



**INFORME TÉCNICO
DICIEMBRE 2007**

Proyecto FPA 2007: Banco de microorganismos extremófilos aislados desde humedales altoandinos hidrológicamente susceptibles.

Ejecutor: Universidad Católica del Norte

Antecedentes Generales del Proyecto

Línea Temática N° 2	“ Gestión para la Conservación Ambiental Local”
Código:	02-015-2007
Comunas:	Antofagasta, San Pedro de Atacama y Ollagüe.
Nombre del Proyecto:	“Banco de microorganismos aislados desde humedales altoandinos hidrológicamente susceptibles”.
Organismo Ejecutor:	Universidad Católica del Norte.
Organismos Asociados:	Centro de Ecología Aplicada Ltda. – CEA y CONAF.
Monto Solicitado a Conama:	\$ 7.000.000.-
Aporte de Terceros:	\$ 17.100.000
Monto Total Proyecto:	\$ 24.100.000

Tema Central del Proyecto: Rescate de microorganismos desde sectores alto-andinos, hidrológicamente susceptibles desde los salares de Atacama, Ascotán y Punta Negra, con la finalidad de probar iniciativas de restauración ambiental en condiciones semi-*in situ*.

¿Qué se entiende por Humedal Hidrológicamente Alterado ?

Un humedal es una zona de tierras, generalmente planas, en la que la superficie se inunda permanente o intermitentemente, al cubrirse regularmente de agua, el suelo se satura, quedando desprovisto de oxígeno y dando lugar a un ecosistema híbrido entre los puramente acuáticos y los terrestres.

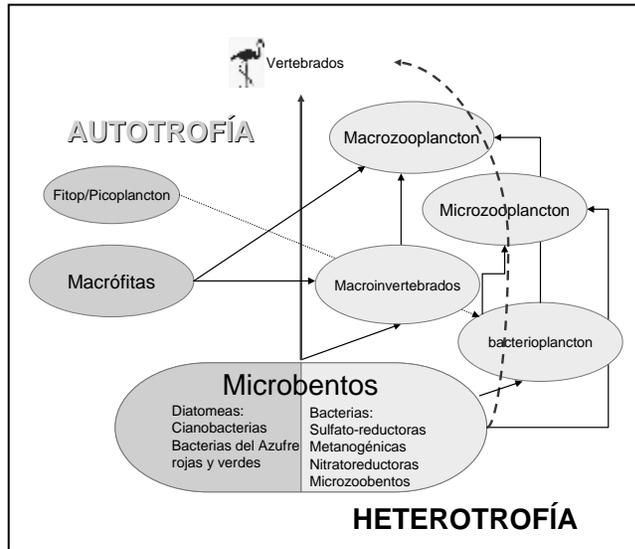
El carácter distintivo de los humedales está en la escasa profundidad del nivel freático, con la consecuente alteración del régimen del suelo.

La vegetación específicamente adaptada a estas condiciones se denomina hidrófita, y reemplaza en estos casos a las especies terrestres normales.

Las peculiaridades del entorno hacen que la fauna presente sea por lo general endémica y netamente diferenciada de las zonas adyacentes; grandes familias de aves y reptiles están únicamente adaptadas a entornos de este tipo.

HUMEDAL HIDROLÓGICAMENTE ALTERADO

1. Alteración de los niveles de agua superficiales y de subterráneos.
2. Alteración en la ciclicidad natural de los niveles de agua (diaria y estacional).
3. Alteración en la calidad química del agua de llenado.
4. Alteración en los mecanismos de recarga de los humedales.



Desarrollo Objetivo 1

1.- Construir una colección de cultivos de microorganismos extremófilos, aislados desde salares y vegas localizadas en el altiplano de Región de Antofagasta.

- Actividades:

Colecta de Muestras desde humedales altiplánicos: Se realizaron dos salidas a terreno (abril y julio 2007) para coleccionar muestras de sedimentos y agua de humedales del sector Ascotán (Laguna Los Patos, Laguna Noroeste) y el sector Soncor (Chaxas, Barros Negros y Punta Negra). Una vez coleccionadas, las muestras fueron trasladadas al laboratorio de Química Biológica del Departamento de Ciencias Químicas y Farmacéuticas de la Universidad Católica del Norte, Antofagasta.

Puntos de Muestreo

1.- Salar de Ascotán

2.- Salar de Atacama

3.- Salar de Punta Negra

Tipos de Muestras Recolectadas

Sedimentos



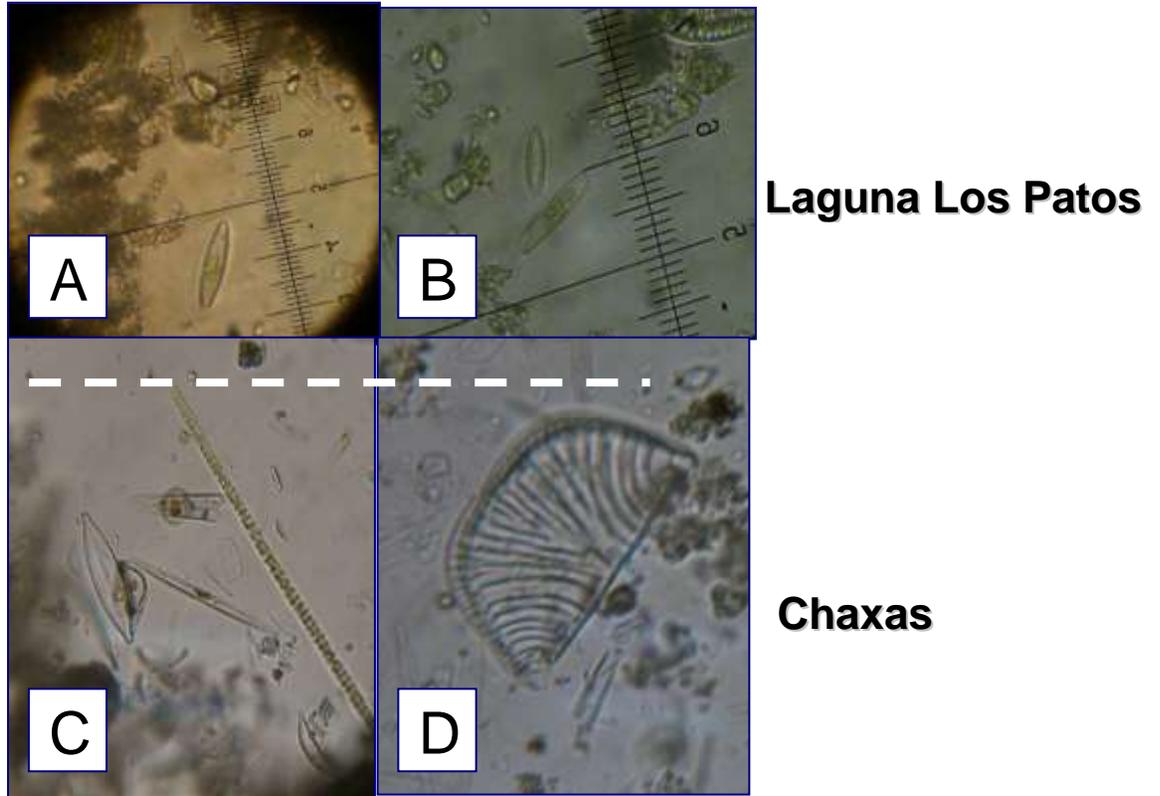
Agua



Análisis microscópico de las muestras colectadas: Las muestras de sedimentos fueron analizadas en el laboratorio bajo un microscopio Microscopio Binocular Japan Optical Co. L2000A, para caracterizar comunidades microbianas.

En la Tabla I se resume la presencia de grupos de organismos formando comunidades en los sitios de muestreo analizados.

Análisis Microscópico



Observaciones al microscopio de las comunidades microbianas en las muestras colectadas. A y B Laguna Los Patos, C y D Laguna Chaxas

Presencia de microorganismos en los sitios de muestreo

SECTORES DE MUESTREO		MICROORGANISMOS			
		Cloroficeas	Diatomeas	Filamentosas	Otros (Protozos)
SECTOR ASCOTAN	Laguna los Patos	*	*		
	Laguna Noroeste	*	*		*
	Laguna Vega II	*	*		
SECTOR SONCOR	Laguna Chaxas	*	*	*	*
	Laguna Barros Negros	*	*	*	*
	Salar de Punta Negra	*	*	*	

Procedimientos para el aislamiento de cepas

Estrías en medio sólido

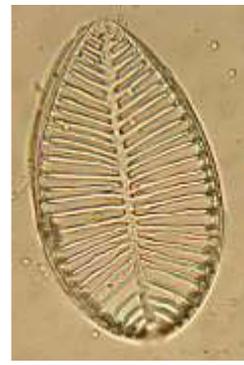
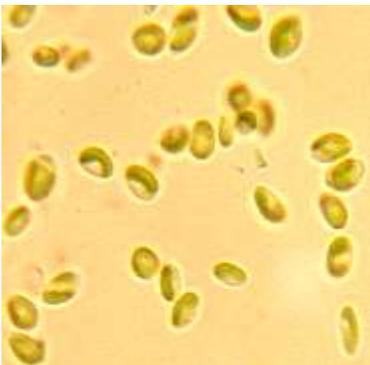


Diluciones seriadas



Para la obtención de bacterias, cianobacterias y microalgas

Cepas aisladas



AISLAMIENTO DE MICROALGAS			
Especie	Clase	Origen	Medio de Cultivo
Dunaliella sp 001	Cloroficea	Chaxas	Jhonson
Dunaliella sp 002	Cloroficea	Los Patos	Bristol
Dunaliella sp 003	Cloroficea	Chaxas	F 1/2
Chlorella sp 001	Cloroficea	Chaxas	BG-11
Chlorella sp 002	Cloroficea	Punta Negra	CHU modificado, BG-11, Bristol
Anabaena sp 001	Cianoficea	Chaxas	CHU modificado
Anabaena sp 002	Cianoficea	Los Patos	Bristol
Anabaena sp 003 *	Cianoficea	Vega II	Bristol
Haematococcus sp 002	Cloroficea	Chaxas	CHU modificado
Chlamydomonas sp 001	Cloroficea	Chaxas	CHU modificado
Anabaenopsis sp 001	Cianoficea	Chaxas	CHU modificado
Anabaenopsis sp 002 *	Cianoficea	Vega II	CHU modificado
Suriella sp *	Diatomea	Punta Negra	CHU
Navicula sp *	Diatomea	Punta Negra	CHU
* Proceso de aislamiento			

Cultivo de Trabajo Cepas Aisladas: (2 litros)



Se obtuvieron cepas aisladas de microalgas y se cultivaron en medios específicos en Batch de 2 litros para aumentar la cantidad de masa recuperada.

Aislamiento y Tipificación de Microalgas: Las muestras de sedimentos fueron inoculadas en medios de cultivos específicos para Cloroficeas (Bristol, Jhonsons),

Cianofíceas (BG11, CHU modificado) y Diatomeas (CHU) y se utilizó la metodología de estrias y dilución seriada para el aislamiento y cultivo axénico de cepas microalgales.

La tipificación se realizó a través de claves taxonómicas (Parra y col. 1988) para caracterizar a las cepas entre los grupos: clorifeas, cianofíceas y diatomeas e identificarlas a nivel genérico cada cepa aislada.

Las cepas de microalgas aisladas son un total de 14 las cuales se detallan en la Tabla anterior.

Aislamiento de cepas microbianas:

Aislamiento de Bacterias sulfo oxidantes y sulfato reductoras: Las muestras de sedimentos fueron inoculadas en matraces de Erlenmayer conteniendo 200ml de medio enriquecido y selectivo para bacterias sulfo oxidantes, luego de tres días de incubación a temperatura ambiente, los matraces que presentaron turbidez del medio de cultivo fueron considerados con crecimiento de bacterias sulfo oxidantes.

En forma paralela se inocularon muestras de sedimentos en botellas schott de 250 ml conteniendo un medio enriquecido y selectivo para bacterias sulfato reductoras saturadas con nitrógeno gaseoso para darle la condición de anaerobiosis. Luego de tres días de incubación a temperatura ambiente, las botellas con presencia de precipitado negro fueron consideradas con crecimiento de bacterias sulfato reductoras.

En el proceso de aislamiento solo se lograron aislar bacterias dentro grupos funcionales tales como sulfooxidantes y sulfato reductoras.

Análisis del metabolismo del Azufre por bacterias: Sulfooxidantes (SOB) y Sulfatoreductoras (SRB)



SOB



SRB

Se observa los set experimentales para el crecimiento de bacterias sulfooxidantes y sulfato reductoras.

El crecimiento de bacterias del azufre en los sitios de muestreo se muestra en la siguiente tabla.

Bacterias del metabolismo del azufre

Punto de Muestreo	SRB	ASO
Chaxas (sector)	-	+
Barros Negros	-	-
L. Chaxas	+	+
L. Noroeste	+	-
E. Meteorológica	+	+
Ascotán	-	+
VCL 1-2	-	+
VCL 2	-	+
VCL 2-1	+	+
VCL 2-2	+	+

Cultivo y Mantenimiento de Microorganismos: Las cepas aisladas son mantenidas en los siguientes cultivos:

1.- STOCK:

Bacterias: El crecimiento de comunidades de bacterias sulfo oxidantes y sulfato reductoras obtenidas en el laboratorio, fueron concentradas por centrifugación (6.000 rpm x 5 minutos), luego resuspendidas en glicerina e incubados a -10°C para su conservación.

Microalgas: Las cepas de microalgas aisladas fueron inoculadas en tubo de agar inclinado en medios específicos para cada cepa, e incubadas a 20⁰C con iluminación continua de densidad de 180µmol m⁻² s⁻¹ desde tubos fluorescentes en una cámara de incubación.

2.- CULTIVO INICIAL:

Microalgas: A partir de cultivos Stock, se inocula cada cepa en matraces de Erlenmayer de 125ml con medio de cultivo líquido y se mantienen en las mismas condiciones de temperatura e iluminación indicadas anteriormente.

3.- CULTIVO DE TRABAJO:

Cuando sea requerido el crecimiento de una cepa particular (microalga o bacteria), inóculos del cultivo inicial de esta cepa, se llevan a medios frescos para su proliferación. Dependiendo de la utilización del cultivo de trabajo y de la cepa microbiana, dependerá el volumen, medio de cultivo (nutrientes, líquido o sólido) , parámetros y tiempo de incubación. Para optimizar el crecimiento de los microorganismos, los cultivos de trabajo en medio líquido se incubarán en un shaker orbital y/o se proporcionará aireación a través de bombas de aire.



Cultivo Stock de microalgas en tubos de agar semi inclinados



Cultivo inicial en matraces de 125 ml con medios de cultivo específicos para cada cepa.



Cultivo de trabajo de microalgas en volúmenes superiores a 1 litro.

Estudio en Mesocosmos

Sistema experimentalmente controlado, que permite reproducir a escala un proceso ecológico a distintos niveles (población, comunidad y ecosistema)

Desarrollo Objetivo 2

2.- Restauración de microhabitats a escala de mesocosmos, utilizando matrices ambientales hidrológicamente alteradas.

Diseño Experimental



↑
Acuario de vidrio
cubierto con papel
aluminio →

- Manguera para el llenado con agua de cada sector (diluida (25 y 50%) y sin diluir).
- Capa de sedimentos (8 a 10 cm) provenientes de los sitios alterados
- Malla que separa los sedimentos del fondo
- Soporte para sedimentos
- Compartimento con agua del sitio alterado



→ Piezómetro para el control de variables fisicoquímicas

Resultados: Sector Laguna los Patos Salar de Ascotán

	Fecha	Bacterias	Frústulos de diatomeas vacíos	Cistes activados de Microalgas	Diatomeas con proplastidios	Diatomeas con plastidios	Diatomeas planctónicas	Otras microalgas	Quistes activados de protozoos	Protozoos
Diluida en un 75%	4/09/07		●							
	1/10/07	●	●							
	3/10/07	●	●		●					
	10/10/07	●	●			●				
	29/10/07	●	●			●				
	Post/sequia	●	●			●				
Diluida en un 50%	4/09/07		●							
	1/10/07	●	●							
	3/10/07	●	●							
	10/10/07	●	●						●	
	29/10/07	●	●		●					
	Post/sequia	●	●		●	●				●
Sin dilución	4/09/07		●							
	1/10/07	●	●							
	3/10/07	●	●			●				
	10/10/07	●	●			●				
	29/10/07	●	●			●				
	Post/sequia	●	●			●				

Resultados: Sector Laguna Chaxas, Salar de Atacama

	Fecha	Bacterias	Frústulos de diatomeas vacíos	Cistes activados de Microalgas	Diatomeas con proplastidios	Diatomeas con plastidios	Diatomeas planctónicas	Otras microalgas	Quistes activados de protozoos	Protozoos
Diluida en un 75%	4/09/07		●							
	1/10/07	●	●							
	3/10/07	●	●			●				
	10/10/07	●	●			●				
	29/10/07	●	●			●		●		
	Post/sequia	●	●			●		●		●
Diluida en un 50%	4/09/07		●							
	1/10/07		●							
	3/10/07	●	●							
	10/10/07	●	●			●	●			
	29/10/07	●	●			●	●	●		
	Post/sequia	●	●			●	●	●		●
Sin dilución	4/09/07		●							
	1/10/07	●	●	●						
	3/10/07	●	●	●						
	10/10/07	●	●	●						
	29/10/07	●	●	●						
	Post/sequia	●	●	●		●				●

Resultados: Sector VCL-1 Salar de Punta Negra

	Fecha	Bacterias	Frústulos de diatomeas vacíos	Cistes de Microalgas	Diatomeas con propiastidios	Diatomeas con plastidios	Diatomeas planctónicas	Otras microalgas	Quistes activados de protozoos	Protozoos
Diluida en un 75%	4/09/07		●							
	1/10/07	●	●		●					
	3/10/07	●	●			●				
	10/10/07	●	●			●	●			
	29/10/07	●	●			●	●			
	Post/sequia	●	●	●		●			●	
Diluida en un 50%	4/09/07		●							
	1/10/07	●	●		●					
	3/10/07	●	●		●					
	10/10/07	●	●			●				
	29/10/07	●	●			●				●
	Post/sequia	●	●			●				●
Sin dilución	4/09/07		●							
	1/10/07	●	●	●						
	3/10/07	●	●			●				
	10/10/07	●	●			●				
	29/10/07	●	●			●	●			
	Post/sequia	●	●		●	●				●

Conclusiones

1. Sedimentos con un nivel muy bajo de humedad, permiten la recuperación de la comunidad biológica básica: diatomeas y bacterias.
2. La recuperación de un estructura básica, parece ser independientemente del tiempo de sequía previo
3. La recuperación de la estratificación del film microbiano (Tapete microbiano), parece ser de larga data (ausencia de especies filamentosas de cianobacterias)
4. La interrupción del periodo de inundación estimula la aparición de la microfauna asociada al tapete.
5. Las comunidades microbianas en los sitios muestreados en el sector Ascotán, están formadas mayoritariamente por microalgas Clorofíceas y Diatomeas.
6. Las comunidades de los sitios muestreados en el sector Sóncor están formadas mayoritariamente por microalgas Clorofíceas, Diatomeas y Filamentosas del grupo de las Cianofíceas y Clorofíceas.
7. Bacterias sulfo-oxidantes y sulfato-reductoras no cohabitan en un mismo sitio de muestreo, para la mayoría de los puntos analizados. Estos resultados deberán ser analizados en función de las características fisicoquímicas de cada lugar.
8. Se aisló un total de 12 cepas entre cianofíceas, clorofíceas y diatomeas.

