estudio.

Cuadro 7. Composición química de las fuentes termales N-01, N-02, en ppm, Campo Geotérmico Miravalles, Costa Rica, 1997-1998.

Sitio	Temp °C	pH	Cond uS/m	Na ⁺	K ⁺	Ca ⁺⁺	Mg ⁺⁺	Cl ⁻	SO ₄ ⁻	HCO ₃ ⁻	F ⁻	B	SiO ₂	Bal iónico	D ‰
N01	38	6.75	585	52	16	66	13.8	44	57	214	0.14	0.64	146	9.14	-49.0
N02	55	6.52	731	54	18	83	20.7	32	102	287	0.17	0.45	188	5.33	-45.11

Adaptado de Yock, A. (1998)

1.12 Usos de las fuentes termales

1.12.1 Vigilancia volcánica

La quebrada Tabacón (Volcán Arenal), mostró un incremento en su temperatura y descarga, varios meses antes de la erupción del 29 de julio de 1968 (Alvarado & Barquero, 1987 en Soto *et al.* 1999). Análisis químicos de las fuentes termales y frías en las cercanías del Volcán Arenal se realizan constantemente con el objeto de monitoreo volcánico. Se pretende que este tipo de análisis geoquímico pueda indicar las condiciones termodinámicas críticas, antes de que se produzca una explosión importante en el volcán (Marini *et al.* 1990).

1.12.2 Usos para la salud

Las aguas termales presentan una gama de aplicaciones que van desde el tratamiento con aguas (interno y externo) hasta los barros medicinales. Los beneficios que el hombre puede recibir de estas manifestaciones pueden sintetizarse en dos metodologías, la hidroterapia y la geoterapia (Soto *et al.* 1999).

1.12.2.1 Hidroterapia

La hidroterapia interna se basa en la aplicación de lavados intestinales y nasales, o ingestión de aguas minerales que ayudan en la digestión. En Costa Rica existe una cantidad significativa de manantiales de aguas medicinales (Cuadro 7), algunos de los cuales han sido estudiados tanto desde el punto de vista químico, como físico y bacteriológico. El azufre que poseen algunas aguas termominerales tiene acción directa sobre el cuerpo como desinfectante y purificante.

A los diversos tipos de agua termal, se atribuyen diferentes beneficios, así las aguas cloruradas activan las funciones gastrointestinales y sirven como antiinflamatorio, las sulfatadas tienen efectos laxantes y purgantes, y las carbonatadas y bicarbonatadas son beneficiosas para el aparato digestivo y afecciones gástricas (Soto *et al.* 1999).

Cuadro 8. Principales fuentes termales utilizadas turísticamente en Costa Rica

Nombre	Localización	Infraestructura
Río Tabacón	Faldas del Volcán Arenal	Hotel-Balneario
Balde Thermae	Faldas del Volcán Arenal	Balneario
Hotel Tucano	8km este de Ciudad Quesada	Hotel-Balneario
Termales del Bosque	7km este de Ciudad Quesada	Área de conservación
Teñidero (Río Celeste)	Guatuso, Volcán Tenorio	Reserva forestal
Agua Caliente	3km sur de Cartago	Balneario
Los Patios	Sur de Orosi	Balneario
Hornillas Las Pailas	24 km NE Liberia, Rincón de la Vieja	Parque Nacional
Las Hornillas	6 km N, Fortuna de Bagaces, Volcán Miravalles	Área protegida

Adaptado de Paniagua, S. (2000)

1.12.2.2 Geoterapia

El tratamiento con barro o arcilla es una de las prácticas más comunes en muchas partes del mundo. Algunos lugares en Costa Rica poseen estos tratamientos (Tabacón, Termales del Bosque y el Tucano). La arcilla aplicada como cataplasma o mascarilla, quita al cuerpo parte de su calor, absorbe toxinas y otras secreciones (Paniagua, 2000).

1.12.2.3 Desarrollo turístico

Se considera que el desarrollo turístico de las aguas termales en Costa Rica, por su temperatura y propiedades fisicoquímicas y bacteriológicas, es una fuente alternativa de turismo. En los últimos años ha proliferado en gran medida la construcción de infraestructuras en las cercanías de las fuentes termales para implementar adecuadamente el turismo recreativo, que atrae cada año a miles de turistas tanto nacionales e internacionales que acuden en busca del confort y relajación que brindan esta agua (Paniagua, 2000).

1.13 Técnica de amplificación del ADN

En el año 1987 Kary Mullis de la Corporación Cetus describe la técnica de PCR la cual constituyó un gran aporte en los avances de la biología molecular, ya que previamente la amplificación de ADN se realizaba por clonación genética en bacterias, lo que implicaba un gasto de tiempo y dinero considerables (Audersik, 1997).

Para llevar a cabo esta reacción se deben diseñar, a partir de una región ya conocida de la secuencia, dos oligonucleótidos de ADN (también llamados iniciadores o "primers") cada uno complementario a cada banda de la doble hélice del ADN y se colocan en lados opuestos de la región de interés. Estos oligonucleótidos sirven como iniciadores para la síntesis *in vitro* del ADN, la cual es catalizada por una ADN polimerasa termoestable, y ellos determinan ambos finales del fragmento de ADN que se obtiene como producto final. La ADN polimerasa es aislada de una bacteria termófila (*Thermophylus aquaticus*), y tiene la ventaja de ser estable a altas temperaturas (95°C o más), por lo que no se desnaturaliza en los repetitivos aumentos de temperatura. (Alberts *et al.* 1994).

El ADN de interés es sometido a repetidos ciclos, donde cada uno involucra 3 pasos; la desnaturalización, en donde la temperatura aumenta entre los 95 - 96°C, para separar la doble hélice de ADN en dos hebras simples, el apareamiento en donde a una temperatura más baja cada iniciador se une a sus cadenas complementarias y finalmente la extensión o síntesis en donde la ADN polimerasa empieza a copiar la hebra de ADN a partir de la región donde se encuentra unido cada primer, utilizando nucleótidos libres siguiendo la complementariedad de bases de la hebra que está copiando y continúa hasta el fin de la hebra. (Figura 26) (Audersik, 1997)

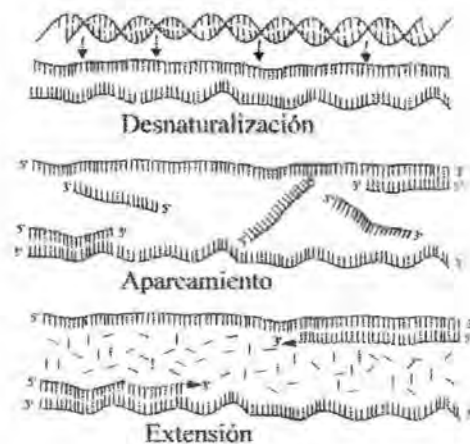


Figura 26. Esquema de los pasos que se dan en una reacción en cadena de la polimerasa (Tomado de Audersik, 1997).

Cuando el proceso es repetido en varios ciclos, los fragmentos recién sintetizados sirven como ADN patrón, y en unos pocos ciclos el producto predominante será una sola especie de fragmento de ADN, cuya longitud corresponde a la distancia entre los dos iniciadores originales (Alberts *et al.* 1994).

1.14 Técnica de secuenciación del ADN

Una de las técnicas utilizadas para secuenciar ADN es la denominada secuenciación cíclica, o de amplificación lineal, basada en la técnica original de dd terminación. Tal como una reacción estándar de PCR, se usa una ADN polimerasa termoestable y un formato de ciclos de temperatura de desnaturalización, apareamiento y síntesis de ADN.

La diferencia radica en que en el ciclo de secuenciación se emplea solamente un iniciador y además se incluyen en la reacción ddNTPs (dideoxinucleótidos): ddATP, ddGTP, ddCTP, ddTTP, que funcionan como terminadores de cadena (Strachan & Read, 1999).

Cada ddNTP está marcado con una sonda fluorescente. Al usar sólo un iniciador, el producto se acumula en forma lineal, no exponencial como sucede en la PCR. En la secuenciación automatizada los fragmentos producto de la reacción de secuenciación se corren en un gel de electroforesis desnaturizante, así los ddNTP marcados que determinan el punto de terminación de cada fragmento pasan por un rayo láser ubicado en una posición constante del gel.

Al pasar por el rayo láser, la sonda de marcaje emite una longitud de onda diferente para cada uno de los cuatro ddNTPs, esta información es guardada electrónicamente y la secuencia interpretada se almacena en la base de datos del computador central (Strachan & Read, 1999).

2. Justificación

Costa Rica es un país con una gran biodiversidad y una serie de condiciones ambientales idóneas para el desarrollo de innumerables formas de vida. Actualmente no existen estudios precisos, que caractericen las especies de cianobacterias presentes en las aguas termales de nuestro país. Este aspecto toma relevancia dada la gran cantidad de actividad volcánica que se presenta en nuestro territorio, lo que nos permite contar con muchas fuentes de aguas termales, a las que se les dan diversos usos.

Es sabido que muchos géneros de cianobacterias son capaces de producir metabolitos secundarios que tienen potencial tóxico para los seres humanos (Peinador, 1993), por esto es importante determinar si en nuestro país, contamos con las especies que podrían presentar toxicidad potencial.

Además, estudios previos revelan que las cianobacterias termofilicas, muestran un grado de endemismo en áreas geográficas restringidas (Castenholz, 1996), y podría darse el caso de que nuestro país, por sus características, sea un reservorio natural de nuevas especies de procariotas fotosintéticos.

3. Materiales y Métodos

3.1 Colecta de las muestras:

Se recolectaron en marzo del 2003, en las inmediaciones de la planta Geotérmica de Miravalles, Guayabo y Fortuna de Bagaces un total de 22 muestras de agua, sedimentos y biofilms que indicaban la presencia de cianobacterias. Se utilizaron tubos cónicos plásticos estériles de 50 mL, sin medio de cultivo, ya que las muestras permanecieron en el sustrato original y a temperatura ambiente para ser transportadas a los laboratorios del Centro de Investigaciones en Biología Celular y Molecular (CIBCM).

Se definieron sitios de muestreo, bien caracterizados y de estos se seleccionaron los que presentaron características idóneas para la presencia de cianobacterias.

3.1.1 Sitio 1

Área de las hornillas y fumarolas (Fig.27). En esta zona se obtuvo rangos de temperatura de 34 a 38 °C y un pH de 2. De este sitio se tomaron 3 muestras que no fueron incluidas en este estudio, ya que las cianobacterias requieren un pH mínimo cercano a 4 para su crecimiento.



Fig.27. Área de hornillas y fumarolas. Proyecto Geotérmico Miravalles, Guanacaste Costa Rica.

3.1.2 Sitio 2

Corresponde una fuente de aguas termales, ubicada al este del centro recreacional "Termomanía" (Fig.28). El rango de temperaturas medidas fue de 35 a 37°C; el pH fue de 5.45 y la conductividad fue de 500-600 $\mu\text{S}/\text{m}$. Esta fuente de aguas termales vierte directamente en una pequeña laguna de unos 5 metros de diámetro. Se observaron crecimientos de biofilms color verde azulado en el fondo y parduzco en unas formaciones semejantes a columnas de hasta 20 cm de alto, que desde el suelo atraviesan la capa de agua al flotar debido a las burbujas que probablemente contienen oxígeno de origen fotosintético, y que quedan atrapadas por una red de filamentos de microalgas y cianobacterias en una matriz mucosa. De este sitio se tomaron 6 muestras. El sitio corresponde a la fuente termal N-01 y la composición química en ppm se observa en el cuadro 7 de la página 22 de este documento.

Las aguas de esta fuente termal son utilizadas con fines recreacionales por el Complejo Turístico Termomanía, en Guayabo (Miravalles), Guanacaste.

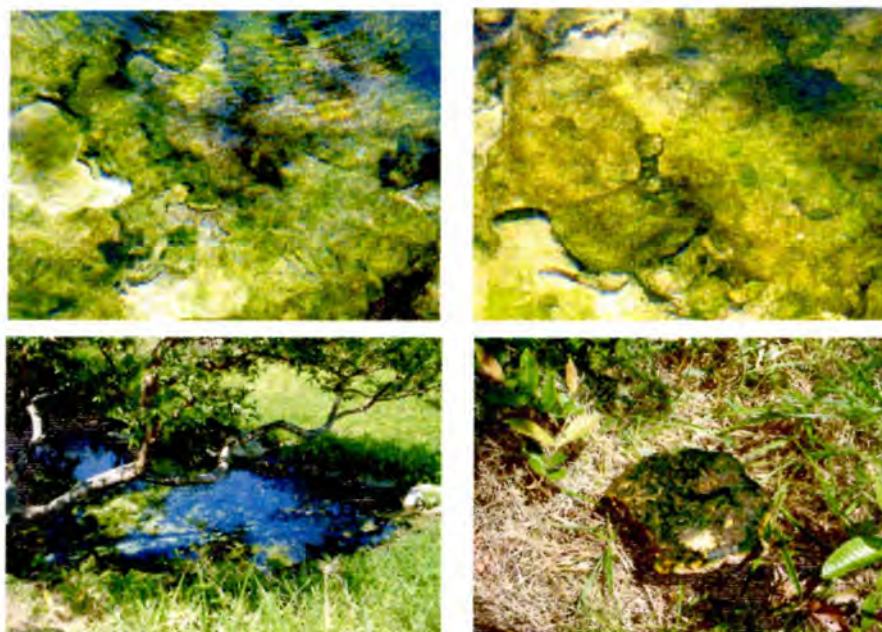


Fig.28. Fuente de aguas termales ubicada detrás del Complejo Turístico Termomanía, Guayabo, Guanacaste

3.1.3 Sitio 3

Corresponde al termal 2, detrás del Campo Geotérmico Miravalles (Fig.29). Sitio de control ambiental U1 y U2 (Yock, 1998). La temperatura varió entre los 38 y 55°C, el pH varió entre 5.5 y 6.58, y la conductancia entre 510 y 1038 $\mu\text{S/m}$. Se tomaron 13 muestras de varios sitios, siguiendo la corriente de la naciente aguas abajo. El sitio corresponde al lugar de muestreo N-02 descrito previamente por Yock (1998), cuya composición química se observa en el cuadro 7 de la página 22 de este documento.

Las aguas de esta fuente termal, son utilizadas por el Complejo Turístico Yoko, con fines recreacionales.

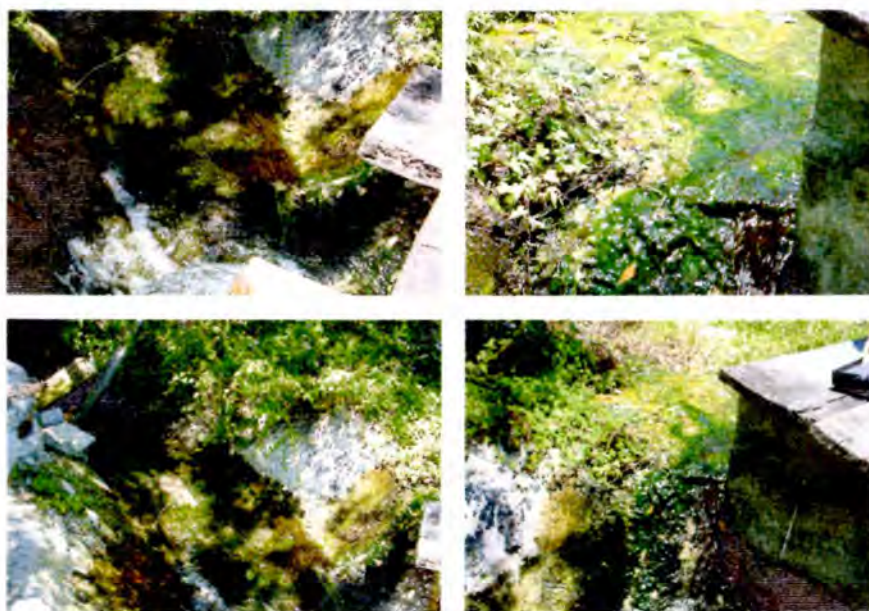


Fig.29. Fuente de aguas termales ubicado detrás de la planta geotérmica (Sitio N2) Guayabo, Guanacaste

3.2 Análisis inicial:

Una vez en el laboratorio las muestras se observaron macroscópicamente y se separó pequeñas porciones con características morfológicas típicas de cianobacterias. Estas porciones se colocaron en medio de cultivo BG11 tanto líquido como sólido. Las muestras en medio líquido se mantuvieron en agitación a 35°C, con ciclos de luz / oscuridad de 12 horas cada uno. Se utilizó una intensidad aproximada de 500 lux.

Las muestras sembradas en agar se mantuvieron a temperatura ambiente protegidas de la luz directa.

3.3 Caracterización microscópica:

Con la muestra aislada de la matriz principal se realizó una preparación, colocando una pequeña porción del material entre porta y cubre objetos. En microscopio de luz Nikon®, a un aumento de 40x y 100x. Se describieron y documentaron las principales características morfológicas de los microorganismos presentes y se estableció un registro fotográfico.

3.4 Cultivo

Las diferentes muestras fueron cultivadas en medio mineral definido, sólido y líquido (BG11) y con adición de antibióticos (ampicilina y cicloheximida), de acuerdo al procedimiento indicado por Rippka, (1979). El detalle de la preparación de los medios de cultivo utilizados se encuentra en la sección de Anexos.

3.5 Purificación

Para la purificación de las bacterias se ensayaron los siguientes métodos:

3.5.1 Aislamiento de colonias en agar BG11:

Se tomó una porción de muestra tratando de separarla con el asa y se distribuyó homogéneamente sobre el plato. Se incubó a una temperatura similar a la del sitio de muestreo por alrededor de 22 días protegido de la luz directa pero no en oscuridad total (aproximadamente 500 lux).

3.5.2 Tratamiento con cicloheximida:

Se preparó un medio BG11 líquido, con una concentración de cicloheximida de 100 mg/L (Rippka, 1979), esterilizada por filtración y la muestra de cianobacterias se incubó

en agitación a 35 °C por 7 días. Transcurrido ese tiempo se evaluó el crecimiento de las cianobacterias y la contaminación por hongos y otros eucariotas.

3.5.3 Tratamiento con Lysol:

Se tomaron porciones de cada muestra, y se homogenizaron, haciéndolas pasar a través de jeringas con agujas de diferente calibre, desde #18 hasta #22^{1/2} y tuberculina para separar los filamentos y evitar que los contaminantes queden protegidos dentro de la matriz de cianobacterias. El material fue transferido a tubos eppendorf y se realizaron tres series de lavados con medio BG11 limpio. Posteriormente el botón final se debe colocó en un pozo de placas de microtitulo de 6 pocillos con 4 mL de una solución de Lysol. Se ensayaron dos concentraciones de desinfectante: 6% y 4.5%. Las muestras estuvieron en contacto con el desinfectante por 1, 3, y 5 minutos, esto para cada concentración. Transcurrido ese tiempo las muestras fueron enjuagadas sucesivamente en tres pozos con medio limpio para eliminar el lysol. Finalmente se colocaron en medio BG11 líquido y se incubaron a 35 °C en agitación por una semana para evaluar posteriormente crecimiento y contaminación.

3.5.4 Tratamiento rápido con ampicilina:

Se realizó el mismo procedimiento de homogenización utilizado en el método anterior, y luego se aplicó el método rápido con ampicilina (Rippka, 1979). Los botones de células, luego de la centrifugación se resuspendieron en una solución esterilizada por filtro de 0.22 μ m con las siguientes concentraciones: 0.5% (m/v) de glucosa, 0.1% (m/v) de casaminoácido y 1mg/mL de ampicilina y se incubó a temperatura ambiente por 36 horas en oscuridad. Luego se realizó un lavado a los tricomas y se incubaron en BG11 líquido a 35°C en agitación por una semana para evaluar posteriormente crecimiento de las cianobacterias y la contaminación por otros procariotas.

3.5.5 Cultivo en Agar BG11 con ampicilina:

Consistió en una variante de agar BG11, utilizando una concentración de agar de 12 g/l, y agregando al medio autoclavado, una concentración de ampicilina de 1g/L, preparada de forma estéril. Se esparció uniformemente sobre la placa, la muestra procesada. En

este medio las muestras se incubaron a 35°C por un máximo de dos días y luego se pasaron los tricomas a medio BG11 limpio sin ampicilina, ya sea líquido o sólido por 7 días para evaluar posteriormente crecimiento de las cianobacterias y la contaminación por otros procariontes. En las muestras en las que a los dos días no se encontró evidencia de contaminación, se tomó el material cuidadosamente con una aguja estéril y se colocó en un tubo de vidrio con aproximadamente 15 mL de medio BG11 limpio, que se colocó en agitación a 35°C. A los 7 días se volvió a evaluar crecimiento y se realizó prueba de esterilidad al sobrenadante del cultivo. Se debe trabajar en cámara de flujo laminar con todos los cuidados y asepsia necesarios.

3.6 Preparación de las muestras para la descontaminación

Antes de los procedimientos de descontaminación las muestras se procesaron de la siguiente forma:

Se tomó alrededor de 3 mL del cultivo (con una cantidad considerable de masa bacteriana) y se colocó asépticamente en el interior de una jeringa de 5 mL estéril, ensamblada a una aguja de calibre 18. Se hace presión con el émbolo para pasar el cultivo a través de la aguja. El proceso se repitió 3 veces con cada aguja, y se utilizó además agujas de calibre 20, 21^{1/2} y 22. Se utilizó jeringas de tuberculina en las muestras que los permitieron. El material que salió de la jeringa se recolectó en tubos estériles para realizarle 3 lavados con 12 mL de medio BG11 limpio, centrifugando por 5 minutos a 3000g entre cada lavado. El último botón se resuspendió en un volumen no mayor a 2 mL y de ésta suspensión se tomó el material para llevar a cabo el procedimiento de descontaminación.

3.7 Prueba de esterilidad

Esta prueba se realizó para evaluar el estado de los cultivos en cuanto a contaminación bacteriana, o bien para verificar la efectividad de los tratamientos de descontaminación aplicados a las muestras. Consistió en tomar una muestra del sobrenadante del cultivo a analizar, utilizando un hisopo estéril y se inoculó este material en agar BUG, LB o agar nutritivo. La placa inoculada se incubó a 35°C y se revisó a las 24 y 48 horas. En los casos en que se evidenció contaminación, se procedió a aplicar el tratamiento con

agar BG11/ampicilina. Se recomienda utilizar una placa de agar BUG por cada 5 pruebas, ya que la contaminación se evalúa por presencia o ausencia pero no se cuantifica.

3.8 Extracción de ADN:

La extracción de ADN se llevó a cabo siguiendo este protocolo:

Las células correspondientes a un cultivo de 50 mL aproximadamente, se resuspendieron en 200 a 300 uL de TE (en tubos cónicos de 15 mL). Se agregaron 40 uL de SDS 10%, 250 uL de Fenol y 600uL de perlas de vidrio estéril SIGMA G-1277 (212-300 um), G-4649 (106 um) y G-1152 (710-1180um), combinadas en proporción 2:1:1.

Luego la mezcla se incubó por 10 minutos a 70°C, agitando cada tres minutos. Una vez transcurrido el tiempo de incubación se enfrió y se agregó 250 uL de cloroformo. Inmediatamente se realizaron 10 ciclos de 1 minuto de agitación en vortex con 1 minuto en hielo. Posteriormente se centrifugó por 15 minutos a 3000g para luego extraer el sobrenadante al que se le agregó 1 volumen de fenol-cloroformo, se agitó y se centrifugo de nuevo.

A este segundo sobrenadante se le añadió 1/10 de volumen de NaOAc 3M, pH 4.8 y 2.5 volúmenes de etanol absoluto. Se dejó precipitando en hielo entre 30 minutos a 1 hora, y se centrifugo 15 minutos a 3000g. Se eliminó el etanol con una pipeta. El precipitado obtenido se lavó con 100 uL de etanol al 75% y dejó reposar durante 5 minutos, luego se eliminó el etanol con una pipeta y se dejó secar. Una vez eliminado todo residuo de etanol el ADN se resuspendió en 50 uL de TE o en agua bidestilada estéril para analizar la muestra en un gel de agarosa. El material resuspendido se pasó a tubos Eppendorf. Para guardar el extracto se precipitó el ADN añadiendo nuevamente 1/10 de volumen de NaOAc 3M, pH 4.8 y 2.5 volúmenes de etanol absoluto y se congeló a -20 °C.

3.9 Amplificación del ADN

Se tomó una suspensión del ADN extraído, según el procedimiento anterior y se llevó a cabo una reacción de polimerización de fragmentos específicos del ADN utilizando dos

juegos de imprimadores, uno específico y otro mas general. Los imprimadores específicos fueron: **CYA-106F** (5'-GACGGGTGAGTAACGCGTGA-3') y **CYA-1512R** (5'-GCTACCTTGTTACGACTTCACC-3') (16S-27F / 16S-1509R). Los imprimadores generales fueron: **16S-27F** (5'-AGAGTTTGATCCTGGTCAG-3') y **16S-1509R** (5'-AAGGAGGGGATCCAGCCGCA-3'). Las proporciones de reactivo utilizadas por muestra se detallan en el siguiente cuadro:

Cuadro 9. Proporción de reactivos por muestra utilizados en la reacción de polimerización para la amplificación del ADN.

Orden	Reactivo	Volumen / muestra (uL)
1	Agua para PCR	10.2
2	Buffer 10x para PCR	2.5
3	MgSO4	4
4	Nucleótidos	4
5	Imprimador Forward	1
6	Inprimador Reverse	1
7	ADN	2
8	Polimerasa (Pfu)	0.3

Para cada muestra se agregaron las cantidades de reactivos mencionadas anteriormente, esto para cada juego de imprimadores utilizado. Luego la mezcla se colocó en el termociclador Gene Amp® PCR System 2700, de la casa comercial Applied Biosystems para llevar a cabo la secuencia de reacciones que generan la amplificación. El termociclador se programo para realizar la siguiente secuencia:

Paso	Temperatura	Tiempo	Número de ciclos
1	94°C	2:00 min	1
2	92°C	1:00 min	
	55°C	2:10 min	25
	72°C	2:10 min	
3	72°C	7:00 min	1
4	4°C	Indefinido	-

3.10 Elución de la banda de ADN

Se utilizó el DNA Extraction Kit #K0513 de Fermentas^R. Se cortó una porción del gel de agarosa con un volumen aproximado de 100 uL que contenía la banda de ADN a eluir, y se incubó con 3 volúmenes de Binding Solution, por 5 minutos a 55 °C para disolver la agarosa. Luego se agregó 5 uL de la suspensión de sílica y se incubó por 5 minutos más a 55 °C, agitando vigorosamente cada 2 minutos. Esta mezcla se centrifugó a 13000 rpm para formar un botón y remover el sobrenadante.

Se hicieron 3 lavados con 500 uL de Wash Buffer frío, y en el último lavado se eliminó por completo el sobrenadante hasta obtener un botón seco. Se agregó sucesivamente dos volúmenes de 30ul de agua bidestilada estéril, para disolver el ADN, resuspendiendo el botón e incubando 5 minutos a 55 °C. Luego de cada volumen se centrifugó la mezcla a por 30 segundos a 13000 rpm y se extrajo el eluido con micropipeta.

3.11 Cuantificación del ADN eluido

Se cuantificó el ADN purificado corriendo la muestra en gel de agarosa, por comparación de las bandas con escaleras alélicas comerciales, para obtener un valor aproximado de la cantidad de ADN presente después de la purificación.

Se utilizó la escalera DNA Quanti-LadderTM, de OriGene, Technologies, Inc., que consiste en una serie de bandas con el tamaño y cantidad de ADN indicados en el Cuadro 10.

Cuadro 10. Escalera alélica DNA Quanti-Ladder™, de OriGene

Tamaño/ banda (pb)	Cantidad de ADN/ banda (ng/5uL)
10000	100
8000	80
6000	60
5000	50
4000	40
3000	30
2500	25
2000	20
1500	15
1000	100
800	80
600	60
400	40
200	20

Así, al comparar la banda de la muestra con las bandas de las escaleras comerciales, se obtiene un valor aproximado de la cantidad de ADN presente después de la purificación.

3.12. Secuenciación

Se realizó una secuenciación cíclica utilizando "Big Dye Terminators", con la versión 1.1. Los resultados de los productos fueron analizados en un procesador ABI PRISM™ 377 DNA Sequencer.

3.13 Análisis de la secuenciación

La secuenciación se realizó con la muestra 2.4, identificada para efectos de este análisis como CYA 2.04. Una vez obtenida la secuenciación, se compararon los fragmentos generados por los iniciadores Reverse y Forward, para editar los errores en la secuencia. Se utilizó el programa BIOEDIT 5.0.9.

Luego se realizó una búsqueda contra bacterias usando el programa BLAST del NCBI, utilizando esta secuencia de 530 nucleótidos, (de la posición 863 a la 1393). De los resultados obtenidos se eligieron 11 géneros, para realizar el análisis comparativo.

Primero se hizo un alineamiento múltiple de las secuencias de los 11 géneros (Anexo 2), para obtener un índice de similitud. Basado en estos resultados, se utilizó el programa MEGA 2.1 (2001) para generar un árbol filogenético.

3.13 Congelación de cianobacterias

Para conservar las cianobacterias en congelación se concentró el contenido de un cultivo de 50 mL en fase exponencial tardía, y luego se mezcló 850 uL de la suspensión celular con 150 uL de DMSO*. La preparación se guardó inmediatamente a -80°C. (Aldrich, 1974)

4. Resultados

4.1 Selección de las muestras

De las muestras colectadas, se trabajó con 6 muestras provenientes del sitio 2 de colecta, que se identificaron con los números de 2.1 a 2.6, y 13 muestras del sitio 3 que se identificaron con los números de 3.1 a 3.13. Del sitio uno no se colectó muestras por que las características químicas de ese sector no fueron compatibles con los requerimientos mínimos de las cianobacterias.

4.2 Análisis inicial:

Tras un análisis macroscópico, se separaron de las muestras pequeñas porciones con características morfológicas compatibles con cianobacterias. Estas porciones fueron analizadas al microscopio antes de iniciar su cultivo y descontaminación y la descripción de lo observado se resume en los cuadros 11 y 12:

Cuadro 11. Características microscópicas de las muestras iniciales colectadas en el Sitio 2

# Muestra	Observaciones iniciales
2.1	Organismos unicelulares tipo cianobacteria formando agregados
2.2	Grumos y células filamentosas tipo cianobacteria
2.3	Grumos y células filamentosas tipo cianobacteria
2.4	Grumos color café y células filamentosas tipo cianobacteria
2.5	Células filamentosas, se observa contaminación con protozoarios tipo paramecio
2.6	Cianobacterias filamentosas delgadas en masas

Cuadro 12. Características microscópicas de las muestras iniciales colectadas en el Sitio 3

# Muestra	Observaciones iniciales
3.1	Formas filamentosas y unicelulares color verdoso
3.2	Cianobacterias filamentosas en grumos
3.3	Masas celulares en grumos color verde y café, unicelulares y formando cadenas cortas
3.4	Cianobacterias filamentosas en grumos color café, formas unicelulares en cadenas cortas
3.5	Cianobacterias filamentosas que forman fibras y cadenas cortas, grumos en distintas tonalidades de verde
3.6	Cúmulos de filamentos y cadenas cortas
3.7	Filamentos delgados en grumos
3.8	Filamentos muy delgados en agrupaciones fibrosas
3.9	Filamentos muy delgados con depósitos color café
3.10	Filamentos muy delgados con depósitos color café
3.11	Filamentos muy delgados con depósitos color café
3.12	Cúmulos de filamentos y cadenas cortas, de grosor variable
3.13	Cianobacterias filamentosas que forman fibras y cadenas cortas, grumos en distintas tonalidades de verde

4.3 Análisis de los cultivos

Dos meses después de inocular el material de colecta en medio BG11 líquido y sólido, se analizaron los cultivos. Debido a la contaminación presente en las muestras, el aislamiento en agar BG11 no fue efectivo, ya que las cianobacterias crecen muy lentamente respecto a los contaminantes. En las placas se observaron evidencias de crecimiento de cianobacterias, con la aparición de colonias de aspecto filamentosas, color verde azulado, que en general presentaron contaminación con hongos y bacterias, algunas de las cuales fueron luego identificadas por medio del método BIOLOG. Por su rápido crecimiento, los contaminantes se esparcieron por todo el plato, lo que

imposibilitó el aislamiento de colonias puras. Las observaciones microscópicas de los cultivos en medio BG11 líquido, se resumen en el cuadro 13:

Cuadro 13. Características microscópicas de los cultivos en medio BG11 líquido de las muestras colectadas en el Sitio 2

# Muestra	Observaciones del cultivo
2.1	Cianobacteria unicelular, posible grupo I o II. Bastante pura, con detritos celulares. Probabilidad de 2 morfotipos
2.2	Se observan 2 morfotipos, uno unicelular y otro filamentoso. Presencia de heterocistos. Contaminación con algas y protozoarios. Similar a
2.3	<i>Pseudoanabaena</i> Se observa 1 morfotipo filamentoso. Contaminación con protozoarios.
2.4	Similar a <i>Anabaena</i> Predominio de morfotipo filamentoso, con presencia de células redondas
2.5	Contaminación con protozoarios. Similar a <i>Anabaena</i> Predominio de morfotipo filamentoso, con presencia de células redondas
2.6	Contaminación con protozoarios. Similar a <i>Anabaena</i>
3.1	Muchos detritos, parece muerta, se descarta cultivo líquido Mezcla de estructuras filamentosas y esféricas. Se observan estructuras
3.2	similares a quistes de protozoarios. Masa muy necrozada con formas unicelulares y filamentosas, predominan
3.6	las estructuras unicelulares Grumos de estructuras filamentosas, muy delgadas, con poco color, y
3.9	zonas necróticas.
3.10	Masa de aspecto necrótico, prevalecen solo algas, se descarta.
3.12	Células muertas y detritos. Se descarta cultivo líquido
3.13	Células muertas y detritos. Se descarta cultivo líquido Se observan estructuras filamentosas

No todas las muestras colectadas fueron evaluadas en este primer análisis de cultivos, ya que en algunos casos no se dio crecimiento en medio líquido, y en medio sólido, el crecimiento fue muy lento. Mas adelante se logró tomar material de las placas de agar

BG11 y se inoculó en medio líquido donde el crecimiento fue exitoso, tal fue el caso de las muestras 2.6, 3.3, 3.5, 3.7, 3.11

4.4 Identificación de las bacterias contaminantes aisladas

Los contaminantes aislados en los cultivos de agar BG11, se repicaron en agar BUG, luego se les realizó tinción gram y prueba de oxidasa para montar la prueba de identificación BIOLOG, obteniendo los siguientes resultados:

Cuadro 14. Identificación de las bacterias contaminantes aisladas de los cultivos en medio líquido BG11, correspondientes a ambos sitios de muestreo

Contaminante	Origen	Morfología	Gram	Identificación
1	2.4, 2.5, 3.6	Bacilo	Negativo	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>
2	2.5, 2.6, 3.11	Bacilo	Negativo	<i>Pseudomonas sp.</i>
3	3.1, 3.6	Bacilo	Negativo	<i>Pseudomonas boreopolis</i>
4	2.1, 2.2, 2.3	Coco	Positivo	<i>Micrococcus diversus</i>
5	2.4, 2.6	Bacilo	Positivo	<i>Arthrobacter ilicis</i>

4.5 Tratamiento con cicloheximida:

La concentración de cicloheximida utilizada, eliminó la presencia de hongos sin afectar el crecimiento de las cianobacterias. En una prueba de esterilidad realizada 7 días después del tratamiento, se evidenció que la presencia de bacterias contaminantes persistió.

4.6 Tratamiento con Lysol:

Se probaron 3 muestras: 2.1, 2.5 y 3.1. Las cianobacterias sobrevivieron el tratamiento aplicado por 1 y 3 minutos, pero no durante 5 minutos, esto para ambas concentraciones de Lysol utilizadas (6% y 4.5%). Sin embargo en una prueba de esterilidad realizada 7 días después del tratamiento, se evidenció contaminación en los tres tiempos de exposición en ambas concentraciones, esto para las tres muestras tratadas. Por esta razón se descartó el tratamiento con Lysol como método de purificación.

4.7 Tratamiento rápido con ampicilina:

Se probaron cinco muestras: 2.1, 2.4, 2.5, 3.1 y 3.13. La prueba de esterilidad realizada a los 7 días del tratamiento evidenció contaminación sólo en una muestra, la 3.13 lo que corresponde a un 80% de efectividad. Por esto se decidió incluir este tratamiento como una alternativa para realizar la purificación y descontaminación de los cultivos.

4.8 Cultivo en Agar BG11 con ampicilina:

Este método dio buenos resultados, se probaron las mismas muestras que en el tratamiento anterior, pero en este caso el 100% de las pruebas de esterilidad fueron negativas, esto quiere decir que no evidenciaron contaminación bacteriana luego de incubar las placas de agar BUG por 48 horas. Basados en este resultado, se consideró este método como el de elección para la descontaminación de cultivos de cianobacterias, siempre y cuando se siga el debido proceso de preparación del material, previo a la descontaminación.

Las muestras que no evidenciaron contaminación en la prueba de esterilidad fueron recultivadas en diversas condiciones de temperatura y agitación, para acelerar el crecimiento y obtener suficiente material para llevar a cabo la extracción de ADN.

4.9. Análisis microscópico y descripción de las muestras descontaminadas con ampicilina

Se seleccionaron las muestras que no presentaban contaminación y nuevamente se les realizó el análisis microscópico para ubicarlas de forma tentativa en alguno de los 5 grupos generales en que se clasifican las cianobacterias (Cuadro 15).

Cuadro 15. Características microscópicas y probable clasificación de las muestras descontaminados en medio BG11 líquido

Muestra	Características	Probable grupo	Probable género	Figura
2.1	Dos morfotipos:			
	Unicelular: formas individuales	I	<i>Gleothoece</i>	30
	Filamentoso	III	<i>LPP</i>	31
2.2	Filamentos muy delgados con septos conspicuos en las puntas	III	<i>Pseudoanabaena</i>	32
2.3	Filamentos muy delgados con septos escasos sólo en las puntas que se observan redondeadas	III	<i>Pseudoanabaena</i>	33
2.4	Filamentos muy delgados con septos escasos sólo en las puntas redondeadas	III	<i>Pseudoanabaena</i>	34
2.5	Filamentos muy delgados con hormogonias y septos escasos sólo en las puntas. Sin ramificaciones	III	<i>Pseudoanabaena</i>	35
2.6	Filamentos muy delgados con septos y con pigmentación mas fuerte	III ó IV	<i>Leptolynbya</i> ó <i>Anabaena</i>	36
3.1	Filamentosa con heterocistos y septos pronunciados	V	<i>Fischerella</i>	37
3.11	Filamentos muy delgados con septos escasos sólo se observan en las puntas	III	<i>Pseudoanabaena</i>	38
3.13	Filamentosa con heterocistos y septos pronunciados. Segmento redondos	IV ó V	<i>Nostoc</i> ó <i>Fischerella</i>	39

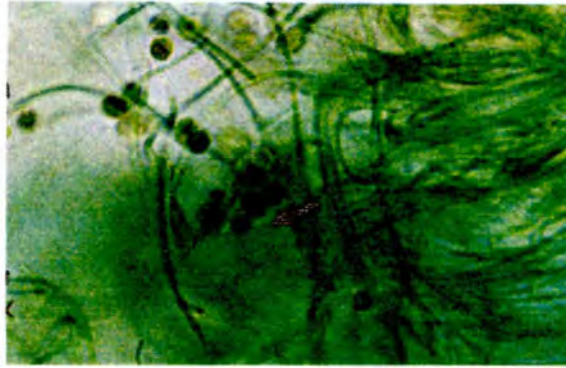


Fig. 30 Micro fotografía de la una preparación al fresco de la muestra 2.1 (unicelular)
(100x)

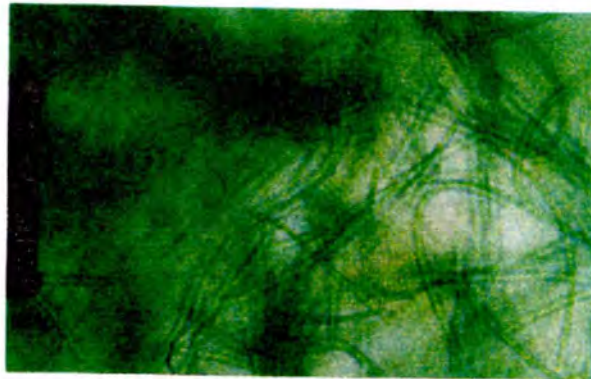


Fig. 31 Micro fotografía de la una preparación al fresco de la muestra 2.1. (Filamentosa)
(100x)

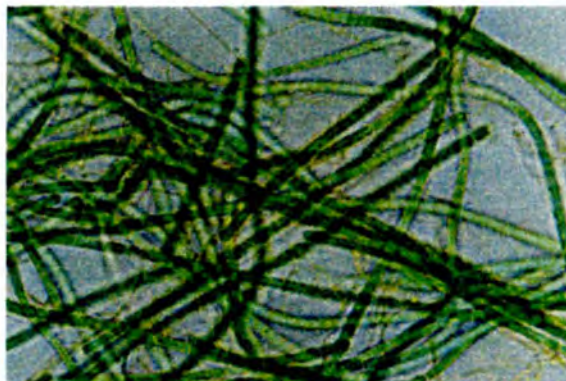


Fig. 32 Micro fotografía de la una preparación al fresco de la muestra 2.2. (100x)

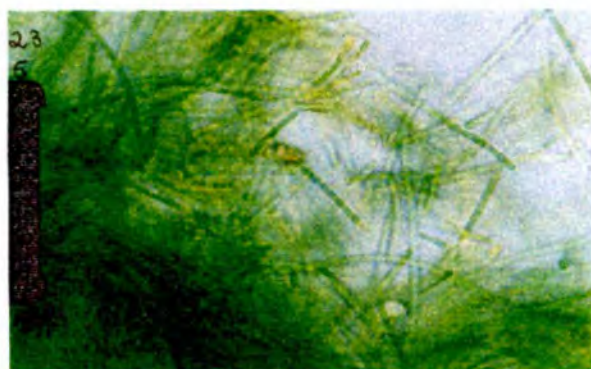


Fig. 33 Micro fotografía de la una preparación al fresco de la muestra 2.3. (100x)

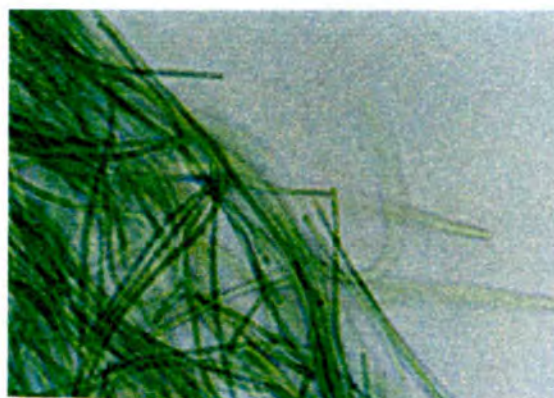


Fig. 34 Micro fotografía de la una preparación al fresco de la muestra 2.4. (100x)

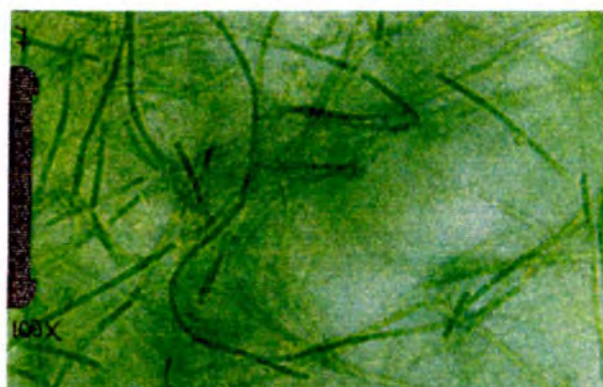


Fig. 35 Micro fotografía de la una preparación al fresco de la muestra 2.5. (100x)

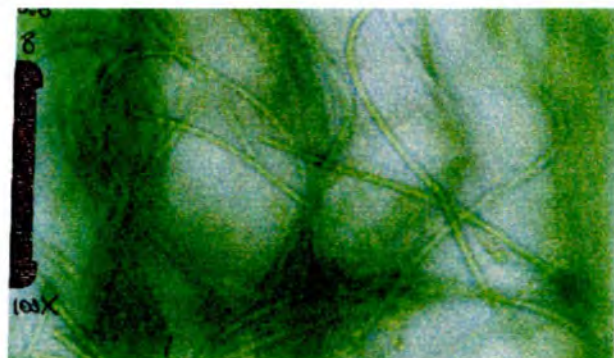


Fig. 36 Micro fotografía de la una preparación al fresco de la muestra 2.6. (100x)

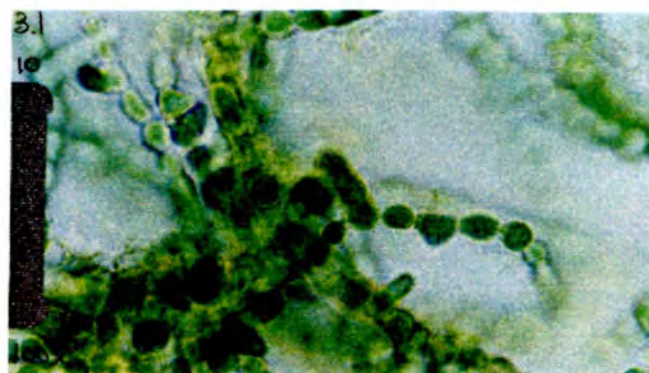


Fig. 37 Micro fotografía de la una preparación al fresco de la muestra 3.1. (100x)

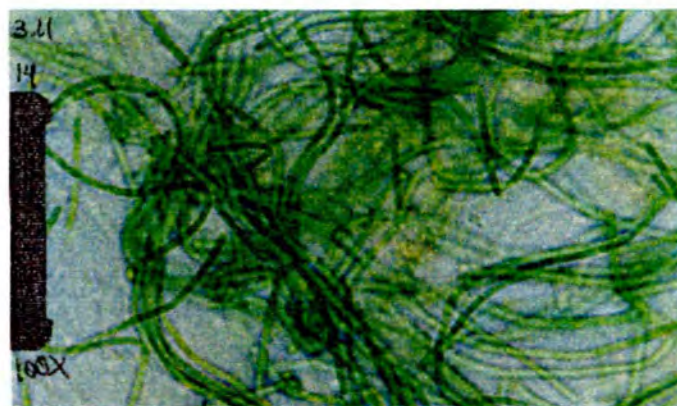


Fig. 38 Micro fotografía de la una preparación al fresco de la muestra 3.11 (100x)

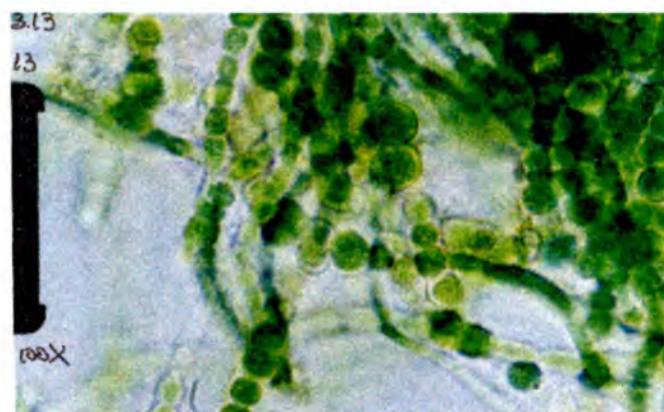


Fig. 39 Micro fotografía de la una preparación al fresco de la muestra 3.13 (100x)

4.10 Extracción de ADN:

La extracción de ADN fue exitosa para las muestras 2.1, 2.2, 2.4, 2.5, 2.6 y 3.13, lo que se comprobó al realizar una electroforesis de las muestras en gel de agarosa. El gel fue teñido con bromuro de etidio y la banda de ADN fue visualizada con una lámpara de luz UV. La banda que mostró mejor calidad y cantidad de ADN fue la correspondiente a la muestra 2.4 (Fig. 40)

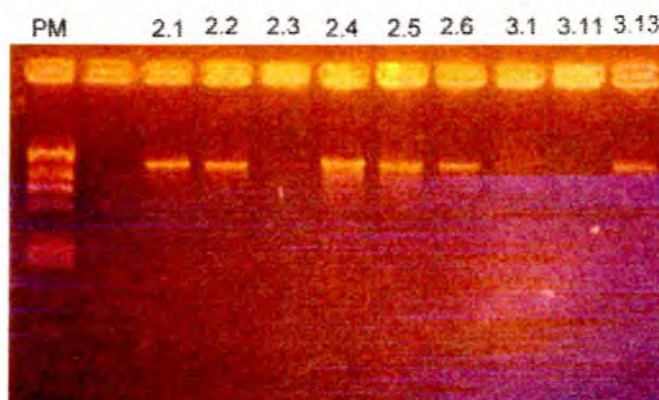


Fig. 40. Fotografía del gel de agarosa 0.8%, teñido con Bromuro de Etidio, donde se corrieron los productos de la extracción del ADN.

4.11 Amplificación por PCR:

Se seleccionó la muestra 2.4 para llevar a cabo la reacción de amplificación por PCR. Se llevó a cabo la reacción con la secuencia de temperaturas especificados en materiales y métodos (página 40). Al correr la muestra en el gel de agarosa, se evidenciaron las bandas del peso esperado (entre 1500 y 1700 pb) , sólo en la reacción que utilizó los imprimadores específicos CYA106F y CYA1512R. Dicha banda se eluyó del gel para proceder a secuenciar el fragmento obtenido. En el caso de la reacción que utilizó los imprimadores 16S, se observaron varias bandas pero ninguna correspondió al peso esperado.

4.12 Análisis de la secuenciación

Se esperaba obtener una secuencia de aproximadamente 1700 pb, pero finalmente se utilizó una secuencia de 530 pb para el análisis. Esto debido a que el fragmento obtenido aportaba información de la secuencia al inicio y al final, ya que se perdió un fragmento importante de la parte media. Por esto se buscó en la secuencia final (que era la mas grande), el mayor fragmento libre de errores y omisiones (Fig. 41).

```
>Cya2.04
CCGCACAAGCGGTGGAGTATGTG-TTTAATTNGATGCAACGCGAAGAACC
TTACCAGGGCTTGACATGTCCGGGACCTTCTTGAAAGAGGAG-GTGCCTT
CGGGAACCGGAGCACAGGTGGTGCATGGCTGTCGTCAGCTCGTGTCTGTGA
GATGTTGGGTAAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCTCGTCCTCAGTTGCCA
TCA-TTGAGTTGGGCACTTTGGGGAGACTGCCGGTGACAAACCGGAGGAA
GGTGGGGATGACGTCAAGTCAGCATGCCCTTACGTCCTGGGCTACACAC
GTACTACAATGCTGTGGACAAAGAGT-TGCGAGCCGGCGACGGCAAGCCA
ATCTCATAAA-CCACGGCTCAGTTCAGATTGCAGGCTGCAACTCGCCTGC
ATGAAGGAGGAATCGCTAGTAATCGCAGGTCAGCATACTGCGGTGAATAC
GTTACCCGGGCCTTGACACACCGCCGTCACACCATGGGAGTTGGCCAC
GCCCCAAGTCGTTACTCCAACCATTTCGTGGAGGGGG
```

Figura 41. Secuencia de 530 pb correspondiente al gen ribosomal 16S. Muestra 2.4

Luego de alinear las secuencias de los 11 géneros elegidos, se realizó una comparación de éstos con la secuencia de la muestra 2.4 y se obtuvo el valor del porcentaje de similitud con cada género (Cuadro 16 y Fig. 42)

Cuadro 16. Porcentaje de similitud de la secuencias de los 11 géneros elegidos con la muestra 2.4

# Entrada	Especie	% Similitud
AB074504	Calothrix brevissima	87.8
AB093485	Hapalosiphon sp.	89.3
AB101003	Nostoc commune	89.3
AF132772	Synechococcus sp.	87.9
AF132787	Pseudanabaena PCC7402	92.4
AJ344560	Fischerella sp.	89.1
AJ580008	Limnothrix sp.	90
AJ630648	Oscillatoriales cyanobacterium	88.9
AY038033	Anabaenopsis sp. PCC 9215	91.1
AJ133180	Nodularia sp.	88.1
X84809	Leptolyngbya sp.	92.1

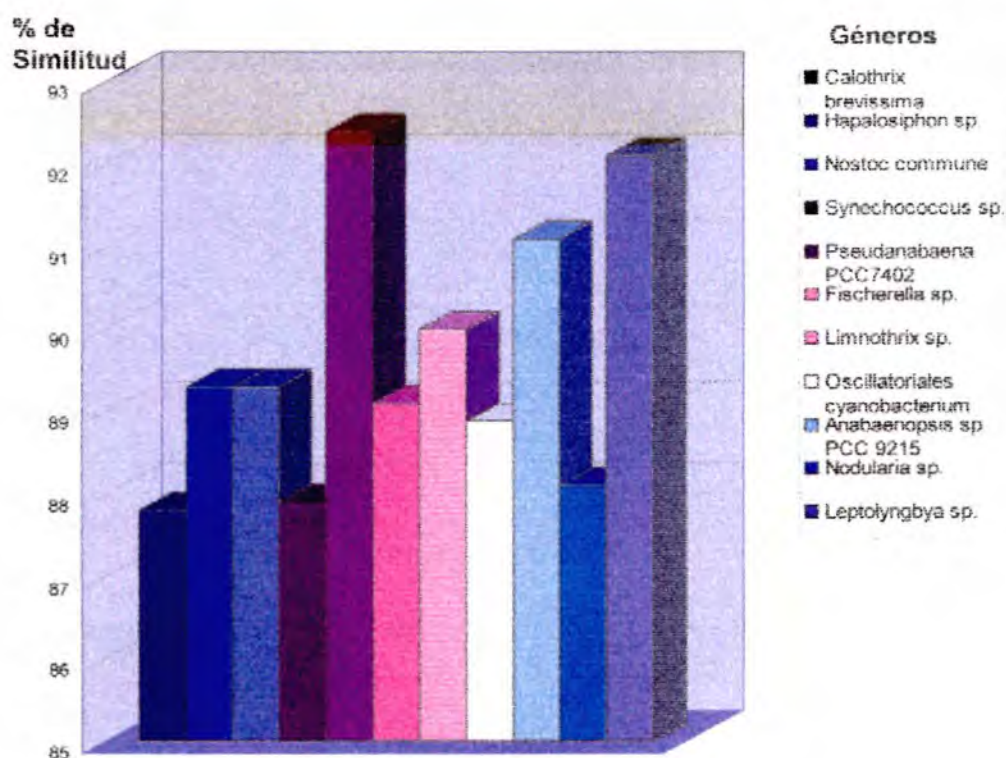


Figura 42. Comparación de los porcentajes de similitud de la secuencia del fragmento de ADN de la muestra 2.4 con los géneros de cianobacterias seleccionados

Se obtuvieron dos árboles filogenéticos por dos métodos distintos, el primero por el método de Kimura, Neighbor y el segundo por el método de máxima parsimonia. En ambos casos se utilizaron 1000 remplazos (Fig. 43 y 44)

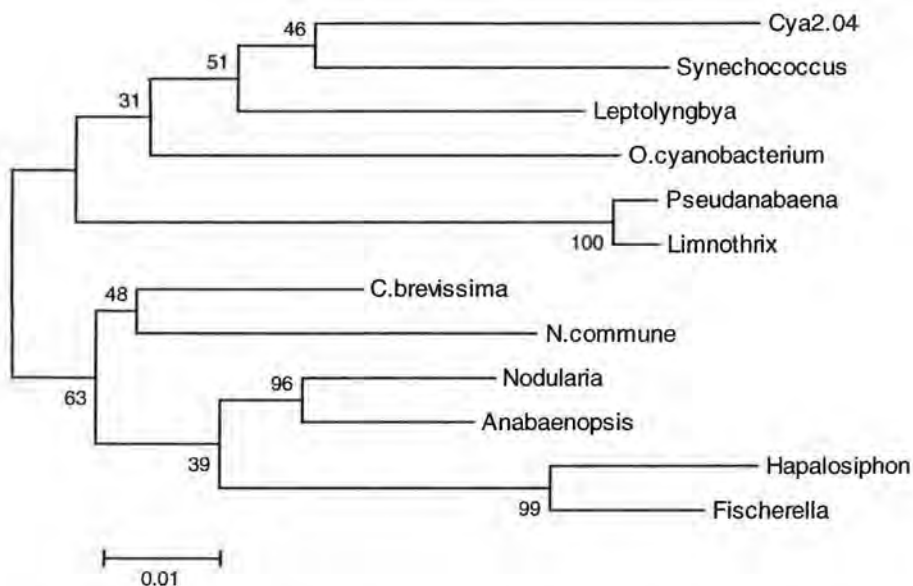


Figura 43 Árbol filogenético construido con el método de Kimura NJ, 2 parámetros con 1000 reemplazos

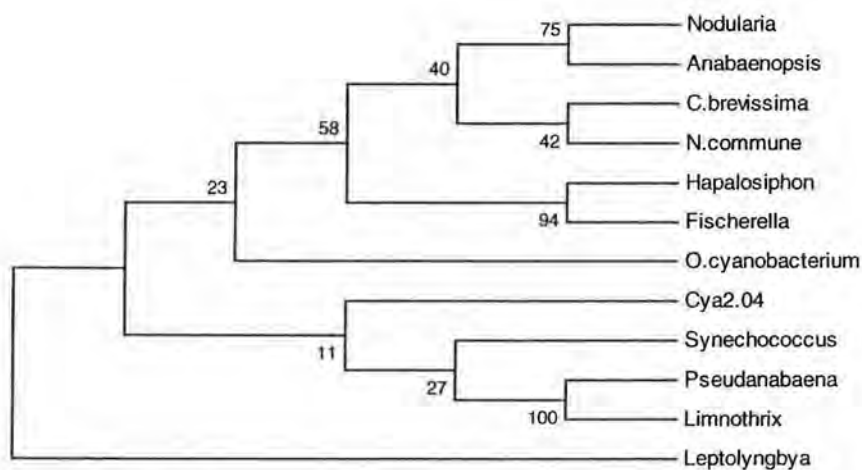


Figura 44 Árbol filogenético construido con el método Máxima Parsimonia con 1000 reemplazos.

5. Discusión

Costa Rica cuenta con una ubicación geográfica, y un clima apto para el desarrollo de muchas especies, y este estudio representa una evidencia más de la gran biodiversidad con que cuenta nuestro país, ya que en sólo dos sitios muestreados, se encontraron una gran variedad de cianobacterias. En las muestras colectadas se hallaron representantes de cuatro, de los cinco grupos en que se encuentran clasificadas las cianobacterias.

Las muestras iniciales representaron todo un reto, ya que fueron matrices muy complejas, que albergaban, no solo más de un morfotipo de cianobacterias, sino que además se evidenció la presencia de muchos otros microorganismos tales como algas, hongos, bacterias y hasta protozoarios.

Para resolver este problema, se realizó un análisis macroscópico y se trató de separar y aislar, de forma muy cuidadosa las partes de la muestra que presentaron características típicas de las cianobacterias, tal es el caso de la coloración verde azulada que distingue la mayoría de especies.

En esta etapa, la falta de experiencia y conocimiento sobre las diversas variedades de cianobacterias, pudieron ocasionar que se perdieran algunas especies que formaran parte de la muestra inicial, y que no hayan sido separadas por presentar otra coloración, por ejemplo.

El procesamiento que se le dio a las muestras, no fue llevado a cabo en las condiciones ideales, ya que se pretendía incubar las muestras cultivadas en medio BG11 líquido, en condiciones de agitación, a una temperatura similar a la del sitio de recolección, pero esto no se pudo lograr por la falta de equipo, ya que sólo se contó con una incubadora con agitación, la cual se mantuvo a una temperatura intermedia, de 35 °C.

El resto de las muestras se mantuvieron a temperatura ambiente, con agitación para aumentar la oxigenación de los cultivos.

Al analizar los cuadros de resultados donde se anotan las observaciones a lo largo del procesamiento (Cuadros 11, 12, 13 y 15), se puede evidenciar la pérdida de morfotipos o especies de cianobacterias, como en el caso de la muestra 2.2 y la 3.1 en donde inicialmente se observaban dos morfotipos y al final se presentó sólo uno.

Esto puede deberse a que las condiciones de mantenimiento de los cultivos, favorecieran el crecimiento de una de las especies presentes, o que a la hora de tomar porciones de cultivos para descontaminar, la muestra no fuera homogénea y en ese paso se perdiera uno de los morfotipos.

Otra posibilidad es que alguno de los morfotipos fuera sensible a los diversos métodos de descontaminación utilizados, tal es el caso de la cicloheximida, usada para eliminar los hongos o la ampicilina, para eliminar bacterias.

Por otra parte el hecho de que se presente mas de un morfotipo en la muestra, también representa un problema, ya que suelen ser muy difíciles de separar y esto afectaría la identificación por métodos moleculares, en donde se requiere que el ADN extraído sea lo más puro posible.

El análisis de las bacterias contaminantes se llevó a cabo utilizando el método BIOLOG, que se basa en la utilización de carbohidratos, por la vía oxidativa que da como resultado la producción de iones que genera un cambio en el pH y este en el indicador, lo que lleva a obtener un patrón de color definido con el que se llega a la identificación de la bacteria. En un total de 13 muestras analizadas, se encontró sólo cinco bacterias diferentes, o sea que el contaminante fue común para varias muestras, lo que es de esperar por la cercanía y conexión entre los lugares en donde se realizó el muestreo.

La eliminación de los contaminantes fue considerada una prioridad para el avance de este estudio, ya que se presenta una gran diferencia en la velocidad de crecimiento de las cianobacterias, con respecto a la de los contaminantes (hongos y bacterias), lo que representa una gran desventaja para la obtención de cultivos puros y una importante pérdida en tiempo.

En cuanto al análisis de los métodos utilizados para descontaminar las muestras, se llegó a la conclusión de que la cicloheximida fue muy efectiva para eliminar la contaminación por hongos, sin afectar el crecimiento de la cianobacteria, ya que de hecho se reportaron cultivos que se mantuvieron con cicloheximida por meses sin evidenciar cambios o interferencia con el crecimiento de la cianobacteria.

El tratamiento con Lysol fue descartado, porque además de producir severos daños a las cianobacterias, no fue efectivo en la eliminación de los contaminantes.

Los métodos que utilizaron ampicilina fueron bastante efectivos, pero se debe tener el cuidado de preparar la muestra en la forma indicada en el procedimiento, para que la penetración y el contacto con el antibiótico, sean óptimos. Además es de suma importancia tomar en cuenta que la ampicilina es inestable, y pierde su efecto en un corto lapso de tiempo después de ser reconstituida (aproximadamente 5 días).

La ubicación de las muestras en los diversos grupos y géneros, se realizó de forma tentativa, basándose en la comparación de características morfológicas observadas al microscopio. Se pretendía confirmar los géneros propuestos, por métodos moleculares, pero por falta de tiempo y recursos, se seleccionó una muestra; la que presentó la mejor calidad y cantidad de ADN (Fig.40), para realizar la amplificación y secuenciación respectiva. La muestra seleccionada fue la 2.4.

En la reacción de PCR, utilizada para llevar a cabo la amplificación, los imprimadores que dieron buen resultado, generando una banda con el peso esperado, fueron los imprimadores específicos CYA 106F y CYA 1512 R.

En cuanto a los resultados obtenidos en la secuenciación, se obtuvieron fragmentos provenientes tanto del primer Forward como del Reverse, con sentido 5'3' y 3'5' respectivamente, ambos incompletos, con errores y omisiones. Se obtuvo la banda complementaria al fragmento Reverse y se alineó con el fragmento Forward para compararlas y corregir manualmente errores dentro de lo permitido, como nucleótidos no identificados en alguna de las bandas.

Se esperaba obtener una banda de entre 1500 y 1700 nucleótidos pero al eliminar las secciones con errores se llegó a un fragmento de 530 nucleótidos que fue el utilizado para el análisis comparativo.

Primero se utilizó el programa BLAST para hacer una búsqueda contra bacterias, y de ahí se seleccionaron 11 géneros con similitudes para comparar. Estos 11 géneros se alinearon entre ellos y con la muestra y se obtuvo el porcentaje de similitud.

El género que presentó mayor similitud con la muestra fue *Pseudanabaena* con un 92.4% de similitud, lo cual coincide con el género asignado a esta muestra según las características morfológicas observadas al microscopio.

En general los porcentajes de similitud se mantuvieron altos; no menores a un 87.8 % lo que indica la probabilidad de que la secuencia de 530 nucleótidos, corresponda a una región conservada, común para las cianobacterias. Por lo tanto sería importante tratar de obtener una secuencia de mayor longitud para definir mejor los resultados.

Se construyeron dos árboles filogenéticos, uno con el método Neighbor-Joining de Kimura, que utiliza la distancia filogenética para hacer una comparación entre los géneros propuestos y la muestra a analizar. (Fig. 43).

Este árbol en realidad no define un posible género para la muestra analizada, ya que los índices en las ramificaciones son muy bajos. Idealmente estos índices deben ser mayores a 75-80%.

En este resultado, podemos observar un probable grupo de 5 géneros que se relacionan de forma mas estrecha con la muestra, entre ellos: *Leptolyngbya*, *Pseudoanabaena*, *Limnothrix*, *Oscillatoria* y *Synechococcus*. Este último género puede ser excluido del grupo de probabilidades, por las fuertes diferencias a nivel morfológico, ya que este género es unicelular y la muestra analizada es filamentosa.

El segundo árbol en se construyó con el método de máxima parsimonia. Este se basa en sitios informativos y utiliza un criterio conservador para relacionar secuencias que tengan el menor número de diferencias. Al analizar este árbol, (Fig. 44), se observa que

divide los géneros propuestos en dos grupos bien definidos, y relaciona la muestra 2.4 con uno de ellos. En este caso se repiten cuatro de los cinco géneros propuestos con el árbol construido con el método anterior. Estos géneros son: *Leptolyngbya*, *Pseudoanabaena*, *Limnothrix*, y *Synechococcus*. De igual forma este último puede excluirse de las posibilidades por las mismas razones antes mencionadas.

A pesar de que en este caso el análisis molecular no es concluyente, si nos orienta hacia un posible género, que de paso coincide con el propuesto por el análisis morfológico microscópico. Por esto se recomienda repetir el análisis poniendo especial énfasis en la obtención de una secuencia de tamaño adecuado (1500 pb) y en el correcto alineamiento de las secuencias.

6. Conclusiones

Con la elaboración de este trabajo se llegó a las siguientes conclusiones:

La ubicación geográfica, y las diversas condiciones ambientales, hacen de Costa Rica un lugar apto el desarrollo de muchas especies, y este estudio representa una evidencia más de la gran biodiversidad con que cuenta nuestro país, ya que en dos sitios muestreados se encontraron posibles representantes de 4 de los cinco grupos de cianobacterias que se conocen.

Las muestras iniciales representaron todo un reto, por su complejidad y la presencia de muchos otros microorganismos tales como algas, hongos, bacterias y hasta protozoarios.

En la mayoría de los casos las condiciones de mantenimiento de los cultivos han permitido un crecimiento adecuado de las muestras, generando material suficiente para realizar los análisis moleculares.

La presencia de más de un morfotipo por muestra representa un problema, ya que suelen ser muy difíciles de separar y esto impediría la identificación por métodos moleculares, en donde se requiere que el ADN extraído corresponda a una única especie.

La eliminación de los contaminantes fue una prioridad para el avance de este estudio, ya que las cianobacterias están en desventaja en cuanto a la velocidad de crecimiento con respecto los contaminantes (hongos y bacterias). Esto interfiere con la obtención de cultivos puros y representa una importante pérdida en tiempo. Para llevar a cabo la descontaminación, la preparación previa de la muestra es indispensable, ya que permite que la penetración y el contacto con el antibiótico, sean óptimos.

En cuanto a la amplificación del material genético por PCR, los mejores resultados se obtuvieron utilizando los imprimadores específicos CYA 106F y CYA 1512 R

La falta de tiempo, impidió realizar una adecuada secuenciación de la muestra seleccionada, por lo tanto se recomienda repetirla para obtener un fragmento más significativo que permita definir mejor la identidad de la cianobacteria presente en la muestra seleccionada.

El análisis microscópico de las características morfológicas no es por si sólo un método suficiente para clasificar las cianobacterias, por esto se recomienda combinar esta técnica con métodos moleculares, realizados en condiciones óptimas para obtener un resultado concreto y confiable.

7. Referencias

- Alberts B. 1994. *Molecular Biology of The Cell*. 3^a Edición, New York, U.S.A. 291-306.
- Aldrich, H. C. 1974. Cell separation in blue-green bacteria. *J. Bacteriol.* 118:708-716.
- Armijo, M. y San Martín, J. 1984. La salud por las aguas termales. EDAF S.A., Madrid España. 65-73.
- Audersik, J. 1997. *Biología General*. 2^{da} Edición. Mc-Graw Hill Interamericana. México D.F. 357-369.
- Cabrera, M.G., Quirós, Y. y Rojas, L. 1994. El termalismo y su relación con el turismo en Costa Rica. ULACIT, San José, Costa Rica. 15-22.
- Castenholz, R. W. 1998. Culturing methods for cyanobacteria. *Methods Enzymol.* 167: 68-93.
- Castenholz, R. W. 2001. Phylum Cyanobacteria. Oxygenic Photosynthetic Bacteria. In: *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. Second Edition. G. Garrity, D. R. Boone, and R. W. Castenholz (eds.) New York.
- Castenholz, R. W. 1996. Endemism and biodiversity of thermophilic cyanobacteria. *Nova Hedwigia.* 112:33-47.
- García, P. F., López C. A. y Nübel, U. 2001. Phylogenetic and morphological diversity of cyanobacteria in soil desert crust from the Colorado Plateau. *App. Environ. Microbiol.* 67:1902 -1910.
- Glazer, A.N. 1988. Phycobiliproteins. *Methods Enzymol.* 167:291-303.

Gómez, V. 1972. Propiedades físicas y químicas del agua de la fuente termal "Aguacaliente de San Carlos". Tesis de Licenciatura. Universidad de Costa Rica, San José.

Henley, R. W. 1984. Chemical structure of geothermal systems. *Rev Econom Geol.* 1: 9-30

Marini , L. Guidi, M. Fernandez, J. y Barquero, R. 1990. Analisis geoquímico de las fuentes termales y frías del Volcán Arenal. *Bol OSIVAM.* 3:9-27.

Mc Donald, G. 1972. Volcanoes. Prentice -May Inc. New Jersey. USA. 359-364.

Miller R. S. y Castenholz R. W. 2000. Evolution of thermotolerance in hot springs of cyanobacteria of the genus *Synechococcus*. *App. Environ. Microbiol.* 66: 4222-4229.

Nübel, U., Garcia, P.F. y Muyzer, G. 1997. PCR primers to amplify 16S rRNA genes from cyanobacteria. *App. Environ. Microbiol.* 63 : 3327- 3332.

Palinska, K. A., Horgan, W. J y Krumbein, W. E. 2002. Cyanobacteria. pp 1-8. En: *Encyclopedia of Life Sciences (Nature Publishing Group),. Macmillan Publishers Ltd, New York.*

Paniagua, S. 2000. Geología de Costa Rica: Aguas Termales. Editorial Tecnológica de Costa Rica. San José. 443-455.

Paniagua, S. y Van der Bilt, H. 1979. Geología y bioquímica de las aguas termales del Valle Central, Costa Rica. *Rev. Cien. Tecnol.* 3:109-129.

Peinador, M. 1999. Las cianobacterias como indicadores de contaminación orgánica. *Rev. Biol. Trop.* 47: 381- 391.

Rippka, R. 1988. Recognition and identification of cyanobacteria. *Methods Enzimol.* 167: 28-67.

Rippka, R., Deruelles, J., Waterbury, J. B., Herdman, M. y Stainer, R. 1979. Generic assignments, strain histories and properties of pure cultures of cyanobacteria. J. Gen. Microbiol. 111:1- 61.

Schlegel, H. 1998. Antibiotic activity of new cyanobacterial isolates from Australia and Asia against green algae and cyanobacteria. J. Appl. Phycol. 10:471-479.

Soto, G., López, D.L., Fernández, J. y Alvarado, G. 1999. El origen de las fuentes termales y minerales de la meseta Central. Apuntes de Geología. 2:1-8.

Strachan, T. y Read, A.P. 1999. Human Molecular Genetics. BIOS Scientific Publishers Ltd. Segunda Edición, USA. 124-134.

Whitton B. A. 1992. Diversity, ecology and taxonomy of the cyanobacteria. pp 1-51. En: Carr, N.G. y Mann, N. (eds). Photosynthetic Prokaryotes. New York

Yock, F.A. 1998. Chemical and isotopic studies in the Miravalles Geothermal Field, Costa Rica. Geothermal Training Programme. 17: 461-473.

Referencias de Internet

Galería de imágenes. Instituto de Bioquímica Vegetal y Fotosíntesis. Descargado el 2 de mayo del 2004. http://www.ibvf.cartuja.csic.es/Cultivos/Seccion_I.htm

Galería de imágenes. Cyanosite: Webserver for Cyanobacterial Research. Descargado el 5 de abril del 2004. <http://www-cyanosite.bio.purdue.edu/index.html>

Microscope gallery by PlantBio Co., Ltd. Descargado el 5 de abril del 2004. <http://www.plantbio.com/Bio2/Fphytopl/fpp2012.htm>

Galería de imágenes.
http://www.autocoat.com/rhcis/markets_and_products/images/myxosarcina.jpg

Galería de imágenes.

<http://www.isis.de/members/~ralfwagner/Bilder/Cylindrospermum.jpg>

Galería de imágenes. <http://www.nirgal.net/terraformation.html>

Galería de imágenes.

http://botit.botany.wisc.edu/images/130/Bacteria/Cyanobacteria/Oscillatoria/_MC.html

Galería de imágenes. <http://ag.arizona.edu/limnology/Cyanophyta/arthro1.jpg>

Galería de imágenes. <http://www.uwm.edu.pl/wbiol/tablica/glony/index2.htm>

Galería de imágenes.

http://www.cobra.ac.uk/introduction/html/why_cobra_important.cfm

Galería de imágenes. http://forest.mtu.edu/students/jlmusolf/hapalosiphon_Mc.jpg

ANEXO 1

Preparación medio líquido:

Como medio de cultivo se utilizó el BG11 con nitratos (BG11c), que se preparó mezclando las siguientes sustancias en las cantidades y concentraciones indicadas en el cuadro 18:

Cuadro 18. Composición química del medio BG11

Sustancia	Concentración (g/L)	Cantidad (mL)
NaNO ₃	150	10
CaCl ₂ • 2H ₂ O	36	1
K ₂ HPO ₄ • 3 H ₂ O	40	1
MgSO ₄ • 7 H ₂ O	75	1
Na ₂ CO ₃	20	2
Na ₂ EDTA	1	1
Citrato de amonio férrico	6	1
Ácido cítrico	6	1
Elementos traza	-	1

El volumen se llevó a 1 litro con agua bidestilada y el pH se ajustó a un valor entre 7.5 – 7.9. Este medio debe autoclavarse y guardar bien sellado en refrigeración (4°C)

Preparación de medio BG11 sólido (1L)

Se pesaron 15 g de agar en polvo (15 g/L) y colocaron en un balón de fondo plano. Luego se agregó un litro de medio BG11 líquido y se calentó hasta disolver.

Una vez disuelto, se autoclavó y el medio se vació, en forma aséptica, en placas con un grosor entre 0.6 y 0.8 mm. Estas placas se dejaron solidificar, y se guardaron en refrigeración (4°C)

Preparación de medio BG11 / Ampicilina (0.5 L)

Se preparó medio litro de BG11 como se describió anteriormente, pero en caso de preparar medio sólido, se utiliza una concentración de agar de 12 g/L, o sea para

preparar medio litro se pesaron 6 gramos de agar. Se resuspendieron con 5 mL de agua destilada estéril, 500 mg de ampicilina contenidos en el vial (concentración final de ampicilina: 1mg/mL). Este procedimiento se realizó de forma aséptica.

Una vez autoclavado el medio, se dejó enfriar un poco y se agregaron los 5 mL de solución estéril de ampicilina y se agitó suavemente. El medio se vació en las lo antes posible, tratando de obtener un grosor de 0.5 a 0.8 mm, se dejaron solidificar, se empacaron y se guardaron en refrigeración (4°C). Las placas se usaron para cultivo antes de 5 días, ya que la ampicilina una vez reconstituida puede perder su efecto antibiótico.

ANEXO 2

	10	20	30	40	50	60	70	80	90	100	
Cya2.04	CCGC	CAAG	CGGTGGAG	TATGTG	TTTAATT	NGATGCA	ACGCGA	AGAACCTT	ACCAAGGCTT	GACATGTC	CGGGACCTTCTTTGAAAGAGGAG-GTGCC
Nodularia	CCGC	CAAG	CGGTGGAG	TATGTG	TTTAATT	CGATGCA	ACGCGA	AGAACCTT	ACCAAGGCTT	GACATGTC	CGGGACCTTCTTTGAAAGAGGAGTGCC
C.brevissima	CCGC	CAAG	CGGTGGAG	TATGTG	TTTAATT	CGATGCA	ACGCGA	AGAACCTT	ACCAAGGCTT	GACATGTC	CGGGACCTTCTTTGAAAGAGGAGTGCC
Hapalosiphon sp.	CCGC	CAAG	CGGTGGAG	TATGTG	TTTAATT	CGATGCA	ACGCGA	AGAACCTT	ACCAAGGCTT	GACATGTC	CGGGACCTTCTTTGAAAGAGGAGTGCC
N.commune	CCGC	CAAG	CGGTGGAG	TATGTG	TTTAATT	CGATGCA	ACGCGA	AGAACCTT	ACCAAGGCTT	GACATGTC	CGGGACCTTCTTTGAAAGAGGAGTGCC
Synechococcus sp.	CCGC	CAAG	CGGTGGAG	TATGTG	TTTAATT	CGATGCA	ACGCGA	AGAACCTT	ACCAAGGCTT	GACATGTC	CGGGACCTTCTTTGAAAGAGGAGTGCC
Pseudanabaena PCC7402	CCGC	CAAG	CGGTGGAG	TATGTG	TTTAATT	CGATGCA	ACGCGA	AGAACCTT	ACCAAGGCTT	GACATGTC	CGGGACCTTCTTTGAAAGAGGAGTGCC
Fischerella sp.	CCGC	CAAG	CGGTGGAG	TATGTG	TTTAATT	CGATGCA	ACGCGA	AGAACCTT	ACCAAGGCTT	GACATGTC	CGGGACCTTCTTTGAAAGAGGAGTGCC
Limnothrix sp.	CGCA	CAAG	CGGTGGAG	TATGTG	TTTAATT	CGATGCA	ACGCGA	AGAACCTT	ACCAAGGCTT	GACATGTC	CGGGACCTTCTTTGAAAGAGGAGTGCC
O.cyanobacterium	CCGC	CAAG	CGGTGGAG	TATGTG	TTTAATT	CGATGCA	ACGCGA	AGAACCTT	ACCAAGGCTT	GACATGTC	CGGGACCTTCTTTGAAAGAGGAGTGCC
Anabaenopsis sp.	CCGC	CAAG	CGGTGGAG	TATGTG	TTTAATT	CGATGCA	ACGCGA	AGAACCTT	ACCAAGGCTT	GACATGTC	CGGGACCTTCTTTGAAAGAGGAGTGCC
Leptolyngbya sp.	CCGC	CAAG	CGGTGGAG	TATGTG	TTTAATT	CGATGCA	ACGCGA	AGAACCTT	ACCAAGGCTT	GACATGTC	CGGGACCTTCTTTGAAAGAGGAGTGCC

	110	120	130	140	150	160	170	180	190	200	
Cya2.04	CGGG	AACCGG	AGCACAGG	TGGTGC	ATGGCTGT	CGTCAG	CTCGTGT	CGTGAG	ATGTTGGG	TAAATCCCG	CAACGAGCGCAACCCCTCGTCC
Nodularia	CGGG	AGCGCG	AACACAGG	TGGTGC	ATGGCTGT	CGTCAG	CTCGTGT	CGTGAG	ATGTTGGG	TAAATCCCG	CAACGAGCGCAACCCCTCGTCC
C.brevissima	CGGG	AGCGCG	AACACAGG	TGGTGC	ATGGCTGT	CGTCAG	CTCGTGT	CGTGAG	ATGTTGGG	TAAATCCCG	CAACGAGCGCAACCCCTCGTCC
Hapalosiphon sp.	CGGG	AGCGCG	AACACAGG	TGGTGC	ATGGCTGT	CGTCAG	CTCGTGT	CGTGAG	ATGTTGGG	TAAATCCCG	CAACGAGCGCAACCCCTCGTCC
N.commune	CGGG	AGCGCG	AACACAGG	TGGTGC	ATGGCTGT	CGTCAG	CTCGTGT	CGTGAG	ATGTTGGG	TAAATCCCG	CAACGAGCGCAACCCCTCGTCC
Synechococcus sp.	CGGG	AACCGG	AGCACAGG	TGGTGC	ATGGCTGT	CGTCAG	CTCGTGT	CGTGAG	ATGTTGGG	TAAATCCCG	CAACGAGCGCAACCCCTCGTCC
Pseudanabaena PCC7402	CGGG	AGCGCG	AACACAGG	TGGTGC	ATGGCTGT	CGTCAG	CTCGTGT	CGTGAG	ATGTTGGG	TAAATCCCG	CAACGAGCGCAACCCCTCGTCC
Fischerella sp.	CGGG	AGCGCG	AACACAGG	TGGTGC	ATGGCTGT	CGTCAG	CTCGTGT	CGTGAG	ATGTTGGG	TAAATCCCG	CAACGAGCGCAACCCCTCGTCC
Limnothrix sp.	CGGG	AGCGCG	AACACAGG	TGGTGC	ATGGCTGT	CGTCAG	CTCGTGT	CGTGAG	ATGTTGGG	TAAATCCCG	CAACGAGCGCAACCCCTCGTCC
O.cyanobacterium	CGGG	AGCGCG	AACACAGG	TGGTGC	ATGGCTGT	CGTCAG	CTCGTGT	CGTGAG	ATGTTGGG	TAAATCCCG	CAACGAGCGCAACCCCTCGTCC
Anabaenopsis sp.	CGGG	AGCGCG	AACACAGG	TGGTGC	ATGGCTGT	CGTCAG	CTCGTGT	CGTGAG	ATGTTGGG	TAAATCCCG	CAACGAGCGCAACCCCTCGTCC
Leptolyngbya sp.	CGGG	AGCGCG	AACACAGG	TGGTGC	ATGGCTGT	CGTCAG	CTCGTGT	CGTGAG	ATGTTGGG	TAAATCCCG	CAACGAGCGCAACCCCTCGTCC

	210	220	230	240	250	260	270	280	290	300	
Cya2.04	TCA	TTGAGTTGGG	CACTTTGGGG	GAGCTGCC	GGTGAC	AAACCGG	AGGAAGG	TGGGGATG	ACGTCA	AGTCAG	CATGCCCC
Nodularia	GCA	TTAAGTTGGG	CACTCTAG	AGAGACTGCC	GGTGAC	AAACCGG	AGGAAGG	TGGGGATG	ACGTCA	AGTCAG	CATGCCCC
C.brevissima	GCA	TTAAGTTGGG	CACTCTAG	AGAGACTGCC	GGTGAC	AAACCGG	AGGAAGG	TGGGGATG	ACGTCA	AGTCAG	CATGCCCC
Hapalosiphon sp.	GCATTTAG	GATGGG	CACTCTA	AGGAGACTGCC	GGTGAC	AAACCGG	AGGAAGG	TGGGGATG	ACGTCA	AGTCAG	CATGCCCC
N.commune	GCA	TTAAGTTGGG	CACTCTAG	AGAGACTGCC	GGTGAC	AAACCGG	AGGAAGG	TGGGGATG	ACGTCA	AGTCAG	CATGCCCC
Synechococcus sp.	GCA	TTTCA	GTTGGG	CACTCTA	AGGAGACTGCC	GGTGAC	AAACCGG	AGGAAGG	TGGGGATG	ACGTCA	AGTCAG
Pseudanabaena PCC7402	TCA	TTAAGTTGGG	CACTCTAG	AGAGACTGCC	GGTGAC	AAACCGG	AGGAAGG	TGGGGATG	ACGTCA	AGTCAG	CATGCCCC
Fischerella sp.	GCATTT	CGGGTGGG	CACTCTA	AGGAGACTGCC	GGTGAC	AAACCGG	AGGAAGG	TGGGGATG	ACGTCA	AGTCAG	CATGCCCC
Limnothrix sp.	TCA	TTAAGTTGGG	CACTCTAG	AGAGACTGCC	GGTGAC	AAACCGG	AGGAAGG	TGGGGATG	ACGTCA	AGTCAG	CATGCCCC
O.cyanobacterium	GCA	TTAAGTTGGG	CACTCTAG	AGAGACTGCC	GGTGAC	AAACCGG	AGGAAGG	TGGGGATG	ACGTCA	AGTCAG	CATGCCCC
Anabaenopsis sp.	GCA	TTAAGTTGGG	CACTCTAG	AGAGACTGCC	GGTGAC	AAACCGG	AGGAAGG	TGGGGATG	ACGTCA	AGTCAG	CATGCCCC
Leptolyngbya sp.	GCA	TTTCA	GTTGGG	CACTCTA	AGGAGACTGCC	GGTGAC	AAACCGG	AGGAAGG	TGGGGATG	ACGTCA	AGTCAG

	310	320	330	340	350	360	370	380	390	400
										
Cya2.04	GTACTACAA	TGCTGTGGACAAAGAGT	TGCGAGCCGCGACGGCAAGCCAAATCTCATAAA	CCACGGCTCAGTT	CAGATTG	CGAGGCTGCAACT	CGCCTGC			
Nodularia	GTACTACAA	TGCTACGGACAAAGGGG	AGCTACACAGCAATGTGATGCAAA	TCTCAAAAA	CCGTAGCTCAGTT	CAGATCGCAGGCTGCAACT	CGCCTGC			
C.brevissima	GTACTACAA	TGCTACGGACAAAGGGG	AGCAAGCTAGCGATAGCAAGCAAA	TCTCATAAA	CCGTAGCTCAGTT	CAGATCGCAGGCTGCAACT	CGCCTGC			
Hapalosiphon sp.	GTACTACAA	TGCTACGGACAAAGGGG	AGCGAGACTGCGAAGTTAAGCAAA	TCTCAGAAA	CCGTGGCTCAGTT	CAGATCGCAGGCTGCAACT	CGCCTGC			
N.commune	GTACTACAA	TGCTCCGGACAGAGGGC	AGCAAGCGGGCGACCGCAAGCAAA	TCCCGGAAA	CCGGAGCTCAGTT	CAGATCGCAGGCTGCAACT	CGCCTGC			
Synechococcus sp.	GTACTACAA	TGCTGTGGACAGAGGT	TGCCAACCCGCGAGGGCGAGCTAA	TCTCTTAAA	CCACGGCTCAGTT	CAGATTG	CGAGGCTGCAACT	CGCCTGC		
Pseudanabaena PCC7402	GTACTACAA	TGGCCGGGACAAAGAGT	CGCAAGCATGCGAATGCAAGCTAA	TCTCATAAA	CCCGGTCTTAGTT	CAGATTG	CGAGGCTGCAACT	CGCCTGC		
Fischerella sp.	GTACTACAA	TGCTACGGACAAAGGGG	AGCGAGCCAGCGATGGCAAGCAAA	TCTCAGAAA	CCGTGGCTCAGTT	CAGATCGCAGGCTGCAACT	CGCCTGC			
Limnothrix sp.	GTACTACAA	TGGCCGGGACAAAGAGT	CGCAAGCATGCGAATGCAAGCTAA	TCTCATAAA	CCCGGTCTTAGTT	CAGATTG	CGAGGCTGCAACT	CGCCTGC		
O.cyanobacterium	GTACTACAA	TGCTTCGGACAAAGGGG	AGCAAGCGCGCGAGTGCAAGCTAA	TCCCATAAA	CCGAGGCTCAGTT	CAGATTG	CGAGGCTGCAACT	CGCCTGC		
Anabaenopsis sp.	GTACTACAA	TGCTACGGACAAAGGGG	AGCGACACAGCGATGTGAAGCAAA	TCTCATAAA	CCGTAGCTCAGTT	CAGATCGCAGGCTGCAACT	CGCCTGC			
Leptolyngbya sp.	GTACTACAA	TGCTTCGGACAAAGGGG	TGCGAGCCAGCGATGGCAAGCCAA	TCCCATAAA	CCGAGGCTCAGTT	CAGATTG	CGAGGCTGCAACT	CGCCTGC		
	410	420	430	440	450	460	470	480	490	500
										
Cya2.04	ATGAAGGAGGAATCGCTAGTAATCGCAGGT	CAGCATACTGCGGTGAATACGTT	ACCGGGGCTTGTACACACCGCCCGT	CACACCA	TGGGAGTTGGCCAC					
Nodularia	GTGAAGTCGGAATCGCTAGTAATTCGAGGT	CAGCATACTGCGAGTGAATTCGTT	CCCGGGGCTTGTACACACCGCCCGT	CACACCA	TGGGAGCTGGTCAC					
C.brevissima	GTGAAGTCGGAATCGCTAGTAATTCGAGGT	CAGCATACTGCGAGTGAATTCGTT	CCCGGGGCTTGTACACACCGCCCGT	CACACCA	TGGGAGCTGGTCAC					
Hapalosiphon sp.	GTGAAGGAGGAATCGCTAGTAATTCGAGGT	CAGCATACTGCGAGTGAATTCGTT	CCCGGGGCTTGTACACACCGCCCGT	CACACCA	TGGGAGCTGGTAGT					
N.commune	GTGAAGGAGGAATCGCTAGTAATTCGAGGT	CAGCATACTGCGAGTGAATTCGTT	CCCGGGGCTTGTACACACCGCCCGT	CACACCA	TGGGAGCTGGTAGT					
Synechococcus sp.	ATGAAGGCGGAATCGCTAGTAATTCGAGGT	CAGCATACTGCGGTGAATACGTT	CCCGGGGCTTGTACACACCGCCCGT	CACACCA	TGGGAGTTGGCCAC					
Pseudanabaena PCC7402	ATGAAGGCGGAATCGCTAGTAATTCGAGGT	CAGCATACTGCGGTGAATACGTT	CCCGGGGCTTGTACACACCGCCCGT	CACACCA	TGGGAGCTGGTCAC					
Fischerella sp.	GTGAAGGAGGAATCGCTAGTAATTCGAGGT	CAGCATACTGCGAGTGAATTCGTT	CCCGGGGCTTGTACACACCGCCCGT	CACACCA	TGGGAGCTGGTCAC					
Limnothrix sp.	ATGAAGGCGGAATCGCTAGTAATTCGAGGT	CAGCATACTGCGGTGAATACGTT	CCCGGGGCTTGTACACACCGCCCGT	CACACCA	TGGGAGCTGGTCAC					
O.cyanobacterium	ATGAAGGAGGAATCGCTAGTAATTCGAGGT	CAGCATACTGCGGTGAATACGTT	CCCGGGGCTTGTACACACCGCCCGT	CACACCA	TGGGAGCTGGCCAC					
Anabaenopsis sp.	GTGAAGTAGGAATCGCTAGTAATTCGAGGT	CAGCATACTGCGAGTGAATTCGTT	CCCGGGGCTTGTACACACCGCCCGT	CACACCA	TGGGAGCTGGTCAC					
Leptolyngbya sp.	ATGAAGGCGGAATCGCTAGTAATTCGAGGT	CAGCATACTGCGGTGAATACGTT	CCCGGGGCTTGTACACACCGCCCGT	CACACCA	TGGGAGTTGGCCAC					
	510	520	530							
										
Cya2.04	GCCCCAAGTCGTTACTTCCAA	CCCATTCGTGGAGGGGG								
Nodularia	GCCCCAAGTCGTTACTTCCAA	CCCATTCGTGGAGGGGG								
C.brevissima	GCCCCAAGTCATTACTTCCAA	CCCATTCGTGGAGGGGG								
Hapalosiphon sp.	GCCCCAAGTCGTTACCCCTAAC	TGTTGCGCAGAGGGG								
N.commune	GCCCCAAGTCATTACTTCCAA	CTGTCAAAAGAGGA								
Synechococcus sp.	GCCCCAAGTCGTTACTTCTAA	CCCGTAAGGGAGGGG								
Pseudanabaena PCC7402	GCCCCAAGTCGTTATCTCA	CCCCGCAAGGGAGGGG								
Fischerella sp.	GCCCCAAGTCGTTACCCCTAAC	CTTTCGTGGGAGGGG								
Limnothrix sp.	GCCCCAAGTCGTTATCTCA	CCCCGCAAGGNAGGGG								
O.cyanobacterium	GCCCCAAGTCGTTACCCCTAAC	CCGTTCGCGGAGGGG								
Anabaenopsis sp.	GCCCCAAGTCGTTACCCCA	ACTTTTAGGAGAGGGG								
Leptolyngbya sp.	GCCCCAAGTCGTTACTTCCAA	CCCATTCGTGGAGGA								