



COMISION NACIONAL DE INVESTIGACION CIENCIA Y TECNOLOGIA

VERSION OFICIAL

FECHA: 02/11/2010

PROYECTO INICIACION N°11080228

INVESTIGADOR RESPONSABLE: CRISTINA INES DORADOR ORTIZ

FONDO NACIONAL DE DESARROLLO CIENTIFICO Y TECNOLOGICO (FONDECYT)

Bernarda Morín 551, Providencia - casilla 297-V, Santiago 21

Telefono: 435 43 50 FAX 365 4435

Email: informes.fondecyt@conicyt.cl

INFORME FINAL

PROYECTO FONDECYT INICIACION

N° PROYECTO : 11080228 **DURACIÓN :** 2 años **AÑO ETAPA :** 2009
TÍTULO PROYECTO : HIGH ALTITUDE WETLANDS OF THE CHILEAN ALTIPLANO: THE IMPORTANCE OF PHOTOTROPHIC PROKARYOTES, THEIR SYSTEMIC ROLE IN THE BOTTOM-UP PROCESSES

DISCIPLINA PRINCIPAL : MICROBIOLOGIA
GRUPO DE ESTUDIO : BIOLOGIA 3
INVESTIGADOR(A) RESPONSABLE : CRISTINA INES DORADOR ORTIZ
DIRECCIÓN : Reumen 01560, departamento 401, Coviefi
COMUNA : Antofagasta
CIUDAD : Antofagasta
REGIÓN : II REGION
FONO : +56 55 657701
EMAIL : criordor@gmail.com

INFORME

OBJETIVOS

Cumplimiento de los Objetivos planteados en el Proyecto. Recuerde que los objetivos del proyecto no se refieren a listar actividades desarrolladas sino a los objetivos desarrollados

N°	OBJETIVOS	CUMPLIMIENTO	FUNDAMENTO
1	OBJETIVO 1 Determinar la presencia y diversidad de bacterias fotótrofas anoxigénicas en tres humedales altiplánicos mediante caracterización independiente de cultivo usando genes de la fotosíntesis (puf, crt, bch) como marcadores moleculares funcionales.	TOTAL	Este objetivo ha sido satisfactoriamente logrado, ya que la comunidad de bacterias fotótrofas anoxigénicas fue caracterizada utilizando genes funcionales de la fotosíntesis (pufLM y bchY). Los resultados obtenidos de los análisis de bacterias fotótrofas en el Salar de Atacama fueron recientemente publicados en FEMS Microbiol Ecol., mientras que el manuscrito que da cuenta de las comunidades fotótrofas en el Salar de Huasco y Ascotán se encuentra en preparación. De esta forma, se da a conocer uno de los resultados claves de este proyecto: las comunidades de bacterias fotótrofas del Salar de Atacama son muy diferentes a las que habitan los salares del Altiplano las cuales están dominadas por miembros de las bacterias fotótrofas anoxigénicas aeróbicas, en contraste con las lagunas del Salar de Atacama que son las bacterias fotótrofas anoxigénicas anaeróbicas.

2	<p>OBJETIVO 2</p> <p>Determinar y confirmar la presencia de bacterias aeróbicas fotótrofas anoxigénicas representadas por miembros del clado Roseobacter usando partidores específicos para el gen ribosomal 16S y genes de la fotosíntesis (puf, crt, bch) como marcadores moleculares funcionales.</p>	TOTAL	<p>Los miembros del clado Roseobacter están presentes en todos los humedales analizados lo cual fue confirmado con genotecas del gen ribosomal 16S utilizando partidores específicos para este grupo y con los genes funcionales pufLM y bchY. Además se obtuvieron aislados de este grupo los cuales corresponden a cepas no identificadas de bacterias fotótrofas anoxigénicas aeróbicas (contienen el gen bchY). Uno de los aislados (isolate_H3-15) fue altamente similar con <i>Porphyrobacter sanguineus</i> (99% similitud de secuencia del gen ribosomal 16S), mientras que otro aislado (isolate_H6-23) tuvo baja similitud con el género más cercano Roseinatronobacter (46% similitud de secuencia del gen ribosomal 16S) miembro de la familia Rhodobacteraceae.</p>
3	<p>OBJETIVO 3</p> <p>Determinar la diferenciación genética de genes que codifican para el complejo cosechador de la luz y centro de reacción (puf) en una muestra de agua del Salar de Huasco mediante el análisis de librerías de fósmidos.</p>	TOTAL	<p>El establecimiento de la genoteca de fósmidos fue una técnica difícil de montar en el Laboratorio y se obtuvo siempre un bajo número de clones, los cuales no pudieron ser secuenciados. Sin embargo, la aplicación del marcador molecular bchY recientemente descrito (Yutin et al 2009) al estudio de las comunidades de bacterias fotótrofas dio excelentes resultados ya que se pudo describir la diversidad funcional de este grupo. Tomando en cuenta estos antecedentes y el comentario de uno de los revisores del proyecto, se realizó exitosamente una extracción de DNA de alto peso molecular desde muestra de un tapete microbiano del Salar de Huasco y se procedió a secuenciar la muestra utilizando la técnica de pirosecuenciación (FLX titanium, 454 Life Sciences, Roche) esperando alrededor de 80-120 mil secuencias (30-55 Mb). Este análisis se encuentra en curso en Macrogen Inc. (Corea).</p>
4	<p>OBJETIVO 4</p> <p>Determinar la abundancia de bacterias fotótrofas anoxigénicas y aeróbicas usando cuantificación mediante PCR en tiempo real (Q-PCR) basado en los genes de la fotosíntesis (puf, crt, bch) en muestras ambientales de tres humedales de altura del Altiplano Chileno.</p>	TOTAL	<p>Debido a la alta diversidad de las bacterias fotótrofas anoxigénicas encontradas en los salares analizados, se diseñaron partidores específicos para los grupos encontrados en las genotecas del gen bchY y se utilizaron partidores diseñados para el gen pufM. En el caso del gen bchY, se diseñaron partidores para cuatro grupos de bacterias fotótrofas anoxigénicas aeróbicas, encontrándose una concentración de $3 \times 10^4 - 2 \times 10^5$ copias/ml para el clúster 3 y $9.9 \times 10^2 - 1.7 \times 10^5$ copias/ml para el clúster 4 en distintas muestras del Salar de Huasco y Salar de Ascotán.</p>

5	<p>OBJETIVO 5</p> <p>Evaluar la actividad de bacterias fotótrofas usando RT-PCR de los genes de la fotosíntesis (ej. puf, crt, bch).</p>	TOTAL	<p>Este objetivo fue cumplido ya que se pudo realizar exitosamente extracción de RNA desde distintas muestras ambientales de los sitios estudiados y de aislados del Salar de Huasco, obteniéndose cDNA. Se realizaron genotecas de los grupos específicos encontrados con las genotecas para el gen bchY para el Salar de Huasco y Salar de Ascotán a partir del cDNA y se cuantificó la concentración de bacterias fotótrofas asociadas a estos grupos en muestras ambientales utilizando RT-Q-PCR. Las concentraciones fluctuaron entre $3-1.5 \times 10^3$ copias/ml para el clúster 3 y $2.4 \times 10^1 - 1.9 \times 10^2$ copias/ml para el clúster 4.</p>
6	<p>OBJETIVO 6</p> <p>Determinar la concentración de pigmentos fotosintéticos en el ambiente (Chl a, Bchl) y correlacionarlos con los resultados de genes funcionales.</p>	TOTAL	<p>La concentración de clorofila a fue estimada desde muestras de agua utilizando extracción por solventes. La medición de bacterioclorofila a se realizó desde los aislados obtenidos y desde muestras de agua filtradas, sin embargo no fue posible obtener una señal clara de la absorbancia de este pigmento fotosintético. Por este motivo, distintos pigmentos (clorofila, bacterioclorofila y carotenoides) de las muestras de agua están siendo analizadas por HPLC por el Dr. Lasse Mork Olsen en la estación biológica de Trondhjem, Department of Biology, Norwegian University of Science and Technology, Noruega.</p>

Otro(s) aspecto(s) que Ud. considere importante(s) en la evaluación del cumplimiento de objetivos planteados en la propuesta original o en las modificaciones autorizadas por los Consejos.

RESULTADOS OBTENIDOS:

Para cada uno de los objetivos específicos, describa o resuma los resultados. Relacione las publicaciones y /o manuscritos enviados a publicación con los objetivos específicos. En la sección Anexos incluya información adicional que considere pertinente para efectos de la evaluación.

La extensión máxima de esta sección es de 5 páginas (letra tamaño 10, Arial o Verdana).

INFORME FINAL Proyecto Fondecyt 11080228

Objetivo General

El presente sección muestra los resultados obtenidos en los dos años de ejecución del proyecto, los cuales tuvieron relación estricta con los objetivos planteados inicialmente. Considerando el objetivo general del proyecto el cual buscaba **"evaluar la presencia, abundancia y actividad de las bacterias fotótrofas en tres humedales de altura del Altiplano Chileno"**, se puede señalar que dicho objetivo fue cumplido a cabalidad y cuyos resultados han podido responder la mayoría de las interrogantes que sustentaron este proyecto. En resumen, la hipótesis 1: **"las bacterias fotótrofas anoxigénicas y aeróbicas anoxigénicas están ampliamente distribuidas en los humedales de altura del Altiplano Chileno"**, se cumple ya que se encontraron bacterias fotótrofas en todos los humedales analizados, existiendo diferentes comunidades entre los salares del Altiplano versus las lagunas del Salar de Atacama. Respecto a la hipótesis 2: **"la abundancia significativa de las bacterias fotótrofas anoxigénicas y aeróbicas anoxigénicas necesariamente implica un rol fundamental en la productividad primaria de los humedales altiplánicos"**, está parcialmente resuelta ya que son necesarios más estudios (fuera de los objetivos iniciales del proyecto) respecto a la función de este grupo en el ambiente. Sin embargo, este proyecto entrega una fuerte evidencia del rol fundamental de las bacterias fotótrofas anoxigénicas tanto en los salares del Altiplano como en el Salar de Atacama. La abundancia fue evaluada en grupos específicos encontrados en los salares de Huasco y Ascotán utilizando el gen funcional marcador *bchY*, encontrándose que estos grupos están activos en el ambiente en muestras de agua y de tapetes microbianos. Las Figuras, Tablas y Bibliografía se detallan en el anexo.

Objetivos específicos y resultados

i) Determinar la presencia y diversidad de bacterias fotótrofas anoxigénicas en tres humedales altiplánicos mediante caracterización independiente de cultivo usando genes de la fotosíntesis (*puf*, *crt*, *bch*) como marcadores moleculares funcionales.

Se realizaron dos salidas a terreno este año a los salares de Huasco (Abril 2010) y salares de Ascotán y Atacama (Julio 2010) (Figura 1). Se observó una evidente proliferación de tapetes microbianos en los salares visitados y se analizaron distintas muestras (Tabla 2). Los análisis químicos de las muestras reflejan las marcadas diferencias químicas entre los ambientes estudiados (Tabla 1).

El estudio de las bacterias fotótrofas anoxigénicas (APB) utilizando genes funcionales en el ambiente marino ha demostrado la gran importancia de la fotosíntesis anoxigénica para procesos claves en los ciclos biogeoquímicos del carbono y azufre (Kolber et al 2001; Wagner-Döbler & Biebl, 2006). Las bacterias que realizan fotosíntesis anoxigénica están presentes en siete phyla del dominio *Bacteria* (*Alpha*-, *Beta*-, *Gammaprotobacteria*, *Firmicutes*, *Acidobacteria*, *Chlorobi*, *Chloroflexi*) existiendo diferencias entre ellos en cuanto al mecanismo de la fotosíntesis y los pigmentos relacionados. Algunas bacterias pueden presentar el centro de reacción 1 y otras el centro de reacción 2, lo cual genera dificultades en la búsqueda de un marcador funcional para todos los microorganismos que realizan fotosíntesis anoxigénica. El marcador *pufM* que codifica para la subunidad M del centro de reacción del aparato fotosintético anoxigénico, ha sido ampliamente utilizado para la caracterización de este grupo, sin embargo, sólo amplifica bacterias fotótrofas que tengan el centro de reacción 2 (ej., Beja et al 2002; Yutin et al 2005; Tank et al 2009). Para el estudio de genes funcionales de los otros grupos fotosintéticos anoxigénicos (ej. *Chlorobi*, *Chloroflexi*) se han descrito partidores específicos para el gen *fmoA* (Alexander et al 2002). Recientemente fueron descritos partidores degenerados que amplifican el gen *bchY* el cual está presente en todas las bacterias fotótrofas anoxigénicas (Yutin et al 2009) ya que codifica para la enzima clorofilida oxidoreductasa, clave en la síntesis de bacterioclorofila (pigmento fotosintético de las bacterias fotótrofas anoxigénicas) y aparece como una nueva herramienta para el estudio de este grupo.

Durante el primer año de proyecto se probaron distintas combinaciones de partidores y genes funcionales que codifican para distintas proteínas estructurales y funcionales relacionadas con la

fotosíntesis anoxigénica, además de partidores para el gen 16S RNA que amplifican distintos grupos de bacterias fotótrofas (Tabla 2). De los genes reportados y analizados, se seleccionaron dos pares de partidores para los genes *bchY* (clorofilida oxido reductasa) (Yutin et al 2009), *fmoA* (Alexander et al 2002) y *pufLM* (subunidades L y M del operón *puf*) (Tank et al 2009). Para el análisis del gen ribosomal 16S, se realizaron genotecas con partidores específicos para el clado *Roseobacter* (Selje et al 2004) (Tabla 3).

Filogenia basada en el gen *bchY*

El análisis de las comunidades microbianas utilizando genes funcionales presenta dos desafíos importantes: i) el diseño de partidores lo suficientemente específicos para abarcar la diversidad del grupo en estudio considerando la baja disponibilidad de secuencias para rutas funcionales específicas y ii) la falta de secuencias en las bases de datos públicas como GenBank para comparar las secuencias obtenidas. Considerando el estudio de ambientes poco explorados, como el Altiplano Chileno, y la alta diversidad genética asociada a sus cuencas, es esperable que una parte de las secuencias analizadas no tenga una identidad clara con las secuencias presentes en las bases de datos, lo cual no significa necesariamente, novedad filogenética. En los últimos años la secuenciación de genomas de bacterias fotótrofas anoxigénicas ha aumentado considerablemente (<http://www.roseobase.org/artemis/>) y gracias a ello, ha sido posible comparar las secuencias obtenidas y construir una hipótesis filogenética robusta (Figura 2) (Dorador & Vejar 2010, ISME-13; Dorador 2010, ALAM).

En general, todas las muestras ambientales analizadas (agua, sedimento, tapetes microbianos) (Tabla 2) amplifican para este gen un fragmento de 500 bp de acuerdo a lo reportado por Yutin et al (2009). Se escogieron 5 muestras las cuales fueron clonadas y secuenciadas. De las 84 secuencias obtenidas (Tabla 3), todas fueron asociadas a *Alphaproteobacteria* excepto el clon H3-mat-5 que tuvo 90% de identidad de secuencia de aminoácido con *Congregibacter litoralis*, miembro de *Gammaproteobacteria* y que realiza fotosíntesis anoxigénica (miembro del clado OM60 o NOR5 en ambientes marinos) (Spring et al 2009). Ninguna secuencia fue relacionada con miembros de las bacterias fotótrofas anoxigénicas anaeróbicas (*Alpha-*, *Beta-* o *Gammaproteobacteria*). Distintos clúster presentaron baja identidad de secuencia con la información disponible en las bases de datos formando clúster únicos: i) **Clúster 1 y 2**, formado sólo por secuencias del Salar de Ascotán (Figura 2) presentaron una identidad de secuencia de aminoácidos bajo el 92% con el filotipo más cercano; ii) Cuatro clones del Salar de Huasco y uno de Ascotán (agua y tapete microbiano) fueron asociados al grupo *Rhodobacter*. Dentro de este grupo se describe el **clúster 7** que incluye secuencias de BchY del Salar de Huasco y Ascotán y de dos aislados bacterianos obtenidos desde un afloramiento de bacterias fotótrofas ocurrido en Abril de 2010 en el Salar de Huasco (Figura 1); iii) Los **clúster 3 y 4** están formados sólo por secuencias del Salar de Huasco que presentaron identidad de secuencia de aminoácido menor a 90% con las secuencias de BchY disponibles; iv) El **clúster 5**, formado por secuencias del Salar de Huasco, presentó una baja similitud con el grupo *Erythrobacter*; v) Miembros del **clúster 6** (Salar de Ascotán) fueron asociados a bacterias púrpuras no del azufre, que realizan fotosíntesis anoxigénica aeróbica o anaeróbica; vi) **Clúster 8, 9 y 10** agrupa a distintas secuencias del Salar de Ascotán y Salar de Huasco que tienen baja identidad de secuencias de BchY con cepas cultivadas; vii) **Clúster 11 y 12** incluyen secuencias obtenidas desde Laguna Chaxa en el Salar de Atacama y presentaron una baja identidad de secuencia con las secuencias disponibles. Varias secuencias fueron agrupadas con miembros reconocidos del clado *Roseobacter* como *Loktanela vestfoldensis*, aislado desde tapetes microbianos de lagos antárticos; *Roseovarius*; *Jannaschia* y *Thalassiosibium* (Wagner-Döbler & Biebl 2006).

Análisis filogenético del gen *fmoA* y *crt*

Se obtuvo amplificación específica de diversas muestras del Salar de Ascotán y del Salar de Huasco utilizando los partidores para el gen *fmoA* que codifica para el complejo Fenna-Matthews Olson relacionado con la síntesis de bacterioclorofila en bacterias verdes del azufre (*Chlorobi*) (Alexander et al 2002). Sin embargo, las secuencias de los clones secuenciados no correspondieron al grupo microbiano esperado y más bien, se asocia a amplificación inespecífica (Tabla 3). En el caso del gen *crt*, responsable de la síntesis de carotenoides en bacterias fotótrofas anoxigénicas (Kovacs et al., 2003) no amplificaron las muestras analizadas, excepto para el control positivo *Thiocapsa roseopersicina*. Por lo tanto, no fue posible analizar este gen utilizando la información de partidores disponible en la literatura.

Filogenia basada en el gen *pufLM*

Salar de Atacama: Laguna Chaxa y Laguna Tebenquiche

Uno de los resultados más importantes de este proyecto fue la comparación de información filogenética derivada de distintos genes funcionales marcadores y distintas muestras analizadas. El manuscrito 1 asociado a este proyecto "Unique communities of anoxygenic phototrophic bacteria in saline lakes of Salar de Atacama (Chile): evidence for a new phylogenetic lineage of phototrophic *Gammaproteobacteria* from *pufLM* gene analyses" (Thiel et al 2010; Thiel et al 2010 VAAM) da cuenta de la alta variabilidad de las comunidades de bacterias fotótrofas en distintas muestras del Salar de Atacama las cuales están principalmente asociadas a los grupos halófilos *Chromatium* y *Ectothiorhodospira*. Sin embargo, es destacable la presencia de un clúster único que incluye secuencias de ambas lagunas del Salar de Atacama que correspondería a un nuevo linaje dentro de *Gammaproteobacteria* (Figura 3) Es destacable además, que utilizando los genes *pufLM* se haya detectado una fracción de secuencias relacionadas con bacterias fotótrofas anoxigénicas aeróbicas, lo cual también fue reportado utilizando el gen *bchY* (Figura 2) y *pufLM* como marcador funcional en muestras del Salar de Huasco (Tabla 4).

Altiplano Chileno: Salar de Ascotán y Salar de Huasco

Los partidores utilizados para la amplificación de los genes *pufLM* amplifican un fragmento de 1500 bp, lo cual genera dificultades en el clonamiento. Esta sería la razón de la obtención de un número bajo de clones al realizar las genotecas (Tabla 2). Sin embargo, los clones secuenciados y analizados dieron cuenta de una importante diversidad basada en estos genes (Tabla 4) que estaría acorde con lo reportado utilizando el gen *bchY* como marcador molecular (Figura 2). La mayoría de las secuencias obtenidas pudieron ser afiliadas dentro de Alphaproteobacteria, a pesar de mostrar una identidad de secuencia baja con sus relativos más cercanos (Tabla 4). Las secuencias pudieron ser afiliadas dentro de las bacterias del clado *Roseobacter* (ej, *Roseobacter*, *Sulfitobacter*, *Loktanella*, *Porphyrobacter*) y otras Alpha- como *Methylobacterium* que también tiene la capacidad de realizar fotosíntesis anoxigénica. Dos clones tuvieron una identidad entre el 84-97% con *Ectothiorhodospira* (*Gammaproteobacteria*), una bacteria púrpura del azufre que habita en ambientes salinos y fue reportada como abundante en las lagunas del Salar de Atacama (Manuscrito 1). Además se encontró un clon que estaría relacionado con el aislado NOR5-3, cuto representante cultivado es *Congregibacter litoralis*.

ii) Determinar y confirmar la presencia y diversidad de bacterias fotótrofas anoxigénicas aeróbicas, representadas por miembros del clado *Roseobacter* usando partidores específicos para el gen 16S rDNA para este clado y genes de la fotosíntesis como marcadores moleculares funcionales.

El análisis de genes de la fotosíntesis demostró que el grupo *Roseobacter* está presente en todos los ambientes estudiados y más aún, sería el grupo fotosintético anoxigénico predominante en los salares del Altiplano Chileno. Debido a la novedad de las secuencias reportadas basadas en los genes *bchY* y *pufLM*, es difícil tener una idea clara respecto a la afiliación filogenética de los miembros del clado *Roseobacter* que habitan los ambientes acuáticos del Altiplano Chileno. Además, debido a la alta diversidad microbiana de estos ambientes, la obtención de secuencias del gen ribosomal 16S específicas para este grupo utilizando partidores generales para *Bacteria*, es baja. Es por esto, que se realizaron genotecas del gen ribosomal 16S utilizando partidores específicos para el clado *Roseobacter* (Selje et al 2004).

Filogenia basada en el gen ribosomal 16S para el clado *Roseobacter*

La Figura 4 muestra la hipótesis filogenética derivada del análisis de secuencias específicas para el clado *Roseobacter*. Del total de secuencias obtenidas, el 10% tuvo una afiliación diferente a *Alphaproteobacteria* y no se incluyeron en el análisis (Tabla 2). Se analizaron muestras de la Laguna Tebenquiche, Salar de Ascotán y Salar de Huasco, además de dos aislados fotoheterótrofos obtenidos desde muestras de tapete microbiano de dos sitios (H3 y H6) del Salar de Huasco (Tabla 5). En todas las genotecas se obtuvo un número suficiente de secuencias para describir diversidad (Tabla 2). El filotipo más abundante en todas las muestras analizadas tuvo una alta identidad de secuencia (99%) con el género *Sulfitobacter*, el cual es miembro del clado *Roseobacter*, presente en ambientes marinos (Yoon et al 2007), cuyos miembros son capaces de transformar el sulfito y tiosulfato a sulfato. En análisis filogenético de estas secuencias también muestra alta identidad de secuencia con miembros de los grupos *Roseovarius*, *Loktanella* y *Octadecabacter*, todos miembros del clado *Roseobacter*. Varios filotipos del Salar de Huasco, Salar de Ascotán y Laguna Tebenquiche no fueron agrupados junto con las cepas descritas para este grupo, formando clúster únicos: i) El **clúster 1** presenta secuencias del Salar de Huasco obtenidas anteriormente (Dorador 2007) que no se agrupan con las secuencias obtenidas en este estudio; ii) Miembros del **clúster 2** presentaron una baja identidad con la cepa cultivada más cercana,

Octadecabacter (>70%) formando un clúster diferente que incluye filotipos del Salar de Ascotán y de la Laguna Tebenquiche; iii) El filotipo Asc-3LB-47 (**clúster 3**) presentó un 97% de identidad de secuencia con *Ruegeria pomeroy* (*Silicibacter pomeroy*), miembro del clado *Roseobacter* que es capaz de oxidación de monóxido de carbono (Wagner-Döbler et al 2006); iv) El filotipo H3-2W-13 formó el **clúster 4** que presentó una identidad de secuencia bajo el 97% con cepas cultivadas miembros del clado *Roseobacter*.

Posible bloom de bacterias fotótrofas anoxigénicas aeróbicas en el Salar de Huasco

En la salida a terreno de Abril de 2010 en el Salar de Huasco (Figura 1), se encontraron grandes extensiones de lagunas con un color rojo intenso, además de la presencia de tapetes microbianos en sitios que no se encuentran normalmente como H0. Debido a la posibilidad de tratarse de un afloramiento (bloom) de bacterias fotótrofas, se realizaron aislados utilizando estas muestras como inóculo y agar marino (Difco) como medio de cultivo. Hasta la fecha se han aislado cerca de 20 colonias que tienen coloración rojiza, rosada o naranja. En total, siete de estos aislados presentaron el gen *bchY*, el cual fue secuenciado e incluido en la filogenia para este gen (Figura 2) y se utilizaron para el análisis cuantitativo de los clúster descritos a partir de la filogenia de *bchY* (Tabla 6). El análisis del gen ribosomal 16S de estos aislados mostró que al menos dos son miembros del clado *Roseobacter* con alta similitud con *Porphyrobacter* sp. y con *Rhodobacter* sp. (Figura 4).

iii) Determinar la diferenciación genética de genes que codifican el complejo cosechador de la luz y el centro de reacción (puf) en una muestra de agua del Salar de Huasco utilizando librerías de fósmidos.

El cumplimiento de este objetivo tuvo varias dificultades metodológicas durante el proyecto. El establecimiento de la genoteca de fósmidos fue realizado al menos cinco veces con distintas modificaciones y aproximaciones, las cuales dieron como resultado un bajo número de clones y la mayoría sin inserto. Sin embargo, el propósito de este objetivo fue resuelto de dos maneras: i) este objetivo fue propuesto para comprender la estructura genética de las bacterias fotosintéticas anoxigénicas de los sitios estudiados. Considerando los resultados obtenidos en los objetivos 1 y 2, se encontró una alta diversidad de bacterias fotótrofas existiendo diferencias contrastantes entre las comunidades de los salares del Altiplano (dominancia clado *Roseobacter*) y del Salar de Atacama (dominancia bacterias púrpuras del azufre). Esta diferencia de grupos también tiene inferencia en la estructura genética de las bacterias que realizan fotosíntesis anoxigénica. La obtención de fósmidos que contengan genes de la fotosíntesis fue una propuesta razonable en el planteamiento inicial del proyecto ya que cuando este proyecto fue escrito (abril 2008), existía poca información respecto a genes funcionales marcadores para la descripción de bacterias fotótrofas en el ambiente. La publicación de dos artículos claves para este proyecto que utilizan los genes *pufLM* (Tank et al 2009) y *bchY* (Yutin et al 2009) como marcadores moleculares funcionales, sirvió para el cumplimiento de los objetivos sin necesidad de tener que diseñar partidores específicos sólo considerando la información derivada de la secuencia de los posibles fósmidos obtenidos, lo cual sin duda, hubiese sido un sesgo en el estudio. En ambas publicaciones, además, se generó una gran cantidad de secuencias que se encuentra disponible en GenBank y que puede ser utilizada para el establecimiento de alineamientos y posteriores hipótesis filogenéticas robustas; y ii) a pesar de la justificación anterior, sigue siendo un punto importante la descripción del clúster de los genes de la fotosíntesis asociado a las bacterias fotótrofas presentes en los salares del Altiplano, debido principalmente a la alta novedad que tendrían estos grupos en estos ambientes. Considerando este punto y el comentario de uno de los revisores del proyecto, se realizó extracción de DNA de alto peso molecular desde muestras de un tapete microbiano del sitio H3 del Salar de Huasco (Figura 1), el cual presentó una concentración de 22,5 µg de DNA con un A260/A280 de 1,9 (Figura 6). Esta muestra fue enviada a MacroGen Inc. (Corea) para su secuenciación mediante la técnica de pirosecuenciación utilizando la tecnología 454 (FLX titanium, 454 Life Sciences, Roche), la cual se encuentra en proceso (Figura 6). Se espera obtener entre 80-120 mil secuencias (30-55 Mb) de un tamaño promedio de 400 bp, las cuales deberían contener una gran proporción de secuencias relacionadas con genes de los microorganismos fotosintéticos presentes en el tapete microbiano analizado. Esta información será de gran relevancia para entender la estructura genética de las comunidades presentes y responder así de forma global las preguntas iniciales que motivaron la realización de este proyecto.

iv) Determinar la abundancia de bacterias fotótrofas anoxigénicas y anoxigénicas aeróbicas usando cuantificación mediante PCR en tiempo real (Q-PCR) basado en los genes de la fotosíntesis (*puf*, *crt*, *bch*) en muestras ambientales de tres humedales de altura del Altiplano Chileno.

Para la realización de este objetivo, se consideró el análisis filogenético basado en el gen *bchY* de muestras de los tres humedales estudiados debido a que este marcador mostró la mayor diversidad de bacterias fotótrofas en muestras del Altiplano Chileno (Figura 2). Esta filogenia da cuenta de varios clúster únicos que presentan una baja identidad de secuencias con aquellas disponibles en las bases de datos. Se diseñaron partidores específicos para los clúster 1, 2, 3 y 4 (Tabla 3). Los clúster 1 y 2 fueron dominados por secuencias del Salar de Ascotán y los clúster 3 y 4 por secuencias del Salar de Huasco (Figura 2). Los partidores diseñados para el clúster 1, 3 y 4 mostraron alta especificidad en la amplificación directa utilizando DNA de muestras ambientales como templado y de aislados obtenidos del Salar de Huasco y Ascotán que presentan el gen *bchY* (Tabla 5; Figura 5) mientras que aquellos diseñados para el clúster 2 no fueron específicos (Figura 5). A partir de esta información se procedió a la cuantificación por Q-PCR de los clúster 3 y 4, encontrándose una concentración de 3×10^4 - 2×10^5 copias/ml para el clúster 3 y entre $9,9 \times 10^2$ - $1,7 \times 10^5$ copias/ml para el clúster 4 en distintas muestras del Salar de Huasco y Salar de Ascotán (Tabla 6). Se utilizó como control positivo en las reacciones de PCR y Q-PCR DNA de *Thiocapsa roseopersicina*. El gen *pufM* no fue cuantificado por Q-PCR debido a que la amplificación fue altamente inespecífica. La concentración más alta de los clúster 3 ($1,9 \times 10^5$ copias/ml) y 4 ($1,7 \times 10^5$ copias/ml) fue encontrada en la muestra H3-2w, la cual corresponde a agua del sitio H3 del Salar de Huasco. Comparando resultados previamente descritos sobre la abundancia bacteriana basada en el gen ribosomal 16S en el sitio cercano H4, ésta alcanza $5,34 \times 10^5$ copias/ml (Dorador et al 2010).

v) Evaluar la actividad de bacterias fotótrofas usando RT-PCR de los genes de la fotosíntesis (ej. *puf*, *crt*, *bch*).

Se realizaron extracciones de RNA desde muestras ambientales de los sitios muestreados y desde los aislados fotoheterótrofos obtenidos desde el Salar de Huasco cuya concentración máxima fue de 312,4 ng/ μ l para el aislado H0-22 y 24,9 ng/ μ l para la muestra H3mat (tapete microbiano del sitio H3) (Tabla 5). La reacción de RT-PCR se realizó utilizando partidores al azar y además, el partidor degenerado *bchY_rev* (Yutin et al 2009). El cDNA fue amplificado con los partidores específicos del gen *bchY* diseñados para el objetivo 4 y visualizado en un gel de agarosa al 1% (Figura 5). Se obtuvo amplificación específica de cDNA para algunas muestras del clúster 3 y 4, amplificación inespecífica para el clúster 2 y no se obtuvo amplificado para el clúster 1. Siguiendo estos resultados, se realizó la cuantificación por Q-PCR de las muestras amplificadas cuyos resultados fueron variables considerando dos kits de RT-PCR distintos. Con el kit 1 (Promega) la concentración del clúster 3 varió entre 3,2 y $1,5 \times 10^3$ copias/ml y las concentraciones del clúster 4 fluctuaron entre 2,4 y $1,9 \times 10^2$ copias/ml (Tabla 6). Con el kit 2 (Qiagen) las concentraciones fueron más bajas, encontrándose una variación de $1,7 \times 10^2$ - $8,5 \times 10^2$ copias/ml para el clúster 3 y de $1,2 \times 10^1$ - $8,5 \times 10^1$ copias/ml para el clúster 4 (Tabla 6). Estos resultados dan cuenta de que la comunidad fotótrofa funcional basada en el gen *bchY* se encuentra activa en el ambiente.

vi) Determinar la concentración de pigmentos fotosintéticos en el ambiente (Chl a, Bchl) y correlacionarlos con los resultados de genes funcionales.

La concentración de clorofila a fue estimada desde muestras de agua de los sitios estudiados utilizando extracción por solventes. La concentración de clorofila a en la Laguna Tebenquiche estuvo bajo el límite de detección, mientras que la concentración en muestras de agua del Salar de Huasco y del Salar de Ascotán fueron de 2,7 y 3,14 μ g/L (Tabla 1). La concentración de bacterioclorofila a fue estimada por extracción por solventes, sin embargo, no se obtuvo una señal clara del peak de absorbancia asociado al pigmento. Los resultados derivados de la concentración de clorofila a muestran una baja concentración del pigmento en el agua en contraste con lo reportado para lagos altoandinos, como el Lago Chungará, donde la clorofila alcanza 8,7 mg/L (Dorador et al 2003). Actualmente las muestras están siendo analizadas por HPLC para la medición de distintos pigmentos (clorofila, bacterioclorofila y carotenoides) en el Laboratorio del Dr. Lasse Mork Olsen en la estación biológica de Trondhjem, Department of Biology, Norwegian University of Science and Technology, Noruega.

DESTAQUE OTROS LOGROS DEL PROYECTO TALES COMO:

- Estadías de investigación.
- Actividades de difusión y/o extensión en la temática del proyecto.
- Cualquier otro logro no contemplado en los ítem anteriores y que Ud. quiera destacar.

La extensión máxima de esta sección es de 1 página (letra tamaño 10, Arial o Verdana).

1. Estadías de investigación

Se realizó una estadía de investigación en el Laboratorio PROFC del Profesor Osvaldo Ulloa en la Universidad de Concepción con la Dra. Verónica Molina donde la estudiante de Magíster Daniela Meneses se entrenó en la técnica de PCR en tiempo real para cuantificar las comunidades fotótrofas desde DNA y cDNA.

2. Formación de recursos humanos exceptuando tesis ya informados

Estudiantes de tercer año de la carrera de Biotecnología de la Universidad de Antofagasta realizaron unidades de investigación con temas directamente relacionados con el proyecto. Las unidades de investigación consistieron en: i) establecimiento de genotecas de genes ribosomales para el clado *Roseobacter* (Pablo Pérez); ii) análisis de RT-PCR de muestras ambientales y de aislados fotótrofos (Gonzalo Icaza) y iii) establecimiento de genotecas de fósmidos (Dánisa González). Considerando los estudiantes que participaron en el primer año de proyecto, en total se han entrenado 11 estudiantes de pregrado en técnicas de biología molecular aplicadas al estudio de bacterias fotótrofas y algunos (2) apoyaron las salidas a terreno realizadas. Drina Vejar es estudiante de Magíster en Ciencias Biológicas mención Microbiología y ha apoyado el desarrollo del proyecto desde el comienzo como apoyo técnico en el establecimiento de las genotecas incluyendo apoyo en terreno, extracción de DNA, PCR y clonamiento.

3. Actividades de difusión y/o extensión en la temática del proyecto

Las siguientes actividades fueron realizadas desde Diciembre de 2009 y todas incluyeron información generada por el proyecto.

- 1) Diciembre 2009: "Diversidad y función de microorganismos en humedales altioplánicos", XXXI Congreso de la Sociedad Chilena de Microbiología. Trabajo de incorporación en la Sociedad de Microbiología de Chile. Dicho trabajo obtuvo el premio como mejor trabajo de incorporación.
- 2) Marzo 2010: "Anoxygenic phototrophic bacterial communities of Salar de Atacama, Chile: a functional gene approach using *fmoA* and *pufLM* genes", VAAM Conference, Hannover, Alemania. Trabajo (póster) presentado por la colaboradora Vera Thiel.
- 3) Julio 2010: "Patrones biogeográficos de comunidades microbianas en humedales del Altiplano Chileno". VII Coloquios de Microbiología de Valparaíso, Valparaíso, Chile. (Charla).
- 4) Julio 2010: "Microbial diversity of high altitude wetlands of northern Chile: a functional gene approach". University of Neuchâtel, Neuchâtel, Suiza. (Charla).
- 5) Agosto 2010: "Methodological Approaches to Study Photosynthesis on Aquatic Communities". CIEN Austral, Puerto Montt, Chile. Participación como profesor invitado en Curso de Postgrado.
- 6) Agosto 2010: "Diversidad genética funcional de las comunidades microbianas de sistemas acuáticos del Altiplano Chileno". XX Coloquios de Microbiología, Santiago, Chile. (Charla).
- 7) Agosto 2010: "Aerobic anoxygenic phototrophic bacteria in athaloassohaline wetlands in the Chilean Altiplano determined by *pufLM* and *bchY* genes", ISME-13, Seattle, Estados Unidos. Trabajo (póster) presentado por la colaboradora Vera Thiel.
- 8) Septiembre 2010: "Diversidad de bacterias fotótrofas anoxigénicas en humedales altoandinos en el Altiplano Chileno determinada por análisis de genes funcionales". XX Congreso Latinoamericano de Microbiología, Montevideo, Uruguay. (Charla).
- 9) Octubre 2010: "Estamos rodeados de vida: los microorganismos y sus ambientes". Escuela Básica E-132, Mejillones. Actividad 1000 científicos... 1000 aulas, Explora, Conicyt. (Charla).

4. Cualquier otro logro no contemplado en los ítem anteriores y que Ud. quiera destacar

La IR fue participará del Simposio: "Mar y Desierto: un desafío para la Ecología Microbiana" dentro del XXXII Congreso Chileno de Microbiología en Diciembre próximo.

Los datos generados por este proyecto han permitido la preparación de proyectos de investigación que se encuentran en etapa de postulación: 1) Fondecyt regular "Functional genomics and environmental variability of phototrophic microorganisms in high altitude wetlands of the Chilean Altiplano"; 2) Moore foundation: "Understanding the function of yet-uncultured *Archaea* by establishment of autotrophic enrichment cultures". Este proyecto además ha fortalecido la colaboración con investigadores nacionales (Klaudia Hernández, CIEN Austral; Verónica Molina, UDEC) e internacionales (Johannes F. Imhoff, Alemania; Pilar Junier, Suiza).

RESUMEN:

Describe en forma precisa y breve el t3pico general del proyecto, sus metas y objetivos y los resultados alcanzados. Utilice un lenguaje apropiado para la comprensi3n del p3blico no especialista en el tema. Esta informaci3n podr3 ser difundida. **La extensi3n m3xima de esta secci3n es de 1 p3gina (letra tama3o 10, Arial o Verdana).**

El proyecto titulado "High altitude wetlands of the Chilean Altiplano: the importance of phototrophic prokaryotes, their systemic role in the bottom-up processes" buscaba **"evaluar la presencia, abundancia y actividad de las bacterias fot3trofas en tres humedales de altura del Altiplano Chileno"**, utilizando aproximaciones independiente de cultivo, espec3ficamente mediante genes marcadores funcionales que est3n involucrados en el proceso de la fotos3ntesis anoxig3nica, es decir, aquellos microorganismos que realizan fotos3ntesis sin la generaci3n de ox3geno. Los lugares estudiados fueron los salares de Ascot3n y Huasco ubicados en el Altiplano Chileno sobre los 3800 metros sobre el nivel del mar y las lagunas Chaxa y Tebenquiche ubicadas en el Salar de Atacama a 2500 metros sobre el nivel del mar. Estos sistemas fueron elegidos ya que al ser distintos entre s3, es posible hacer una comparaci3n respecto al tipo de comunidades fot3trofas presentes en estos ambientes.

Considerando la hip3tesis 1 del proyecto: **"las bacterias fot3trofas anoxig3nicas y aer3bicas anoxig3nicas est3n ampliamente distribuidas en los humedales de altura del Altiplano Chileno"**, se cumple ya que se encontraron bacterias fot3trofas en todos los humedales analizados, existiendo diferentes comunidades en los salares del Altiplano versus las lagunas del Salar de Atacama. Respecto a la hip3tesis 2: **"la abundancia significativa de las bacterias fot3trofas anoxig3nicas y aer3bicas anoxig3nicas necesariamente implica un rol fundamental en la productividad primaria de los humedales altipl3nicos"**, se puede resolver parcialmente al considerar que los grupos fot3trofos analizados, utilizando genes funcionales, *est3n activos en el ambiente y presentan una abundancia alta comparado con la abundancia total de Bacteria*. Sin embargo, para responder esta 3ltima hip3tesis a cabalidad son necesarios m3s estudios (fuera de los objetivos iniciales del proyecto) respecto a la funci3n de este grupo en el ambiente.

Los resultados obtenidos por este proyecto entregan una fuerte evidencia del rol fundamental de las bacterias fot3trofas anoxig3nicas tanto en los salares del Altiplano como en el Salar de Atacama, se3alando que las comunidades fot3trofas del Salar de Atacama son dominadas por bacterias p3rpuras del azufre (Chromatiaceae, Ectothiorhodospiraceae), mientras que bacterias fot3trofas anoxig3nicas aer3bicas del clado *Roseobacter*, son las que dominan las comunidades fot3trofas del Salar de Huasco y Ascot3n. Este 3ltimo resultado es de gran importancia ecol3gica, ya que se ha reportado que el clado *Roseobacter* es uno de los grupos microbianos fotosint3ticos m3s importantes en el oce3no y por lo tanto, el rol de este grupo en ambientes no marinos es una l3nea de investigaci3n emergente.

El proyecto finalizado tuvo amplia difusi3n en congresos y simposios, adem3s de generar publicaciones y formar a estudiantes de pregrado y postgrado en el 3rea de la ecolog3a microbiana de ambientes altipl3nicos.

PRODUCTOS

ARTÍCULOS

Para trabajos en Prensa/ Aceptados/Enviados adjunte copia de carta de aceptación o de recepción.

N° : 1
Autor (a)(es/as) : Thiel, V.; Tank, M.; Neulinger SC.; Gehrmann L.; Dorador, C.; Imhoff JF.
Nombre Completo de la Revista : FEMS Microbiology Ecology
Título (Idioma original) : Unique communities of anoxygenic phototrophic bacteria in saline lakes of Salar de Atacama (Chile): evidence for a new phylogenetic lineage of phototrophic Gammaproteobacteria from pufLM gene analyses
Indexación : ISI
ISSN : 1574-6941
Año : 2010
Vol. :
N° :
Páginas :
Estado de la publicación a la fecha : En Prensa
Otras Fuentes de financiamiento, si las hay :
Conicyt-DAAD 2007-224

Envía documento en papel : si
Archivo Asociado al artículo : Thiel_et_al_2010_PufLMAtacama.pdf
http://evalcyt.conicyt.cl/informe_academico/index.php/investigador/f4_articulos/descarga/13868768/11080228/2009/9882/

OTRAS PUBLICACIONES

Sin información ingresada.

CONGRESOS

N° : 1
Autor (a)(es/as) : Dorador, C.
Título (Idioma original) : Diversidad y función de microorganismos en humedales altioplánicos
Nombre del Congreso : XXXI Congreso de la Sociedad Chilena de Microbiología
País : CHILE
Ciudad : Santa Cruz
Fecha Inicio : 01/12/2009
Fecha Término : 04/12/2009
Nombre Publicación : Libro de resúmenes XXXI Congreso de la Sociedad Chilena de Microbiología
Año : 2009
Vol. :
N° :
Páginas : 59
Envía documento en papel : si
Archivo Asociado : Somich2009_2.pdf
http://evalcyt.conicyt.cl/informe_academico/index.php/investigador/f4_congresos/descarga/13868768/11080228/2009/14976/

N° : 2
Autor (a)(es/as) : Thiel, V.; Tank, M.; Neulinger, S. C.; Gehrmann, L.; Dorador, C.; Imhoff, J. F.
Título (Idioma original) : Anoxygenic phototrophic bacterial communities of Salar de Atacama, Chile: a functional gene approach using fmoA and pufLM genes
Nombre del Congreso : Annual Conference of the Vereinigung für Allgemeine und Angewandte Mikrobiologie (VAAM)
País : ALEMANIA
Ciudad : Hannover
Fecha Inicio : 28/03/2010
Fecha Término : 31/03/2010
Nombre Publicación : Biospektrum Abstractband 2010
Año : 2010
Vol. :
N° :
Páginas : 44
Envía documento en papel : si
Archivo Asociado : Biospektrum_VAAM.pdf
http://evalcyt.conicyt.cl/informe_academico/index.php/investigador/f4_congresos/descarga/13868768/11080228/2009/14978/

N° : 3
Autor (a)(es/as) : Dorador, C.; Vejar, D.
Título (Idioma original) : Aerobic anoxygenic phototrophic bacteria in athaloassohaline wetlands in the Chilean Altiplano determined by pufLM and bchY genes
Nombre del Congreso : 13th International Symposium on Microbial Ecology (ISME 13)
País : ESTADOS UNIDOS DE AMERICA
Ciudad : Seattle
Fecha Inicio : 22/08/2010
Fecha Término : 27/08/2010
Nombre Publicación : Abstract book
Año : 2010
Vol. :
N° :
Páginas :
Envía documento en papel : si
Archivo Asociado : AbstractSubmitted_Phototrophic.pdf
http://evalcyt.conicyt.cl/informe_academico/index.php/investigador/f4_congresos/descarga/13868768/11080228/2009/14984/

N° : 4
Autor (a)(es/as) : Dorador, C.; Vejar, D.; Meneses, D.
Título (Idioma original) : Diversidad de bacterias fotótrofas anoxigénicas en humedales altoandinos en el Altiplano Chileno determinada por análisis de genes funcionales
Nombre del Congreso : XX Congreso Latinoamericano de Microbiología
País : URUGUAY
Ciudad : Montevideo
Fecha Inicio : 27/09/2010

Fecha Término : 30/09/2010
Nombre Publicación : Libro de resúmenes
Año : 2010
Vol. :
N° :
Páginas :
Envía documento en papel : no
Archivo Asociado : ResumenFototrofas.pdf
http://evalcyt.conicyt.cl/informe_academico/index.php/investigador/f4_congresos/descarga/13868768/11080228/2009/14988/

TESIS/MEMORIAS

N° : 1
Título de Tesis : Abundancia y función de bacterias fotótrofas en Salares del Altiplano Chileno
Nombre y Apellidos del(de la) Alumno(a) : Daniela Andrea Meneses Escudero
Nombre y Apellidos del(de la) Tutor(a) : Cristina Inés Dorador Ortiz
Título Grado : Magister
Institución : Universidad de Antofagasta
País : CHILE
Ciudad : Antofagasta
Estado de Tesis : En Ejecución
Fecha Inicio : 01/03/2010
Fecha Término : 27/12/2010
Envía documento en papel : si
Archivo Asociado : IncripcionTesis_DanielaMeneses.pdf
http://evalcyt.conicyt.cl/informe_academico/index.php/investigador/f4_tesis_memorias/descarga/13868768/11080228/2009/7689/

ANEXOS

N° : 1
Archivo Asociado : ANEXO.pdf
http://evalcyt.conicyt.cl/informe_academico/index.php/investigador/f5_anexos/descarga/13868768/11080228/2009/15135/

A continuación se detallan los anexos físicos/papel que no se incluyen en el informe en formato PDF.

--