

UNIVERSIDAD DE MAGALLANES  
FACULTAD DE CIENCIAS  
DEPARTAMENTO CIENCIAS Y RECURSOS NATURALES



**Diversidad Filogenética de Cianobacterias y Eubacterias en Estromatolitos  
Modernos de Laguna Amarga, Torres del Paine.**

Simón Alejandro Soto Saldiva

Director Tesis : Paris Lavin Sepulveda  
Co-Director Tesis: Javier Díaz Ochoa

2016

**Diversidad Filogenética de Cianobacterias y Eubacterias en Estromatolitos Modernos de Laguna Amarga, Torres del Paine.**

Simón Soto Saldivia  
Departamento de Ciencias y Recursos Naturales  
11 de Mayo 2016

**Decano Facultad Ciencias:** Dr. Victor Diaz.

**Jefe de Carrera:** Dr. Cristian Aldea

Aprobado por Comisión de Calificación

**Director Tesis:** Dr. Paris Lavin Sepúlveda

**Co-director:** Dr. Javier Diaz Ochoa

**Evaluador 1:** Dra. Ingrid Hebel

**Evaluador 2:** Dra. Gloria Sanchez S.

**Evaluador 2:** Dr. Marcelo Solari C.

Tesis entregada como requerimiento para obtener el Título de Biólogo Marino en la Facultad de Ciencias.

2016

## I. ÍNDICE DE CONTENIDOS

<b>1. AGRADECIMIENTOS .....</b>	<b>8</b>
<b>2. RESUMEN .....</b>	<b>9</b>
<b>3. INTRODUCCIÓN .....</b>	<b>11</b>
3.1 Definición de Estromatolito.....	11
3.2 Estromatolitos Modernos.....	12
3.3 ¿Qué controla la formación de estromatolitos modernos? .....	13
3.4 Factores que participan en la litificación .....	14
3.5 ¿Dónde se encuentran los estromatolitos? .....	16
3.6 Estromatolitos en el subcontinente sudamericano.....	17
3.7 Biodiversidad en los estromatolitos.....	18
3.7.1 Diversidad bacteriana (no cianobacterias) .....	19
3.7.2 Diversidad filogenética de cianobacterias asociadas a estromatolitos modernos marinos .....	20
3.7.3 Diversidad filogenética de cianobacterias en estromatolitos de lagunas hipersalinas .....	22
3.7.4 Diversidad encontrada en laguna amarga.....	25
3.8 Principales problemas para el estudio de estromatolitos modernos .....	26
<b>4. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA .....</b>	<b>27</b>
<b>5. HIPÓTESIS.....</b>	<b>29</b>
<b>6. OBJETIVOS .....</b>	<b>30</b>
<b>7. MATERIALES Y MÉTODOS .....</b>	<b>31</b>
7.1 Área de Estudio.....	31
7.1.2 Características morfométricas de Laguna Amarga.....	32
7.1.3 Características químicas Laguna Amarga .....	31
7.1.4 Obtención de Muestras .....	33
7.2 Determinación de diversidad filogenética en bacterias para Estromatolitos Modernos .....	34
7.2.1 Técnicas moleculares.....	34
7.2.2 Extracción de ADN .....	35

7.2.3 Reacción en cadena de la polimerasa (PCR) .....	35
7.2.4 PCR y nested-PCR.....	36
7.2.5 Electroforesis .....	38
7.2.6 DGGE .....	38
7.2.7 DGGE Cianobacterias .....	38
7.2.8 DGGE Eubacterias.....	40
7.3 Secuenciación Bandas DGGE .....	40
7.4 Análisis filogenético .....	41
7.5 Análisis de similitudes y Componentes principales .....	42
7.6 Cuantificación de nutrientes, pH, salinidad y temperatura en Laguna Amarga ....	42
<b>8. RESULTADOS .....</b>	<b>44</b>
8.1 DGGE con partidores para la zona V3-V4 de Cianobacterias .....	44
8.1.1 Asignación filogenética de las bandas del DGGE .....	46
8.1.2 Perfil DGGE de acuerdo a las secuencias de Cianobacterias .....	48
8.2 Perfil DGGE Eubacterias.....	51
8.2.1 Composición filogenética de Eubacterias.....	53
8.2.2 Composición filogenética de Eubacterias por muestras .....	56
8.3 Secuencia en la base de datos GenBank .....	59
8.4 Condiciones físico-químicas.....	60
<b>9. DISCUSIÓN .....</b>	<b>64</b>
9.1 Problemas relacionados con la técnica de PCR y DGGE en estudios de ecología	64
9.2 Riqueza de especies Cyanobacterias y Eubacterias (similitud-dísimilitud) .....	65
9.3 Secuencias y clasificación taxonómica.....	67
9.4 Secuencias de Cianobacterias y estromatolitos Modernos .....	68
9.5 Cianobacterias en Laguna Amarga y en otras lagunas hipersalinas .....	69
9.6 Diversidad filogenética Eubacteriales .....	71
9.7 Comparación de Eubacterias con otros lagos hipersalinos Andinos .....	72
<b>10. CONCLUSIONES .....</b>	<b>74</b>
<b>11. LITERATURA CITADA.....</b>	<b>75</b>
<b>12. ANEXOS.....</b>	<b>82</b>

## II. ÍNDICE FIGURAS

<b>Figura 1:</b> Mapas de la ubicación geográfica de estromatolitos modernos más conocidos .....	17
<b>Figura 2:</b> Esquema general de la distribución estratificada bacterias de acuerdo a sus características taxonómicas y metabólicas .....	19
<b>Figura 3:</b> Gráfico de secuencias encontradas según su afinidad taxonómica para estromatolitos .....	20
<b>Figura 4:</b> Estromatolito del margen este de Laguna Amarga atrapado .....	28
<b>Figura 5:</b> Vista satelital de Laguna Amarga, Torres del Paine, Chile .....	31
<b>Figura 6:</b> Esquema de Laguna Amarga. Donde se aprecia las transecta 1 en la zona oriental y transecta 2 en la zona occidental .....	33
<b>Figura 7:</b> Gel DGGE con partidores específico de Cianobacterias para la zona V3-V4 .....	45
<b>Figura 8:</b> Relaciones de similitud de sorensen a partir de las bandas DGGE con partidores específicos de Cianobacterias (región V3-V4) .....	46
<b>Figura 9:</b> Relaciones de similitud de Sorensen a partir de bandas DGGE de Cianobacterias filtrando secuencias de Diatomeas y Bacterias (no cianobacterias.....	49
<b>Figura 10:</b> Análisis filogenético utilizando la región V3-V4 .....	50
<b>Figura 11:</b> Fotografía del gel DGGE Eubacterias de acuerdo al gradientes realizado.. .....	52
<b>Figura 12:</b> Relaciones de similitud de Sorensen a partir de bandas DGGE con partidores específicos de Eubacterias .....	53
<b>Figura 13:</b> Composición filogenética general, del total de bandas secuenciadas, presentes en Laguna Amarga .....	55
<b>Figura 14:</b> Gráfico relación filogenética porcentual de los filos presente por muestra .....	57
<b>Figura 15:</b> Gráfico relación filogenética porcentual de clases presentes por muestra .....	58

<b>Figura 16:</b> Concentraciones de nutrientes de las muestras de estromatolitos y tapetes microbianos asociados al sedimento.....	62
<b>Figura 17:</b> Análisis componentes principales entre muestras y nutrientes.....	63
<b>Figura 18:</b> Fotografías del terreno realizado para la captura de las muestras .....	82
<b>Figura 19:</b> Muestras tomadas en la zona oriental y en la zona occidental .....	82
<b>Figura 20:</b> Muestra de estromatolito reaccionando al Ácido Clorhídrico .....	83
<b>Figura 21:</b> Muestra de tapete microbiano reaccionando al Ácido Clorhídrico .....	83
<b>Figura 22:</b> Fotografía de una muestra analizada de estromatolito moderno .....	84
<b>Figura 23:</b> Fotografía de una muestra de tapete microbiano analizado.....	84
<b>Figura 24:</b> Curva de medición de nitrato ( $\text{NO}_3^-$ ) .....	86
<b>Figura 25:</b> Curva de medición de nitrito ( $\text{NO}_2^-$ ).....	86
<b>Figura 26:</b> Curva de medición de fosfato ( $\text{PO}_4^{3-}$ ) .....	87
<b>Figura 27:</b> Curva de medición de amonio ( $\text{NH}_4$ ) .....	87

### III. ÍNDICE DE TABLAS

<b>TABLA 1:</b> Géneros descritos en ambientes marinos como en lagunas hipersalinas..	24
<b>TABLA 2:</b> Ubicación geográfica muestras obtenidas en Laguna Amarga.....	34
<b>TABLA 3:</b> Partidores 16s de Eubacterias y partidores específicos ( <i>Primers</i> ) <i>Forward</i> y <i>Reward</i> para Eubacterias y Cianobacterias.....	37
<b>TABLA 4:</b> Rango de medición de la concentración de nutrientes <i>kit hanna</i> , longitudes de onda medidas y las sales utilizadas para las curvas de medición.....	43
<b>TABLA 5:</b> Asignaciones taxonómicas de las bandas analizadas de acuerdo a con la base de datos GenBank. ....	47
<b>TABLA 6:</b> Géneros presentes de Cianobacterias por muestras en Laguna Amarga ..	48
<b>TABLA 7:</b> Asignaciones taxonómicas de las bandas analizadas con partidores generales de Eubacterias, de acuerdo a con la base de datos GenBank .....	54
<b>TABLA 8:</b> Composición Taxonómica de las muestras presentes en Laguna Amarga .....	56

<b>TABLA 9:</b> Valores promedio de concentración de nutrientes y su desviación estándar, de las muestras de agua en Laguna Amarga.....	60
<b>TABLA 10:</b> Índice de similitud de Sorensen de DGGE con partidores específicos de la región V3-V4 para cianobacterias .....	88
<b>TABLA 11:</b> Índice de similitud de Sorensen de bandas de Cianobacterias entre las muestras .....	88
<b>TABLA 12:</b> Índice de similitud de Sorensen de DGGE utilizando partidores específicos de Eubacterias. ....	88
<b>TABLA 13:</b> Análisis de ANOVA realizado a las mediciones de nitrato.....	89
<b>TABLA 14:</b> Análisis de ANOVA realizado a las mediciones de nitrito .....	89
<b>TABLA 15:</b> Análisis de ANOVA realizado a las mediciones de amonio .....	90
<b>TABLA 16:</b> Análisis de ANOVA realizado a las mediciones de fosfato.....	91
<b>TABLA 17:</b> Análisis de ANOVA realizado a las mediciones de fosfato total.....	91
<b>TABLA 18:</b> Análisis de ANOVA realizado a las mediciones de razón N:P .....	92

#### IV. ÍNDICE DE ANEXOS

<b>ANEXO 1:</b> Fotografías Terreno.....	15
<b>ANEXO 2:</b> Fotografías de las muestras analizadas .....	15
<b>ANEXO 3:</b> Análisis de nutrientes por colimetría .....	15
<b>ANEXO 4:</b> Tablas Índice de similitud de Sorensen .....	15
<b>ANEXO 5:</b> Tablas análisis de ANOVA nutrientes. ....	15

## 1. AGRADECIMIENTOS

Quisiera agradecer al Instituto Antártico Chileno por recibirme y facilitar sus instalaciones, reactivos y herramientas para el desarrollo de esta tesis. En especial quisiera agradecer a mi profesor tutor Paris Lavin por depositar su confianza en mí, apoyarme y enseñarme en todos los aspectos del conocimiento durante este proceso, a Juanita Levihuan ayudante de laboratorio, quien tuvo la paciencia de entregarme el soporte logístico y técnico en momentos necesarios para poder cumplir los objetivos propuestos en esta tesis, a mi profesor co-director de tesis Javier Díaz Ochoa por ayudarme en los escritos, en el entendimiento de procesos físico-químicos que ocurren en el ambiente y las correcciones de esta tesis.

Infinitas Gracias.



## 2. RESUMEN

Los estromatolitos son estructuras organosimentarias compuestas por una comunidad bacteriana. Corresponden a uno de los primeros ecosistemas de lo que se tiene registro. Hoy en día estos ecosistemas son encontrados en algunos ambientes con características consideradas como extremas. Estos ecosistemas han demostrado ser diversos en su composición filogenética, de acuerdo al medio en que se encuentren. En Sudamérica los estromatolitos se encuentran principalmente en ambientes hipersalinos asociados a la Cordillera de los Andes, tanto hacia latitudes cercanas al Ecuador como en la Patagonia. En el presente estudio se analizó la diversidad filogenética de cianobacterias y eubacterias presentes en la comunidad microbiana asociadas a tapetes microbianos y estromatolitos de Laguna Amarga (Torres del Paine, Sur de Chile) por medio de la técnica molecular de Electroforesis en gel con gradiente denaturante (DGGE). Los resultados describen que la comunidad presente en la laguna no es homogénea, presentando diferencias según el sitio de muestreo y una posible relación con las concentraciones de nutrientes presente en cada muestra. Los *taxa* encontrados asociados a estas estructuras organosedimentarias se correlacionan con aquellas descritas tanto en Sudamérica como en otras latitudes. Sin embargo, se observan diferencias en la riqueza filogenética de *taxa* específicos. Estos resultados obtenidos por medio de herramientas moleculares son los primeros para uno de los sitios con estromatolitos más Australes del planeta, ayudando a un mejor entendimiento de los organismos presentes. Esta información abre la oportunidad de estudios futuros en diversas áreas de investigación (ecología, biotecnología, etc.) que permitirían incentivar medidas de protección para esta laguna.