

# Red de Observatorios Microbianos

*Protocolos de estandarización y toma de muestras de agua en América Latina*



# **Red de Observatorios Microbianos**

*Protocolos de estandarización y toma de muestras de agua  
en América Latina*

*Fermani Paulina, Gereá Marina, Graziano Martín, Mateus-Barros Erick, Sabio y  
García Carmen, Sánchez María Laura, Schiaffino Romina*

*Compiladores*

*2023*

*Primera Edición*

## **Resumen**

El impacto antrópico y los factores climáticos actúan de manera conjunta sobre los ecosistemas como agentes forzantes de cambios, llevando muchas veces al deterioro de los mismos. El efecto de estos agentes depende de la localización geográfica, el clima y la vegetación, entre otros factores naturales y antrópicos que caracterizan los ambientes estudiados. Para comprender el impacto de estos factores sobre los ecosistemas acuáticos y/o terrestres es importante contar con información continua, estandarizada y extendida en el tiempo.

Dentro de los ecosistemas acuáticos, los ensamblajes microbianos juegan un rol fundamental en los ciclos de la materia y energía; y además tienen la potencialidad de ser indicadores robustos del estado ecológico y sanitario de los mismos, debido a su sensibilidad y rápida respuesta a los cambios ambientales. En este sentido, el monitoreo a largo plazo de los ensamblajes microbianos podría brindar valiosa información sobre las características de los cuerpos de agua y los cambios que éstos sufren.

Teniendo en cuenta estas premisas, en el marco de la primera reunión de la red colaborativa en ecología acuática microbiana de América Latina ( $\mu$ SudAqua), realizada en La Paloma (Rocha, Uruguay) en diciembre de 2017, se decidió crear un conjunto de observatorios cuyo objetivo principal es evaluar de qué manera el impacto antrópico y los factores climáticos, en un gradiente latitudinal, influyen la estructura y dinámica de la comunidad microbiana a nivel continental en la diversidad de ambientes acuáticos de la región. Es así que nace la Red de Observatorios Microbianos de Latinoamérica.

Los observatorios microbianos son herramientas valiosas que se han establecido alrededor del mundo para tener acceso a información sistematizada sobre las comunidades microscópicas. Sin embargo, en América Latina son escasos. En esta Red de Observatorios se seleccionaron sitios-observatorios correspondientes a diferentes ambientes acuáticos (dulces, marinos, lénticos, lóticos, con diferentes tipos de impacto antrópico) teniendo en cuenta la accesibilidad a los mismos para lograr la continuidad de los muestreos. Asimismo, los sitios-observatorios elegidos contemplan una frecuencia mínima bimestral (preferentemente mensual) y simultánea, en la capa superficial de la columna de agua (eufótica), y la medición de parámetros sencillos, utilizando protocolos

consensuados entre sus integrantes, que faciliten la continuidad a largo plazo y la posibilidad de realizar análisis comparativos entre los distintos sitios.

El **presente libro** pretende enumerar los protocolos establecidos y estandarizados para la toma de muestras de parámetros físico-químicos y comunidades biológicas en el agua, y el posterior análisis en el laboratorio, teniendo en cuenta los diferentes cuerpos de agua.

Esta red tiene como objetivo fundamental afianzar los lazos de colaboración entre laboratorios de investigación de diferentes países latinoamericanos para potenciar las capacidades y conocimientos de cada grupo. De esta manera, pretendemos promover el intercambio de saberes para encontrar respuestas colectivas a preguntas que nos conciernen como región.

## **Prólogo**

*Fermani Paulina, Gereca Marina, Graziano Martín, Sabio y García Carmen,  
Schiaffino Romina*

Los observatorios microbianos son un instrumento valioso para obtener información sistematizada y organizada sobre las comunidades microbianas. A pesar de esto, en América Latina se encuentran pocos observatorios que contemplen estudios a largo plazo, debido principalmente a la dificultad de mantener la infraestructura necesaria para este tipo de actividades. En este sentido, durante el primer encuentro de la Red de Ecología Acuática Microbiana ( $\mu$ SudAqua, <https://microsudaqua.netlify.app/>) llevada a cabo en diciembre de 2017 en Rocha (Uruguay), surgió la necesidad de crear una Red de Observatorios Microbianos Acuáticos de América Latina. Allí comenzaron a debatirse y consensuarse los objetivos a largo plazo para la Red. Así, se estableció como objetivo general conformar un conjunto de observatorios (sitios) para evaluar de qué manera el impacto antrópico y los factores climáticos en un gradiente latitudinal afecta la estructura y dinámica de la comunidad microbiana a nivel continental en la diversidad de ambientes acuáticos de la región. Confiábamos también que esto nos permitiría generar un trabajo colectivo entre grupos latinoamericanos para fortalecer los estudios regionales y colaborativos.

Para la conformación inicial de la Red de Observatorios Microbianos Acuáticos de América Latina, en la primera reunión de la Red  $\mu$ SudAqua se propusieron 8 sitios-observatorios de diferentes tipos de ambientes acuáticos (de agua dulce, marinos, lénticos, lóticos) a lo largo de Latinoamérica. Para lograr la continuidad de los muestreos, en la selección de los sitios se consideró fuertemente la accesibilidad a los mismos y que éstos, preferentemente, formaran parte de proyectos locales que ayudaran a sostener la recolección de las muestras. Estos sitios fueron reevaluados en base a las dificultades encontradas durante la fase de consolidación de la Red. Así, los muestreos de los microobservatorios contemplaron una frecuencia mensual (eventualmente bimestral, dependiente de la accesibilidad del lugar), en la capa superficial de la columna de agua (eufótica), y la medición de parámetros sencillos que

faciliten la continuidad a largo plazo. Posteriormente, se realizó un relevamiento de los sitios propuestos y la eventual incorporación de nuevos observatorios.

Para poder abordar un análisis conjunto de los parámetros en cada sitio, en el primer encuentro del año 2017 se debatieron y se definieron las variables comunes a analizar. Una vez definidos estos parámetros, se inició un largo proceso de búsqueda de protocolos para cada uno de ellos que, en lo posible, pudieran ser utilizados por todos los observatorios (ríos, arroyos, lagos, estuarios, etc.). A través de encuestas e intercambios virtuales se relevó el equipamiento, las técnicas y los protocolos utilizados por cada lugar y se buscó consensuar protocolos unificados para cada uno de los parámetros propuestos. Durante el proceso, se evidenció que los ambientes eran muy heterogéneos y los protocolos que servían para un tipo de observatorio podían no ser útiles para otro. Por ejemplo, la eficiencia de la extracción de la clorofila con etanol o acetona varía con el tipo de ambiente (agua dulce o salina), por lo que se definió incluir ambos métodos. Por otro lado, en el caso particular de la extracción de ADN, los sitios que ya analizaban ADN ambiental previamente a la constitución de la Red, empleaban distintos procedimientos (por ejemplo, comercial o casero; extracción con SDS o CTAB, etc.) y no se encontró un criterio común para elegir un único protocolo, por lo que se decidió no establecer una metodología particular. Sin embargo, en el presente libro incluimos una de las metodologías más utilizadas en los actuales sitios-observatorios para extracción de ADN. Toda esta información se compiló en un documento que se compartió con los grupos de los observatorios para iniciar los muestreos pilotos de la Red, con protocolos estandarizados que permitieran evidenciar y discutir ventajas y dificultades de los mismos durante este período inicial, en la segunda reunión de la Red. En noviembre de 2019, se realizó el segundo encuentro  $\mu$ SudAqua en Chascomús (Buenos Aires, Argentina), en donde tuvo lugar el segundo taller de la Red de Observatorios Microbianos. Allí se mostraron los resultados preliminares de los primeros meses de muestreo, y se continuó trabajando sobre distintos aspectos de la Red, poniendo en común avances y dificultades, y estableciendo nuevas metas. Hasta ese encuentro, la Red incluía observatorios localizados en Costa Rica, Brasil, Uruguay y Argentina, cuyas comunidades microbianas y principales características limnológicas se monitoreaban bimestralmente. La red de observatorios contaba en ese entonces con diferentes

ecosistemas acuáticos entre los que se incluían 8 sitios de monitoreo (período 2019-2020): 4 lagos/lagunas, 2 ríos, 1 estuario y 1 sitio marino. De lo discutido en esa reunión, y dada la imposibilidad de unificar todos los protocolos, se replanteó el objetivo inicial y se consensuó mantener el documento con los protocolos más comunes o utilizados. En este documento, los procedimientos para la mayoría de los parámetros se encuentran unificados, mientras que en algunos casos se presenta más de una opción metodológica, dependiendo del tipo de ambiente analizado (agua dulce o marino) y otros se dejan a criterio de cada sitio (por ej., ADN ambiental). Además, considerando dudas metodológicas de algunos protocolos, se grabaron e incluyeron en el documento videos explicativos de algunas de las técnicas.

En el año 2020, como consecuencia de la pandemia por Covid-19, la mayoría de los sitios discontinuó su muestreo por un período de al menos un año y medio. Luego de una reunión virtual de la Red en octubre del 2021, se definió retomar con los muestreos sincronizados en todos los sitios en abril del 2022 y se alentó la incorporación de nuevos sitios-observatorios en la siguiente etapa. Actualmente, la Red cuenta con 13 sitios-observatorios activos constituidos por los siguientes ambientes: 3 lagunas, 4 ríos, 2 estuarios y 4 sitios marinos (<https://microsudaqua.netlify.app/>).

Presentamos aquí el **Libro de Protocolos Estandarizados** de la Red de Observatorios como una guía consensuada en la Reunión del año 2019 en Chascomús, y que utilizamos actualmente todos los sitios-observatorios para realizar los muestreos.

Diciembre de 2023

## ***Participantes de la Red de Observatorios Microbianos (2017-2023)***

### **Argentina**

Allen Dohle, Sharon - INIBIOMA (UNComahue-CONICET)

Baliña, Sofía - IEGEBA (CONICET-UBA)

Barrena, Maité - CIMAS-CONICET

Bastidas Navarro, Marcela - INIBIOMA (UNComahue-CONICET)

Bernal, María Carolina - IEGEBA (CONICET-UBA)

Burgueño, Giuliana; CIMAS-CONICET, ESCiMar, UNCo

Cetra, Nicolás; CIMAS-CONICET, ESCiMar, UNCo

Fermani, Paulina - IBIOMAR-CONICET

García, Patricia - INIBIOMA (UNComahue-CONICET)

Gerea, Marina - INIBIOMA (UNComahue-CONICET)

Gómez, Bárbara - Instituto Nacional del Agua (INA)

Gómez Lugo, Sebastián - IEGEBA (CONICET-UBA)

Graziano, Martín - IEGEBA (CONICET-UBA)

Huber, Paula - INALI - CONICET

Hünicken, Leandro - CIMAS (CONICET-UNS)

Izaguirre, Irina - IEGEBA (CONICET-UBA)

Lagomarsino, Leonardo - INTECH (CONICET-UNSAM)

Latorre, Maite - CADIC-CONICET

Lozada, Mariana - IBIOMAR-CONICET

Malits, Andrea - CADIC-CONICET

Mansilla Ferro, Carolina - INIBIOMA (UNComahue-CONICET)

Martyniuk, Nicolás - INIBIOMA (UNComahue-CONICET)

Miranda, Cecilia - IMIBIO - Gobierno de Misiones

Ojeda, Damian - INEDES (UNLu-CONICET-CIC)  
O' Farrel, Inés - IEGEBA (CONICET-UBA)  
Padulles, María Luz - INEDES (UNLu-CONICET-CIC)  
Porcel, María Sol - IEGEBA (CONICET-UBA)  
Quiroga, María Victoria - INTECH (CONICET-UNSAM)  
Saad, Juan - CIMAS-CONICET, ESCiMar, UNCo  
Sabio y García, Carmen - Universidad de Buenos Aires (UBA)  
Salas, Cecilia - CIMAS-CONICET  
Sánchez, María Laura - IEGEBA (CONICET-UBA)  
Santucho, Gladys Janet - INTECH (CONICET-UNSAM)  
Saraceno, Martín - IEGEBA (CONICET-UBA)  
Schiaffino, Romina - CIT NOBA (CONICET-UNNOBA)  
Soto Cárdenas, Carolina - INTECH (CONICET-UNSAM)  
Torremorell, Ana - INEDES (UNLu-CONICET-CIC)  
Unrein, Fernando - INTECH (CONICET-UNSAM)

## **Brasil**

Araujo-Paina Karime - Universidade Federal de São Carlos  
Arboleda-Baena, Clara María - Universidade Federal de São Carlos  
Cassiano-Oliveira, Israel - Universidade Federal de São Carlos  
Costa, Mariana - Universidade Federal do Rio Grande do Norte  
de Melo, Michaela - Université du Québec à Montréal  
Espolau, Greyce - Universidade Federal de São Carlos  
Guido-Giongo, Daniel - Universidade Federal de São Carlos  
Hummer, Eloisa - Universidade Federal de São Carlos  
Junger, Pedro - Universidade Federal de São Carlos

Lacativa Bagatini, Inessa - Universidade Federal de São Carlos

Perbiche Neves, Gilmar - Universidade Federal de São Carlos

Mateus-Barros, Erick - Universidade Federal de São Carlos

Sarmento, Hugo - Universidade Federal de São Carlos

### **Costa Rica**

Gómez, Eddy - Universidad de Costa Rica

### **Uruguay**

Alonso, Cecilia - CURE-UdelaR

González, Belén - CURE-UdelaR

Griffero, Luciana - CURE-UdelaR

Zanetti, Juan - CURE-UdelaR

### **Protocolos**

Protocolo de Clorofila-a: Romina Schaffino y Maria Laura Sánchez

Protocolo de Fitoplancton cuantitativo: María Laura Sánchez y Romina Schiaffino

Protocolo de Citometría: Fernando Unrein y Andrea Malitz

Protocolos de Nutrientes Disueltos: Martín Graziano, Leonardo Lagomarsino

Protocolo de Nutrientes Totales: María Luz Padulles y Eddy Gómez

Protocolo de ADN ambiental: Carmen Sabio y García, Luciana Griffero, Paulina Fermani

Protocolo de Materia orgánica disuelta y Carbono orgánico disuelto: Marina Gereá

## **Índice**

<b>Indicaciones generales para realizar los muestreos</b> .....	1
<b>Planilla 1: Preparación del material para el muestreo</b> .....	2
1) Clorofila-a y Nutrientes.....	2
2) Fitoplancton cuantitativo.....	3
3) Citometría.....	3
4) ADN ambiental.....	5
5) Carbono Orgánico Disuelto (COD) y Materia Orgánica Disuelta (MOD).....	6
<b>Planilla 2: Material para llevar a campo y protocolo de muestreo</b> .....	7
1) Mediciones en el campo.....	7
2) Clorofila-a y Nutrientes.....	8
3) Fitoplancton cuantitativo .....	8
4) Citometría.....	8
5) ADN ambiental.....	10
6) Carbono Orgánico Disuelto (COD) y Materia Orgánica Disuelta (MOD).....	10
<b>Planilla 3: Protocolo de análisis en el laboratorio</b> .....	11
1) Turbidez.....	11
2) Clorofila-a y Nutrientes.....	12
3) Fitoplancton cuantitativo.....	15
4) Citometría.....	16
5) ADN ambiental.....	17
6) Carbono Orgánico Disuelto (COD) y Materia Orgánica Disuelta (MOD).....	20
<b>Bibliografía</b> .....	23
<b>Epílogo</b> .....	24

## **Indicaciones Generales para realizar los muestreos**

En esta sección se indica cómo se realizarán los muestreos, con qué frecuencia, en qué lugar del cuerpo de agua y qué parámetros se medirán.

### **Muestreos:**

- ✓ Muestreo mensual preferentemente (eventualmente bimestral).
- ✓ Muestreos matutinos, durante la segunda quincena del mes. De ser bimestral, durante los meses pares (febrero, abril, junio, agosto, octubre, diciembre)
- ✓ Se muestrea en la capa fótica del cuerpo de agua.
- ✓ Forma de identificar las muestras: **DOS LETRAS PARA SITIO\_aammdd**

### **Parámetros a medir:**

#### **1) Clorofila-a (Chl-a)**

#### **2) Nutrientes:**

- Nutrientes totales ---> Fósforo total (FT), nitrógeno total (NT)
- Nutrientes disueltos ---> Amonio ( $\text{NH}_4^+$ ), nitratos ( $\text{NO}_3^-$ ), fosfatos ( $\text{PO}_4^+$ )

#### **3) Fitoplancton cuantitativo**

#### **4) Citometría**

- Bacterias heterótrofas
- Picoplancton y nanoplancton autotrófico

#### **5) ADN ambiental**

#### **6) Materia Orgánica Disuelta (MOD) y Carbono Orgánico Disuelto (COD)**

## **Planilla 1: Preparación del material para el muestreo**

Los materiales para tener en cuenta en la realización del muestreo se resumen en el siguiente listado. En los apartados posteriores se detallan las particularidades de cada parámetro a medir:

- ✓ Frascos plásticos de 250 o 500 o 1000 ml (para medición de nutrientes totales, nutrientes disueltos/Clorofila-a, fitoplancton, ADN ambiental, COD/MOD). Para Clorofila-a y ADN ambiental en ambientes marinos coleccionar la muestra en bidones de 5L.
- ✓ HCl 10%
- ✓ H<sub>2</sub>O destilada o agua ultrapura (ej. Milli-Q®)
- ✓ Solución de Lugol acidificado (1%) (fitoplancton)
- ✓ Crioviales estériles de 5 ó 4,5 ml con fijador a definir para cada cuerpo de agua (para análisis procariontas, picoeucariontas y nanoplancton por citometría)
- ✓ Cajas para guardar crioviales (citometría)
- ✓ Termo de N<sub>2</sub> Líquido (citometría)
- ✓ Pipeta y puntas (tips)
- ✓ Botella Niskin o Van Dorn (dependiendo del sitio)
- ✓ Malla de 50  $\mu$ m

### **Preparación del material para cada tipo de análisis:**

#### **1) Clorofila-a y Nutrientes**

Clorofila-a y Nutrientes disueltos: lavar frascos plásticos con HCl 10%. Luego enjuagar al menos 3 veces con agua destilada o ultrapura. El tamaño del frasco dependerá del volumen que se requiera filtrar para la determinación de la concentración de clorofila-a. El agua filtrada se recuperará para determinar la concentración de los nutrientes disueltos.

Nutrientes totales: lavar frascos plásticos de 250 o 500 ml con HCl 10%. Luego enjuagar al menos 3 veces con agua destilada o ultrapura.

## 2) Fitoplancton cuantitativo

Lavar una botella/frasco de 200-500 ml con agua destilada y preparar Lugol acidificado.

### Preparación de Lugol acidificado:

- ✓ Preparar 200 ml de Lugol 13,6% (30 gramos de soluto en 220 ml de solución = 13,6%*m/v*): 20 g IK + 10 g I<sub>2</sub> en 200 ml de agua destilada (conviene hacerlo con agitador magnético para que sea más rápido) + 10% de ácido acético glacial (20 ml).

La solución de Lugol acidificada se conserva en oscuridad y heladera (4°C), protegiendo el frasco con papel aluminio.

Nota: El Lugol también se consigue preparado, al cual hay que acidificar con 10% de ácido acético glacial.

## 3) Citometría

A continuación, se detallan los materiales que se necesitan para preparar las muestras de citometría, según el fijador que se vaya a utilizar (P+G, Glutaraldehído o GlyTE) y el tipo de organismos a preservar (bacterias, picoautótrofos y nanoplancton):

- Rotular crioviales de 4,5 ml y agregar 400 µl del conservante que use en el laboratorio (bacterias, picoautótrofos y nanoplancton)

El stock de crioviales con el conservante alicuotado se almacena en freezer a -20°C.

A continuación, se detallan las preparaciones de los fijadores, según el tipo de organismos a preservar y sitio de muestreo.

### Preparación de P+G:

Trabajar bajo campana de extracción.

Para preparar 1 litro de P+G (1% Paraformaldehído + 0.05% Gutaraldehído final):

- Calentar 800 ml de PBS 1X a 60°C y mantener a esa temperatura con agitador magnético.
- Agregar 100 g de Paraformaldehído
- Agregar lentejas de NaOH de a una y seguir agitando hasta que la solución se clarifique (debería tardar entre 1-5 min.)
- Sacar del calor
- Agregar 20 ml de Glutaraldehído al 25%.
- Ajustar a pH = 7,2 con HCl
- Llevar a 1 litro con PBS 1X.
- Filtrar a través de filtro de policarbonato de 0,22  $\mu\text{m}$ .
- Alicuotar 400  $\mu\text{l}$  en cada criovial.
- Almacenar en freezer a -20°C (mejor a -80°C).

Nota: una vez descongelado el fijador debe guardarse a 4°C y usarse dentro de la semana o descartarse!

### Preparación de GlyTE (solución de glicerol + buffer TE):

- Preparar 100 ml de solución EDTA 0,5 M:
  - Poner 18.6 g EDTA + 80 ml agua ultrapura (Mientras se mezcla con el agitador magnético, ajustar a pH = 8 agregando lentamente NaOH).
  - Agregar agua ultrapura hasta un volumen final de 100 ml.
  - Filtrar a través de 0,22  $\mu\text{m}$ .
- Preparar 100X TE (1 M Tris; 100 mM EDTA):
  - Poner 12,1 g de TRIS + 20 ml de 0,5 M EDTA (previamente preparado)
  - Añadir agua ultrapura hasta 80 ml (Mientras se mezcla con el agitador magnético, ajuste a pH = 8 agregando lentamente HCl al 37%).

- Agregar agua ultrapura hasta un volumen final de 100 ml.
- Filtrar a través de 0,22  $\mu\text{m}$ .
  
- *Preparación de stock de GlyTE:*
  - Mezclar:
    - 20 ml 100x TE pH 8,0
    - 60 ml de agua ultrapura
    - 100 ml de glicerol de grado molecular (usar jeringa)
  - Pasar el stock de GlyTE a través de un filtro de 0,22  $\mu\text{m}$  y almacenar refrigerado (4°C).
  - El GlyTE recién preparado y filtrado se alicuota en los crioviales. El volumen que se conserve sin alicuotar debe volver a filtrarse antes de usar.

Nota: autoclavar las soluciones de 0,5M EDTA restantes y 100X TE y almacenar hasta la próxima preparación de GlyTE.

#### **4) ADN ambiental**

Lavar botellas de plástico de 250, 500 ml o un mayor volumen (si fuera necesario) con HCl 10 % (1 vez). Luego lavar 2-3 veces con agua destilada, y finalizar con 1 lavado de H<sub>2</sub>O ultrapura. El tamaño de la botella dependerá del volumen que se filtre posteriormente.

Lavar un sistema de filtración de la misma manera que las botellas, para utilizar en el laboratorio.

Nota: en general, se filtran entre 100 y 300 ml de muestra. En lagunas hipereutróficas como Chascomús, se filtran entre 30 y 50 ml. En el mar, se filtran entre 1 a 4 litros.

### **5) Carbono Orgánico Disuelto (COD) y Materia Orgánica Disuelta (MOD)**

Lavar una botella de 250 mL de plástico 1 vez con HCl 10%, y posteriormente al menos 3 veces con agua destilada para llevar a campo y recolectar muestras de agua.

Lavar con HCl 10 %, enjuagar al menos 3 veces con agua destilada y 1 vez con agua ultrapura y muflar a 440°C durante al menos 1 hora un sistema de filtración de vidrio. Por otra parte, seguir el mismo lavado que para el sistema de filtración y muflar a 440°C durante al menos 1 hora frascos color caramelo de 100 ml de capacidad para cada parámetro. Ambos serán usados en el laboratorio, luego del muestreo.

## Planilla 2: Material para llevar a campo y protocolo de muestreo

A continuación, se enumeran los materiales necesarios para llevar al campo:

- ✓ Planilla de campo
- ✓ pHmetro
- ✓ Conductímetro
- ✓ Oxímetro y sensor de temperatura
- ✓ Disco de Secchi
- ✓ Botella Niskin o Van Dorn (dependiendo del sitio)
- ✓ Pipeta y puntas
- ✓ Rotulador
- ✓ Red de 50  $\mu\text{m}$  o similar
- ✓ Heladera, hielo y/o friopack
- ✓ Termo de N<sub>2</sub>-Líquido (para citometría)
- ✓ Frascos plásticos de 250 o 500 ml previamente lavados (nutrientes totales, nutrientes disueltos/Clorofila-a, fitoplancton, ADN ambiental, COD/MOD)
- ✓ Lugol acidificado y pipeta pasteur de plástico (fitoplancton)
- ✓ Crioviales de 4,5 ml con P+G (citometría): bacterias, picoautótrofos y nanoplancton
- ✓ Crioviales de 4,5 ml con GlyTE (citometría): bacterias, picoautótrofos y nanoplancton
- ✓ Ecosonda o vara graduada para medir nivel de agua
- ✓ Piseta con agua destilada para lavar los sensores de campo (Conductímetro, pHmetro, Oxímetro) y papel para secar.

### Procedimientos:

#### **1) Mediciones en el campo**

Registrar la temperatura del agua, pH, conductividad y oxígeno disuelto utilizando sensores de campo y siguiendo las indicaciones del equipo a utilizar.

Identificar y relevar variables relevantes para los distintos ambientes. Por ej., en arroyos, se puede medir el ancho, la profundidad, la velocidad corriente, el caudal, el tipo de vegetación circundante, etc. En lagos y mar, la transparencia por disco de Secchi, la vegetación circundante, la profundidad, etc.

## **2) Clorofila-a y Nutrientes**

Colectar la muestra de agua sin filtrar en los frascos plásticos previamente lavados y trasladar las muestras en frío (4°C) y oscuridad.

## **3) Fitoplancton cuantitativo**

Colectar entre 200 y 500 ml (dependiendo del sitio de estudio) de agua subsuperficial sin filtrar y guardar en una botella/frasco previamente lavado. Fijar la muestra con Lugol acidificado al 1% (concentración final). Conservar en frío (4°C) y oscuridad hasta su posterior recuento.

Nota: si no se recuenta rápidamente, revisar las muestras, y agregar una gota de Lugol acidificado (1%), para que no pierda su color, y seguir conservando.

## **4) Citometría**

Tomar muestras de agua y pre-filtrar por malla de zooplancton (red de 50  $\mu\text{m}$ ).

Incorporar la muestra a los distintos crioviales, que contienen distintos conservantes, según el sitio de estudio y microorganismos a analizar:

- Bacterias, picoautótrofos y nanoplancton: Agregar 4 ml de muestra a los crioviales de 4.5 ml con 400  $\mu\text{l}$  del conservante/fijador elegido (Glyte o P+G)
- Homogeneizar cada muestra por inversión y mantener durante 10 minutos en oscuridad.

- Luego, sumergir cada muestra en N<sub>2</sub>-Líquido hasta congelamiento y almacenar a -80°C dentro de la caja respectiva (de no ser posible guardar a -20°C).

Nota: video-tutorial disponible en la carpeta compartida sobre el procesamiento de las muestras para su conservación:

[https://drive.google.com/file/d/1h6cbLzvIX\\_0J5IX1of0xe03nkOW6sW6sH/view?usp=sharing](https://drive.google.com/file/d/1h6cbLzvIX_0J5IX1of0xe03nkOW6sW6sH/view?usp=sharing)



Notas a tener en cuenta para la correcta preservación de las muestras para citometría:

- Fijar la muestra lo más rápido posible tratando de evitar que el conservante quede descongelado y a temperatura ambiente mucho tiempo, particularmente si se utiliza P+G.
- Idealmente, llevar el bidón de N<sub>2</sub>-Líquido al sitio de muestreo y fijar la muestra *in situ*.
- De no ser posible esta opción, coleccionar la muestra y transportarla en oscuridad y frío (4°C) hasta el laboratorio y fijarla lo más rápido posible.
- El P+G una vez descongelado debe utilizarse inmediatamente para fijar la muestra. De no ser utilizado inmediatamente puede ser guardado a 4°C por una semana como máximo. Transcurrido este tiempo debe descartarse. No puede ser vuelto a congelar ni mantenido a temperatura ambiente por tiempo prolongado, ya que se altera la eficiencia de la fijación.
- El **congelamiento** es una parte clave para la preservación de la muestra. Lo importante es que el congelamiento de la muestra fijada sea lo más rápido posible, de ahí la necesidad de contar con N<sub>2</sub>-Líquido. De no poseer N<sub>2</sub>-Líquido,

entonces congelar directamente a  $-80^{\circ}\text{C}$ , y si tampoco se dispone de  $-80^{\circ}\text{C}$ , congelar directamente a  $-20^{\circ}\text{C}$ , aunque esta última opción, no se recomienda.

- En conclusión: **más frío => más rápido se congela => mejor calidad de la muestra!**
- **La muestra no debe descongelarse hasta que se vaya a analizar.** ¡Si se transportan muestras ya fijadas deben transportarse congeladas!

## **5) ADN ambiental**

Enjuagar las botellas previamente lavadas, 2 veces con el agua del sitio y coleccionar la muestra. Es recomendable, sobre todo en los sitios más impactados, pre-filtrar con un tamiz de  $50\ \mu\text{m}$ .

Trasladar la muestra al laboratorio en frío ( $4^{\circ}\text{C}$ ).

## **6) Carbono Orgánico Disuelto (COD) y materia orgánica disuelta (MOD)**

Colectar 250 ml de muestra de agua (alcanza para ambas mediciones) en el frasco plástico previamente lavado.

Trasladar la muestra en oscuridad y a temperatura ambiente o en frío.

### Planilla 3: Protocolo de análisis en el laboratorio

A continuación, se enumeran los materiales necesarios para utilizar en el laboratorio, luego de extraer las muestras de campo:

- HCl 10%
- H<sub>2</sub>O destilada y/óultrapura
- Sistema de filtración (Nutrientes disueltos/Clorofila-a y ADN)
- Reactivos, tipo Hach (Nutrientes disueltos)
- Peroxodisulfato de dipotasio (K<sub>2</sub>O<sub>8</sub>S<sub>2</sub>) (Nutrientes totales)
- Ácido Bórico (H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub>) (Nutrientes totales)
- NaOH 1M (Nutrientes totales)
- Filtros tipo Whatman GF/F de 0,7 μm tamaño de poro muflados a 450°C durante al menos 4 horas (Nutrientes disueltos/Clorofila-a)
- Papel aluminio (Clorofila-a)
- Sistema de filtración de vidrio lavado con ácido y muflado a 440°C durante al menos 1 hora (COD y MOD)
- Filtros de policarbonato de 0,22 μm de poro (tipo Millipore GTTP04700) (ADN)
- Filtros de 3 μm de poro (opcional ADN)
- Filtros de fluoruro de polivinilideno (PVDF) ó Membrana GV (Millipore - GVWPO4700) de 0,22 μm de poro (COD y MOD)
- Frasco color caramelo de 100 ml de capacidad muflado a 440°C durante al menos 1 hora (COD y MOD)
- Turbidímetro (en caso de disponer)
- Espectrofotómetro UV con capacidad de realizar espectros de absorción

#### Procedimientos:

##### **1) Turbidez**

- En caso de contar con un Turbidímetro, separar un volumen para la medición de turbidez por Turbidimetría, a partir del equipo utilizado por cada grupo.

Nota: en caso de no contar con turbidímetro, puede realizar la determinación de sólidos en suspensión a partir de protocolos APHA.

## 2) Clorofila-a y Nutrientes

### Nutrientes totales:

- Los frascos con las muestras extraídas del campo se almacenan a  $-20^{\circ}\text{C}$  hasta su determinación.
- Disolver 5g de peroxodisulfato y 3g de Ácido Bórico con 35 ml de NaOH y llevar a 100 ml con agua MiliQ® (El peroxodisulfato tarda mucho en disolver, utilizar agitador magnético)
- Una vez disuelto utilizar en proporción 4ml de reactivo: 30 ml de muestra.
- Autoclavar 90'
- Enfriar y filtrar
- Realizar las determinaciones de Fósforo Reactivo Soluble y Nitratos
- La determinación se realizará por métodos APHA o EPA. Para agua de mar, recomendamos seguir métodos de Strickland-Parsons (1972).

### Clorofila-a y Nutrientes disueltos:

- Inmediatamente luego del campo, filtrar un volumen determinado de muestra por filtros tipo Whatman GF/F de  $0,7\ \mu\text{m}$  de tamaño de poro muflados. Es importante mantener el material protegido de la luz para reducir la fotooxidación. Filtrar agua hasta que se colmate el filtro. El volumen a filtrar dependerá del material en suspensión, por lo tanto, en ambientes eutróficos, se utilizará poco volumen, mientras que en ambientes oligotróficos o marinos pueden ser entre 1000 y 2000 ml.
- Anotar el volumen filtrado.
- Colocar el filtro (doblado a la mitad con la parte filtrada sobre sí misma) en un sobrecito de papel de aluminio rotulado (fecha, nombre del cuerpo de agua, mililitros filtrados y cantidad de filtros).

- Conservar en freezer a  $-20^{\circ}\text{C}$  para facilitar la ruptura de las paredes celulares y la liberación del pigmento. Se pueden guardar los filtros por hasta 3 semanas.

El filtro se utilizará para la determinación de Clorofila-a (2A).

El agua filtrada se utilizará para la determinación de Nutrientes disueltos (2B).

#### (2A) Determinación de Clorofila-a:

Este paso puede realizarse unos días después de haber filtrado la muestra y haberla guardado a  $-20^{\circ}\text{C}$ , pero se recomienda hacerlo antes de cumplir las 3 semanas de almacenamiento.

- Cortar los filtros en pedazos pequeños (5 ó 6 porciones) y colocarlos en frascos o tubos forrados con papel de aluminio. Agregar 8 ml de etanol absoluto caliente (entre  $60^{\circ}\text{C}$  y  $70^{\circ}\text{C}$ ) por filtro, como solvente de extracción. En caso de haber utilizado 2 filtros para una misma muestra, colocar 12 ml de solvente de extracción.
- Pasar por un vórtex o agitar vigorosamente y asegurarse de que los pedazos de filtro queden sumergidos en el etanol.
- Anotar el volumen de solvente agregado. El etanol absoluto debe ser llevado a temperatura en un recipiente adecuado y utilizando un baño maría. Controlar la temperatura con un termómetro dentro del etanol.
- Dejar en reposo y en oscuridad durante 24 hs en heladera ( $4^{\circ}\text{C}$ ) para facilitar la extracción de los pigmentos fotosintéticos.

Al día siguiente de la extracción:

- Centrifugar unos 10 minutos la muestra a 3500 o 4000 rpm
- Proceder a leer en el espectrofotómetro la Absorbancia a 665 y 750 nm. Previamente realizar un blanco con etanol puro.
- En la misma cubeta agregar 1 gota de HCl 1 N y luego de 1 minuto volver a leer la Absorbancia a ambas longitudes de onda. No excederse con la colocación de HCl

porque algunos pigmentos accesorios pueden cambiar su absorbancia a la de la feofitina-a e interferir con la determinación.

*Fórmula para el cálculo de la concentración de Clorofila-a:*

$$[\text{Clorofila-a sin feopigmentos}] = F [(Abs_{1665} - Abs_{1750}) - (Abs_{2665} - Abs_{2750})] k v$$

donde Clorofila-a sin feopigmentos se expresa en  $\mu\text{g}$  por litro; Abs1= Absorbancia antes de acidificar; Abs2= Absorbancia después de acidificar; F = es un factor de corrección para equiparar la reducción en la absorbancia con la Clorofila-a inicial (2.43 para el etanol, 2.72 para el metanol y 2.43 para la acetona); k = coeficiente de absorción específica (11.2 para el etanol, 11.62 para el metanol y 10.48 para acetona); v = volumen del extracto en ml / (volumen muestra en litros x espesor cubeta en cm).

#### Consideraciones:

- ✓ Utilizar Etanol absoluto para análisis.
  - ✓ Utilizar las cubetas exclusivas para clorofila. Lavar con detergente EXTRAN y luego lavar nuevamente con etanol.
  - ✓ Calibrar con etanol puro a 665 nm y a 750 nm para blanco.
  - ✓ Calibrar nuevamente cada 4 muestras para comprobar la calibración
  - ✓ Lavar las cubetas con etanol entre muestra y muestra.
- Extracción con acetona para agua marina/salada:
- Seguir los mismos pasos detallados en el protocolo anterior, pero en lugar de utilizar etanol absoluto caliente, utilizar acetona (sin calentar) para fitoplancton marino, como solvente de extracción.

#### Consideraciones:

- ✓ Utilizar Acetona 90% para análisis.

- ✓ Utilizar las cubetas exclusivas para clorofila. Lavar con detergente EXTRAN y luego lavar nuevamente con acetona.
- ✓ Calibrar con acetona pura a 665 nm y a 750 nm para blanco.
- ✓ Calibrar nuevamente cada 4 muestras para comprobar la calibración
- ✓ Lavar las cubetas con acetona entre muestra y muestra.

➤ Extracción con metanol para agua dulce:

Alternativamente al uso de etanol caliente se puede utilizar metanol como solvente de extracción. Si el grupo de trabajo va a utilizar este solvente hay que realizar una inter-calibración previa para chequear la capacidad de extracción de ambos solventes. Los pasos a seguir son los mismos detallados en el protocolo con etanol absoluto.

(2B) Nutrientes disueltos:

Se recomienda realizar la determinación en el día o en los días siguientes inmediatos. Si la medición de nutrientes no se realiza el mismo día, el filtrado se almacena a  $-20^{\circ}\text{C}$  hasta su determinación.

Nota: la determinación de cada uno de los parámetros se realizará por métodos APHA o EPA. Recomendamos: Amonio, método de salicilato (EPA Method 350.1) - método fenato alternativo, APHA 4500-NH3-F; Nitratos: método de reducción por cadmio, APHA 4500-NO3-E; Ortofosfato: método de vanadato-molibdato, APHA 4500-P-C - método ácido ascórbico, APHA 4500-P- E. Para agua de mar, recomendamos seguir métodos de Strickland-Parsons (1972).

### 3) Fitoplancton cuantitativo

- Conservar la muestra refrigerada ( $4^{\circ}\text{C}$ ) y en oscuridad, hasta su posterior cuantificación por microscopio invertido.

Nota: El fijado con Lugol requiere control periódico del color de las muestras almacenadas, a fin de reponer el Lugol faltante por oxidación del iodo. Si las

muestras se observan decoloradas, agregar una gota de Lugol acidificado nuevamente.

#### 4) Citometría

Utilizando un citómetro de flujo, se analizarán las muestras extraídas y conservadas de bacterias heterótrofas (1), picoplancton autotrófico (2) y nanofitoplancton autotrófico (3).

Dado que cada grupo tiene acceso a diferentes tipos de citómetros no es posible estandarizar los settings, sin embargo, sí se puede establecer algunos criterios de análisis. En general:

- El *threshold* de los settings "siempre" deben ser colocados en la fluorescencia "FL1 o FITC" para las tinciones con SybrGreen y "FL3 o PerCP" para las algas.
- Agregar beadsYellow-Green de 1  $\mu\text{m}$  para usar como referencia de tamaño y fluorescencia.
- Anotar el volumen de muestra y de dilución, la velocidad, la tensión, los ajustes y el nombre del archivo.

##### (1) Bacterias heterótrofas:

- Las bacterias se tiñen con SybrGreen I.

Preparación de la workingsolution (WS) de SybrGreen I:

- La WS 100X (workingsolution) de SybrGreen I se prepara diluyendo 1:100 veces el stock comercial (10.000X) en DMSO.
- Para analizar la muestra en el citómetro se tiñen 100  $\mu\text{l}$  de muestra con 1  $\mu\text{l}$  de WS (1X concentración final).

- Incubar a temperatura ambiente por 10' en oscuridad antes de pasar la muestra por el citómetro.
- Las bacterias se analizan típicamente en dos bi-plots: FL1-SSC y FL3-FL1

(2) Picoplancton autotrófico:

- Las muestras se analizan en el citómetro sin teñir.
- Se utilizan típicamente los bi-plots: FL3-SSC, FL3-FL2 y FL3-FL4. Los últimos dependen de si las picocianobacterias presentes en las muestras son ricas en ficoeritrina (FL2) o en ficocianina (FL4).

(3) Nanofitoplancton autotrófico:

- Se utiliza la misma muestra y los mismos plots que para el picoplancton autotrófico, pero modificando los settings (bajando el voltaje), de modo de ubicar los picoeucariotas abajo a la izquierda de forma que se visualice mejor toda la población de nanofitoplancton.

## 5) ADN ambiental

### *Procedimiento de filtración y conservación*

- Desinfectar la mesada y material de trabajo con etanol 70%
- Filtrar con filtros de 0,22  $\mu\text{m}$  entre 100 y 300 ml de muestra, excepto en el mar que se filtrará entre 1 y 4 litros. Para ello, se utilizará un sistema de filtración previamente lavado 1 vez con HCl 10%, 2 veces con agua destilada y 1 vez con H<sub>2</sub>O ultrapura. Nota: se puede utilizar este mismo filtrado (entre 100 y 150 ml del volumen filtrado) y conservarlo en frasco de vidrio color caramelo para la medición de COD.
- Conservar los filtros en un criotubo o eppendorf estéril sin buffer a -80°C.

Nota 1: En los sitios muy impactados es recomendable filtrar con filtros de 3  $\mu\text{m}$  previo a la filtración por filtros de 0,22  $\mu\text{m}$  para evitar la colmatación del último filtro con partículas en suspensión.

Nota 2: video-tutorial disponible en la carpeta compartida sobre el procedimiento de filtrado:

<https://drive.google.com/file/d/1h7XTJY8vcSX59xdISlInn6uTrGJpcbAK/view?usp=sharing>



### ***Procedimiento de extracción del ADN ambiental***

La red no cuenta con un procedimiento estandarizado para la extracción de ADN y cada sitio usa sus propios protocolos. A modo orientativo, dejamos dos referencias para realizar un procedimiento de extracción mediante un método casero (que es usado por varios de los sitios) y otro mediante un kit de extracción.

- a- Protocolo de extracción con buffer CTAB: *Fernández Zenoff et al. (2006)*
- b- Protocolo con kit de extracción: *Lozada et al. (2022)*.

### **a-Protocolo CTAB (Modificado de *Fernández Zenoff et al. (2006)*)**

***CTAB seguido de la extracción con una solución de cloroformo y alcohol isoamílico:***

- 1) Realizar una solución de lysis buffer CTAB (Cetyl Trimethyl Ammonium Bromide) (2% CTAB; 1.4M NaCl, 100 mM Tris-Cl pH 8, 20 mM EDTA pH 8). Esta solución se almacena a temperatura ambiente. Es estable varios años. Antes de usar se le agrega B-Mercaptoetanol al 0.2% final y se calienta a 60°C.

- 2) Alicuotar dicha solución de CTAB en eppendorfs de 2 mL e incorporar cada filtro
- 3) Incubar a 60 °C durante 30 minutos
- 4) Luego, se realizan dos pasos de purificación: agregar 0.7 ml de cloroformo-álcohol isoamílico (24;1) y centrifugar a 14000 rpm durante 10 minutos

Nota 2: al centrifugar, tenga cuidado de orientar todos los tubos en la misma dirección, pues no es posible observar a simple vista el pellet que se formará

- 5) Recuperar la fase acuosa en otro tubo de 1,5 mL (teniendo cuidado de no eliminar los residuos restantes)
- 6) Luego, el ADN es precipitado en isopropanol frío

Nota 3: colocar en heladera durante al menos 15 minutos. Cuanto más tiempo esté el material en heladera, mayor será la precipitación, considere dejar precipitar el material durante toda una noche

- 7) Centrifugar a 14000 rpm durante 10 minutos

Nota 4: al centrifugar, tenga cuidado de orientar todos los tubos en la misma dirección, pues no es posible observar a simple vista el pellet que se formará

- 8) Retirar el sobrenadante, evitando cuidadosamente el pellet
- 9) Luego, pasos de lavado serán necesarios, para esto, añadir etanol al 80% helado
- 10) Mezclar y centrifugar durante 2 minutos a 5000 rpm

Nota 5: para ambientes oligotróficos, aumentar el tiempo a 7 minutos

- 11) Repetir el paso de etanol al 80%
- 12) Eliminar el sobrenadante, evitando el pellet
- 13) Secado y almacenamiento

Dejar secar el pellet al aire, con el eppendorf boca abajo para proteger el pellet, durante 15 minutos

Nota 6: se puede secar en SpeedVac

- 14) Re suspender el pellet en 100µL de agua ultrapura o miliQ®

Nota 7: en ambientes oligotróficos, re suspender en 50µL;

Nota 8: al añadir el agua, procurar lavar el lado donde está adherido el Pellet

- 16) Determinar la concentración de ADN en Nanodrop®, Picodrop® o Fluorómetro
- 17) Diluir el ADN a 10 ng/µL utilizando agua ultrapura o miliQ®

18) Almacenar en el congelador a -20°C.

#### **b- Utilizando kits de extracción**

El ADN se puede extraer utilizando Fast DNA Spin Kit (MP Biomedicals Inc. EE.UU.) siguiendo las instrucciones del fabricante, y cuantificado con fluorómetro o Nanodrop®. Para muestras marinas se puede seguir los procedimientos de Lozada et al. (2022).

### **6) Carbono Orgánico Disuelto (COD) y materia orgánica disuelta (MOD)**

- Filtrar al menos 200 ml de muestra a través de filtros PVDF o GV (0,22 µm) utilizando un sistema de filtración de vidrio previamente lavado y muflado.
- Almacenar la muestra filtrada en dos frascos de vidrio caramelo con tapa de teflón, previamente lavados y muflados. Uno de los frascos se destinará a la medición de COD y el otro para la de MOD. No colocar papel aluminio entre el frasco y la tapa del mismo

*Nota 1: utilizar filtros de fluoruro de polivinilideno (PVDF), de Membrana GV (Millipore - GVWP04700) de 0,22 µm de poro o PES, utilizados previamente para la extracción de ADN*

#### **Carbono orgánico disuelto (COD):**

- Conservar la muestra en oscuridad y a 4°C.
- Procesar la muestra en un analizador de carbono que determine NPOC (non purgable organiccarbon).

*Nota 2: si el ambiente muestreado presenta mucha carga de materia orgánica (ej. COD ≥ 10 mg/L), adicionar 3 gotas de HCl puro al frasco para su conservación.*

#### **Materia orgánica disuelta (MOD):**

De ser posible, realizar la medición del espectro de absorción de la muestra inmediatamente después de filtrada. Para ello, tener la precaución de homogeneizar la

temperatura de la muestra y del agua ultrapura que se utilizará como blanco del espectrofotómetro.

- Sumergir los frascos de muestras en un baño térmico a 20°C durante media hora antes de realizar la medición. Es importante homogeneizar las temperaturas para evitar ruido o variaciones irregulares del espectro entre los 700 y los 800 nm, rango que luego se utilizará para corregir la muestra.
- Una vez que las muestras se encuentren a 20°C, encender el espectro y dejar calentar las lámparas del equipo por al menos media hora.
- Para realizar la medición, deberá utilizar una cubeta de cuarzo de la longitud de paso de luz adecuada para el ambiente estudiado (i.e. 1 cm, 5 cm o 10 cm).
- Configurar el espectrofotómetro para medir un barrido del espectro de absorción de la muestra entre 200 y 800 nm. Extraer las absorbancias para trabajar luego.
- ***Para optimizar y homogeneizar los cálculos el grupo GESAP (Bariloche) preparó una planilla Excel con macros para todos los miembros de la red de observatorios:***

<https://docs.google.com/spreadsheets/d/1nzTMZoUEo0AXijHO5dEfODJC10MnaoyW/edit#gid=1978573616>



- Esta planilla calculará automáticamente los pasos que se detallan a continuación.
- Realizar una corrección de los espectros de absorción de la muestra a *posteriori* de la sustracción del espectro del agua ultrapura. Para ello, debe promediar las absorbancias entre 700 y 800 nm y restar este promedio a cada una de las absorbancias del espectro completo.

- De acuerdo a su espectrofotómetro, las unidades de absorbancia (AU) deberán convertirse en coeficientes de absorción (Abs) de la siguiente manera:  $a = 2,303A/L$ , donde  $a$  es el coeficiente de absorción Neperiano ( $m^{-1}$ ),  $A$  es la absorbancia y  $L$  es la longitud del paso de luz por la cubeta (expresada en metros).
- Luego sobre los espectros corregidos y en transformados a coeficientes de Absorción deberá calcular:
  - a-  $a_{254}$
  - b-  $a_{350}$
  - c-  $a_{440}$
  - d- la pendiente espectral  $S_{275-295}$
  - e- SUVA 254 ( $a_{254} \cdot COD$ )
  - f- SUVA 350 ( $a_{350} \cdot COD$ )
  - g-  $S_R$
- Registrar en la planilla Excel provista por GESAP para cada muestra:
  - a- localización geográfica del sitio de muestreo,
  - b- volumen de muestra colectada (mL),
  - c- filtro utilizado (PVDF, GV o fibra de vidrio),
  - d- espectrofotómetro empleado,
  - e- tipo de cubeta (es decir, longitud del paso de la luz en metros, e.g. 0,01m o 0,1m).

## Bibliografía

- APHA (American Public Health Association) (1998). Standard methods for the examination of water and wastewater. En: Clescerl LS, Greenberg AE, Eaton AD (eds) Book 20. APHA, Washington, DC, p 4-487.
- Fernández Zenoff V., Siñeriz F. & Farías M.E. (2006). Diverse responses to UV-B radiation and repair mechanisms of bacteria isolated from high-altitude aquatic environments. *Applied and Environmental Microbiology*, 72(12), 7857-7863. <https://doi.org/10.1128/AEM.01333-06>
- Lozada M., Zabala M.S., García P.E., Diéguez M.C., Bigatti G., Fermani P., Unrein F., Dionisi H.M. (2022). Microbial assemblages associated with the invasive kelp *Undaria pinnatifida* in Patagonian coastal waters: structure and alginolytic potential. *Sci. Total Environ.* 154629. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2022.154629>
- Strickland J.D.H., Parsons T.R. (1972). A practical handbook of sea-water analysis, 2nd edn. J. Fish. Res. Board Can. 167, 311.

## *Epílogo*

El trabajo en equipo y colaboración es imprescindible para llevar a cabo este gran proyecto. Sin dudas, el aporte de cada uno de nosotros y la predisposición a las reuniones virtuales y presenciales, son motores para llevar a cabo con entusiasmo los muestreos temporales y permiten planear la proyección a largo plazo de la Red de Observatorios Microbianos. Aquí, presentamos algunas fotos de las reuniones, integrantes junto con algunos sitios-observatorios latinoamericanos.



*2017 - Grupo de Trabajo de la Red de Observatorios Microbianos (Uruguay)*



*2019 - Grupo de Trabajo de la Red de Observatorios Microbianos (Argentina)*



*2021 - Grupo de Trabajo de la Red de Observatorios Microbianos (virtual)*



*2022 - Grupo de Trabajo de la Red de Observatorios Microbianos (Brasil)*



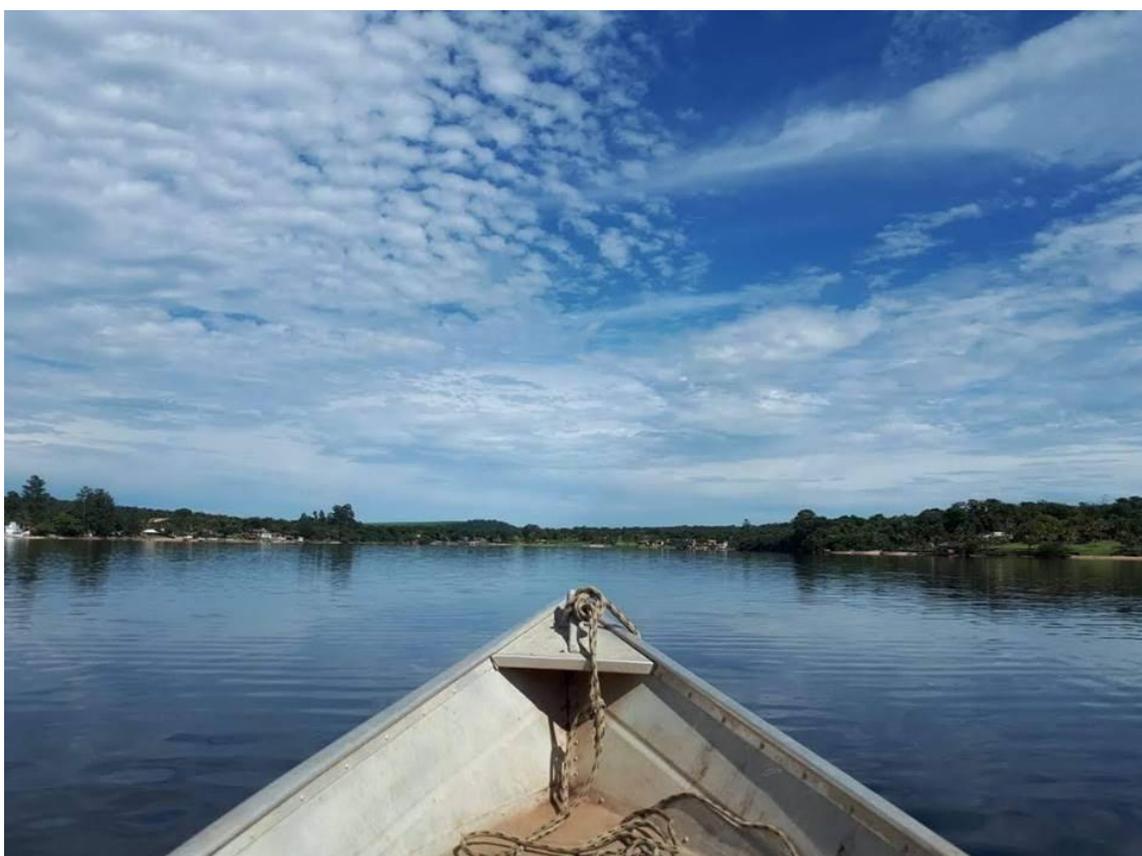
*Foto representativa de sitio-observatorio marino, Punta Este, Puerto Madryn, Chubut, Argentina*



*Foto representativa de sitio-observatorio lótico de agua dulce, Arroyo San Francisco, Claypole, Prov. Buenos Aires, Argentina*



*Foto representativa de sitio-observatorio léntico de agua dulce, Laguna El Trébol, Bariloche, Prov. Río Negro, Argentina*



*Foto representativa de sitio-observatorio léntico de agua dulce, Reservorio Broa, Itirapina, San Pablo, Brasil*