



UNIVERSIDAD NACIONAL DE LA PLATA
FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS
DEPARTAMENTO DE QUIMICA

Trabajo de Tesis Doctoral

Diversidad Microbiana en Ambientes Volcánicos

María Sofía Urbietta

Director: Dr Edgardo Donati

Codirector: Dra Elena González Toril

Año 2013

Este Trabajo de Tesis Doctoral es presentado para optar al
grado de Doctor de la Facultad de Ciencias Exactas

Fue realizado en CINDEFI (CCT La Plata-CONICET, UNLP)



A quienes siempre estuvieron conmigo

Reconocimientos

A la Facultad de Ciencias Exactas de la Universidad Nacional de La Plata y al Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET) por haber hecho posible la realización del presente Trabajo de Tesis Doctoral.

Al Laboratorio de Extremofilia dirigido por el Dr. Ricardo Amils en el Departamento de Planetología y Habitabilidad del Centro de Astrobiología (Instituto Nacional de Tecnología Aeroespacial – Consejo Superior de Investigaciones Científicas) en Madrid, España, por permitirme realizar dos estancias a lo largo de este Trabajo de Tesis Doctoral.

Al Ente Provincial de Termas de Neuquén (EPROTEN) por permitir la realización de este estudio en el Parque Geotermal Copahue.

Al grupo de la Dra. Giaveno perteneciente al IDEPA (CONICET, UNCo) y a la Facultad de Ingeniería de la Universidad Nacional del Comahue, por la logística y la organización de las campañas de muestreo a la zona de Copahue.

Agradecimientos

A mi director Dr. Edgardo Donati, por brindarme su confianza absoluta, por permitirme trabajar con libertad, darme la oportunidad de viajar y formarme, por acompañarme durante este proceso y aguantar depresiones y eternas discusiones. Muchas gracias.

A mi codirectora Dra. Elena González Toril, por compartir conmigo todo su conocimiento, brindarme su laboratorio, su oficina, su casa, su familia, por llevarme a pasear en Madrid y hacer de mis viajes una experiencia mucho más agradable y enriquecedora.

A mis compañeros del laboratorio, los de hoy, Cecilia, Josefina, Marcela, Natalia, Graciana, Sara, Camila, Pato, Ana, y los que estuvieron a lo largo de todo el recorrido por las horas compartidas, las charlas científicas y las no científicas, los mates y las tortas.

A mis compañeros del CINDEFI, por la ayuda en todo lo que necesité siempre, por las charlas de pasillo, el apoyo y las enseñanzas.

A la Dra. Alejandra Giaveno, Ale, por el apoyo constante, la ayuda, las charlas nocturnas filtrando muestras en Copahue y el cariño, personal y a la ciencia.

A mi familia: mi papá Gerardo y mi mamá Ana por su confianza, siempre, y apoyo incondicional en absolutamente todo lo que he emprendido en mi vida. Infinitas gracias, hubiera sido imposible sin ustedes ahí. A mis hermanos Juan Agustín y Catalina, por el apoyo, aun sin entender muy bien a que fui al volcán y a España. A Constantino, que llegó para revolucionar la familia, llenarnos de amor y besos de baba, y sacarnos una sonrisa aun en los momentos más difíciles.

A mis amigas Pauli, Cintia, Belén y Georgi, por estar al lado mío siempre, en todas, los jueves y todos los días. Las adoro, mi vida no sería lo mismo sin ustedes.

A mis amigos de la facu, Rodi, Martín, Marian, Sebas, Jime y Lau, porque los quiero mucho!!

Al Dr. Antonio Lagares, por sembrar el bichito de la ciencia allá en el año 2002 en Química Biológica y luego permitirme aprender a su lado en su laboratorio y sentarse conmigo a hacer mi primera PCR.

A todos los que siempre creyeron en mi, miles de gracias.

El sistema Copahue-Caviahue, que comprende el Volcán Copahue, el Río Agrio, varias manifestaciones geotermales de distintas temperaturas además de lagunas, lagos y otros cursos de agua, es un ambiente natural de características principalmente termales y ácidas, derivadas de su origen volcánico. Estos hábitats están colonizados por microorganismos especialmente adaptados para sobrevivir en condiciones extremas, por lo que son denominados extremófilos. Los extremófilos participan activamente en la geoquímica del lugar, formando parte de los ciclos naturales de varios elementos químicos. Muchas de las arqueas y bacterias que habitan en ambientes extremos son especies nuevas, no conocidas para el hombre, aunque algunas de ellas están ahí desde los orígenes de la vida en la Tierra. La biodiversidad de estos ambientes constituye un patrimonio que debe conocerse y valorarse. Ese conocimiento puede ser aplicado para estudiar los procesos evolutivos que se tuvieron lugar en la Tierra, conocer los mecanismos moleculares que hacen resistentes a los extremófilos y entender cómo participan en los ciclos biogeoquímicos del ambiente. Los microorganismos que pudieran ser aislados de estos ambientes podrían ser usados posteriormente para desarrollar nuevos procesos biotecnológicos u optimizar los ya existentes. El estudio de la biodiversidad extremófila no es tarea sencilla. Los microorganismos de ambientes extremos crecen en condiciones difíciles de reproducir en el laboratorio y pueden tener requerimientos nutricionales que desconocemos. Es por eso que las técnicas de biología molecular cultivo-independientes se vuelven herramientas indispensables. A partir de estas premisas e inquietudes se formularon las hipótesis del presente Trabajo de Tesis Doctoral que se canalizaron a través de los objetivos que se describen a continuación.

Objetivo general

Realizar la prospección de la diversidad microbiana de la región volcánica de Caviahue-Copahue, un ambiente extremo con altas temperaturas y bajos valores de pH, utilizando herramientas de biología molecular cultivo independientes.

Objetivos específicos:

- ◆ Realizar la prospección de la biodiversidad procariota del Río Agrio, un sistema donde las condiciones fisicoquímicas cambian a lo largo de su recorrido.
- ◆ Realizar la prospección de la biodiversidad en algunos pozos geotermales representativos de acuerdo a sus condiciones fisicoquímicas y su nivel de intervención antropogénica.
- ◆ Relacionar la diversidad y las especies procariotas presentes en cada sitio con sus condiciones fisicoquímicas, la geoquímica del lugar y los ciclos de elementos importantes en la zona como los del azufre y del hierro.
- ◆ Detectar posibles nuevas especies extremófilas.
- ◆ Predecir condiciones para el aislamiento de nuevas especies.
- ◆ Predecir posibles características fisiológicas y aplicaciones biotecnológicas de nuevas especies.

Índice

Sección 1 – Introducción	1
1.1. Biodiversidad	2
1.1.1. ¿Qué es la biodiversidad?	2
1.1.2. Importancia del estudio de la biodiversidad	3
1.1.3. Estudio de la biodiversidad microbiana	3
1.2. Interacción de los microorganismos con el medioambiente	5
1.2.1. El papel de los microorganismos en los procesos geológicos	6
1.2.2. Parámetros fisicoquímicos que influyen en la actividad geomicrobiológica de los microorganismos	9
1.3. Ambientes extremos y microorganismos extremófilos	11
1.3.1. Importancia del estudio de ambientes extremos y microorganismos extremófilos	15
1.4. Ambientes de alta temperatura y bajo pH	17
1.4.1. Origen de los ambientes ácidos	17
1.4.2. Características de los ambientes geotermales	20
1.4.3. Ciclos geomicrobiológicos más importantes en ambientes geotermales y volcánicos	21
1.5. Aplicaciones biotecnológicas de los microorganismos acidófilos y termófilos	27
1.6. Ambientes extremos, el origen de la vida y la astrobiología	31
1.7. Estudio de biodiversidad de ambientes extremos	33
Referencias – Sección 1	40

Sección 2 - Sistema geotermal Copahue-Caviahue.	47
Presentación de los lugares de estudio	
2.1. Volcán Copahue	50
2.2. Río Agrio	51
2.3. Campo Geotermal de Copahue	56
2.3.1. Las Máquinas	56
2.3.2. Las Maquinitas	58
2.3.3. Centro Termal Copahue	59
2.4. ¿Qué se conoce hasta hoy de la biodiversidad procariota de la zona geotermal de Copahue y el Río Agrio?	61
Referencias – Sección 2	63
Sección 3 - Materiales y Métodos	65
3.1. Sitiosde muestreo	66
3.1.1. Pozos geotermales	66
3.1.2. Río Agrio	67
3.2. Determinaciones fisicoquímicas <i>in situ</i>	67
3.3. Toma de muestras para extracción de ADN	67
3.4. Toma de muestras para hibridación <i>in situ</i>	68
3.5. Determinación de metales y aniones en solución	68
3.6. Extracción de ADN, amplificación de los genes ARNr 16S y construcción de las bibliotecas genómicas	69

3.7. Análisis de las bibliotecas de secuencias del gen ARNr 16S de arqueas y bacterias	71
3.8. Hibridaciones <i>in situ</i> : FISH y CARD-FISH	74
3.8.1. Observación al microscopio y recuentos	78
3.9. Análisis canónico de correspondencia (ACC)	78
Referencias – Sección 3	80

Sección 4 - Biodiversidad procariota en los pozos geotermales de Copahue

4.1. Ubicación y características fisicoquímicas de las muestras	83
4.2. Clonación del gen ARNr 16S	86
4.2.1. Análisis de las bibliotecas de clones	86
4.3. Biodiversidad en los pozos geotermales de Copahue según las secuencias de genes ARNr 16S encontradas	91
4.3.1. Bacterias	94
4.3.2. Arqueas	102
4.4. Estudio semicuantitativo de la biodiversidad de los pozos geotermales: hibridaciones FISH y CARD-FISH	108
4.4.1. Bacterias	113
4.4.2. Arqueas	116
4.5. Análisis estadístico de los datos fisicoquímicos y de diversidad en los pozos geotermales de Copahue	117
4.6. Discusión	122
4.6.1. Influencia de las características fisicoquímicas del ambiente en la biodiversidad	122

4.6.2. Diversidad procariota en las aguas de los pozos geotermales de Copahue	124
4.6.3. Posibles metabolismos procariotas presentes en los pozos geotermales de Copahue	137
4.7. Consideraciones sobre el trabajo realizado y la biodiversidad de las aguas de los pozos geotermales de Copahue	145
Referencias – Sección 4	147

Sección 5 - Biodiversidad procariota en las aguas del Río Agrio

151

5.1. Ubicación y características fisicoquímicas de las muestras	152
5.2. Clonación del gen ARNr 16S	153
5.2.1. Análisis de las bibliotecas de clones	153
5.3. Biodiversidad en las aguas del Río Agrio Superior según las secuencias de genes ARNr 16S encontradas	163
5.3.1. Bacterias	166
5.3.2. Arqueas	180
5.4. Estudio semicuantitativo de la biodiversidad en las aguas del Río Agrio Superior: hibridaciones CARD-FISH	186
5.5. Análisis estadístico de los datos fisicoquímicos y de diversidad en las aguas del Río Agrio Superior	191
5.6. Discusión	197
5.6.1. Influencia de las características fisicoquímicas del ambiente en la biodiversidad del Río Agrio	197
5.6.2. Diversidad procariota en las aguas del Río Agrio Superior	199

5.6.3. Posibles metabolismos procariotas presentes en las aguas del Río Agrio Superior	209
5.7. Consideraciones sobre el trabajo realizado y de la biodiversidad de las aguas del Río Agrio Superior	218
Referencias – Sección 5	220
Sección 6 - Conclusiones generales	226
6.1. Conclusiones generales sobre las técnicas y metodologías utilizadas	227
6.2. Conclusiones generales sobre la diversidad procariota en los pozos geotermales de Copahue y del Río Agrio. Similitudes y diferencias de la biodiversidad en los sitios de muestreo del sistema geotermal Copahue-Caviahue.	228
Publicaciones derivadas del Trabajo de Tesis Doctoral	230



Sección 1

Introducción

1.1. Biodiversidad

1.1.1. ¿Qué es la Biodiversidad?

No es sencillo obtener una definición universal y precisa del término biodiversidad. Muchas de las que se encuentran en la literatura se refieren únicamente a la diversidad de animales y plantas, olvidando el inmenso y variado universo que representan los microorganismos. Algunas de las definiciones más generales que pueden encontrarse son:

“Biodiversidad es la variedad de todos los tipos y formas de vida, desde los genes a las especies a través de una amplia escala de ecosistemas” (Gaston, 1996).

“La biodiversidad es la variabilidad de organismos vivos de cualquier origen, incluidos, entre otras cosas, los ecosistemas terrestres, marinos y otros ecosistemas acuáticos, y los complejos ecológicos de los que forman parte; comprende la diversidad dentro de cada especie, entre las especies y de los ecosistemas” (Convenio de Naciones Unidas sobre Conservación y Uso Sostenible de la Diversidad Biológica).

El término biodiversidad o diversidad biológica hace referencia a la amplia variedad de organismos sobre la Tierra, las interacciones durables de estos con el medio ambiente inmediato y los patrones naturales que los rigen. Es el resultado de miles de millones de años de evolución según procesos naturales y también de la influencia creciente de las actividades del ser humano. La biodiversidad comprende también la variedad de ecosistemas y las diferencias genéticas dentro de cada especie que permiten la combinación de múltiples formas de vida y cuyas mutuas interacciones con el resto del entorno, fundamentan el sustento de la vida sobre el planeta.

1.1.2. Importancia del estudio de la Biodiversidad

La importancia de la biodiversidad, y consecuentemente de su estudio, puede ser vista desde tres aspectos:

- ✂ **Aspecto ecológico:** hace referencia a la diversidad biológica desde el punto de vista sistémico y funcional; el correcto equilibrio y mantenimiento de la biodiversidad garantiza el bienestar de la biósfera. Los distintos elementos que definen la biodiversidad, actúan como unidades funcionales que cumplen con los llamados servicios básicos para la supervivencia. La biodiversidad está asociada a la evolución; los ecosistemas más diversos, así como las especies con mayor diversidad genética, tienen mayores chances de adaptarse a los cambios del medio ambiente y garantizar su continuidad (Loreau et al., 2001).
- ✂ **Aspecto económico:** la biodiversidad es, sin duda alguna, un recurso económico, aunque la mayoría de las veces sea intangible. La estimación del valor de la biodiversidad de cualquier ambiente natural es fundamental para conocer de forma completa su potencial económico (Pearce y Moran, 1994).
- ✂ **Aspecto científico:** el estudio de las especies que han poblado la Tierra y de sus interrelaciones es una de las mayores motivaciones desde los orígenes de la ciencia. Este conocimiento permite formular teorías sobre la evolución de la vida en nuestro planeta y realizar predicciones sobre la existencia de vida en otros puntos del universo.

1.1.3. Estudio de la biodiversidad microbiana

En cualquier ambiente la diversidad microbiana, en particular, la procariota (bacterias y arqueas), supera ampliamente la diversidad de especies multicelulares. Por ejemplo, según el censo oceánico realizado en el 2010 existen aproximadamente 230.000 especies macroscópicas que habitan los océanos, mientras que las especies bacterianas se calculan en 2×10^6 (Curtis et al., 2002). Este mero hecho hace sumamente interesante el estudio de la biodiversidad microbiana de cualquier ambiente. El abordaje de la temática presenta algunas características que lo vuelven particularmente complejo. Una, muy importante, es la incapacidad de detectar los individuos a simple vista. Aún utilizando microscopía, las especies microbianas

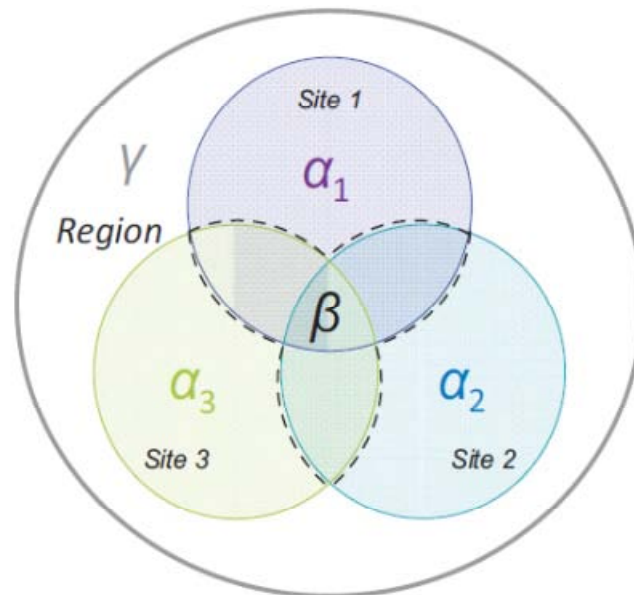
generalmente no poseen características morfológicas precisas que permitan distinguirlas unas de las otras. Otro problema es definir una unidad para cuantificarla y compararla. Por estos motivos, el estudio de la biodiversidad microbiana precisó del desarrollo de nuevas metodologías y definiciones. A pesar del esfuerzo adicional que requiere, son muchos los proyectos y las publicaciones científicas dedicados a este tema (Amaral-Zettler et al., 2011; Bouskill et al., 2012, Farías et al., 2013).

El estudio de la diversidad es siempre comparativo y requiere una referencia espacial y temporal. Basándose en esto, se definen las medidas de la biodiversidad para el estudio de un ecosistema (Zinger et al., 2012):

- ✧ **Diversidad Alfa:** hace referencia a la diversidad en un sitio o una muestra. Generalmente se mide a través de la riqueza de especies (número de especies) y de la distribución de las especies. La riqueza de especies encontrada es muy dependiente del esfuerzo de muestreo realizado. Para corregir este sesgo se utilizan estimadores de riqueza como el índice de Chao o ACE. Para cuantificar la dominancia se utiliza, por ejemplo, el índice de Simpson.
- ✧ **Diversidad Beta:** permite comparar la diversidad de dos o más puntos. Puede determinarse considerando únicamente la composición de especies, para lo cual se utilizan índices de similitud como los de Jaccard o Sorensen. Otro enfoque posible considera la abundancia relativa de las especies, para lo cual se utilizan los índices de Bray-Curtis o Morisita-Horn. Cuando los análisis de biodiversidad están hechos en base a secuencias de genes de ARN ribosómico, no es conveniente la comparación directa de las abundancias debido a las variaciones de los números de copia de cada especie, sumados al sesgo de la reacción de amplificación por PCR.
- ✧ **Diversidad Gama:** hace referencia a la diversidad regional. Se aplican los mismos parámetros que para la diversidad Alfa, pero en una zona mucho más grande que incluye todos los puntos de muestreo.

Figura 1.1 Representación esquemática de las medidas de biodiversidad.

Diversidad Alfa (α) representada por los círculos de colores. Diversidad Beta (β) representada por la línea punteada en la intersección de los círculos. Diversidad Gama (γ) representada por el círculo exterior (tomado de Zinger et al., 2012)



1.2. Interacción de los microorganismos con el medioambiente

Existe una fuerte correlación entre los microorganismos y las condiciones ambientales del ambiente que ocupan; dichas condiciones están definidas por numerosas variables entre las que se encuentran temperatura, presión, humedad, radiación, pH, salinidad y cantidad y tipo de nutrientes. Estos parámetros condicionan las especies que se establecen en un hábitat y, a su vez, estas especies ejercen una evidente influencia sobre el ambiente. Un ejemplo de ese tipo de interacciones puede describirse para el suelo. Allí los microorganismos cumplen con varias funciones muy importantes para el bienestar del ecosistema: participan en la erosión de los suelos y rocas a partir de la producción de metabolitos como amoníaco, ácidos nítrico, sulfúrico, oxálico o cítrico y dióxido de carbono, entre otros; tienen acción enzimática directa sobre otros compuestos oxidándolos o reduciéndolos; son fundamentales en la mineralización de la materia

orgánica a través de las rutas de descomposición y participan de forma activa en la formación del humus. En otros ambientes, las condiciones fisicoquímicas ejercen una presión de selección que permite que solo algunas especies puedan desarrollarse. Por ejemplo, en las profundidades de los océanos solo pueden habitar especies que hayan desarrollado mecanismos para adaptarse a bajas temperaturas y altas presiones (Ehrlich y Newman, 2008).

Los diferentes metabolismos que poseen los microorganismos de una comunidad, se integran a los procesos que tienen lugar en un ecosistema, interviniendo de ese modo en los ciclos de los elementos más representativos de cada ambiente. Algunos ejemplos de estas actividades microbianas y sus impactos, son los metabolismos degradativos (celulolíticos, pectinolíticos, proteolíticos) que proveen fuentes de carbono más accesibles para otros miembros del ecosistema, las acciones nitrificantes, desnitrificantes o fijadoras de nitrógeno que poseen diversos microorganismos y la capacidad de oxidación o reducción de distintos compuestos y elementos como oxígeno, azufre, hierro, para hacerlos accesibles a otras especies.

1.2.1. El papel de los microorganismos en los procesos geoquímicos

Muchos microorganismos, tanto eucariotas como procariotas, tienen un rol activo en distintos procesos geoquímicos. Dentro de los últimos, bacterias y arqueas están igualmente involucradas. Algunos ejemplos de procariotas geológicamente importantes son los que metabolizan hidrógeno (aeróbica o anaeróbicamente), los oxidantes o reductoras de hierro, azufre y manganeso, los nitrificantes y desnitrificantes, las bacterias sulfato reductoras, las anaeróbicas fotosintéticas y las cianobacterias productoras de oxígeno.

Los procariotas pueden dividirse en grupos de acuerdo a sus características fisiológicas, lo que determina el rol que cumplen dentro de la geoquímica del ambiente en el cual se desarrollan. Una forma de clasificar los microorganismos de acuerdo a la fuente de carbono y energía que utilizan es la siguiente:

❖ **Quimiolitótrofos** (autótrofos quimiosintéticos):

- obtienen energía a partir de la oxidación de compuestos inorgánicos
- utilizan CO_2 , HCO_3^- o $\text{CO}_3^{=}$ como fuente de carbono
- incluyen bacterias y arqueas

❖ Fotolitótrofos (autótrofos fotosintéticos):

- obtienen energía a partir de la conversión de energía lumínica en energía química
- utilizan CO_2 , HCO_3^- o $\text{CO}_3^{=}$ como fuente de carbono
- pueden generar O_2 como parte su proceso metabólico (oxigénicos) o no (anoxigénicos)
- incluyen varias especies de bacterias pero no se han encontrado arqueas con estas características metabólicas

❖ Mixótrofos:

- pueden obtener energía a partir de la oxidación de compuestos orgánicos o inorgánicos
- pueden utilizar como fuente de carbono compuestos orgánicos o CO_2 , HCO_3^- o $\text{CO}_3^{=}$
- incluyen bacterias y arqueas

❖ Fotoheterótrofos (heterótrofos fotosintéticos):

- obtienen energía, total o parcialmente, a partir de la conversión de energía lumínica en energía química
- utilizan compuestos orgánicos como fuente de carbono
- principalmente incluyen bacterias aunque también se conocen algunos ejemplos de arqueas (halófilos extremos)

❖ Quimioheterótrofos:

- obtienen energía de la oxidación de compuestos orgánicos
- utilizan compuestos orgánicos como fuente de carbono
- incluyen bacterias y arqueas

A su vez, los microorganismos pueden tener metabolismo aeróbico (utilizan O_2 como último aceptor de electrones en la cadena respiratoria) o anaeróbico (utilizan otra sustancia, orgánica o inorgánica, como aceptor final de los electrones); además, pueden tener cierta tolerancia a las condiciones de aerobiosis o anaerobiosis lo que les permite desarrollarse, o al menos subsistir, en una mayor variedad de ambientes. Estas características fisiológicas condicionan el hábitat donde se desarrollarán los microorganismos y el impacto que producirán en el mismo.

Muchos microorganismos pueden ser considerados como agentes geológicos al realizar alguna acción específica sobre el ambiente. Según Ehrlich y Newman, (2008), algunos ejemplos de estas actividades pueden ser:

- ❖ **Agentes de concentración:** producen una acumulación localizada de sustancias inorgánicas mediante depósito de productos del metabolismo dentro de la célula, acumulación pasiva por adsorción sobre la superficie o por intercambio iónico o promoviendo la precipitación de compuestos insolubles fuera de la célula.
- ❖ **Agentes de dispersión:** promueven la disolución de compuestos insolubles, generalmente por reacciones de óxido-reducción.
- ❖ **Agentes de fraccionamiento:** algunos microorganismos pueden actuar selectivamente sobre compuestos particulares de una mezcla, cambiar su estado y separarlos de la misma. Algunos, incluso, pueden distinguir y actuar selectivamente sobre determinados isótopos de un mismo elemento favoreciendo la separación.
- ❖ **Agentes de litificación:** son microorganismos que producen sustancias que unen sedimentos inorgánicos para formar las rocas sedimentarias. Estas pueden ser carbonatos de calcio, óxidos de aluminio o hierro, silicatos, etc.

Un proceso geoquímico muy importante en el que los microorganismos tienen un rol fundamental es la mineralización de la materia orgánica. La disponibilidad de carbono y otros elementos fundamentales para el desarrollo de vida en la biosfera es limitada y por eso deben ser reciclados y reintroducidos en los ciclos naturales. Este proceso requiere la completa degradación de la materia orgánica proveniente de los restos de organismos muertos o de sus productos metabólicos. Los microorganismos poseen rutas metabólicas y enzimas extracelulares particulares que les permiten llevar a cabo estas tareas, ya sea individualmente o en comunidades. La mineralización puede ser aeróbica y, en ese caso, la materia orgánica es completamente degradada a CO_2 , H_2O , NO_3^- , PO_4^{3-} y SO_4^{2-} . Si la mineralización es anaeróbica, los productos finales serán CH_4 , H_2 , NH_3 , H_2S y PO_4^{3-} (Ehrlich y Newman, 2008).

Otro mecanismo por el cual los microorganismos pueden influir en los procesos geoquímicos es a través de la producción y liberación al medio de ciertos metabolitos. Algunos heterótrofos pueden generar ácidos orgánicos, además de CO_2 , como subproductos de la respiración. Estos, además de disminuir el pH, pueden complejar diversas sustancias. Otros quimiolitótrofos producen importantes cantidades de H_2SO_4 o HNO_3 (dependiendo de qué compuesto utilicen para obtener energía) que pueden reaccionar con diversos minerales y favorecer su disolución total o parcial. Otras especies, al utilizar compuestos nitrogenados como péptidos o proteínas, generan amoníaco que en solución acuosa puede disolver silicatos. Otros ejemplos de

interacciones en procesos geoquímicos mediadas por metabolitos, son la producción de ligandos específicos como los sideróforos, o de fuertes agentes reductores u oxidantes como Fe(II), H₂S o Fe(III) capaces de reaccionar con algunos minerales y favorecer su lixiviación (Ehrlich y Newman, 2008).

1.2.2. Parámetros fisicoquímicos que influyen en la actividad geomicrobiológica

Los parámetros fisicoquímicos, como temperatura, pH, presión, radiación, influyen en el metabolismo de los microorganismos y así, en su actividad geomicrobiológica. La temperatura es una de las variables con mayor influencia, debido a su marcado efecto en casi todas las funciones de la célula, particularmente, las enzimáticas, y sobre estructuras celulares como las membranas lipídicas. El aumento de temperatura generalmente produce un aumento en la velocidad de las reacciones enzimáticas, pero este aumento opera en un rango limitado debido a que las enzimas, por ser de naturaleza proteica, se desnaturalizan fuera de cierto margen de temperatura específico para cada una.

A lo largo de los últimos años, se ha detectado vida en un rango muy amplio de temperatura, desde algo menos de 0°C hasta aproximadamente 130°C. Sin embargo, no existen organismos, procariotas ni eucariotas, capaces de sobrevivir en todo este rango de temperatura. Esto es debido a que para la supervivencia en las diferentes condiciones de temperatura, las células necesitan tener composición, estructuras y actividades metabólicas particulares. El rango de temperatura en el que puede sobrevivir un organismo intacto, refleja el rango de estabilidad térmica de sus componentes celulares como membranas y proteínas. Así, a grandes rasgos, existen microorganismos psicrófilos, capaces de crecer desde aproximadamente 0 a 20°C; mesófilos, que se desarrollan en temperaturas entre 10 y 45°C, con temperaturas óptimas de crecimiento entre 25 y 30°C para algunos y entre 35 y 40°C para otros, termófilos que crecen a temperaturas mayores de 45°C e hipertermófilos que se desarrollan por encima de los 80°C. Aquellos microorganismos que se desarrollan a temperaturas superiores a 100°C lo hacen en ambientes donde la presión es superior a una atmósfera, ya que el agua en estado líquido es una condición fundamental para la existencia de vida (Horikoshi et al, 2011).

Parámetros como pH y Eh (potencial de oxidoreducción) también tienen influencia en las funciones y componentes celulares y, consecuentemente, en el impacto de los microorganismos sobre su ambiente. La maquinaria celular puede funcionar en un rango estrecho de pH cercano a

la neutralidad; debido a esto, los microorganismos que viven en ambientes ácidos o básicos deben desarrollar diferentes estrategias para regular su pH interno. Tal cual fue determinado por Baas y Becking en 1960, los valores de pH y Eh ambientales definen la distribución de los microorganismos.

La presión hidrostática tiene una influencia algo más difusa. Presiones de 200 a 400 atmósferas, a temperaturas por debajo del punto de ebullición del agua, inhiben reversiblemente la síntesis de proteínas. Los organismos barófilos pueden crecer a presiones mayores a 400 atm; los facultativos crecen más despacio a medida que aumenta la presión, mientras que los obligados crecen más despacio a medida que se alejan de las condiciones de su ambiente natural y generalmente no se desarrollan a presiones cercanas a 1 atm a la misma temperatura.

1.3. Ambientes extremos y microorganismos extremófilos

Los ambientes extremos se definen como aquellos en los que una o más características fisicoquímicas se encuentran fuera de los parámetros normales, tomando valores considerados límites para la vida. (Kristjansson y Hreggvidsson, 1995). Es necesario aclarar, que la definición así planteada hace referencia a los parámetros normales para la vida humana; obviamente para las especies que se desarrollan en esos ambientes extremos, dichas condiciones son las normales. Las variables más importantes que pueden afectar las funciones y estructuras de componentes celulares (como membranas, ácidos nucleicos y proteínas) y, por lo tanto, las que permiten definir un ambiente como extremo, son temperatura, pH, presión, disponibilidad de oxígeno, salinidad y exposición a la radiación. La Tabla 1.1 muestra algunos ejemplos de ambientes extremos estudiados en los cuales se ha encontrado vida.

Tabla 1.1 Ejemplos de ambientes extremos estudiados

Parámetro fisicoquímico extremo	Ejemplo de ambiente
Temperatura	
alta	Regiones geotermales: Parque Nacional Yellowstone (USA), Caviahue-Copahue (Argentina)
baja	Regiones polares: suelo y aguas antárticas
pH	
bajo	Natural: Río Agrio (Argentina); Río Tinto (España) Antropogénico: drenajes ácidos de mina
alto	Natural: lagos y termas alcalinas, suelo desértico Antropogénico: cuerpos de aguas contaminados por desechos industriales
Presión	Cavernas en el fondo del océano
Radiación	Lagunas de altura
Salinidad	Lagos hipersalinos, Mar Muerto (Medio Oriente)

Las especies capaces de desarrollarse en ambientes extremos son denominadas extremófilas. En los ambientes extremos se han encontrado organismos pertenecientes a los 3 dominios, Bacteria, Archaea y Eukarya, aunque en la mayoría de los casos, las especies procariotas son las más diversificadas y mejor adaptadas, siendo capaces de sobrevivir en condiciones más adversas que los eucariotas (Rothschild y Mancinelli, 2001). La Tabla 1.2 muestra la clasificación más utilizada para los extremófilos según las condiciones que soporten.

Tabla 1.2 Clasificación de extremófilos

Condición extrema	Extremófilo
Temperatura	
60 – 80°C - > 80°C	Hipertermófilos
45 – 60°C	Termófilos
10 – 0°C	Psicrófilos
< 0°C	Psicrófilos extremos
pH	
2 – 0	Acidófilos extremos
5 – 3	Acidófilos
> 8	Alcalófilos
Presión	
200 – 400 atm	Barotolerantes
> 400 atm	Barófilos
Radiación	Radiófilos
Salinidad > 5M NaCl	Halófilos

Es común que muchos microorganismos, debido al ambiente en el cual se desarrollan, posean más de una de estas cualidades. Por ejemplo, los microorganismos que habitan en el fondo de los océanos deben lidiar con bajas temperaturas además de las altas presiones y, en algunos casos, con condiciones de hipersalinidad y falta de oxígeno. En el otro extremo, los microorganismos que viven en zonas geotermales soportan altas temperaturas y, en ciertos casos, bajos valores de pH y/o altas concentraciones de metales.

Si bien para estos microorganismos es normal vivir en ambientes extremos, su supervivencia bajo esas condiciones es el resultado de haber desarrollado diferentes estrategias para poder mantener las funciones y estructuras celulares activas; estas estrategias les permiten no sólo sobrevivir en estado latente, sino crecer y colonizar los diversos nichos. La especialización que alcanzan estos microorganismos es tan alta que se vuelven extremófilos obligados, es decir, las condiciones extremas, no sólo son normales sino necesarias para su desarrollo. A continuación, se describen brevemente algunas de las estrategias que utilizan estos microorganismos; las mismas están enfocadas hacia las modificaciones a nivel proteico pero también ocurren a nivel de DNA, ribosomas y membranas (Morozkina et al, 2010).

– **Termófilos e hipertermófilos**

El aumento de temperatura afecta principalmente las proteínas de los microorganismos, no sólo en su estructura sino también en sus interacciones. Los estudios comparativos demuestran que los termófilos obtienen mayor estabilidad en sus proteínas a altas temperaturas mediante:

- aumento de la carga superficial
- aumento de la hidrofobicidad en el centro de la proteína (las interacciones hidrofóbicas aumentan al aumentar la temperatura)
- reemplazo de residuos termolábiles expuestos en la superficie (cisteína, asparagina, ácido aspártico)
- aumento de interacciones iónicas y de redes de interacciones iónicas en las estructuras secundarias, terciarias y cuaternarias (las interacciones electrostáticas son más fuertes a altas temperaturas debido a la disminución de la constante dieléctrica)
- aumento del volumen de los residuos de aminoácidos que permite un mejor empaquetamiento y disminuye la entropía de rotación en la forma desplegada

– **Psicrófilos**

Algunos de los mecanismos de supervivencia más importantes son:

- producción y acumulación dentro de la célula de moléculas que disminuyen el punto de fusión del agua
- desarrollo de rutas enzimáticas que puedan funcionar a bajas temperaturas
- mayor contenido en ácidos grasos insaturados en las membranas lipídicas, lo que favorece la fluidez de las mismas. Otros lípidos también contienen ácidos grasos

poliinsaturados e hidrocarburos de cadena larga con alta proporción de dobles enlaces.

Para aumentar la flexibilidad de sus proteínas generan algunas modificaciones en las secuencias e interacciones:

- menor cantidad de enlaces disulfuro y puentes salinos
- aumento de interacciones con solventes
- menor cantidad e uniones por puente de hidrógeno entre dominios
- menor cantidad de interacciones hidrofóbicas en el centro de la proteína

– Acidófilos

La principal estrategia consiste en mantener el pH intracelular cerca de la neutralidad (Baker y Dopson, 2007). Para ello, poseen membranas celulares más impermeables que las de los neutrófilos y gran cantidad de transportadores secundarios que bombean protones fuera de la célula. Además, se ha determinado que poseen una elevada proporción de genes dedicados a la reparación del ADN y síntesis de chaperonas para enfrentar los posibles daños que la acidez pueda provocar sobre su material genético.

El potencial de membrana inverso generado por la diferencia de pH entre el medio intracelular y el extracelular, está intrínsecamente relacionado con la obtención de energía celular ya que es el principal componente de la fuerza electromotriz de protones que permite la síntesis de ATP. Por otro lado, se ha sugerido que el potencial positivo de la cara interna de la membrana de los acidófilos los hace resistentes a las altas concentraciones de cationes metálicos tóxicos que suele haber en los ambientes en los cuales se desarrollan. Esta misma teoría permitiría explicar la elevada susceptibilidad de estos microorganismos al aumento en las concentraciones de aniones como NO_3^- y Cl^- .

En el caso particular de las arqueas, los lípidos de sus membranas presentan enlaces éter entre los ácidos grasos con cadenas isopreniodes ramificadas (del tipo del fitanil y bifitanil) y el glicerol, en comparación con la unión éster entre una gran variedad de ácidos grasos y el glicerol que se encuentra en bacterias y eucariotes. La unión éter es menos sensible a la hidrólisis ácida que la unión éster, lo cual contribuye a la supervivencia de las arqueas en medios ácidos.

– Halófilos

Estos microorganismos tienen diferentes sistemas que les permiten mantener constantes las concentraciones de los iones dentro de la célula. Pueden mantener un balance osmótico con el medio ambiente, por lo que las estructuras celulares de los halófilos están adaptadas a funcionar en medios con altas concentraciones salinas (3 a 5 M NaCl o KCl). Existen otros microorganismos que mantienen bajos niveles de sales en el citoplasma debido a la presencia de grandes cantidades de solutos orgánicos. Respecto de sus proteínas, se ha encontrado que son más ácidas que las de sus contrapartes; por esa razón, presentan mayor cantidad de cargas negativas en su superficie lo que garantiza un mayor efecto de hidratación superficial y evita el agregado.

Otro mecanismo utilizado por diferentes microorganismos para adaptarse a vivir en ambientes extremos, es el uso de solutos estabilizantes de bajo peso molecular generalmente llamados solutos compatibles. Estos solutos actúan uniéndose no específicamente a la superficie expuesta de las proteínas, minimizándola y así favoreciendo la forma plegada (nativa) sobre la desplegada. Algunos ejemplos de estos solutos son 2,3-difosfoglicerol, mio-inositol fosfato y sus derivados, alfa manosilglicerato y diglicerol fosfato.

1.3.1. Importancia del estudio de ambientes extremos y microorganismos extremófilos

El estudio de los ambientes extremos, de los microorganismos que los habitan y de sus características, es muy importante desde varios puntos de vista. Desde una óptica científica y académica, resulta relevante debido a la curiosidad de la ciencia de conocer e intentar comprender todo lo que ocurre en la Tierra. A nivel del ecosistema, permite conocer las interrelaciones de las distintas especies con su medioambiente y como éstas intervienen en la geomicrobiología del lugar. Para la biología evolutiva, los microorganismos extremófilos aportan conocimiento sobre las estrategias de adaptación de las especies a distintas condiciones fisicoquímicas y permiten estudiar cómo distintas estructuras celulares y rutas metabólicas han evolucionado para asegurar la supervivencia y colonización de nichos específicos. El estudio de los ambientes extremos y los extremófilos ha tenido un gran impulso por su relación con el origen de la vida en la Tierra y, potencialmente, en otros planetas. Dichos estudios también son importantes debido a las numerosas aplicaciones biotecnológicas tanto de las especies

extremófilas aisladas como las dispuestas en consorcios y de sus metabolitos y macromoléculas incluyendo las extremoenzimas. Ambos temas serán abordados más adelante para el caso particular de los ambientes de alta temperatura y bajos valores de pH.

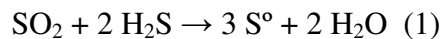
Finalmente, los estudios de diversidad, en particular de ambientes extremos, son importantes por la gran posibilidad de descubrir nuevas especies. El descubrimiento de nuevas especies y la posibilidad de aislarlas y caracterizarlas, abre también las puertas para nuevas aplicaciones biotecnológicas, con sus eventuales impactos económicos. Tal cual fuera mencionado anteriormente, los microorganismos extremófilos y sus enzimas están adaptados a funcionar en condiciones particulares que muchas veces se asemejan a las necesarias para realizar determinados procesos químicos o para producirlos en condiciones más favorables. Para desarrollar estas aplicaciones, así como para una correcta caracterización bioquímica y fisiológica, es necesario aislar las nuevas especies que pudieran haber sido previamente detectadas por técnicas de biología molecular. El proceso de aislamiento suele ser muy largo y tedioso. Los microorganismos extremófilos crecen muy lentamente *in vitro* y pueden pasar meses hasta obtener desarrollos visibles. Además, en la mayoría de los casos se desconocen los requerimientos nutricionales de las especies que se busca aislar, así como pH y temperatura óptimos de crecimiento, por lo que el trabajo es, esencialmente, de prueba y error. Un problema extra es que los extremófilos suelen tener dificultades para lograr un crecimiento adecuado en medio sólido. Esto dificulta la obtención de colonias, un paso clave en el aislamiento de microorganismos. Finalmente, algunos microorganismos ambientales no pueden ser aislados completamente y crecidos en forma independiente en el laboratorio, debido a que crecen en forma simbiótica con otros miembros de su comunidad de origen, ya sea porque utilizan como nutriente algún producto secundario de su metabolismo o porque aquellos consumen alguna sustancia que les es tóxica. Aún con todos los inconvenientes planteados, el aislamiento y la caracterización de nuevas especies extremófilas es indispensable para la caracterización de las especies y para eventuales aplicaciones, por lo que se justifica el esfuerzo necesario para realizarlo.

1.4. Ambientes de alta temperatura y bajo pH

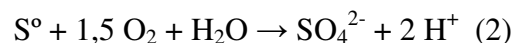
1.4.1. Origen de los ambientes ácidos

Los ambientes ácidos y los microorganismos que viven en ellos, son particularmente interesantes porque, usualmente el bajo pH del medio es consecuencia del metabolismo microbiano y no una característica intrínseca del sistema, como puede ocurrir en otros ambientes extremos (alta o baja temperatura, alta presión o radiación) (Hallberg y Johnson, 2001; Amils et al., 2007). Los ambientes ácidos tienen dos orígenes posibles: uno asociado a las zonas volcánicas y la consecuente producción de compuestos azufrados y otro, debido a la oxidación de sulfuros metálicos, tanto de forma natural como antropogénica a través de la actividad minera (Dopson y Johnson, 2012).

En las zonas volcánicas, principalmente en aquellas que aún se encuentran en actividad, existen fumarolas y “puntos calientes” alimentados por cámaras de magma que se encuentran entre 2 y 5 Km de profundidad y generan emanaciones de gases como N₂, CO₂, H₂ y H₂S. Estas zonas ricas en compuestos sulfurados, tanto solubles en agua como presentes en minerales (Métrich y Mandeville, 2010), reciben el nombre de solfataras. En estas zonas, frecuentemente pueden observarse en la superficie, cristales de azufre prismático que son producto de la condensación de los gases SO₂ y H₂S:



El S⁰ es oxidado por O₂ en un proceso catalizado principalmente por bacterias y arqueas acidófilas, generando H₂SO₄ y aumentando la acidez del medio:



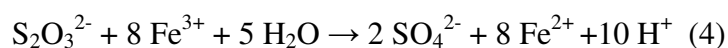
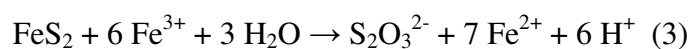
La acidez generada promueve la corrosión y lixiviación de las rocas del ambiente, formando una especie de barro ácido, rico en metales, típico de este tipo de áreas volcánicas. Por sus características, estas zonas son inestables y las fumarolas y pozos suelen disminuir o aumentar su actividad o dejar de ser activos en algún momento y reaparecer en otra zona dentro del campo geotermal. Debido a la combinación de las características ácidas, marcados gradientes térmicos y alta concentración de metales en determinadas zonas, estos ambientes son colonizados por una

variedad de extremófilos con diferentes capacidades de adaptación. Existen muchos trabajos donde se ha realizado la prospección de la biodiversidad de distintas zonas volcánicas ácidas (Löhr et al., 2006; Aminin et al., 2008; Finsinger et al., 2008; Aditiawati et al., 2009; Benson et al., 2011; Burgess et al., 2012) y que muestran la presencia de bacterias y fundamentalmente de arqueas termoacidófilas capaces de oxidar compuestos del azufre y/o H₂.

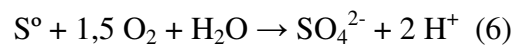
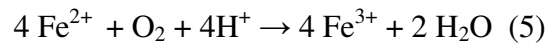
Es importante destacar que no todos los ambientes de origen volcánico mantienen necesariamente la condición de alta temperatura a lo largo del tiempo. En muchos casos ocurre que la fuente geotermal se extingue y el sistema naturalmente se enfría, sin perder las características ácidas; en otros casos, tal cual ocurre en los ríos de naturaleza volcánica, el alejamiento del origen geotermal provoca que su temperatura disminuya.

El otro origen posible de los ambientes ácidos se relaciona con la oxidación de sulfuros metálicos. Este origen puede darse por dos vías: *a*) de forma natural, por la oxidación de los depósitos terrestres de minerales sulfurados, particularmente pirita, dando origen a los drenajes ácidos de roca (DAR) o *b*) por causas antropogénicas, en donde los procesos extractivos que se realizan para obtener metales y carbón, facilitan la exposición de sulfuros al aire y al agua, catalizando su oxidación química y/o microbiológica y produciendo los drenajes ácidos de minas (DAM). En ambas vías los mecanismos que actúan son esencialmente los mismos e involucran principalmente a ciertos sulfuros cuya oxidación genera acidez; entre estos sulfuros se destaca la pirita (FeS₂) que es, además, el mineral sulfurado más abundante en la Tierra (Johnson, 2010).

La oxidación de la pirita se produce de modo significativo en presencia de Fe(III). Este proceso, en forma simplificada, puede ser dividido en dos etapas: un ataque inicial por Fe(III) (ecuación 3) y la oxidación de los compuestos intermediarios de azufre a sulfato (ecuación 4).



A valores de pH menores de 4 la oxidación abiótica del Fe(II) ocurre muy lentamente. En esas condiciones, las actividades catalíticas de los microorganismos acidófilos oxidantes de hierro (catalizan la reacción indicada por la ecuación 5) y de los oxidantes de azufre (catalizan la reacción interpretada por la ecuación 6, que se repite para facilitar la comprensión del lector), son fundamentales para la generación de DAR y DAM (Johnson y Hallberg, 2003).



El Río Tinto en Huelva, España, es el caso más estudiado de un ambiente ácido generado por la oxidación natural de sulfuros. Este río se caracteriza por ser un sistema de más de 90 Km de longitud con temperaturas entre 15 y 20°C que mantiene un pH de aproximadamente 2,5, una elevada concentración de metales pesados y concentraciones de Fe(III) que pueden llegar incluso a valores tan altos como 20 g/L. Las condiciones extremas del Río Tinto son esencialmente debidas a la actividad de los microorganismos acidófilos más que, como se creía anteriormente, a la intensa actividad minera de la zona; algunos estudios realizados demuestran que las condiciones de acidez son previas a cualquier actividad minera realizada por el hombre (Fernández Remolar et al., 2003). La biodiversidad de este peculiar sistema compuesta principalmente por especies acidófilas relacionadas con el metabolismo del Fe y su relación con las características fisicoquímicas extremas que presenta, han sido reportados en numerosos trabajos (González Toril et al., 2003; Aguilera et al., 2007; García Moyano et al., 2007; Amaral Zettler et al., 2011).

Otro ejemplo de oxidación natural de sulfuros es el descrito por Dopson y Johnson (2012) para algunos ambientes subterráneos que contienen aguas ricas en sulfuros. Cuando estas aguas entran en contacto con O₂, se promueve la oxidación microbiana generando H₂SO₄ que disuelve los carbonatos de las rocas y promueve la formación de cavernas. Si este efluente no es neutralizado por minerales básicos, toda la zona presenta fuerte acidez. El complejo de cuevas y cavernas en Frasassi, Italia, es un ejemplo representativo de dichos sistemas. En sus aguas, con valores de pH entre 0 y 1, se han descrito biofilms formados por un número reducido de bacterias y arqueas acidófilas vinculadas al metabolismo del azufre.

Los sistemas subterráneos urbanos de aguas residuales pueden presentar una situación similar. Estas aguas son ricas en materia orgánica que puede tener cierto contenido de compuestos de azufre y sulfatos disueltos. Los procesos como la reducción disimilatoria de sulfatos y la desulfurilación (producto de la hidrólisis de grupos tiol provenientes, por ejemplo, del aminoácido cisteína) generan H₂S; éste puede ser oxidado a H₂SO₄ por bacterias oxidantes de azufre que crecen formando biofilms en la superficie de los caños. La generación de ácido provoca la corrosión y la perforación de los caños y significa un grave problema para los sistemas de distribución de aguas residuales (Dopson y Johnson, 2012).

1.4.2. Características de los ambientes geotermales

Los ambientes geotermales están caracterizados principalmente por mantener altas temperaturas en forma constante. Se encuentran ampliamente distribuidos en la Tierra y pueden dividirse en dos clases, los que se encuentran en el fondo del océano, como cavernas y cuevas con actividad geotermal, y los que se encuentran en la superficie terrestre formando pozos hidrotermales, fumarolas y solfataras. Las cavernas de las profundidades del océano suelen tener fuentes de aguas de mayor temperatura, mayor contenido de minerales, en especial los sulfurados, y nada de aporte de energía solar. Las zonas geotermales sobre la superficie terrestre se generan ante el ascenso de aguas calientes de fosas subterráneas; estas aguas, los gases y vapores que las acompañan, llegan a la superficie a través de rajaduras o poros de la corteza terrestre (Yim, 2007). En la página <http://geothermal.marin.org/index.html> se puede encontrar una detallada descripción de las características de estos ambientes, un listado de los principales puntos con actividad geotermal del mundo e información acerca de los usos de la energía geotermal.

Una característica de los ambientes geotermales, en particular de los de origen volcánico, es la existencia de dos zonas marcadamente distintas en el suelo. La zona superficial, oxidada, que en muchos casos es rica en óxido férrico de color naranja, y por debajo una zona anóxica, generalmente de color negro, debido a la precipitación de sulfuros metálicos. La interfase entre estas dos zonas suele ser rica en azufre elemental y consecuentemente presenta color amarillo. Por otro lado, los pozos con efluentes marcadamente ácidos pueden estar en contacto con zonas neutras o ligeramente alcalinas y, de ese modo, se generan ambientes con gradientes de pH dentro del mismo campo geotermal.

1.4.3. Ciclos geomicrobiológicos más importantes en ambientes geotermales y volcánicos

Sin duda, los ciclos geoquímicos que se encuentran más representados en este tipo de ambientes, son los del azufre y del hierro y, en algunos ambientes particulares, el del arsénico. Debido a que la pirita, como se ha dicho, el mineral sulfurado más abundante del planeta, también contiene hierro, muchas veces estos ciclos se encuentran íntimamente relacionados. La actividad de los microorganismos acidófilos, quimiolitotróficos y heterótrofos, aeróbicos y aneróbicos mantiene el ciclo en funcionamiento.

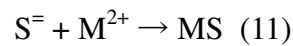
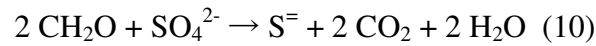
Ciclo del Azufre

El azufre es, seguramente, el elemento más importante en los ambientes geotermales y volcánicos; de ahí el término solfataras para denominarlos genéricamente. En los compuestos de azufre presentes en esos ambientes, el azufre se puede encontrar en todos sus estados de oxidación posibles, -2, 0, +4 y +6; en otros compuestos, el azufre puede encontrarse en más de un estado de oxidación como ocurre, por ejemplo, en tiosulfato, tetratiónato y en otros politionatos. Muchos microorganismos acidófilos y/o termófilos juegan un papel clave en la interconversión de estos estados (Dopson y Johnson, 2012).

Dentro de los microorganismos capaces de oxidar compuestos reducidos de azufre, existen quimiolitotrofos, fotoautótrofos como las cianobacterias, mixótrofos y heterótrofos. La gran mayoría utiliza O_2 como aceptor final de electrones pero en su ausencia, algunos pueden utilizar $Fe(III)$ o NO_3^- . Los quimiolitotrofos, mesófilos y termófilos, utilizan la energía obtenida a partir de la oxidación de compuestos reducidos del azufre para fijar CO_2 a través del ciclo reverso de los ácidos tricarbónicos o del ciclo de Calvin-Benson y así vinculan los ciclos de azufre y del carbono en los ambientes geotermales (Ehrlich y Newman, 2008).

Los compuestos oxidados del azufre pueden ser reducidos bajo condiciones anaeróbicas por distintas especies microbianas. La reducción de SO_4^{2-} a S^{2-} es catalizada por microorganismos sulfato-reductores; estos microorganismos son denominados genéricamente BSR indicando las iniciales de “bacterias sulfato reductoras” (o SRB del inglés “sulfate reducing bacteria”), aunque actualmente se sabe que también existen arqueas con esta capacidad metabólica (Thauer y Kunow, 1995). Este proceso es de gran importancia geoquímica ya que prácticamente no puede ocurrir abióticamente en las condiciones de temperatura y presión de la superficie terrestre, debido a la gran energía de activación que requiere. Existen muchos tipos distintos de BSR pero,

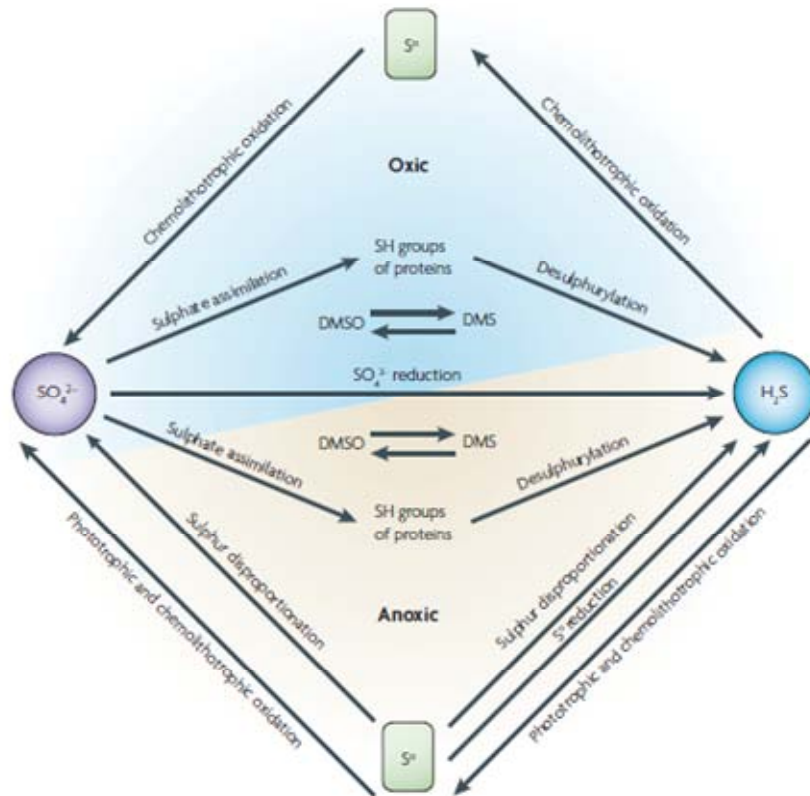
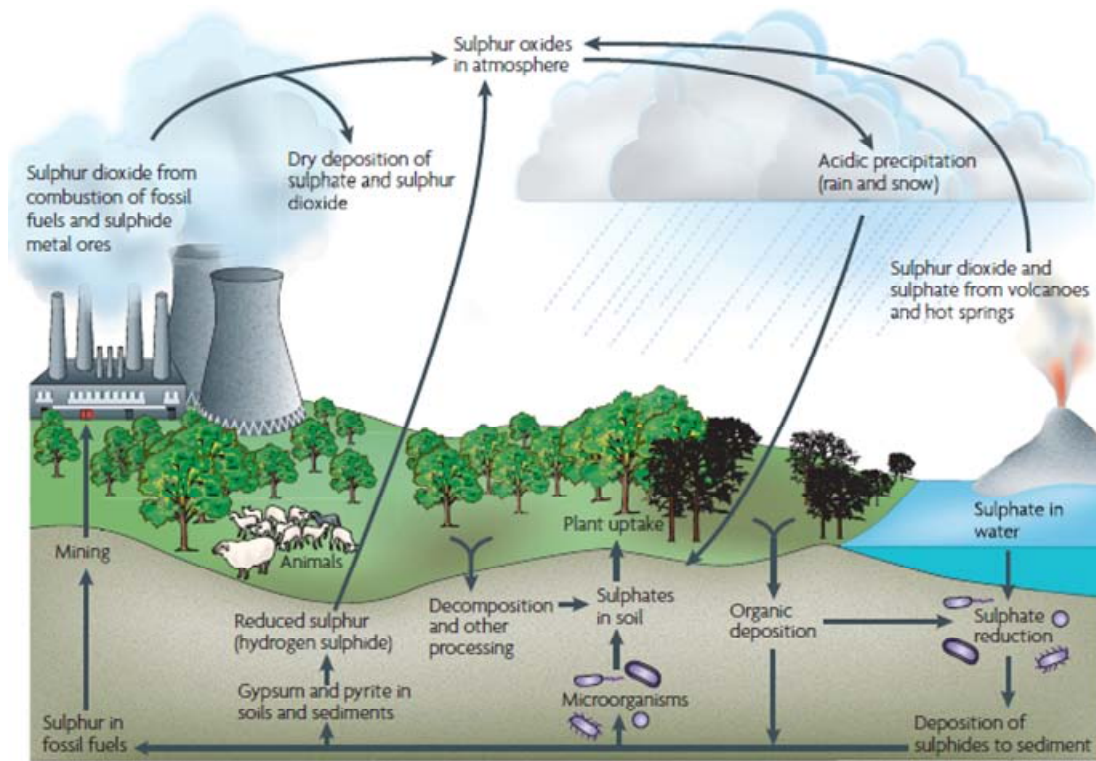
en forma general, todas oxidan una fuente orgánica a CO_2 y reducen sulfato a sulfuro (ecuación 10). El sulfuro puede actuar como agente inmovilizador ya que es un anión capaz de precipitar metales divalentes, aun en muy bajas concentraciones, generando los respectivos sulfuros metálicos insolubles (ecuación 11).



Los microorganismos también interfieren en el ciclo geoquímico del azufre al catalizar el fraccionamiento de ciertos minerales sulfurados ya que algunos son capaces de distinguir entre los isótopos ^{32}S y ^{34}S . Los compuestos de azufre de origen meramente geológico tienen naturalmente una relación de isótopos $^{32}\text{S}/^{34}\text{S}$ entre 21,3 y 23,2. Los microorganismos del azufre capaces de producir fraccionamiento atacan preferentemente al ^{32}S . Así, determinados depósitos de materiales azufrados de origen biológico, estarán enriquecidos en aquel isótopo y tendrán diferente composición isotópica a los de origen geológico (Ehrlich y Newman, 2008).

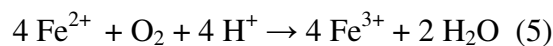
Las dos imágenes de la Figura 1.2 muestran dos formas diferentes de ver el ciclo del azufre. La primera es una visión ecológica global, indicando cómo este elemento está presente en los procesos que ocurren en el aire, el agua y el suelo, involucrando a plantas, animales y microorganismos, además de la intervención del hombre a través de la actividad industrial y la minería. En la segunda imagen se ven las transformaciones que sufre este elemento en su ciclo natural, en condiciones aeróbicas y anaeróbicas, tanto en sus formas inorgánicas, $\text{S}^=$, S° , $\text{SO}_4^=$, como en los compuestos orgánicos que puede formar, dimetilsulfóxido (DMSO), dimetilsulfuro (DMS), grupo tiol (HS) en proteínas, etc.

Figura 1.2 Ciclo del azufre y transformaciones químicas y microbiológicas del elemento (tomadas de Muyzer et al., 2008)



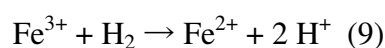
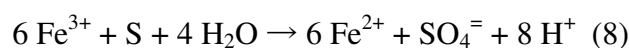
Ciclo del Hierro

La erosión de las rocas, el suelo o los sedimentos movilizan hierro y lo introducen en el ciclo natural. De estos mecanismos, la erosión de las rocas es el más afectado por la actividad microbiana. Como ya se describió anteriormente, algunos microorganismos son capaces de catalizar la oxidación de Fe(II) y/o de sulfuros lo que permite la generación de oxidantes como Fe(III) y/o de fuertes condiciones de acidez a través de la formación de H₂SO₄ (ecuaciones 5 y 6, respectivamente). El hierro es movilizado de los minerales usualmente como Fe(II) y luego puede ser oxidado a Fe(III) biótica o abióticamente. En particular, si el medio es ácido esa oxidación puede ser catalizada, como se ha indicado, por microorganismos acidófilos quimiolitotróficos o quimioheterotróficos aeróbicos. El Fe(III) puede precipitar como hidroxocompuestos o sulfatos básicos. La oxidación de Fe(II) a Fe(III) y su posterior precipitación como Fe(OH)₃ (que representa sólo una de las especies químicas que puede precipitar bajo esas condiciones) mantienen la acidez del sistema (el primer proceso consume protones mientras la precipitación de los hidroxocompuestos los libera). Estos procesos están representados por las siguientes ecuaciones (para facilitar la comprensión, se repite la ecuación 5 y se muestra en la ecuación 7 una versión simplificada de la hidrólisis del Fe(III) y la precipitación de hidroxocompuestos):



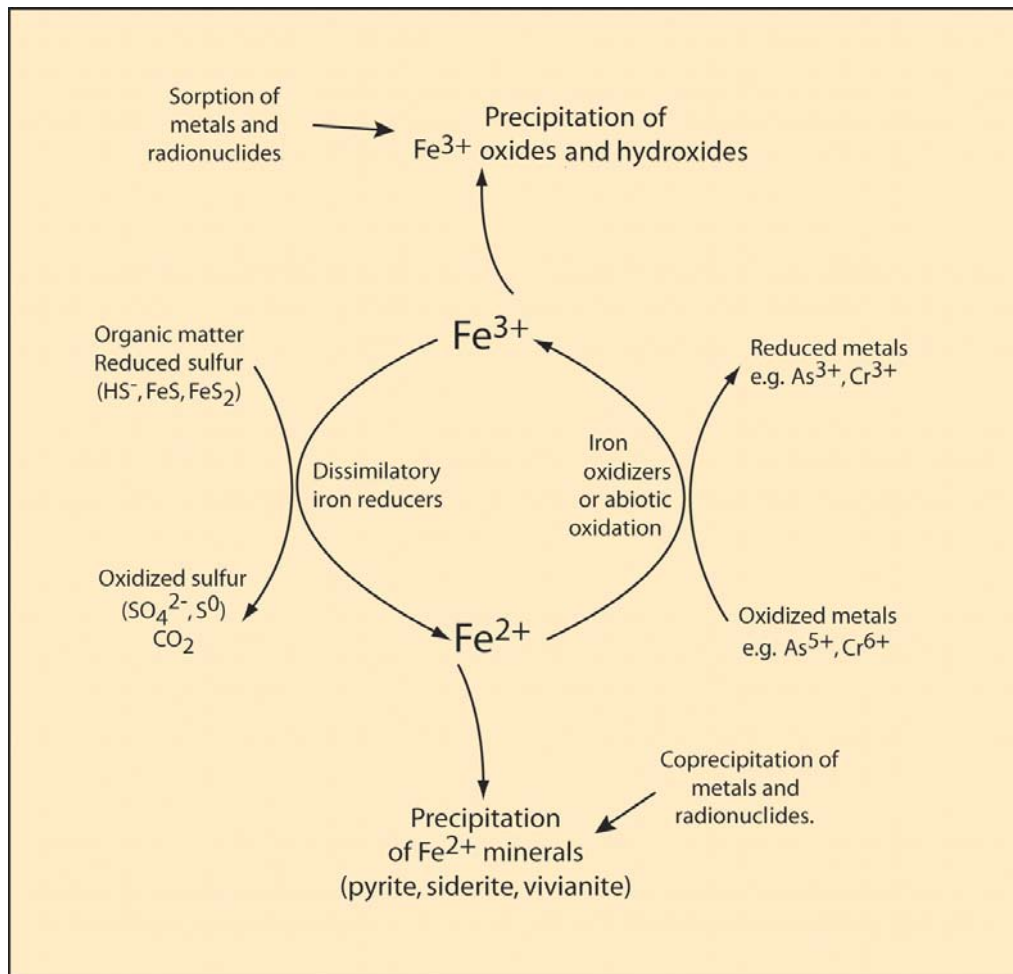
Si en el medio existen ligandos que formen complejos estables y solubles, el Fe(III) puede permanecer en solución y ser transportado lejos de su lugar de formación, dispersándose por el resto del ambiente.

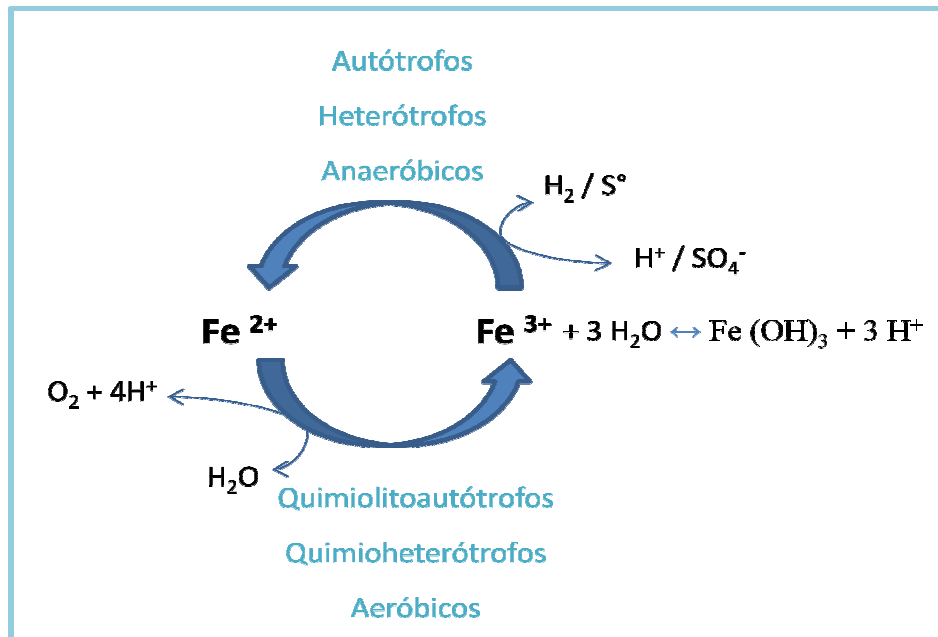
Otro proceso que puede tener lugar dentro del ciclo del hierro, es la reducción disimilatoria de Fe(III) a Fe(II). Este proceso es catalizado por microorganismos anaeróbicos o anaeróbicos facultativos que utilizan Fe(III) como aceptor final de electrones de la cadena respiratoria. Algunos microorganismos como los que se encuentran en ambientes volcánicos o geotermales como los descritos anteriormente, pueden utilizar S⁰ o H₂ como dadores de electrones, según se representa en las ecuaciones 8 y 9, respectivamente.



En la Figura 1.3 se muestran los principales procesos que tienen lugar dentro del ciclo del hierro. El primer esquema indica de forma general todos los procesos geomicrobiológicos en los que puede estar involucrado el hierro. El segundo gráfico muestra las reacciones catalizadas por microorganismos más comunes en ambientes ácidos.

Figura 1.3 Esquema del ciclo del hierro en ambientes ácidos





Ciclo del Arsénico

El arsénico (As) se encuentra en importantes cantidades en algunos ambientes geotermales (algunos pozos del Parque Nacional Yellowstone, EEUU; Solfatara Pisciarelli, Italia; Uzon Caldera, Rusia) mientras que no aparece en otros como en la zona geotermal de Copahue en Neuquén, Argentina. Generalmente se encuentra presente formando parte de minerales como oropimente (As_2S_3), rejalgar (As_2S_2), lolignita ($FeAs$) y arsenopirita ($FeAsS$). Algunas especies microbianas son capaces de metabolizar diferentes compuestos del As, por lo que también puede plantearse un ciclo geomicrobiológico para este elemento. En estudios en zonas geotermales de alta temperatura, se han encontrado microorganismos capaces de crecer utilizando diferentes rutas metabólicas que involucran compuestos de As. Algunas especies anaeróbicas quimiolitoautótrofas son capaces de reducir AsO_4^{-3} , actuando éste como aceptor de electrones y con H_2 como dador; otras especies pueden catalizar la precipitación de compuestos de As y S, mientras que otras son capaces de oxidar As elemental y diversos compuestos de As(III) (Huber et al., 2000; Donahoe Christiansen et al., 2004; Hamamura et al., 2009). Estos estudios demuestran que los microorganismos desempeñan un papel fundamental en el ciclo geoquímico del As, y junto a las condiciones fisicoquímicas determinan la especiación de este elemento en los ambientes geotermales. Por otro lado, debido a las características de sus metabolismos, estos microorganismos contribuyen a la vinculación de los ciclos del As y el S.

1.5. Aplicaciones biotecnológicas de los microorganismos acidófilos y termófilos

La aplicación biotecnológica más desarrollada de los microorganismos acidófilos, mesófilos y termófilos, está relacionada con el procesamiento de minerales con intervención microbiana (biominería) y la biorremediación de sitios contaminados con metales. En la actualidad, existen operaciones biomineras a escala comercial que permiten recuperar metales como Cu, Co, Ni y U y beneficiar la recuperación de Au, a partir de minerales o sus concentrados, de residuos de baja ley o de desechos de otros procesos. Estos procesos mediados por microorganismos se consideran “tecnologías limpias” porque tienen menores requerimientos energéticos, menores costos y, fundamentalmente, menor impacto ambiental que los procesos no biológicos tradicionales. La biominería hace uso de la capacidad de ciertos microorganismos acidófilos de producir Fe(III) y H₂SO₄ que crean las condiciones para la oxidación y disolución de sulfuros metálicos y otros minerales (Johnson, 2010). En los casos en los que el metal que se intenta recuperar se solubiliza a través de la acción microbiana, el proceso se conoce como biolixiviación. Comercialmente se aplica fundamentalmente en el caso del Cu. Si el metal de interés se mantiene en la fase sólida, pero la acción de los microorganismos lo hace más accesible al ataque por otros agentes lixiviantes, el proceso recibe el nombre de biooxidación. Esta técnica se utiliza como pretratamiento para la recuperación de Au en minerales refractarios.

Los microorganismos hierro-oxidantes tienen la tarea fundamental de generar constantemente Fe(III), potente oxidante que produce el ataque de los sulfuros metálicos. Por su parte, los microorganismos oxidantes del azufre degradan partes sulfuradas del mineral facilitando la disolución de los metales. Además, mediante la liberación de protones al medio, mantienen las condiciones de pH entre 1 y 3 que requieren los microorganismos hierro-oxidantes para su óptimo funcionamiento y que permiten que los metales liberados se mantengan en solución. Algunos microorganismos son capaces de oxidar hierro y compuestos reducidos de azufre (ecuaciones 5 y 6), lo que los hace particularmente útiles para la biominería.

Los microorganismos acidófilos y termófilos capaces de oxidar hierro y/o azufre, son especialmente útiles para aplicaciones como biolixiviación, biooxidación y biodesulfuración de carbón, ya que a mayor temperatura la mayoría de los procesos incrementan significativamente sus velocidades. La biolixiviación y biooxidación son procesos altamente exotérmicos lo que conlleva a un rápido aumento de temperatura del medio si no hay una disipación eficaz del calor.

Cuando se utilizan microorganismos mesófilos debe emplearse energía para enfriar el sistema y mantener la temperatura dentro de los valores óptimos de funcionamiento de los mismos. Al utilizar termófilos o hipertermófilos, este paso, que aumentaría los costos del proceso, no es necesario. Además, estos microorganismos permiten solubilizar algunas especies minerales como molibdenita y calcopirita que son refractarios al tratamiento a temperaturas moderadas (Liang et al., 2012).

La biorremediación, en particular, la de sitios contaminados con metales pesados, es otra área de aplicación de sumo interés para los microorganismos acidófilos. Esta clase de contaminación es uno de los problemas ambientales más importantes en la actualidad debido a que muchas industrias, como la minera o la del curtido de cueros, producen y descargan sus residuos en el ambiente, y los mismos poseen elevados contenidos de metales pesados. Esto ha provocado un creciente interés en desarrollar procesos capaces de remover o neutralizar los efectos tóxicos de los metales en suelos, sedimentos y cursos de agua. A diferencia de lo que ocurre con los contaminantes orgánicos que pueden ser degradados completamente desde el punto de vista químico, los metales pesados no pueden ser destruidos. Para remediar el impacto producido por la contaminación con metales pesados, sólo es posible utilizar procesos a través de los cuales se modifique su movilidad o su toxicidad, cambiando de especie química o de estado de oxidación. Los microorganismos, y en particular los extremófilos, son una herramienta muy importante para la biorremediación de sitios contaminados con metales pesados, ya que son capaces de solubilizar metales por lixiviación ácida o por complejación, inmovilizarlos por acumulación/sorción o precipitarlos a través de la producción de metabolitos que pueden reaccionar con los metales para dar compuestos insolubles. Estos procesos biológicos pueden ser utilizados para el tratamiento de sólidos contaminados y efluentes líquidos debido a la flexibilidad de los microorganismos extremófilos para adecuarse a diferentes condiciones fisicoquímicas, tal cual pueden encontrarse en los efluentes. Además, estos procesos suelen ser selectivos y poco costosos (Urbieta, 2011). A continuación, exponemos muy brevemente algunos ejemplos del uso de microorganismos acidófilos en biorremediación.

La biolixiviación de metales a partir de materiales de desecho permite el reciclado de estos por procesos muy similares a los que ocurren en los ciclos geoquímicos en la naturaleza y así, permiten reducir el uso de material de partida, energía y espacio. Algunos ejemplos son el uso de biolixiviación por acción de microorganismos azufre-oxidantes para la recuperación de metales como Cr, Ni, Pb, Cu y Zn a partir de barros de digestores anaeróbicos de plantas de tratamiento de residuos municipales o de las cenizas de incineración de residuos (Viera y Donati, 2004).

La bioprecipitación es una estrategia que ha probado ser exitosa para remover metales pesados desde efluentes líquidos (Urbietta et al., 2011). Una de las variantes de este bioproceso es la precipitación de metales con H_2S producido por bacterias sulfato reductoras como producto final de su metabolismo (ecuación 10). El anión sulfuro es un agente sumamente útil para la precipitación de metales pesados debido al bajo valor de producto de solubilidad (K_{ps}) que poseen los sulfuros metálicos. De esta manera, los metales en solución son inmovilizados en precipitados estables que pueden ser más fácilmente removidos del ambiente. Este proceso se ha aplicado puntualmente en escala piloto. Esta técnica, denominada biosulfidogénesis, podría ser aplicada para el tratamiento de DAM o aguas de procesamientos de minerales, separando metales capaces de precipitar como sulfuros y que tengan productos de solubilidad (K_{ps}) suficientemente diferentes. La concentración del agente precipitante, S^{2-} , puede ser modificada controlando el pH del medio; uno de los inconvenientes para ello es la alta sensibilidad de estos microorganismos a la acidez del medio. No obstante, Nancucheo y Johnson (2012) describieron un sistema de biosulfidogénesis utilizando un consorcio de bacterias sulfato reductoras acidófilas con el cual precipitaron selectivamente metales a partir de efluentes ácidos.

Por último, dentro de las alternativas de la biorremediación, algunas especies de microorganismos acidófilos azufre-oxidantes, son capaces de reducir especies metálicas cuyos metales se presentan en altos estados de oxidación (por ejemplo, especies con $Cr(VI)$ o $U(VI)$), que son usualmente más tóxicos y biodisponibles, en especies reducidas que suelen ser menos tóxicas y menos solubles (Quintana et al., 2001). Esta capacidad está relacionada con la generación de compuestos de azufre con gran poder reductor (sulfuro, tiosulfato y polisulfuros) como intermediarios en la oxidación de azufre a sulfato.

Los microorganismos termófilos e hipertermófilos tienen gran relevancia a nivel biotecnológico por el uso de sus macromoléculas y especialmente de las enzimas. Su alta estabilidad térmica y tolerancia a la desnaturalización por temperatura las convierte en una versión mejorada de los clásicos catalizadores químicos. Además, las enzimas presentan varias ventajas sobre los catalizadores químicos, ya que son biodegradables, tienen mejor comportamiento frente a materiales sin pretratamientos y generan menor cantidad de productos de desecho. El uso de termoenzimas disminuye la posibilidad de contaminación con otras enzimas o microorganismos que puedan generar subproductos indeseables debido a la alta temperatura a la que actúan. Probablemente, en estas condiciones los microorganismos contaminantes tengan muy baja actividad o directamente estén inactivados. Los procesos a alta temperatura presentan otros beneficios tales como disminuir la viscosidad del medio de reacción y aumentar la solubilidad de determinados sustratos o productos. Existen aplicaciones de

enzimas termoestables en diversas industrias químicas, textiles, alimenticias y farmacéuticas, entre otras. Además, variantes recombinantes de esas enzimas han sido clonadas y expresadas en microorganismos más fáciles de cultivar y manejar, como *Escherichia coli*, lo que ha aumentado su campo de uso. Existen numerosos trabajos que reportan las propiedades y el uso de enzimas de microorganismos extremófilos, en general, y de termófilos e hipertermófilos, en particular (Fijuwara, 2002; Egorova y Antranikian, 2005; Champdoré et al., 2007; Morozkina et al., 2010). De las numerosas enzimas obtenidas de microorganismos termófilos que se conocen actualmente, haremos referencia a dos ejemplos por su particular relevancia. El hallazgo y luego la producción a gran escala de la enzima TAQ polimerasa, aislada de la especie hipertermófila *Thermus aquaticus*, fue un hecho trascendente en el desarrollo de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), técnica fundamental de la biología molecular que permitió su gran avance en los últimos 30 años. Por otro lado, una actividad industrial donde las enzimas obtenidas de microorganismos termófilos son de gran relevancia, es la conversión del almidón a jarabe de fructosa u otros productos elaborados. Cualquier transformación que quiera hacerse sobre este polímero debe ser realizada a alta temperatura, ya que el almidón requiere calentarse a 60°C para hacerlo accesible a la hidrólisis enzimática. En este proceso se utilizan amilasas, pululanasas y α -glucosidasas aisladas de hipertermófilos con temperaturas óptimas entre 80 y 100°C (Irwin, 2012).

1.6. Ambientes extremos, el origen de la vida y la astrobiología

La astrobiología es una rama relativamente reciente de la ciencia que estudia el origen, la distribución y la posibilidad de expansión de la vida en el universo. Para poder abarcar estos temas en forma global, requiere del aporte de varias disciplinas como la biología, astrofísica, astronomía, bioquímica, química, geología, microbiología, genética evolutiva, química prebiótica y tecnologías para la exploración de ambientes terrestres y extraterrestres. Los esfuerzos conjuntos de estas diversas áreas de la ciencia están posibilitando el estudio y el diseño de estrategias para incrementar el conocimiento sobre el origen y evolución de la vida en la Tierra así como la formulación de hipótesis sobre posibles formas de vida microbianas en otros planetas.

Se estima que la Tierra tiene una edad de 4 a 6 eones (1 eón equivale a 1.000 millones de años) (Ehrlich, 2002). En el período comprendido entre 4 eones, cuando se piensa que se originó la vida celular, y 2 eones atrás, los únicos habitantes fueron diferentes especies de bacterias. La actividad de estos microorganismos tuvo un fuerte impacto sobre las condiciones fisicoquímicas y geológicas del planeta en ese entonces y esos mismos cambios determinaron la evolución de la vida en la Tierra. Las condiciones que reinaban en la Tierra en los orígenes de la vida eran las que hoy se clasifican como extremas: regiones con muy altas temperaturas y fuerte actividad volcánica, otras de muy baja temperatura, gran abundancia de minerales sulfurados, altas concentraciones de radiación solar y ambientes principalmente anaeróbicos y con baja disponibilidad de agua. Si bien existen varias hipótesis sobre el origen de la vida y las condiciones en las cuales surgieron las primeras formas celulares (Ehrlich, 2002; Javaux y Marshall, 2005), es claro que éstas deben haber sido extremófilas. La prueba de existencia de estas especies ancestrales se obtuvo a partir de datos obtenidos utilizando técnicas con isótopos de C de materia orgánica y de S en sedimentos productos de la bioprecipitación en diferentes sitios tales como las formaciones ferruginosas de Isua en Groenlandia o de los microfósiles procariotes en el oeste de Australia. Debido que los restos hallados presentan gran similitud en estructura y morfología con las células procariotas actuales, se plantea la hipótesis de que estas últimas han evolucionado a partir de ancestros primitivos que habitaron la Tierra hace millones de años (Ehrlich, 1998).

Si bien no todas las características que presentan los extremófilos son productos de

adaptaciones evolutivas, algunas probablemente tengan un origen temprano y les hayan permitido sobrevivir en las condiciones de la Tierra en los orígenes. Entre estas, están la síntesis de pigmentos para absorber y mitigar los efectos de la elevada radiación solar, la gruesa capa de polisacáridos que presentan algunos microorganismos que les permite mantener las condiciones de humedad necesarias para el funcionamiento celular aún en ambientes desérticos, membranas lipídicas resistentes a altas o bajas temperaturas, rutas metabólicas que les permiten obtener energía a partir de minerales o de la luz, etc.

La zona de Río Tinto es un ambiente extremo de gran interés para la astrobiología y que ha sido muy estudiado por considerarse geológicamente un análogo de Marte en la Tierra (Amils et al., 2007). Los precipitados de hierro y azufre que se encuentran en esta zona, producto del metabolismo de los microorganismos acidófilos que lo habitan, son comparables a los que se han encontrado en la superficie de Marte. Este hecho hace del Río Tinto y su biodiversidad procariota, un muy buen modelo de estudio.

Estos resultados muestran la importancia del estudio de los ambientes extremos así como de las especies que los habitan. El estudio de los extremófilos permite conocer sus mecanismos de adaptación y rutas metabólicas y así dilucidar las que pudieron haber tenido sus congéneres primitivos y cómo pudieron haber evolucionado hasta las especies que existen hoy.

1.7. Estudio de biodiversidad de ambientes extremos

Previo al auge del desarrollo y uso de métodos de biología molecular en ecología microbiana, los relevamientos de biodiversidad estaban limitados por las posibilidades de lograr que los microorganismos presentes en una muestra natural, crecieran en las condiciones de laboratorio. Esto implicaba una tarea muy laboriosa, ensayando diferentes medios de cultivo y condiciones que, además, requerían un gran volumen de las muestras naturales. Una vez logrado el enriquecimiento de la muestra original, era necesario aislar los miembros de la comunidad microbiana presente mediante crecimiento en placa y la obtención de colonias únicas y definidas o mediante el uso de la técnica de diluciones seriadas. Estas metodologías son complejas y pueden requerir largos períodos de incubación, con el riesgo de contaminaciones o de deterioro del material. Esta situación es aún más complicada cuando se trata de estudiar la diversidad en ambientes extremos. Para tener éxito en recuperar la mayor cantidad de especies posibles presentes en la muestra natural, deben utilizarse condiciones de cultivo lo más parecidas posibles a las del ambiente de origen. Muchas veces estas condiciones son difíciles de reproducir en el laboratorio y esto limita la posibilidad de hacer ensayos múltiples. Otras veces no se cuenta con demasiada información sobre las especies que se intentan aislar y, por lo tanto, se desconocen sus requerimientos nutricionales y esto dificulta el diseño de medios de cultivo para su eficaz crecimiento.

Muchos estudios de biodiversidad microbiana de ambientes naturales realizados en los últimos 20 años utilizando técnicas de ecología molecular y cultivos, han demostrado que la gran mayoría de los microorganismos presentes en un determinado ambiente son no cultivables (o, al menos, no es posible cultivarlos utilizando los medios y condiciones habituales). Los porcentajes de especies que han podido ser crecidas en condiciones de cultivo en el laboratorio respecto del conteo total de células, varían de acuerdo a las características del ambiente y la diversidad presente. Los porcentajes de especies recuperadas mediante cultivos respecto del total de especies que se estima presentes, según lo reportado por Amann y colaboradores en 1995, varían desde 0,001% para el agua del mar hasta un 15% para los barros activados en plantas de tratamiento de desechos. Resulta sorprendente que aún hoy los microorganismos cultivables sigan siendo un porcentaje muy bajo de los microorganismos totales (Prakash et al., 2013). Bajo esta perspectiva, el estudio de la biodiversidad microbiana de ambientes extremos exige el uso de técnicas moleculares sin por ello descartar las técnicas de cultivo en forma paralela.

La descrita arriba es la razón por la cual los trabajos actuales sobre relevamiento de biodiversidad microbiana están realizados, parcial o totalmente, en base a técnicas de biología molecular cultivo independiente. Estas técnicas permiten identificar las especies pertenecientes a una comunidad sin necesidad de cultivarlas y aislarlas en el laboratorio porque utilizan para la identificación el material genético de la comunidad completa, ADN o ARN, o constituyentes celulares como proteínas, lípidos de membrana, etc. El uso de información genotípica presenta ciertas ventajas para el estudio de comunidades naturales:

- ✘ la composición del ADN y ARN es independiente del medio ambiente y sus condiciones
- ✘ las moléculas de ADN y ARN están universalmente distribuidas en todos los seres vivos y pueden utilizarse para comparaciones a gran escala entre los más diversos ambientes
- ✘ el estudio puede abordarse a través de distintas técnicas complementarias que aportan distinta información a distintos niveles

De todos los genes que se pueden utilizar como cronómetros moleculares, el gen ARNr 16S para procariontes, el gen ARNr 18S y los espaciadores intergénicos ITS (del inglés “Internal Transcribed Spacer”) para eucariotas son los que más se utilizan para el análisis de biodiversidad de comunidades microbianas. Esta elección no es caprichosa ya que estos, en especial los genes ARNr 16 y 18S, presentan ventajas frente a otras moléculas también utilizadas con este fin como ATPasas, citocromo C, enzimas de la ruta de reparación del ADN (recA) e incluso genes que codifican para otros ARN. Algunas de estas ventajas son:

- ✘ los genes que codifican para ARN ribosómicos están altamente conservados por su rol fundamental en la síntesis de proteínas
- ✘ la función de los ARN ribosómicos es universal, constante y acotada; surgió en una etapa muy incipiente de la evolución celular y no fue afectada por cambios en el medio ambiente
- ✘ los ARNr 16S son moléculas grandes de aproximadamente 1500 pares de bases (pb) que contienen gran cantidad de información genética lo que permite un alto nivel de resolución en las comparaciones
- ✘ no se ha descrito transferencia lateral de genes de ARN ribosómico
- ✘ la disimilitud evolutiva en la secuencia de ARNr 16S de dos organismos es representativa de la variación en sus correspondientes genomas. La variación en las

estructuras primarias de ARN ribosómicos refleja distancia evolutiva

- ✧ poseen regiones altamente conservadas y otras hipervariables, por lo que permiten hacer identificación filogenética desde el nivel de dominio hasta, en algunos casos, el nivel de especie
- ✧ son fácilmente alineables
- ✧ en la actualidad existen varias bases de datos de secuencias de gen ARNr 16S que se actualizan permanentemente

El gen ARNr 23S es más grande (2100 pb) por lo que provee mayor información genética y tiene mayor poder de resolución para la reconstrucción filogenética, pero debido a su gran tamaño, la secuenciación es más difícil y las bases de datos son mucho más pobres.

Una de las técnicas más usada en los estudios de ecología microbiana de comunidades procariotas, es la técnica de PCR utilizando cebadores universales, clonación y secuenciación del gen ARNr 16S, parcial o completa, a partir del ADN genómico de toda la comunidad. Su utilidad se basa en la suposición que la PCR amplifica con igual eficiencia los genes ARNr 16S de los distintos miembros de la comunidad. Es sabido que esta suposición no es del todo correcta y que la PCR tiene en muchos casos cierto sesgo. La presencia de algunas secuencias de ADN cercanas a la región a amplificar que inhiben la reacción, la diferente respuesta de la amplificación según la cantidad de ADN molde y el número de ciclos, la cantidad en la que se encuentran las distintas especies originalmente en la comunidad o la eficiencia del método de extracción de ADN sobre las distintas especies, son algunos de los factores que pueden afectar el análisis de diversidad al utilizar técnicas PCR dependientes (Reysenbach et al., 1992; Wilson y Blitchington, 1996; Hansen et al., 1998, Webster et al., 2003; Liphay et al., 2004). Aún así, todos los trabajos en ambientes naturales, procesos industriales, sitios contaminados o la microflora de seres vivos, utilizan en mayor o menor medida metodologías que involucran PCR.

La manera más tradicional de aplicar la técnica de amplificación por PCR, clonación y secuenciación al estudio de comunidades procariotas es mediante la construcción de bibliotecas del gen ARNr 16S. Estas bibliotecas pueden hacerse más generales o específicas según los cebadores que se utilicen para la amplificación. Para los estudios de diversidad ambiental de procariotas suelen utilizarse cebadores generales para los dominios *Bacteria* y *Archaea* que permitan amplificar el gen ARNr 16S completo (aproximadamente 1500 pb). En los ambientes extremos, que suelen presentar una diversidad relativamente baja, esta metodología presenta la ventaja que, secuenciando un número razonable de clones, se logra cubrir la diversidad del ambiente y obtener secuencias lo suficientemente largas como para permitir la caracterización

filogenética de los integrantes de la comunidad.

Otra alternativa muy utilizada para esta metodología es la DGGE (Denaturing Gradient Gel Electrophoresis), que consiste en la amplificación del ADN genómico de una comunidad utilizando cebadores modificados que permiten separar los amplicones, en una posterior corrida electroforética en un gel de poliacrilamida con gradiente de agentes desnaturalizantes, según su secuencia primaria. La técnica se basa en suponer que cada banda observada en el gel corresponde, potencialmente, a una especie diferente presente en la comunidad. Así, la técnica de DGGE permite tener una rápida idea de la biodiversidad de un ambiente, e incluso, comparar varios ambientes en la misma corrida electroforética. Esta herramienta de biología molecular también permite caracterizar las comunidades, ya que las bandas del gel pueden ser recortadas, el ADN eluído y secuenciado. A diferencia de la metodología descrita anteriormente, el análisis filogenético y la clasificación taxonómica que pueden hacerse a partir de estas secuencias son mucho más pobres, debido a que los fragmentos que se amplifican son de menos de 600 pares de bases (Muyzer et al., 1993; Cunliffe et al., 2008).

Una variante de la técnica convencional de PCR es la PCR en tiempo real (RT PCR, del inglés real time PCR). Su principal característica es que permite obtener información cuantitativa sobre el número de copias de un determinado gen presente en la muestra original. Esta técnica no es muy utilizada en los estudios de diversidad de comunidades microbianas, principalmente por las numerosas dificultades que tiene la puesta a punto y validación de la técnica. Requiere de la determinación de la eficiencia del método de extracción de ADN de la comunidad y un cuidadoso diseño de los cebadores a utilizar para evitar la formación de productos de amplificación espurios y dímeros de cebadores que interfieren con la cuantificación. La presencia de contaminantes es otro problema importante de la técnica cuando es utilizada en muestras ambientales. Algunos contaminantes, como ácidos húmicos, metales pesados o altas concentraciones salinas, disminuyen la eficiencia de la amplificación y repercuten en los resultados cualitativos. Además de las complicaciones experimentales, la técnica de RT PCR es costosa, ya que requiere un termociclador especial que permita registrar el avance de la reacción de PCR, así como cebadores y preparaciones de la mezcla de reacción específicas. Aún así, existen algunos trabajos sobre comunidades microbianas que utilizan RT PCR tanto con cebadores universales como con específicos para determinadas especies (Liu et al., 2006; Schippers y Neretin, 2006; Bouskill et al, 2012).

Los microarrays son otra de las metodologías PCR dependientes que se han utilizado en algunos trabajos de biodiversidad (Zhou, 2003; Yin et al., 2007; Garrido et al., 2008, Goberna et al., 2012). Consisten en un soporte sólido que forma una matriz de dos dimensiones sobre el

cual se fija un gran número de secuencias cortas de ADN (sondas) con un orden específico. Sobre estas sondas se unirán por similitud de secuencia, fragmentos de ADN de la muestra previamente amplificados y marcados, lo que permitirá su detección posterior. Determinados diseños permiten obtener información semicuantitativa sobre los genes utilizados. Existen distintos tipos de microarrays utilizados en genómica ambiental que se clasifican según cuál sea la diana de sondas que utilicen:

- ✧ **Filogenéticos:** utilizan sondas que hibridan con genes con función taxonómica (ej ARNr 16S)
- ✧ **Genes funcionales:** las sondas son diseñadas para hibridar con genes implicados en el procesos metabólicos
- ✧ **Genómicos:** construidos con ADN genómico de diferentes especies y cepas de colección

La gran ventaja de esta técnica es que permite la detección rápida y en un único paso, de una gran cantidad de genes con muy alta sensibilidad. La principal desventaja es que es una técnica muy costosa debido a la tecnología necesaria para la construcción del soporte y la fijación de las sondas. Además, su puesta a punto y su validación son extremadamente laboriosas.

La herramienta de última generación que más se utiliza en ecología molecular es la secuenciación masiva, destacándose técnicas como la pirosecuenciación e Illumina. Se trata de una metodología PCR dependiente que provee una enorme cantidad de información. La misma puede aplicarse al material genético de toda la comunidad, amplificando y secuenciando pequeños trozos de ADN que luego pueden ensamblarse o analizarse independientemente o aplicarse para la secuenciación de pequeñas porciones de genes específicos (por ejemplo, el gen ARNr 16S). Los fragmentos que pueden obtenerse por pirosecuenciación son cortos, de unos 400 pb aproximadamente, por lo que no permiten hacer estudios filogenéticos de buena calidad, aunque se pueden utilizar para análisis estadísticos sobre la diversidad, abundancia y dominancia de especies en la comunidad. Si bien existen muchos reportes de diversidad microbiana en diferentes ambientes utilizando esta metodología (Delmont et al., 2011, Chong et al., 2012; Cleary et al., 2012; Lynch et al., 2012), su uso aún está restringido por su elevado costo y el gran trabajo bioinformático que requiere el análisis de los resultados crudos de secuenciación.

Las metodologías hasta ahora descriptas, se basan en la amplificación por PCR de un determinado gen y por esto mismo no permiten obtener datos cuantitativos, a excepción de la

técnica de RT PCR. Para realizar una descripción cuantitativa de la biodiversidad procariota de un determinado ambiente, una de las mejores metodologías hasta ahora diseñadas en ecología molecular, es la hibridación in situ con sondas marcadas con fluorescencia (FISH, del inglés Fluorescence *In Situ* Hybridisation) y sus variantes. Las sondas que se utilizan son oligonucleótidos de ADN de aproximadamente 18 a 20 pb que hibridan específicamente con una región complementaria del ARNr 16S del ribosoma procariota y están marcadas con una molécula fluorescente. Las sondas pueden diseñarse con diferente nivel de especificidad, para detectar diferentes grupos taxonómicos, desde muy generales para los dominios *Bacteria* y *Archaea* hasta muy específicas para géneros y especies. Existen muchas sondas reportadas en bibliografía y en la base de datos on line <http://www.microbial-ecology.net/probebase>. La hibridación con sondas específicas se usa generalmente en combinación con alguna tinción que marque todas las células presentes en la muestra, como puede ser DAPI, SyBr Green o naranja de acridina. De este modo, todos los microorganismos de la muestra quedan teñidos de un único color mientras que sólo aquellos que hibridan con la sonda utilizada, se tiñen con otro. Utilizando un microscopio de epifluorescencia con distintos filtros pueden hacerse recuentos de ambas señales y calcular porcentajes de hibridación. Esto permite cuantificar a diferentes niveles taxonómicos los microorganismos presentes en una muestra. Una misma muestra puede hibridarse incluso con dos o más sondas marcadas con distintos fluorocromos específicos para diferentes niveles taxonómicos o distintos genes.

Las metodologías de secuenciación del gen ARNr 16S y FISH son complementarias y a su vez se retroalimentan, ya que a partir de los datos de secuencia pueden diseñarse nuevas sondas específicas para cuantificar especies propias de la muestra. Existen algunas variantes de la técnica, como CARD FISH (Catalysed Reported Deposition) y RING FISH (Recognition of Individual Genes), que la hacen más sensible y así permiten utilizarla para identificación filogenética en muestras complejas o con baja biomasa, o para la detección de genes específicos para alguna función metabólica (Pernthaler et al., 2002; Pratscher et al., 2009).

La diversidad en las comunidades microbianas puede estudiarse no sólo desde la óptica de la filogenética, sino también en base a sus características funcionales y propiedades metabólicas. Esto implica responder la pregunta “¿quiénes están ahí?”, pero también “¿qué están haciendo?”. Para este fin existen diferentes abordajes y técnicas. Una de las más sencillas es la amplificación por PCR de los llamados genes funcionales; estos genes permiten identificar determinadas funciones metabólicas potencialmente presentes en una comunidad. Algunos de estos genes tienen características similares a los cronómetros moleculares y permiten la construcción de árboles filogenéticos. En los últimos años, ha crecido el uso de técnicas de alto rendimiento para

el estudio funcional de comunidades como son la metatranscriptómica, metaproteómica y metabolómica; en ellas se estudian los productos de transcripción de diversos genes funcionales, el perfil proteico completo o determinados metabolitos producto de la actividad de la comunidad, respectivamente. Estas técnicas son muy costosas y difíciles de poner a punto y, si bien brindan gran cantidad de información, no siempre sus resultados son sencillos de interpretar o permiten construir un modelo funcional del ambiente.

Constantemente se están desarrollando nuevas técnicas que permiten conocer mayor cantidad de información de los sistemas y con mayor nivel de resolución. Muchas de estas nuevas técnicas apuntan a conocer “¿quién está haciendo qué?” en una escala en el espacio cada vez menor, desde los cm hasta, prácticamente, el orden de los μm . Un ejemplo de este tipo de metodologías de muy última generación es una que combina la hibridación in situ por CARD FISH con la incubación con sustratos marcados isotópicamente. La técnica permite conocer qué especies de una determinada comunidad participan en qué procesos metabólicos. Para esto el compuesto cuyo metabolismo quiere estudiarse debe ser marcado isotópicamente e incubado con la comunidad para que las células incorporen el sustrato marcado. Luego, una muestra de esta comunidad es filtrada y retenida en membranas que son hibridadas con sondas específicas para detectar un determinado grupo filogenético de interés. La actividad metabólica se determina utilizando Nano SIMS (Nano Scale Secondary Ion Mass Spectroscopy) que tiene altísima sensibilidad y un gran poder de resolución.

Referencias – Sección 1

Aditiawati P., Yohandini H., Madayanti F., Akhmaloka A. (2009) Microbial diversity of acidic hot spring (Kawah Hujan B) in geothermal field of Kamojang Area, West Java-Indonesia. *The Open Microbiol J* 3: 58–66.

Aguilera A., Souza Egipsy V., Gómez F., Amils R. (2007) Development and structure of eukaryotic biofilms in an extreme acidic environment, Rio Tinto (SW, Spain). *Microbial Ecol* 53: 294–305.

Amann R.I., Ludwig W., Schleifer K.H. (1995) Phylogenetic identification and in situ detection of individual microbial cells without cultivation. *Microbiol Rev* 59: 143–169.

Amaral-Zettler L.A., Zettler E.R., Theroux S.M., Palacios C., Aguilera A., Amils R. (2011) Microbial community structure across the tree of life in the extreme Rio Tinto. *The ISME J* 5: 42–50.

Amils R., Gonzalez Toril E., Fernandez Remolar D., Gomez F., Aguilera A., Rodriguez N., Malki M., Garcia Moyano A., Fairen A.g., de la Fuente V., Sanz J.L. (2007) Extreme environments as Mars terrestrial analogs: The Rio Tinto case. *Planetary and Space Science* 55: 370–381.

Aminin A., Warganegara F.M, Aditiawati P., Akhmaloka A. (2008). Simple enrichment and independent cultures to expand bacterial community analysis from Gedongsongo hot spring. *J Biosc Bioeng* 106: 211–214.

Baas Becking L.G.M., Kaplan I.R., Moore D. (1960). Limits of the natural environment in terms of oxidation-reduction potentials. *J Geol* 68: 243–284.

Baker Austin C., Dopson M. (2007) Life in acid: pH homeostasis in acidophiles. *Trends in Microbiol* 15: 165–171.

Benson C.A., Bizzoco R.W., Lipson D.A., Kelley S.T. (2011) Microbial diversity in nonsulfur, sulfur and iron geothermal steam vents. *FEMS Microbiol Ecol* 76: 74–88.

Bouskill N.J., Eveillard D., Chien D., Jayakumar A., Ward B.B. (2012) Environmental factors determining ammonia-oxidizing organism distribution and diversity in marine environments. *Environ Microbiol* 14: 714–729.

Burgess A.E., Unrine J.M., Mills G.L., Romanek C.S., Wiegel J. (2012) Comparative Geochemical and Microbiological Characterization of Two Thermal Pools in the Uzon Caldera,

Kamchatka, Russia. *Microb Ecol* 63: 471–489.

Champdoré M., Staiano M., Rossi M., D'Auria N. (2007) Proteins from extremophiles as stable tools for advanced biotechnological applications of high social interest. *J R Soc Interface* 4: 183–191.

Chong C.W., Pearce D.A., Convey P., Yew W.C., Tan I.K. (2012) Patterns in the distribution of soil bacterial 16S rRNA gene sequences from different regions of Antarctica. *Geoderma* 181: 45–55.

Cleary D.F.R., Smalla K., Mendon-Hagler L.C.S., Gomes N.C.M. (2012) Assessment of variation in bacterial composition among microhabitats in a mangrove environment using DGGE fingerprints and barcoded pyrosequencing. *PLOS ONE* 7: e29380. doi:10.1371/journal.pone.0029380.

Cunliffe M., Schafer H., Harrison E., Cleave S., Upstill Goddard R., Colin Murrell J. (2008) Phylogenetic and functional gene analysis of the bacterial and archaeal communities associated with the surface microlayer of an estuary. *The ISME J* 2: 776–789.

Curtis T.P., Sloan W.T., Scannell J.W. (2002) Estimating prokaryotic diversity and its limits. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 99: 10494–10499.

Delmont T.O., Robe P., Cecillon S., Clark I.M., Constancias F., Simonet P., Hirsch P.R., Vogel T.M. (2011). Accessing the Soil metagenome for studies of microbial diversity. *Appl Environ Microb* 77: 1315–1324.

Donahoe-Christiansen J., D'Imperio S., Jackson C.R., Inskip W.P., McDermott T.R. (2004) Arsenite-oxidizing *Hydrogenobaculum* strain isolated from an acid-sulfate-chloride geothermal spring in Yellowstone National Park. *Appl Environ Microbiol* 70: 1865–1868.

Dopson M., Johnson D.B. (2012) Biodiversity, metabolism and applications of acidophilic sulfur-metabolizing microorganisms. *Environ Microbiol* 14: 2620–2631.

Egorova K., Antranikian G. (2005) Industrial relevance of thermophilic archaea. *Curr Op Microbiol* 8: 649–655.

Ehrlich H.L. (1998) Geomicrobiology: its significances for geology. *Earth Science Rev* 45: 45–60.

Ehrlich H.L. (2002) *Geomicrobiology*. 4th edn. New York, USA, Marcel Dekker Inc.

Ehrlich H.L. y Newman D.K. (2008) *Geomicrobiology*. 5th edn. New York, USA, Marcel Dekker Inc

Fernández-Remolar D.C., Rodríguez N., Gomez F., Amils R. (2003) The geological record of an acidic environment driven by iron hydrochemistry: the Tinto River system. *J Geophys Res* 108: 5080–5095.

Farías M.E, Rascovan N., Toneatti D.M., Albarracín V.H., Flores M.R. (2013) The Discovery of stromatolites developing at 3570 m above sea level in a high-altitude volcanic lake Socompa, Argentinean Andes. *PLoS ONE* 8: e53497. doi:10.1371/journal.pone.0053497.

Fijuwara S. (2002) Extremophiles: Developments of their special functions and potential resources. *J Biosci Bioeng* 94: 518–525.

Finsinger K., Scholz I., Serrano A., Morales S., Uribe-Lorio L., Mora M., Sittenfeld A., Weckesser J., Hess W.R. (2008). Characterization of true-branching cyanobacteria from geothermal sites and hot springs of Costa Rica. *Environ Microbiol* 10: 460–473.

García-Moyano A., González-Toril E., Aguilera A., Amils R. (2007) Prokaryotic community composition and ecology of floating macroscopic filaments from an extreme acidic environment, Río Tinto (SW, Spain). *Syst Appl Microbiol* 30: 601–614.

Garrido P., González Toril E., García-Moyano A., Moreno Paz M., Amils R., Parro V. (2008) An oligonucleotide prokaryotic acidophile microarray: its validation and its use to monitor seasonal variations in extreme acidic environments with total environmental RNA. *Environ Microbiol* 10: 836–850.

Gaston K.J. (1996) *Biodiversity: biology of numbers and difference*. Gastón, K.J. (ed) Blackwell Science. Oxford, Inglaterra.

Goberna M., Gadermaier M., Schoen M.A., Sperl D., Franke Whittle I.H., Wett B., Insam H. (2012) Fingerprinting the microbial communities in organic wastes using oligonucleotide microarrays and real-time PCR. En: *Soil Enzymology in the Recycling of Organic Wastes and Environmental Restoration*. Trasar Cepeda C., Hernández T., García C., Rad C., González Carcedo C. (eds) Springer Berlin Heidelberg, Alemania. pp. 285–298.

Gonzalez Toril E., Llobet Brossa E., Casamayor E.O., Amann R., Amils R. (2003) Microbial ecology of an extreme acidic environment, the Tinto River. *Appl Environ Microbiol* 69: 4853–4865.

Hallberg K.B., Johnson D.B. (2001) Biodiversity of acidophilic prokaryotes. *Adv App.*

Microbiol 49: 37–84.

Hamamura N., Macur R.E., Korf S., Ackerman G., Taylor W.P., Kozubal M., Reysenbach A.-L., Inskeep W.P. (2009) Linking microbial oxidation of arsenic with detection and phylogenetic analysis of arsenite oxidase genes in diverse geothermal environments. *Environ Microbiol* 11: 421–431.

Hansen M.C., Tolker-Nielsen T., Givskov M., Molin S. (1998) Biased 16S rDNA PCR amplification caused by interference from DNA flanking the template region. *FEMS Microbiol Ecol* 26: 141–149.

Horikoshi K., Antranikian G., Bull A.T., Robb F.T., Stetter, K.O. (2011) *Extremophiles Handbook*. Springer, New York, USA.

Huber R., Huber H., Stetter K.O. (2000) Towards the ecology of hyperthermophiles: biotopes, new isolation strategies and novel metabolic properties. *FEMS Microbiol Rev* 24: 615–623.

Irwin J.A. (2012) The role of extremophilic microorganisms and their bioproducts in food processing and production. En: *Extremophiles: Sustainable Resources and Biotechnological Implications*. Singh O.M. (ed) Wiley Blackwell. DOI:10.1002/9781118394144.ch8

Javaux E.J., Marshall C.P. (2005) Tracking the record of early life. En: Steemans P., Javaux E. (eds.) *Pre-Cambrian to Palaeozoic Palaeopalynology and Palaeobotany. Carnets de Géologie / Notebooks on Geology*, Brest, Memoir.

Johnson D.B., Hallberg K.B. (2003) The microbiology of acidic mine waters. *Res Microbiol* 154: 466–473.

Johnson D.B. (2010) The biogeochemistry of biomining. En *Geomicrobiology: Molecular and Environmental Perspective*. Barton L., Mandl M., Loy A. (eds). Dordrecht, Alemania: Springer. pp. 401–426.

Kristjansson J.K., Hreggvidsson G.O. (1995) Ecology and habitats of extremophiles. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 11: 17–25.

Liang C.L., Xia J.L., Nie Z.Y., Yang Y., Ma C.Y. (2012) Effect of sodium chloride on sulfur speciation of chalcopyrite bioleached by the extreme thermophile *Acidianus manzaensis*. *Biores Technol* 110: 462–467.

Lynch M.D.J., Bartram A.K., Neufeld J.D. (2012) Targeted recovery of novel phylogenetic diversity from next-generation sequence data. *The ISME J* 6: 2067–2077.

Lipthaya J.R., Enzinger C., Johnsen K., Amanda J., Sørensen S.J. (2004) Impact of DNA extraction method on bacterial community composition measured by denaturing gradient gel electrophoresis. *Soil Biol Biochem* 36: 1607–1614.

Liu C.Q., Plumb J., Hendry P. (2006) Rapid specific detection and quantification of bacteria and archaea involved in mineral sulfide bioleaching using Real-Time PCR. *Biotechnol Bioeng* 94: 330–336.

Löhr A.J., Laverman A.M., Braster M., van Straalen N.M., Röling W.F.M. (2006) Microbial communities in the world's largest acidic volcanic lake, Kawah Ijen in Indonesia, and in the Banyupahit river originating from it. *Microb Ecol* 52: 609–618.

Loreau M., Naeem S., Inchausti P. (2001) Ecology, biodiversity and ecosystem functioning: current knowledge and future challenges. *Science* 294: 804–808.

Métrich N., Mandeville C.W. (2010) Sulfur in magmas. *Elements* 6: 81–86.

Morozkina E.V., Slutskaya E.S., Fedorova T.V., Tugay T.I., Golubeva L.I., Koroleva O.V. (2010) Extremophilic Microorganisms: Biochemical Adaptation and Biotechnological Application (Review) *Appl Biochem Microbiol* 46: 1–14.

Muyzer G., de Waal E.C., Uitterlinden A.G. (1993) Profiling of complex microbial populations by denaturing gradient gel electrophoresis analysis of polymerase chain reaction-amplified genes coding for 16S rRNA. *Appl Environ Microbiol* 59: 695–700.

Muyzer G., Stams A.J.M. (2008) The ecology and biotechnology of sulphate-reducing bacteria. *Nature Rev Microbiol* 6: 441–454.

Nancucheo I., Johnson D.B. (2012) Selective removal of transition metals from acidic mine waters by novel consortia of acidophilic sulfidogenic bacteria. *Microb Biotechnol* 5: 34–44.

Pearce D.D.W., Moran D. (1994). The economic value of biodiversity. The World Conservation Union. Earthscan Publications Ltd. London, UK.

Pernthaler A., Pernthaler J., Amann R. (2002) Fluorescence in situ hybridization and catalyzed reporter deposition for the Identification of Marine Bacteria. *Appl Environ Microbiol* 68: 3094–3101.

Prakash O., Shouche Y., Jangid K., Kostka J.E. (2013) Microbial cultivation and the role of microbial resource centers in the omics era. *App Microbiol Biotechnol* 97: 51–62.

Pratscher J., Stichternoth C., Fichtl K., Schleifer K.H., Braker G. (2009) Application of

Recognition of Individual Genes-Fluorescence In Situ Hybridization (RING-FISH) to detect nitrite reductase genes (*nirK*) of denitrifiers in pure cultures and environmental samples. *Appl Environ Microbiol* 75: 802–810.

Quintana M., Curutchet G., Donati E. (2001) Factors affecting the chromium(VI) reduction by *Thiobacillus ferrooxidans*. *Biochem Eng J* 9: 11–15

Reysenbach A.L., Giver L.J., Wickham G.S., Pace N.R. (1992) Differential amplification of rRNA genes by polymerase chain reaction. *Appl Environ Microbiol* 58: 3417–3418.

Rothschild L.J., Mancinelli R.L. (2001) Life in extreme environments. *Nature* 409: 1092–1101.

Schippers A., Neretin L.N. (2006) Quantification of microbial communities in near-surface and deeply buried marine sediments on the Peru continental margin using real-time PCR. *Environ Microbiol* 8: 1251–1260.

Thauer R.K., Kunow J. (1995) Sulfate-Reducing Archaea. En: *Sulfate-Reducing Bacteria*. Barton L.L (ed) *Biotechnology Handbooks V. 8*. Springer, New York, USA. pp. 33–48

Urbieta M.S., Vicente M., Yagnentkovsky N., Willis Poratti G.M., Viera M.R., Donati E.R. (2011) Bioprecipitación de metales pesados. En: *Bioprocesos: Tecnologías limpias para la protección y sustentabilidad del medio ambiente*. G. Aroca, D. Cantero (eds). Ediciones Universitarias de Valparaíso (Valparaíso, Chile), (en prensa; ISBN: 978-956-17-0462-6)

Viera M., Donati E. (2004) Microbial processes for metal recovery from waste products. *Current Topics Biotechnol* 1: 117–127.

Webster G., Newberry C.J., Fry J.C., Weightman A.J. (2003) Assessment of bacterial community structure in the deep sub-seafloor biosphere by 16S rDNA-based techniques: a cautionary tale. *J Microbiol Meth* 55: 155–164.

Wilson K.H., Blitchington R.B. (1996) Human colonic biota studied by ribosomal DNA sequence analysis. *Appl Environ Microbiol* 62: 2273–2278.

Yim L.C. (2007) Ecology of naturally occurring thermophilic communities in the Tibet Autonomous region (China). Thesis Doctor of Philosophy at The University of Hong Kong.

Yin H., Cao L., Qiu G., Wang D., Kellogg L., Zhou J., Dai Z., Liu X. (2007) Development and evaluation of 50-mer oligonucleotide arrays for detecting microbial populations in Acid Mine Drainages and bioleaching systems. *J Microbiol Meth* 70: 165–178.

Zhou J. (2003) Microarrays for bacterial detection and microbial community analysis. *Current Op Microbiol* 6: 288–294.

Zinger L., Lique-Gobet A., Pommier T. (2012) Two decades of describing the unseen majority of aquatic microbial diversity. *Molec Ecol* 21: 1878–1896.



Sección 2

Sistema geotermal Copahue-Caviahue.

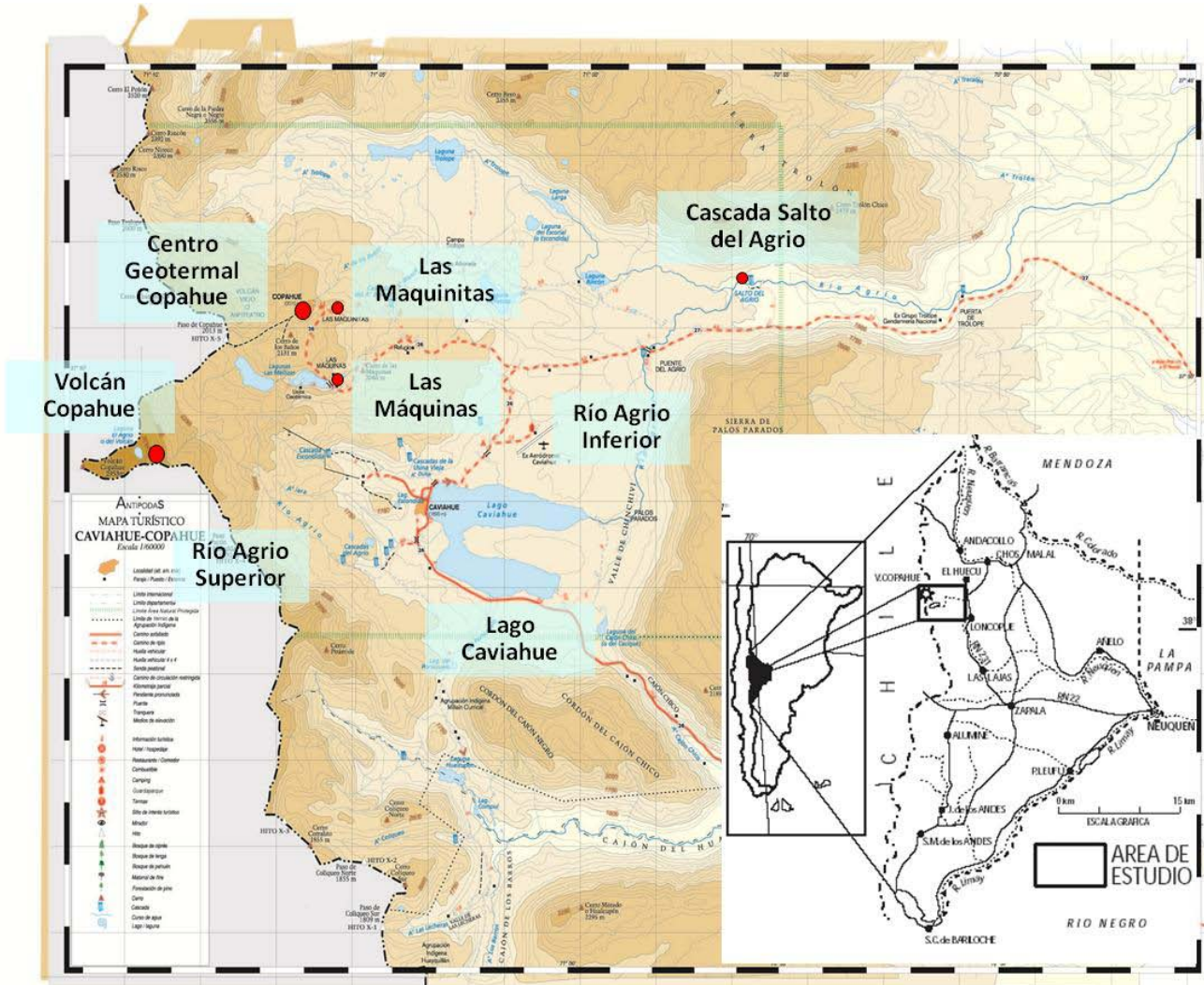
Presentación de los lugares de estudio

En la lengua indígena mapuche Copahue significa “lugar de azufre”. El descubrimiento de las termas de Copahue cuenta con una leyenda aborígen:

Copahue era un cacique muy cruel con los pueblos sojuzgados por él, pero un día estas tribus le dieron muerte. Sus restos fueron sepultados en el volcán que tomó su nombre. Su hijo mayor se trasladó desde Chile para vengar su muerte y durante el periplo, el guerrero quedó prendado de una joven llamada “Pire Rayen (en mapuche: “flor de nieve”) y volvió con ella a sus dominios. La tribu no aceptó a la forastera y se alzó contra Copahue quien murió combatiendo. Lo enterraron en el mismo sitio donde se conocieron los amantes. Al excavar la fosa saltó el chorro de agua hirviente que dio origen a las termas.

La región geotermal de Copahue abarca un sector de la Cordillera Norpatagónica, al noroeste de la provincia de Neuquén, en límite con Chile. Esta zona volcánica se encuentra localizada en el departamento de Ñorquín, encuadrado entre las coordenadas 37° 47´ y 37° 55´ latitud S y 70° 55´ y 71° 10´ longitud O y presenta una superficie total aproximada de 28.300 ha. La Figura 2.1 muestra un mapa esquemático de la región, donde se destacan en forma general las zonas relevadas en este trabajo. La zona de estudio forma parte del Parque Provincial Copahue, que fue declarado Área Protegida en 1963 a través del Decreto Ley Provincial 387/63, con la finalidad de proteger las condiciones naturales de la región y preservar las especies y la diversidad genética.

Figura 2.1 Mapa esquemático de la zona geotermal de Copahue donde se resaltan algunas locaciones importantes para el presente trabajo de tesis. En el extremo inferior izquierdo se muestra la ubicación del área de estudio en un mapa de la República Argentina.



Esta región volcánica se escogió para este trabajo de tesis doctoral debido a sus particulares características fisicoquímicas, en especial altas temperaturas y bajos valores de pH, producto de su origen geológico. En esta sección se realiza una descripción de la geología y geoquímica de la zona con el fin de dar un contexto al estudio de diversidad microbiana realizado. En cada sección de presentación y discusión de resultados se indicarán las características fisicoquímicas particulares de cada uno de los puntos de muestreo relevados.

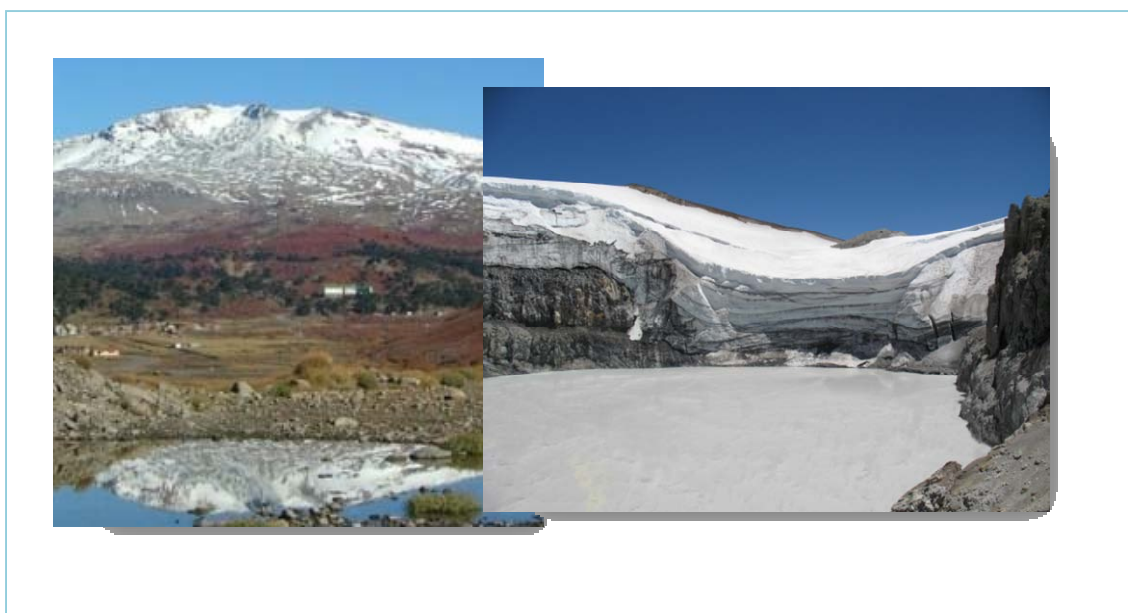
2.1. Volcán Copahue

El volcán Copahue ($37^{\circ} 51' S$ y $71^{\circ} 10' O$) con una altitud de 2977 m sobre el nivel del mar (m.s.n.m.), forma parte del Complejo Efusivo Copahue-Caviahue. La evolución de éste comenzó con la actividad volcánica en el Mioceno superior (Muñoz Bravo et al., 1989) y continúa hasta el presente (Mas, 1993; Delpino y Bermúdez, 1993; Varekamp et al., 2001). Efectivamente, desde fines de Diciembre del año 2012 el volcán da muestras de que aún continúa en actividad, aunque no llegó a sufrir una erupción según los expertos.

El volcán Copahue se encuentra en el extremo sudoeste de la caldera del Agrio. Esta estructura es parte de una serie de formas cuadrangulares alineadas con el arco volcánico cuaternario y que está controlada por dos juegos de fallas ($N 70^{\circ}O$ y $N 30^{\circ}E$) que establecen una zona deprimida de 20 por 15 Km. En el interior de la misma se desarrollaron fosas tectónicas, y asociados a este tipo de estructuras se observan manifestaciones termales activas tales como fumarolas, manantiales calientes, conos de barro, olletas y lagunas, agrupadas en cinco zonas principales: Centro Termal Copahue, Las Máquinas, Las Maquinitas, Anfiteatro y Chancho-Co, esta última en territorio chileno. Todas ellas se hallan sobre el pilar tectónico ubicado al noreste del Volcán Copahue.

En el cráter del volcán Copahue se aloja una laguna cuya composición tienen marcadas diferencias con la de las aguas del resto de la zona por su elevada mineralización y altas concentraciones de cloruro y HCl. Su formación se debe esencialmente a lluvias y deshielos y los gases volcánicos de las fumarolas (H_2S , SO_2 , NH_3 , Cl_2) causan su mineralización. Las aguas son intensamente ácidas, con valores de pH entre 0,2 y 1,1, y temperaturas registradas en un amplio rango, desde aproximadamente $10^{\circ}C$ hasta temperaturas cercanas a las de ebullición del agua a la altitud de volcán, cuando las medidas se realizaron cerca de los períodos eruptivos (Varekamp et al., 2009). El nivel de la laguna se modifica permanentemente, llegando incluso a desaparecer luego de la erupción del volcán en el año 2000. A partir de ese punto, su nivel ha aumentado, pero aun así el acceso es prácticamente imposible y, debido a esto, sus aguas no pudieron recolectarse para ser incluidas en el presente estudio de diversidad microbiana.

Figura 2.2 Vista del volcán Copahue desde el Lago Caviahue e imagen de la laguna del cráter desde la cima del volcán.



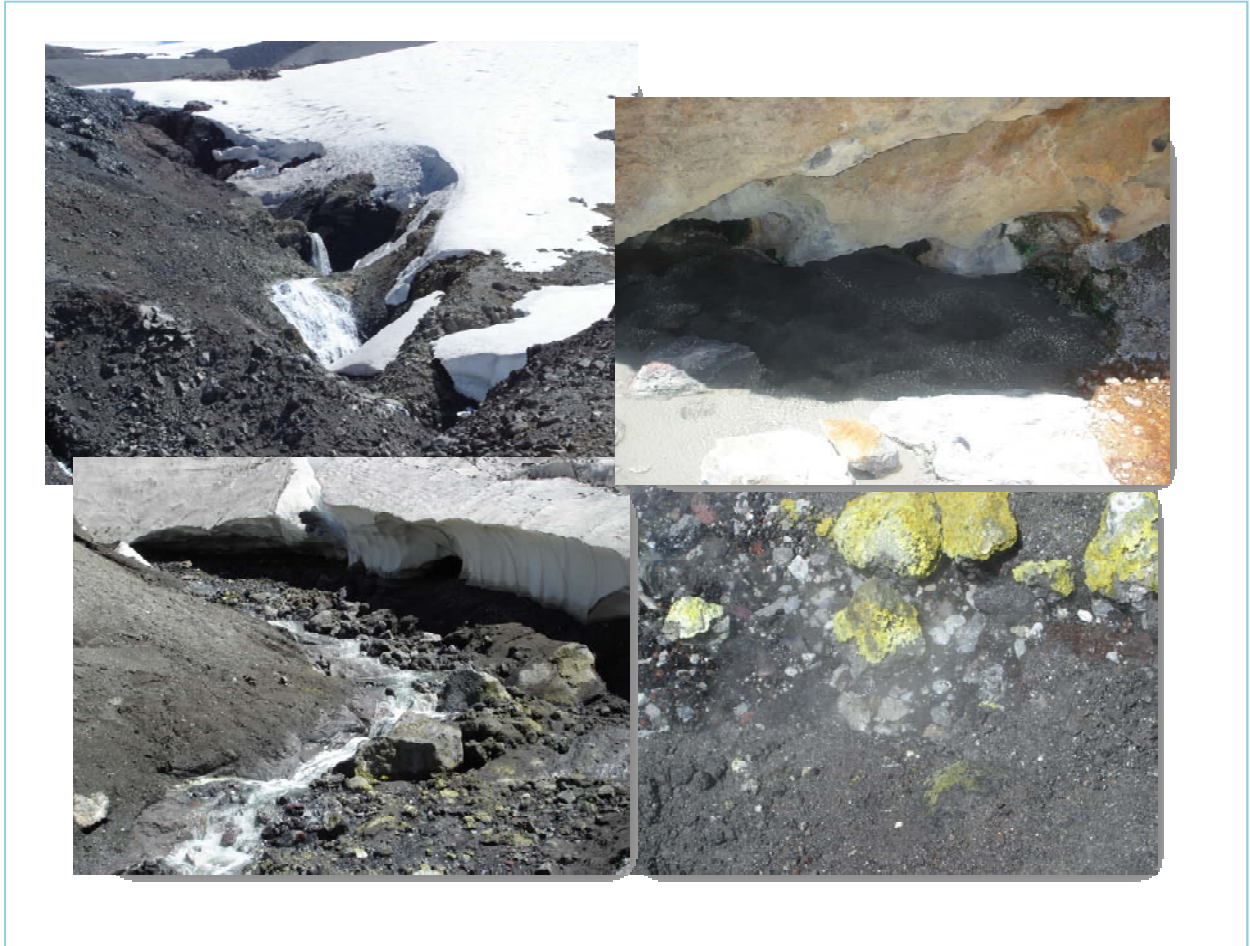
2.2. Río Agrio

Unos 100 metros debajo de la laguna del cráter, a 2740 m.s.n.m., en la ladera este del volcán Copahue, se encuentran dos afluentes termales de aguas ácidas (con valores de pH entre 0,3 y 2,3). La vertiente orientada hacia el sur se considera la naciente del Río Agrio. Unos metros más abajo se localizan los puntos que en este trabajo (y en las publicaciones al respecto) denominamos Vertiente del Agrio 1 y 2 (VA1 y VA2). Los cursos de agua originados en ambas vertientes se unen en un punto, que llamamos Unión dos vertientes (U2V), para formar el cauce del Río Agrio Superior (RAS). La Figura 2.3 muestra algunas fotografías tomadas en estos puntos.

Parámetros como temperatura, pH, contenido de sales y composición isotópica de las vertientes son variables en el tiempo y difieren de los valores medidos en la laguna del volcán. Si bien las tres fuentes tienen un alto contenido de aguas meteóricas, reciben pulsos de gases volcánicos ricos en azufre y fluidos magmáticos, con alto contenido de aniones y cationes, que varían de acuerdo a los ciclos eruptivos del volcán Copahue. Otra fuente de variación en la composición química del agua de las vertientes está asociada a los cambios en el caudal de las mismas, producto de los diferentes aportes de agua por deshielo o precipitaciones (Varekamp,

2004; Parker et al., 2008; Varekamp et al., 2009).

Figura 2.3 Imágenes del Río Agrio Superior en la zona cercana a las vertientes

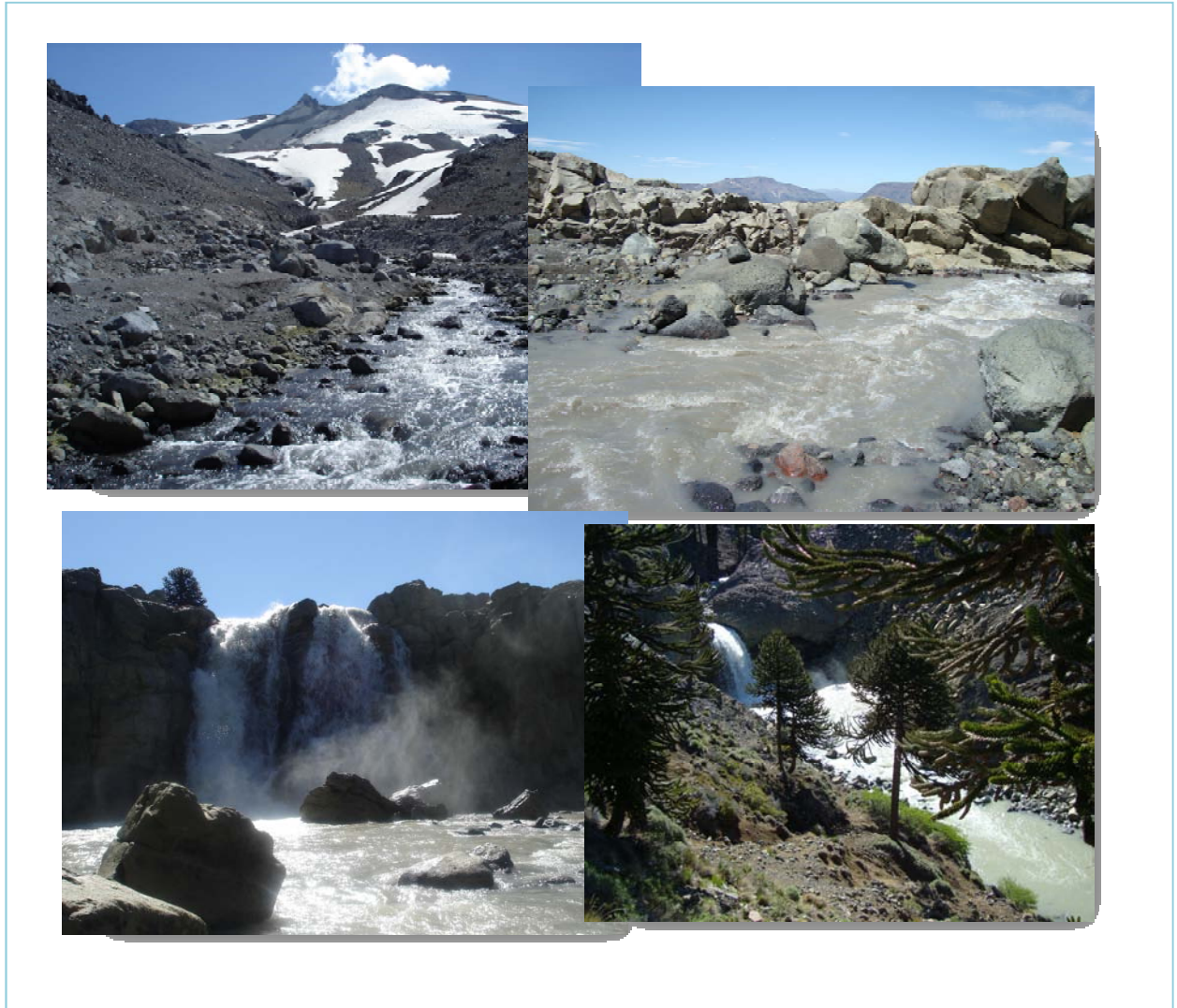


El caudal promedio del RAS es de $2.24 \text{ m}^3/\text{s}$; el río tiene una extensión de 13,5 Km desde su nacimiento hasta la desembocadura en el brazo norte del Lago Caviahue y recorre esta distancia en una pendiente de 8,37 %. El ancho medio del cauce del río es de 5m desde los 5,5 Km hasta los 11,2 Km y de 8 m desde los 11,2 Km hasta la desembocadura en el lago (Rapacioli, 1985).

El río completa su recorrido por la ladera este del volcán, formando una serie de saltos y cascadas, entre las que se destacan las cascadas del Gigante, de la Culebra, Cabellera de la Virgen y Basalto. Algunas de estas pueden observarse en las fotografías de la Figura 2.4. El RAS recibe en su recorrido tres afluentes: el Río Blanco, el Río Rojo y el arroyo Jara. Estos están formados principalmente por aguas de deshielo y así diluyen la composición originalmente geotermal del Río Agrio y producen un gradual aumento de pH a medida que el río baja por la

montaña. Finalmente el RAS descarga sus aguas en el Lago Caviahue, ubicado a 10 Km pendiente abajo de la naciente.

Figura 2.4 Imágenes del Río Agrio Superior y de la zona de las cascadas



El Lago Caviahue es de origen glaciario. Está situado a 1600 m.s.n.m y su posición está determinada por las coordenadas $37^{\circ} 53'$ de latitud S y $71^{\circ} 02'$ longitud O. En la margen oeste se emplaza la localidad de Caviahue, una pequeña villa con una población estable de aproximadamente 1200 habitantes, con gran afluencia de turistas durante todo el año gracias al complejo termal Copahue y a que la zona brinda a la posibilidad de realizar deportes en la nieve en el invierno. El Lago Caviahue es de aguas ácidas, debido al aporte de fluidos del volcán Copahue (Varekamp, 2004). Los valores de pH registrados varían entre 2,1 y 3,7, y la

temperatura de las aguas es de aproximadamente 8°C en la temporada de verano. Posee forma de herradura y sus aguas se distribuyen en dos brazos, Norte y Sur (ver Figura 2.5 y mapa de la Figura 2.1). Tiene aproximadamente 9,75 Km de longitud y 4,72 Km de ancho, su profundidad media es de 51,4 m con un máximo de 100 m. Presenta dos afluentes principales, el Río Agrio Superior (pH 0,5-2,5) y el Río Dulce (pH 7) y como único efluente al Río Agrio Inferior (pH 2,1-6,0) (datos recopilados de Giaveno, 2010). Según un estudio realizado por Gammons y colaboradores (2005), las aguas del lago no presentan variación en su composición y concentración de elementos con la profundidad; en cambio, se observa una dilución respecto de las concentraciones presentes en el RAS debido a la influencia de afluentes tributarios y aguas de deshielo.

Figura 2.5 Imágenes del Lago Caviahue. La foto de la esquina superior izquierda está tomada desde el volcán Copahue y permite ver la forma de herradura del lago.



Luego de su salida del lago, el Río Agrio (ahora denominado Río Agrio Inferior), recorre algo más de 5 Km en un territorio con escasa pendiente y finalmente llega a una espectacular caída llamada Salto del Agrio (Figura 2.6). En esta zona el río es más ancho y sus márgenes están cubiertas de piedras naranjas rojizas debido a la precipitación de minerales de hierro producto del aumento de pH (Gammons et al., 2005). La acidez del RAI disminuye a medida que recibe el aporte de ríos, arroyos y aguas provenientes de los mallines de la región, hasta alcanzar la neutralidad a aproximadamente unos 40 Km de distancia. En el presente trabajo no se analizaron las características del ambiente y la biodiversidad microbiana más allá del Salto del Agrio.

Figura 2.6 Río Agrio Inferior y cascada Salto del Agrio



2.3. Campo Geotermal de Copahue

Las características del campo geotermal de Copahue se comenzaron a estudiar sistemáticamente desde el año 1992, cuando el gobierno de la provincia de Neuquén autorizó el relevamiento del reservorio con la finalidad de aprovechar su potencial geotérmico. Los trabajos incluyeron la perforación de pozos profundos que confirman la presencia de un reservorio de vapor dominante. Los resultados de esos estudios proponen que los fluidos ascienden por sistemas de fallas activas interconectadas en el reservorio. El análisis isotópico sobre agua y vapor, los gases asociados, así como el estudio de relación gas/vapor, permitió probar la existencia de, al menos, dos capas productivas: la más superficial, ubicada entre los 800 y 100 m de profundidad y la más profunda, alrededor de los 1400 m. Las temperaturas, tanto geoquímicas como isotópicas, se encuentran entre 200 y 250°C respectivamente y el análisis de isótopos de carbono, nitrógeno, argón y helio, permitió caracterizar a esos gases como de origen principalmente magmático (Panarello, 2002).

La composición química de las aguas termales fue determinada en el estudio de JICA en el que definen dos tipos principales: bicarbonatadas en la villa de Copahue y sulfatadas en los pozos geotermales. En general, las aguas calientes no tienen origen profundo según se deduce de su composición química e isotópica. Son aguas de un acuífero libre superficial que aumentan su temperatura por pasaje de gases calientes provenientes del reservorio geotermal (Panarello, 2002). En un estudio paralelo (Vallés et al., 2005) se estableció que la mayoría de las aguas en contacto con los fangos son ácidas, con altas concentraciones de iones y presencia de azufre alfa.

En este trabajo se realizó el relevamiento de la diversidad microbiana de tres de las cinco zonas con actividad geotermal del área: Centro Termal Copahue, Las Máquinas y Las Maquinitas. Las mismas serán descriptas a continuación.

2.3.1. Las Máquinas

El sector denominado Las Máquinas se encuentra a 2,2 Km al sur-sureste de la villa Copahue. Consta de aproximadamente 20 hectáreas y está surcado por un arroyo que se inicia a pocos metros al noreste por el rebalse de la laguna Las Mellizas. Este punto fue seleccionado para el presente trabajo por sus condiciones fisicoquímicas pero también por ser el sitio menos

afectado por obras de infraestructura y por la presencia del hombre o de animales. Las instalaciones adyacentes a la laguna principal son propiedad de Gendarmería y están abandonadas.

La zona presenta numerosas fumarolas, algunas con vapor a alta presión, surgentes calientes y pequeños cursos de agua que emanan de estos surgentes. En el sector norte se destaca una laguna artificial caliente de aproximadamente 480 m². En las imágenes de la Figura 2.7 puede observarse que esta laguna (uno de los puntos de muestreo para el relevamiento microbiano) presenta fango de color gris y burbujeo de vapor y gases. Sobre las paredes de las fumarolas se forma azufre y pirita cristalizada; también se encuentra hematita y jarosita en la superficie de las olletas (Valles et al., 2005).

Figura 2.7 Imágenes panorámicas y del agua de la laguna principal en la zona de Las Máquinas



2.3.2. Las Maquinitas

Las Maquinitas es la menor de las manifestaciones termales de la zona. Se seleccionó este punto como representante de los pozos geotermales con condiciones más extremas (mayor temperatura y acidez). Los fluidos termales tienen temperaturas cercanas a la de ebullición del agua a la altitud del campo geotermal de Copahue. Los vapores sobrecalentados, con una temperatura de 132°C, que emanan algunas de las fumarolas y respiraderos dejan depósitos visibles de azufre cristalizado en la superficie más fría de las paredes de las chimeneas. En su estudio sobre la geoquímica del lugar, Panarello (2002) reportó que los gases de las fumarolas son de origen magmático y están formados por CO₂, N₂, CH₄, H₂, Ar, He y CO.

Figura 2.8 Imagen panorámica de la zona de Las Maquinitas y vistas particulares del pozo seleccionado para el relevamiento.



2.3.3. Centro Termal Copahue

El Centro Termal Copahue es un complejo de salud que se encuentra en la villa de Copahue a 1980 m.s.n.m. y a 18 Km de Caviahue, que se construyó aprovechando la mayor de las manifestaciones termales de la zona. El complejo termal, que solo funciona en la temporada de verano (de Diciembre a Abril, debido a las intensas nevadas que lo cubren en invierno), cuenta con servicios de baños en piletas de agua caliente, aplicación de barro e inhalación de vapores adaptados a distintos tratamientos cosméticos y de enfermedades. La extensión y mineralogía de la zona no ha podido ser estudiada en detalle debido a que ha quedado sepultada bajo las continuas construcciones que permitieron el desarrollo urbano de la villa Copahue.

Las principales lagunas del centro termal, todas ellas artificiales y de aguas naturalmente ácidas, se conocen como: Laguna Sulfurosa, Laguna del Chanco, Baño 9, Laguna de las Algas, Agua del Limón y Laguna Verde (dividida en Este y Oeste por un terraplén y un puente). En este trabajo se tomaron muestras para el relevamiento de la diversidad microbiana de Laguna Sulfurosa, Baño 9 y Laguna Verde Este, por ser representativas de las diferentes condiciones, principalmente de temperatura y pH, presentes en la zona. Imágenes de estas lagunas pueden verse en las fotografías de la Figura 2.9. La Laguna Sulfurosa tiene gran cantidad de azufre coloidal disperso y pueden observarse emanaciones de gases en forma continua. La Laguna Verde recibe este nombre de la gran cantidad de microalgas que presenta (esta característica justifica el motivo de su inclusión en este estudio). El sector denominado Baño 9 es particularmente interesante debido a que presenta pozos con variados rangos de pH (2 a 7) y temperaturas que van desde aproximadamente 15°C hasta valores cercanos a la temperatura de ebullición del agua a la altitud del sitio. Se encuentra surcada por pequeños cursos de agua, fumarolas y pozos donde emanar gases. En la zona central se ha construido una pileta artificial para permitir el almacenamiento de aguas y la maduración de barro.

En todos los sitios descriptos de la zona geotermal, entre las fumarolas y pozos de aguas ácidas, se distinguen zonas con menor flujo termal y con aguas más estancadas donde se forman biofilms y estructuras filamentosas (streamer) donde las condiciones son menos extremas que en las aguas (temperaturas moderadas y valores de pH superiores a 3).

Como se mencionó al comienzo, la ubicación y características principales de los puntos específicos de muestro serán descriptos al inicio de cada sección de presentación y discusión de resultados

Figura 2.9 Imágenes de las piletas del centro Termal Copahue de las que se tomaron muestras para realizar el presente trabajo.



2.4. ¿Qué se conoce hasta hoy de la biodiversidad procariota de la zona geotermal de Copahue y el Río Agrio?

Si bien este trabajo y las publicaciones que se han desprendido de él, muestran el primer relevamiento de la diversidad microbiana de la zona utilizando técnicas de biología molecular cultivo independiente, el grupo de investigación del IDEPA, en la Facultad de Ingeniería de la Universidad Nacional del Comahue en Neuquén, y en cooperación con el nuestro, está trabajando desde hace más de 10 años en el enriquecimiento y aislamiento de especies acidófilas de Copahue.

De todos modos, la primera publicación en revistas científicas al respecto pertenece a Wendt-Potthoff y Koschorreck (2002), sin incluir participación de investigadores locales. Estos autores hicieron un estudio semicuantitativo de la ecología microbiana a lo largo del RAS y el Lago Caviahue a partir de los microorganismos cultivables. Para esto realizaron recuentos directos y midieron la actividad de células viables utilizando medios de cultivo específicos para microorganismos hierro-oxidantes, azufre-oxidantes, fermentadores, sulfato-reductores y hierro-reductores en muestras de agua y de sedimentos. Para todos los medios utilizados, la abundancia de bacterias cultivables a partir de las muestras de agua fue siempre muy baja o no detectable. Los autores destacan que la actividad biológica en la naciente y primera parte del río es muy baja, detectando recuentos, muy bajos, únicamente en los medios específicos para azufre-oxidantes y fermentadores. De acuerdo con sus resultados, la actividad microbiana comenzaría a mitad del RAS; en muestras de sedimentos tomadas a partir de esta zona se detectaron crecimientos en todos los medios ensayados y en concentraciones semejantes a las reportadas para otros ambientes similares. Así, los autores proponen que existe un gradiente en la colonización del RAS por bacterias relacionadas con el metabolismo del S y Fe, desde la naciente geotermal, prácticamente estéril, hasta la desembocadura en el lago.

Posteriormente, en una publicación enfocada a la caracterización de especies hierro-oxidantes, Lavalle y colaboradores (2005) del IDEPA y de nuestro grupo, aislaron tres especies de bacterias acidófilas, quimiolitioautótrofas, capaces de oxidar Fe de muestras tomadas en distintos puntos del Río Agrio. A partir de la caracterización morfológica, fisiológica y mediante el uso de enzimas de restricción sobre secuencias del gen 16S rRNA, estos aislados fueron catalogados como cepas autóctonas del género *Acidithiobacillus*, probablemente pertenecientes a la especie *At. ferrooxidans*.

En su trabajo publicado en el año 2010, Chiacchiarini y colaboradores realizaron un relevamiento de los microorganismos acidófilos presentes en el sistema geotermal Copahue-Caviahue, mediante cultivos en diferentes medios líquidos y sólidos. En el trabajo se obtuvieron crecimientos de especies acidófilas, quimioautótrofas y heterótrofas, mesófilas y termófilas de diferentes puntos del Río Agrio y los pozos geotermales. En cuanto a bacterias, reportaron el aislamiento y caracterización de especies relacionadas con *Leptospirillum*, *Sulfobacillus*, *At. ferrooxidans* y *At. caldus*. Dentro del dominio *Archaea* detectaron especies termófilas azufre-oxidantes de la familia *Sulfolobaceae* y otras Fe-oxidantes del género *Ferroplasma*.

El trabajo más reciente que describe algún aspecto de la comunidad microbiana de Copahue es el del aislamiento y la caracterización de la especie *candidatus "Acidianus copahuensis"* (Giaveno et al., 2013). Se trata de una nueva especie de arquea acidófila y termófila, que ha probado gran flexibilidad en su crecimiento en un amplio rango de temperatura y valores de pH. Esta arquea presenta una gran versatilidad metabólica ya que es capaz de oxidar Fe(II) y varios compuestos de S, autotrófica y heterotróficamente, y crecer en forma aeróbica o anaeróbica utilizando diversos donadores y aceptores de electrones. *Candidatus "Acidianus copahuensis"* es una especie autóctona exclusiva de Copahue ya que no hay registros de secuencias del gen ARNr 16S (obtenidas de especies cultivadas o de estudios de metagenómica) similares. Según la base de datos de NCBI las secuencias relacionadas más cercanas corresponden a distintas especies del género *Acidianus* con porcentajes de similitud del aproximadamente 90%.

De acuerdo a lo visto, el relevamiento de la biodiversidad procariota de la zona geotermal de Copahue y el Río Agrio utilizando técnicas cultivo-independientes que es el objetivo de este trabajo de tesis, constituye un aporte fundamental a la caracterización microbiológica del lugar y a la medida de su potencialidad como hábitat de nuevas especies con posibles usos biotecnológicos y biomineros.

Referencias – Sección 2

Chiacchiarini P., Lavallo L., Giaveno A., Donati E. (2010) First assessment of acidophilic microorganisms from geothermal Copahue–Caviahue system. *Hydrometallurgy* 104: 334–341.

Delpino D., Bermúdez A. (1993) La actividad del volcán Copahue durante 1992. Erupción con emisión de azufre piroclástico. *Actas del 12° Congreso Geológico Argentino y 2° Congreso de Exploración de Hidrocarburos (Neuquén)*, p: 292–301.

Gammons C.H., Wood S.A., Pedrozo F., Varekamp J.C., Nelson B., Shope C.L., Baffico G. (2005) Hydrogeochemistry and rare earth element behavior in a volcanically acidified watershed in Patagonia, Argentina. *Chem Geo* 222: 249–267.

Giaveno M.A. (2010) Tesis para optar por el título de Doctor de la Facultad de Ciencias Exactas, Universidad Nacional de La Plata, Argentina.

Giaveno M.A., Urbietta M.S., Ulloa R., González Toril E., Donati E.R. (2013) Physiologic versatility and growth flexibility as the main characteristics of a novel thermoacidophilic *Acidianus* strain isolated from Copahue geothermal area in Argentina. *Microbial Ecol* 65: 336–346.

Lavallo L., Chiacchiarini P., Pogliani C., Donati E. (2005) Isolation and characterization of acidophilic bacteria from Patagonia, Argentina. *Process Biochem* 40: 1095–1099.

Mas L. (1993) El Campo Geotermico de Copahue: Los minerales de alteración y las inclusiones fluidas como indicadores de los parámetros físico químicos del sistema. Tesis para optar al título de Doctor en Geología. Universidad Nacional del Sur. Bahía Blanca, Argentina.

Muñoz Bravo J.O., Stern C., Bermúdez A., Delpino D., Dobbs M.F., Frey F.A. (1989) El vulcanismo de Los Andes. *Revista de la Asociación Geológica Argentina* 44: 270–283.

Panarello H.O. (2002) Características isotópicas y termodinámicas de reservorio del campo geotérmico Copahue- Caviahue, provincia de Neuquén. *Revista de la Asociación Geológica Argentina* 57: 328–340.

Parker S.R., Gammons C.H., Pedrozo F.L., Wood S.A. (2008) Diel changes in metal concentrations in a geogenically acidic river: Rio Agrio, Argentina. *J Volcanol Geoth Res* 178: 213–223.

Rapacioli R.A. (1985) El Lago Caviahue y su Cuenca. Reporte técnico EPAS Oficina de Gobierno de la Provincia de Neuquén, Argentina.

Vallés J., Pettinari G., Baschini M., Grathoff G. (2005) Characterization of muds and waters of the Copahue Geothermal Field, Neuquén Province, Patagonia Argentina. *International Congress of Applied Mineralogy 1*: 507–510.

Varekamp J.C. (2004). Copahue Volcano: a modern terrestrial analog for the opportunity landing site? *Eos* 85: 401–407.

Varekamp J.C., Ouimette A., Herman S., Delpino D., Bermúdez A. (2001) The 1990-2000 eruptions of Copahue, Argentina: a “beehive” volcano in turmoil. *Geology* 29: 1059–1062.

Varekamp J.C., Ouimette A., Herman S., Flynn K.S., Bermúdez A.H., Delpino D.H. (2009) Naturally acid waters from Copahue volcano, Argentina. *App Geochem* 24: 208–220.

Wendt-Potthoff K., Koschorreck M. (2002) Functional groups and activities of bacteria in highly acidic volcanic mountain stream and lake in Patagonia, Argentina. *Microb Ecol* 43:92–106.



Sección 3

Materiales y Métodos

3.1. Sitios de muestreo

Para el presente trabajo de tesis doctoral se utilizaron muestras de cinco pozos geotermales de Copahue y de varios puntos a lo largo del recorrido del Río Agrio. Las características geoquímicas de estas zonas fueron detalladas en la Sección 2. Inicialmente se recolectaron muestras en Diciembre de 2008 que fueron utilizadas principalmente para conocer las características del sistema y poner a punto las técnicas a usar en el trabajo de tesis. Con esta información como base, se recolectaron nuevas muestras en la campaña de Diciembre de 2009 (excepto de los tres primeros puntos del Río Agrio, a donde no se pudo acceder debido a la gran cantidad de nieve presente en la zona) que fueron las que se utilizaron para el presente relevamiento de biodiversidad.

3.1.1. Pozos geotermales

Las muestras de agua que se utilizaron para el análisis de biodiversidad fueron tomadas de los siguientes lugares (entre paréntesis se indican las abreviaturas con las cuales se hará referencia a esos puntos a lo largo de todo el trabajo):

- laguna principal en la zona de Las Máquinas (LMa1)
- Laguna Verde Este (LVE) dentro del complejo termal de Copahue
- Laguna Sulfurosa (LS3) dentro del complejo termal de Copahue
- pileta mayor en la zona de Baño 9 (B9)
- una pequeña fumarola con constante emanación de agua a temperaturas mayores de 80°C y abundante vapor en la zona de Las Máquinas (LMi)

Los cinco pozos utilizados en este estudio se eligieron en base a sus condiciones fisicoquímicas, en particular la temperatura, y se pueden considerar representativos de la gran variedad de ambientes que se encuentran en la región.

3.1.2. Río Agrio

Se tomaron varias muestras de la columna de agua a lo largo del recorrido del río, comenzando en las vertientes en la naciente del río unos metros por debajo del cráter del volcán Copahue, pasando por varios puntos intermedios hasta alcanzar el lago Caviahue frente a la villa homónima, y llegando luego hasta la cascada denominada Salto del Agrio a unos 8 Km del lago.

3.2. Determinaciones fisicoquímicas *in situ*

Los parámetros fisicoquímicos pH, temperatura y conductividad, fueron determinados *in situ* utilizando un multímetro portátil Hanna HI 8424 NEW calibrado contra los estándares correspondientes para cada medida. La concentración de Fe(II) fue medida inmediatamente luego de recolectar las muestras mediante el uso de 1,10-fenantrolina y un espectrofotómetro portátil NanoColor UV/VIS MACHEREY-NAGEL GmbH & Co. KG.

3.3. Toma de muestras para extracción de ADN

Tanto en el río Agrio como en la zona de los pozos geotermales se recolectaron muestras de agua (entre 1 y 2 litros) en recipientes plásticos estériles. Las muestras líquidas fueron inmediatamente filtradas a través de membranas de 0,22 μm de diámetro de poro. Las membranas fueron enjuagadas con agua estéril acidificada con H_2SO_4 (pH 2) para eliminar los metales pesados que pudieran causar hidrólisis del ADN, y luego neutralizadas con buffer TE estéril (10 mM Tris HCl pH 8, 1 mM EDTA). Las membranas con el material celular retenido fueron almacenadas a -20°C hasta realizar la extracción del ADN genómico. Los líquidos filtrados fueron conservados a 4°C para la determinación de metales y aniones o para su eventual uso en el diseño de medios de cultivo específicos para el aislamiento de microorganismos en otros trabajos.

Las muestras de biofilms de los pozos geotermales se recolectaron en tubos Falcon estériles y se almacenaron a 4°C hasta su posterior procesamiento.

3.4. Toma de muestras para hibridación *in situ*

Para una correcta cuantificación de la biodiversidad utilizando técnicas de hibridación *in situ*, las muestras deben ser fijadas en el momento de su recolección. Con este fin, muestras de entre 200 y 1500 μl fueron recolectadas en tubos Eppendorf estériles e incubadas con cantidad suficiente de paraformaldehído para alcanzar una concentración final de 4% p/v. La fijación se realizó a 4°C entre 4 y 16 horas. Una vez transcurrido este tiempo, las muestras fueron diluidas con aproximadamente 15 mL de agua acidificada con H_2SO_4 (pH 2) previamente autoclavada y filtrada. Las células fueron retenidas en membranas Millipore GTTP 0.25 de 0,22 μm de diámetro de poro utilizando un equipo de filtración de campo. Finalmente, las membranas fueron enjuagadas con buffer PBS (130mM NaCl, 7mM Na_2HPO_4 , 3mM NaH_2PO_4 , pH 7,2) previamente autoclavado y filtrado y conservadas a -20°C hasta realizar las hibridaciones correspondientes.

3.5. Determinación de metales y aniones en solución

Se midieron las concentraciones de Ca, Cd, Zn, Fe, Cu, Na, Ni, Pb, Co, Mg, Mn, K y Cr en solución, mediante la técnica de espectrofotometría por absorción atómica, utilizando un espectrofotómetro Shimadzu AA-6650.

La concentración del anión SO_4^{2-} fue determinada por turbidimetría utilizando un exceso de BaCl_2 . La concentración del anión Cl^- fue determinada por titulación con $\text{Hg}(\text{NO}_3)_2$ en presencia del indicador azul de bromofenol (Sclesceri et al., 1998).

3.6. Extracción de ADN, amplificación de los genes ARNr 16S y construcción de las bibliotecas genómicas

Las extracciones de ADN genómico de las muestras se realizaron mediante el kit comercial Fast DNA Spin kit for soil (Bio 101, Carlsbad, CA, USA). En el caso de las muestras de agua, trozos de aproximadamente un cuarto de la membrana se introdujeron en las columnas provistas por el kit. Para la separación de las células de la matriz de las muestras y asegurar su correcta lisis, se utilizó un vórtex común de laboratorio, funcionando durante 10 minutos a máxima velocidad. El resto del protocolo de extracción se realizó de acuerdo a las instrucciones provistas por el fabricante. El ADN genómico de las comunidades microbianas presentes en las muestras fue eluído en 2 alícuotas de 35 µl cada una y almacenado a -20°C. La concentración del ADN obtenido se determinó por absorción a 260 nm utilizando un espectrofotómetro NanoDrop.

Las amplificaciones del gen ARNr 16S de bacterias y arqueas para la construcción de las librerías genómicas se realizaron utilizando los cebadores directos 8F (5'-AGAGTTTGATC(A/C)TGGC-3') para bacterias y 25F (5'-TCYGGTTGATCCYGCCRG-3') para arqueas y el cebador reverso 1492r (5'-TACCTTGTTACGACTT-3') para amplificar ambos dominios (Achenbach y Woese, 1995; Lane, 1991). Los números de los cebadores corresponden a las posiciones del gen ARNr 16S de *Escherichia coli*. Las condiciones del ciclado de PCR fueron las siguientes:

- ✓ 1 ciclo de desnaturalización inicial a 95°C por 5 minutos
- ✓ 38 ciclos de desnaturalización a 95°C por 1 minuto
 - pegado de cebadores por 1 minuto
 - 46°C para los cebadores de bacteria
 - 50°C para los cebadores de arqueas
 - extensión a 72°C por 1 minuto
- ✓ 1 ciclo de extensión final a 72°C por 10 minutos

Las reacciones de amplificación de PCR se realizaron en 50 μL de volumen final, a partir de:

- 5 μL de solución de ADN,
- 10 μL de buffer de reacción 5X (Promega Biotech),
- 5 μL de solución 25 mM de cada uno de los 4 deoxiribonucleótidos,
- 5 μL de solución 5mM del cebador directo,
- 5 μL de solución 5mM de cebador reversos,
- 0,2 μL de Taq polimerasa 1 unidad/mL (Promega Biotech),
- cantidad suficiente para llegar al volumen final de agua calidad biología molecular

Las amplificaciones fueron chequeadas mediante electroforesis en gel de agarosa 1,2%. Se sembraron 5 μL de cada reacción de PCR y se realizó la electroforesis por 30 minutos a voltaje constante de 90V. El gel fue revelado utilizando bromuro de etidio.

Las amplificaciones de PCR que dieron resultados positivos fueron empleadas en la reacción de clonación mediante el kit comercial Topo Ta Cloning Kit (Invitrogen CA, USA). Para la reacción de ligación se utilizaron 2 μL de las amplificaciones de PCR y la mezcla se mantuvo toda la noche a 4°C para maximizar la ligación del fragmento amplificado al vector de clonación. La transformación se realizó utilizando células de *E. coli* One Shot Mach1-T1 Competent Cells provistas por el fabricante (Invitrogen CA, USA).

Para cada una de las librerías de bacterias y arqueas realizadas, se seleccionaron 96 clones y se realizó la extracción automatizada del vector de clonación. La presencia del fragmento correspondiente al gen ARNr 16S inserto se determinó mediante la electroforesis en gel de agarosa 1,2% y la comparación con patrones de peso molecular. En las muestras que se detectaron insertos del tamaño adecuado, se prosiguió con la secuenciación del fragmento del gen ARNr 16S. La reacción de secuenciación se realizó utilizando el kit comercial Big-Dye sequencing kit (Applied Biosystem). La secuenciación completa del fragmento amplificado se realizó en tres etapas, utilizando los cebadores M13F (5'-TGT-AAA-ACG-ACG-GCC-AGT-3') y M13R (5'-CAG-GAA-ACA-GCT-ATG-ACC-3'), cuyas secuencias dianas se encuentran en los extremos del vector de clonación que flanquean al inserto, y un tercer cebador correspondiente a una secuencia en una posición media del inserto: GM5 (5'-CCTACGGGAGGCAGCAG-3') para bacterias y 915 (5'-GTGCTCCCCCGCCAATTCCT-3') para arqueas.

3.7. Análisis de las bibliotecas de secuencias del gen ARNr 16S de arqueas y bacterias

Los cromatogramas arrojados por el equipo de secuenciación fueron transformados al formato de texto FASTA utilizando el software DNA Baser (Trial versión 3.2.52133, Heracle BioSoft). Los tres fragmentos del gen ARNr 16S obtenidos con los tres cebadores utilizados en la secuenciación fueron ensamblados para generar un único contig (secuencia única producto del ensamblaje de dos o más secuencias correlativas) utilizando el mismo software. Además, este programa corta las secuencias a la altura de los cebadores que se utilizaron para la amplificación, eliminando partes inespecíficas, y elimina los nucleótidos de baja calidad (trimming).

Las secuencias fueron analizadas en busca de posibles quimeras utilizando el software on line Bellerophon Chimera Check program (http://greengenes.lbl.gov/cgi-bin/nph-bel3_interface.cgi) y el programa Maillard. Las secuencias detectadas como quimeras por ambos programas fueron eliminadas directamente mientras que aquellas señaladas como posibles quimeras por sólo uno de ellos, fueron analizadas cuidadosamente mediante los alineamientos con diferentes secuencias similares según BLASTn (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov>).

Todas las secuencias ensambladas fueron importadas a una base de datos de más de 50.000 secuencias de genes de ARNr 16S (estructura primaria) mediante el paquete informático ARB (<http://www.arb-home.de>) (Ludwig et al., 2004). Mediante la herramienta adecuada de ARB, las secuencias fueron alineadas y los alineamientos se corrigieron manualmente para mejorar el resultado. Junto con las secuencias de bacterias y arqueas provenientes de los pozos geotermales de Copahue y del Río Agrio, también se cargaron en la base de datos del ARB y se alinearon una gran cantidad de secuencias similares obtenidas de la base de datos de NCBI (<http://ncbi.nlm.nih.gov>) para mejorar los alineamientos y enriquecer los árboles filogenéticos que se construirían luego.

Para poder comparar la riqueza de especies de los distintos puntos, tanto en el Río Agrio como en los pozos geotermales de Copahue, aún cuando las muestras tuvieran diferente tamaño (bibliotecas de clones con diferente número de secuencias), se realizó un análisis de rarefacción. Este permite calcular el número esperado de especies de cada muestra si todas las muestras fueran reducidas a un tamaño estándar. Es decir, calcula el número de especies esperadas si la muestra tuviera un individuo, luego si tuviera dos y así hasta llegar al número de individuos que efectivamente se analizaron. Con estos datos, se construye la curva de rarefacción y se calcula el

número teórico de especies esperadas. En el presente trabajo, el análisis de rarefacción se realizó utilizando el programa DOTUR (Schloss, 2005) a partir de las matrices de similitud construidas utilizando la herramienta on line de la página web Green Genes (http://greengenes.lbl.gov/cgi-bin/nph-distance_matrix.cgi). Las curvas de rarefacción se construyeron a partir de los datos de 0,03 de divergencia de secuencias (equivalente al 97% de similitud) arrojados por DOTUR. A partir de este programa también se obtuvo el estimador no paramétrico Chao1 (Chao, 1984). Este estimador indica el número de especies en una comunidad basado en el número de especies raras en la muestra, es decir, a las especies que están representadas solamente por un único individuo en esa muestra (singletons) y a las especies representadas por exactamente dos individuos en la muestra (doubletons) (Moreno, 2001). En el caso de las bibliotecas de clones, determina la cantidad de unidades taxonómicas operacionales (OTUs del inglés operational taxonomic units) teóricas de la muestra y, comparándolo con el número de OTUs efectivamente detectados, permite estimar cuán completa fue la cobertura de la diversidad según el muestreo realizado.

Los OTUs fueron seleccionados, utilizando el programa DOTUR y las matrices de similitud construidas con el programa ARB, como aquellas secuencias con similitud menor al 97% respecto de las otras. Para aquellos grupos en los que había varias secuencias con similitudes mayores al 97%, se seleccionó la más larga como la representante de cada OTU. La asignación filogenética de los OTUs se realizó utilizando las herramientas on line Classifier y Taxomatic de la página web Ribosomal Database Project (<http://rdp.cme.msu.edu>).

Los árboles filogenéticos fueron construidos con el software ARB utilizando las correcciones y filtros de Neighbour-Joining y Junkes-Cantor. Se realizaron 1000 réplicas de cada árbol (bootstrap) para dar soporte estadístico a los resultados.

Las secuencias de ARNr 16S representativas de los OTUs seleccionados de bacterias y arqueas de los pozos geotermales están depositadas en la base de datos de NCBI bajo los números de acceso JX989227 a JX989264. Las correspondientes a los OTUs de bacterias y arqueas del río Agrio se encuentran depositadas bajo los números de acceso JN982074 a JN982123.

Como parte de la descripción de las bibliotecas de clones de bacterias y arqueas de los pozos geotermales de Copahue y del Río Agrio, se utilizaron varios índices biológicos calculados utilizando la versión 2.14 del programa PAST (Hammer et al., 2001). Aquí se da una pequeña definición de estos índices (Moreno, 2001) y de cómo fueron utilizados en este trabajo, para facilitar su interpretación en las siguientes secciones:

- **Porcentaje de Cobertura.** Está calculado según lo propuesto por Good (1953) utilizando la fórmula:

$$\% C = (1 - (n_1 / N)) \cdot 100$$

donde n_1 es el número de filotipos que aparecen una única vez en la librería (singletons) y N es el número total de clones en la librería.

Este valor indica el porcentaje de los filotipos presentes en la muestra que son representados por la librería de clones.

- **Índice Shannon (H).** Es un índice de biodiversidad y depende de la cantidad de especies (riqueza) y la cantidad relativa de individuos en cada especie (abundancia). Mide el grado de incerteza con el que puede predecirse a qué especie (en este caso, a qué OTU) pertenecerá un individuo (en este caso, una secuencia de un clon) tomado al azar. Su valor aumenta cuanto más homogénea es la distribución.

Un valor de H igual a 0 significa que todos los individuos de la muestra pertenecen a una única especie. El máximo valor de H se obtiene cuando la distribución de los individuos en las especies presentes es perfectamente homogénea.

- **Índice de Margalef.** Es un índice de riqueza específica y se relaciona con el número de especies (OTUs) y el número total de individuos presentes en la muestra (secuencias de clones de cada librería). Aumenta al aumentar la diversidad de especies en la muestra.
- **Índice de Simpson (D).** Es un índice de dominancia. Mide la probabilidad de que dos individuos (secuencias de clones) tomados al azar pertenezcan a la misma especie (OTU).

Un valor de D igual a 0 significaría diversidad infinita mientras que D igual a 1 significaría que no hay diversidad y todos los individuos pertenecen a la misma especie.

- **Índice de Berger-Parker.** Es otro índice de dominancia. Mide la abundancia relativa de la especie (OTU) más abundante.

- **Índice de Pielou (J).** Es un índice de equitabilidad y describe cómo se distribuye la abundancia. Mide la proporción de la diversidad observada con relación a la máxima diversidad esperada.

Un valor de J igual a 0 indica que no hay equitabilidad y todos los individuos pertenecen a una única especie mientras que un valor de J igual a 1 indicaría equitabilidad absoluta, es decir, todas las especies serían igualmente abundantes.

- **Estimador de la riqueza de Chao (S).** Es un estimador del número de especies en una comunidad basado en el número de especies raras en una muestra. Por especies raras se refiere a aquellas que están representadas solamente por un único individuo en esa muestra (número de “*singletons*”) y las representadas por exactamente dos individuos en la muestra (número de “*doubletons*”). Se utiliza para predecir el número máximo teórico de especies en una muestra

3.8. Hibridaciones *in situ*: FISH y CARD-FISH

La técnica de FISH (Fluorescence *In Situ* Hybridisation) se llevó a cabo siguiendo el protocolo descrito por Amann (1995). Las hibridaciones con sondas de diferente especificidad se realizaron sobre porciones independientes de las membranas sobre las que se encontraban fijadas las muestras. Las hibridaciones se realizaron en una cámara húmeda formada por un tubo Falcon de 50 mL cubierto por un papel absorbente embebido en solución buffer de hibridación. Las porciones de las membranas a hibridar se colocaron sobre un portaobjetos y se les agregó la mezcla de hibridación compuesta por 1 μ L de solución de sonda y 8 μ L de solución buffer de hibridación (la composición se detalla en la Tabla 3.1). La cámara húmeda con las muestras se incubó durante 2 hs a 46°C en un horno de hibridación en condiciones de oscuridad. Transcurrido este tiempo, las muestras se lavaron sumergiéndolas en un tubo Falcon con 50 mL de solución buffer de lavado (Tabla 3.2) por 20 minutos a 48°C. Luego las muestras se enjuagaron con agua estéril fría, se tiñeron con 5 μ L de solución del colorante DAPI (4',6'-diamidino-2-fenilindol) 1 μ g/ μ L por 5 minutos y se volvieron a enjuagar con agua estéril y etanol. Finalmente, los trozos de membranas se montaron sobre un portaobjetos limpio y seco, se cubrieron con una gota del protector de fluorescencia Vectashield (Vector Laboratories Inc. CA, USA) y se les colocó un cubreobjetos.

Tabla 3.1. Composición de las soluciones buffer de hibridación (volumen final 2mL) según % de formamida de la sonda a utilizar

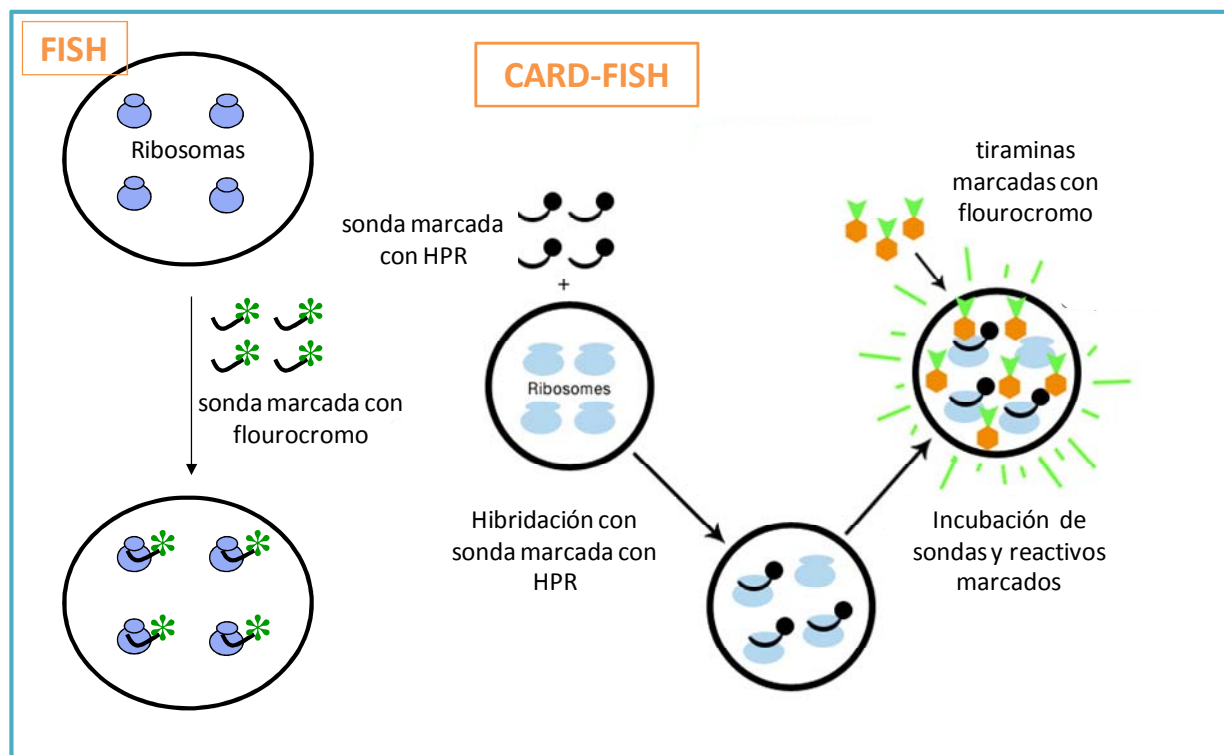
Reactivos	μL de solución				
	20	25	30	35	40
% formamida					
NaCl (5M)	360	360	360	360	360
Tris HCl (1M pH 8)	40	40	40	40	40
Formamida	400	500	600	700	800
Agua	1200	1100	1000	900	800
SDS 5(%)	4	4	4	4	4

Tabla 3.2. Composición de las soluciones buffer de lavado (volumen final 50 mL) según % de formamida de la sonda a utilizar

Reactivos	μL de solución				
	20	25	30	35	40
% formamida					
Tris HCl (1M pH 8)	1000	1000	1000	1000	1000
NaCl (5M)	2150	1490	1020	700	460
EDTA (0.5M pH8)	500	500	500	500	500
Agua	csp 50 ml	csp 50 ml	csp 50 ml	csp 50 ml	csp 50 ml
SDS 5%	100	100	100	100	100

Para la hibridación de las muestras del Río Agrio, que presentaban muy poca biomasa, y para la muestra proveniente de la fumarola de la zona de Las Maquinitas (LMi) que, por el contrario, presentaba alta biomasa y alta cantidad de material autofluorescente, se utilizó la técnica CARD-FISH (Catalysed Reported Deposition Fluorescence *In Situ* Hybridisation). Esta técnica es mucho más sensible que FISH ya que por cada molécula de sonda hibridada se depositan varias moléculas marcadas con el fluorocromo, intensificando la señal de fluorescencia. En CARD-FISH, la sonda está asociada a una enzima peroxidasa (HPR, horseradish peroxidase) que tiene como sustrato tiraminas marcadas con el fluorocromo ALEXA-448. La figura 3.1 muestra esquemáticamente las diferencias entre las dos técnicas de hibridación.

Figura 3.1 Representación esquemática de las técnicas de hibridación in situ FISH y CARD-FISH.



Las hibridaciones con CARD-FISH se realizaron siguiendo el protocolo descrito por Pernthaler (2002), con la excepción de que no se realizó el tratamiento previo con dietil pirocarbonato ya que las muestras no presentaban alta actividad peroxidasa endógena. La permeabilización de las membranas, para permitir el ingreso de la sonda marcada con la enzima peroxidasa, se realizó mediante la incubación por 30 minutos a 37°C con acromopeptidasa (0,6 U/mL concentración final en el buffer 0,01M NaCl, 0,01 M Tris-HCl pH 8,0) y luego lavadas por 1 minuto con agua filtrada y autoclavada. Las peroxidasas fueron inhibidas tratando las membranas con solución 20% de metanol – 0,015% H₂O₂ por 30 minutos a temperatura ambiente.

Las sondas utilizadas para ambas técnicas de hibridación se detallan en la Tabla 3.3. En el caso de FISH, las sondas estaban marcadas en el extremo 5' con el fluorocromo indocarbocianina Cy3. Para CARD-FISH, las sondas estaban unidas a la enzima peroxidasa.

Tabla 3.3. Sondas utilizadas en las hibridaciones por las técnicas de FISH y CARD-FISH. La columna “Abrev.” hace referencia a las abreviaturas utilizadas a lo largo de todo el trabajo en el texto y las figuras.

Sonda	Abrev	Diana	Secuencia Diana (5´-3´)	(%)	Especificidad	Referencia
EUB338 I*	EUB	16S	GCTGCCTCCCGTAGGAGT	0-35	Dominio <i>Bacteria</i>	Amann et al., 1990
EUB338 II*		16S	GCAGCCACCCGTAGGTGT	0-35	<i>Planctomyces</i>	Daims et al., 1999
EUB338 III*		16S	GCTGCCACCCGTAGGTGT	0-35	<i>Verrumicrobia</i>	Daims et al., 1999
ALF968	ALF	16S	GGTAAGGTTCTGCGCGTT	20	<i>Alphaproteobacteria</i>	Neef, 1997
BET42a ^a	BET	23S	GCCTTCCCACCTTCGTTT	35	<i>Betaproteobacteria</i>	Manz et al., 1992
GAM42a ^b	GAM	23S	GCCTTCCCACATCGTTT	35	<i>Gammaproteobacteria</i>	Manz et al., 1992
NTR712c ^c	NTR	16S	CGCCTTCGCCACCGGCCTT	35	Grupo <i>Nitrospirae</i>	Daims et al., 2001
ACD840	ACD	16S	CGACACTGAAGTGCTAAG	10	Género <i>Acidiphilium</i>	Bond et al., 2001
TM1G0138	TM	16S	GCAGTTATCCCCATCAAT	40	<i>Thiomonas</i> grupo 1	Hallberg et al., 2005
TM2G0138		16S	GTAGTTATCCCCATCACA	40	<i>Thiomonas</i> grupo 2	Hallberg et al., 2005
THIO1	THIO	16S	GCGCTTTCTGGGGTCTGC	35	Género <i>Acidithiobacillus</i>	Stoffels, no public.
Aqui-1197		16S	GCATAAAGGGCATAMTGA	30	Orden <i>Aquificales</i>	Rusch et al., 2004
ARCH915	ARCH	16S	GTGCTCCCCGCCAATTCC	20	Dominio <i>Archaea</i>	Massana et al., 1997
NON338		-	ACTCCTACGGGAGGCAGC	35	Control Negativo	Amann et al., 1990

* Las sondas EUBI, EUBII y EUBIII se utilizaron siempre juntas para abarcar la mayor cantidad de especies posibles dentro del dominio *Bacteria*. En el texto se hace referencia a la hibridación con la mezcla de estas tres sondas como EUB338 o simplemente EUB.

^a Usada en conjunto con la sonda competidora GAM42a (5'- GCCTTCCCACATCGTTT -3') (Manz et al., 1992)

^b Usada en conjunto con la sonda competidora BET42a (5'- GCCTTCCCACCTT CGTTT -3') (Manz et al., 1992)

^c Usada en conjunto con la sonda competidora NTR712c (5'-CGCCTTCGCCACCGGTGTTCC-3') (Daims et al., 2001)

3.8.1. Observación al microscopio y recuentos

Las hibridaciones de FISH y CARD-FISH se visualizaron utilizando un microscopio de epifluorescencia Leica DM 2500. Las imágenes fueron adquiridas con la cámara fotográfica Leica DFC 300 FX adosada al microscopio, y su correspondiente software (Leica Microscopy Systems Ltd, Heerburgg, Switzerland). Los recuentos se realizaron utilizando un ocular con grilla y se calculó el promedio de células marcadas en aproximadamente 50 campos. Para las muestras de los pozos geotermales, los porcentajes de hibridación se calcularon como el cociente entre las células hibridadas con la sonda específica y las células teñidas con DAPI en aproximadamente 20 campos. En el caso de las muestras del Río Agrio, debido a la baja biomasa y la alta concentración de material autofluorescente, no pudieron utilizarse los recuentos realizados con la tinción DAPI. Los recuentos de las hibridaciones la sonda EUB tampoco se utilizaron debido a que se obtuvieron valores menores que la suma de los recuentos con las sondas para los grupos taxonómicos de bacterias utilizadas. Debido a ello, y para estas muestras, el recuento de células se calculó como la suma de las hibridaciones con las sondas ALF, BET, GAM, NTR y ARCH. Los porcentajes de hibridación se calcularon dividiendo los valores de recuento obtenidos para cada sonda por la sumatoria de los recuentos de todas las sondas utilizadas.

3.9. Análisis canónico de correspondencia (ACC)

Se utilizó este tipo de análisis estadístico para evaluar las correlaciones entre los parámetros fisicoquímicos y los datos de biodiversidad, ya sean semicuantitativos (recuentos celulares y % de hibridación con las distintas sondas) o de presencia o ausencia de OTUs. Para esto se utilizó el programa CANOCO para Windows versión 4.5 (Microcomputer Power, Ithaca, NY, USA) (ter Braak et al., 2002). ACC es un tipo de análisis de correlación donde se busca el mejor gradiente lineal posible entre un juego de datos multivariados, con la restricción de que los gradientes son combinaciones lineales de las variables explicativas (explanatory variables). En un análisis preliminar realizado con el mismo programa se determinó, según la longitud del gradiente, que debía usarse un enfoque unimodal. Así mismo, CANOCO posee una herramienta de selección de variables que detecta aquellas que están fuertemente correlacionadas y selecciona las que explican mejor la varianza del sistema.

En este tipo de gráficos, la intensidad de la correlación entre las especies (representadas por triángulos) y las muestras (representados por puntos azules) con las variables ambientales se mide por donde la proyección perpendicular de estos puntos corta las flechas rojas de dichas variables (mayor la longitud del segmento determinado por la intersección, mayor la correlación entre esa muestra o especie y la variable ambiental). La intensidad de la correlación entre especies y muestras se mide por la distancia lineal entre sus símbolos. La significancia de los ejes fue determinada utilizando el test de permutaciones de Monte Carlo.

Referencias – Sección 3

Achenbach L., Woese C. (1995) 16S and 23S rRNA-like primers. In *Archaea: a laboratory manual*. Sower K.R., Schreier H.J. (eds). Cold Spring Harbor, New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, pp. 521–523.

Amann R.I. (1995) In situ identification of microorganisms by whole cell hybridization with rRNA-targeted nucleic acid probes. In *Molecular Microbial Ecology Manual*. Akkermans ADL, van Elsas J.D, de Bruijn FJ, editors. Dordrecht, Netherlands: Kluwer Academic Publishers, pp. 1–15.

Amann R.I., Binder, B.J., Olson R.J., Chisholm S.W., Devereux R., Stahl D.A. (1990) Combination of 16S rRNA-targeted oligonucleotide probes with flow cytometry for analyzing mixed microbial populations. *Appl Environ Microbiol* 56: 1919–1925.

Bond P.L, Banfield J.F. (2001) Design and performance of rRNA targeted oligonucleotide probes for in situ detection and phylogenetic identification of microorganisms inhabiting acid mine drainage environments. *Microbial Ecol* 41: 149–161.

Chao A. (1984) Non-parametric estimation of the number of classes in a population. *Scand J Stat* 11: 265–270.

Daims H., Bruhl A., Amann R., Schleifer K.H., Wagner M. (1999) The domain-specific probe EUB338 is insufficient for the detection of all *Bacteria*: development and evaluation of a more comprehensive probe set. *Syst Appl Microbiol* 22: 434–444.

Daims H., Nielsen P., Nielsen J.L., Juretschko S., Wagner M. (2001) Novel *Nitrospira*-like bacteria as dominant nitrite-oxidizers in biofilms from wastewater treatment plants: diversity and *in situ* physiology. *Water Sci Technol* 43: 416–523.

Good I.J. (1953) The population frequencies of species and the estimation of population parameters. *Biometrika* 40: 237–264.

Hallberg K.B., Coupland K., Kimura S., Johnson D.B. (2005) Macroscopic Streamer Growths in Acidic, Metal-Rich Mine Waters in North Wales Consist of Novel and Remarkably Simple Bacterial Communities. *Appl Environ Microbiol* 72: 2022–2030.

Hammer Øyvind D.A., Harper T., Ryan P.D. (2001) PAST: paleontological statistics software package for education and data analysis. *Paleontol Electron* 4: 9–17.

Lane D.J. (1991) 16S/23S rRNA sequencing. In *Nucleic acid techniques in bacterial*

systematics. Stackebrandt E., Goodfellow, M. (eds). Chichester, United Kingdom: John Wiley & Sons, pp. 115–175.

Ludwig W., Strunk O., Westram R. (2004) ARB: a software environment for sequence data. *Nucleic Acids Res* 32: 1363–1371.

Massana R., Murray A.E., Preston C.M., Delong E.F. (1997) Vertical distribution and phylogenetic characterization of marine planktonic *Archaea* in the Santa Barbara Channel. *Appl Environ Microbiol* 63: 50–56.

Manz W., Amann R., Ludwig W., Wagner M., Schleifer. K.H. (1992) Phylogenetic oligodeoxynucleotide probes for the major subclasses of *Proteobacteria*: problems and solutions. *Syst Appl Microbiol* 15: 593–600.

Moreno C.E. 2001. *Métodos para medir la biodiversidad*. M&T–Manuales y Tesis SEA, vol.1. Zaragoza.

Neef A. (1997) Anwendung der in situ-Einzelzell-Identifizierung von Bakterien zur Populations analyse in komplexen mikrobiellen Biozöosen. Ph.D. thesis. Technical University of Munich, Munich, Germany.

Pernthaler A., Pernthaler J., Amann R. (2002) Fluorescence in situ hybridization and catalyzed reporter deposition for the identification of marine bacteria. *Appl Environ Microbiol* 68: 3094–3101.

Rusch A., Amend J.P. (2004) Order-specific 16S rRNA-targeted oligonucleotide probes for (hyper)thermophilic archaea and bacteria. *Extremophiles* 8: 357–366.

Schloss P.D. (2005) Introducing DOTUR, a computer program for defining operational taxonomic units and estimating species richness. *Appl Environ Microbiol* 71: 1501–1506.

Sclesceri L.S., Greenberg A.E., Eaton A.D. (1998) Standard methods for the examination of water and wastewaters. 20th edn. Washington, USA: American Public Health Association.

Ter Braak C.J.F., Smilauer P. (2002). CANOCO reference manual and CanoDraw for Window's user's guide: software for canonical community ordination (version 4.5). Ithaca, USA: Microcomputer Power, pp. 500.



Sección 4

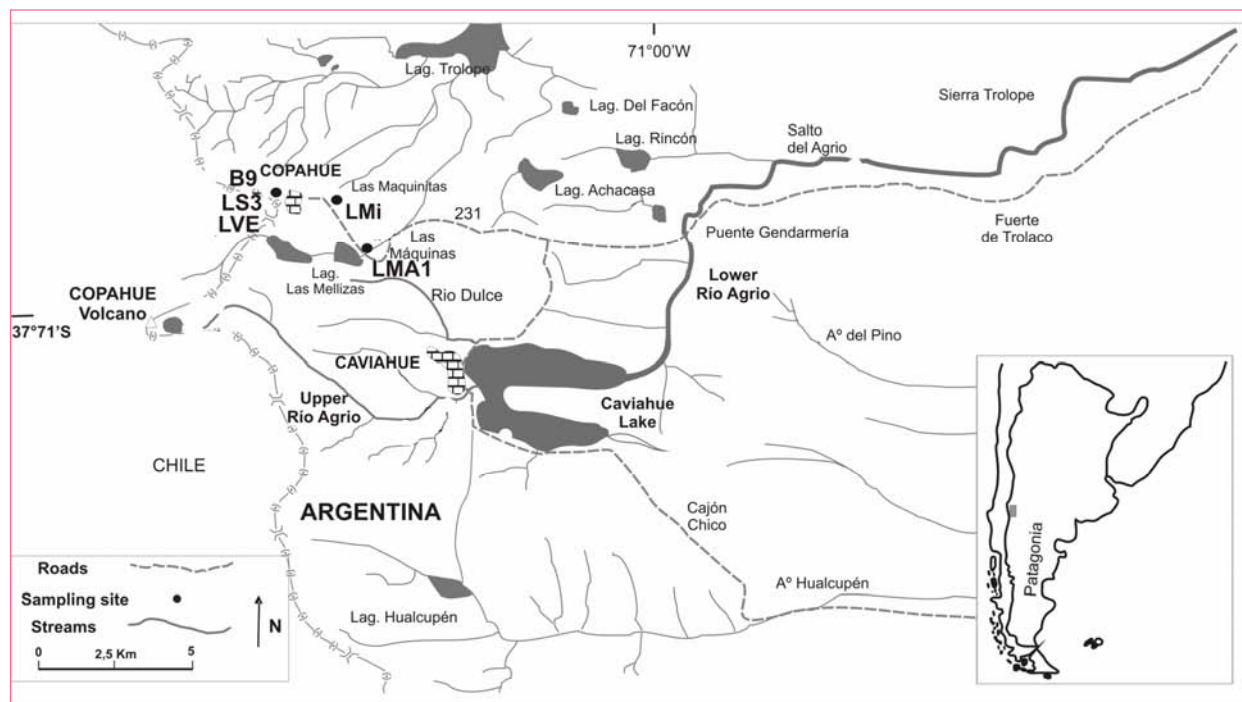
Biodiversidad procariota en los pozos geotermales de Copahue

4.1 Ubicación y características fisicoquímicas de las muestras

En la Sección 2 de este trabajo se presentaron y describieron, en forma general, los sitios elegidos para el relevamiento de la diversidad microbiana de la zona de Copahue-Caviahue. En este apartado se detallarán los lugares puntuales seleccionados y las características particulares de las muestras recolectadas en las zonas de los pozos geotermales.

Para la descripción de la biodiversidad en las aguas de los pozos geotermales se eligieron cinco puntos representativos de las diversas condiciones fisicoquímicas, particularmente temperatura y pH, así como de los distintos grados de intervención antropogénica que se encuentran en la región. Los lugares seleccionados fueron: las lagunas principales en Baño 9 (B9), Laguna Verde Este (LVE), Laguna Sulfurosa (LS3) y Las Máquinas (LMA1) y una pequeña surgente de agua caliente y vapor en la zona de Las Maquinitas (LMi). A lo largo del texto, se hace referencia a estos sitios en forma general como lagunas, piletas o pozos. La Figura 4.1 muestra la ubicación de estos puntos en un mapa de la región.

Figura 4.1 Mapa de la región Copahue-Caviahue donde se marcan los cinco pozos geotermales estudiados.



La Figura 4.2 muestra fotografías de los lugares precisos donde se recolectaron las muestras. Allí puede verse que LVE, B9 y LS3 son grandes piletas dentro del complejo geotermal Copahue, mientras que LMa1 se encuentra en una zona más descampada. Se muestra una imagen de la surgente de agua caliente y vapor en la roca en la zona de LMi.

Figura 4.2 Imágenes de los puntos de toma de muestra en el campo geotermal de Copahue



Las principales características fisicoquímicas de las muestras de agua recolectadas se muestran en la Tabla 4.1. Mediante espectrofotometría de absorción atómica, no se detectaron otros elementos como Cd, As, Zn, Cu, Ni, Pb, Co y Cr.

Tabla 4. 1 Características fisicoquímicas de las aguas de los cinco pozos geotermales analizados. Las concentraciones de aniones y cationes están expresadas en mg/L.

	T°C	pH	Conduct (μS/cm)	Na ⁺	Mg ²⁺	K ⁺	Ca ²⁺	Mn ²⁺	SO ₄ ²⁻	Cl ⁻
LVE	31,5	3,00	1317	7,28	1,07	4,34	4,68	ND	291,80	35,70
LMa1	36,0	3,20	663	ND	0,70	0,48	0,98	ND	119,50	5,30
B9	40,5	2,70	3720	52,55	1,65	4,34	3,78	ND	346,80	2,10
LS3	54,3	3,00	1133	20,54	3,05	10,97	6,67	ND	381,80	56,70
LMi	87,0	2,00	4250	40,48	1,25	9,96	0,54	0,48	618,70	1,80

	Fe (total)	% Fe(II)	% Fe (III)
LVE	3,34	88,66	11,34
LMa1	6,96	13,01	86,99
B9	7,02	-	-
LS3	3,72	38,91	61,09
LMi	32,85	98,68	1,32

ND: No detectado

- : No hay datos

Las cinco muestras de aguas recolectadas son de naturaleza ácida, siendo LMi la que presenta las condiciones más extremas. Los pozos seleccionados son representativos de la variación en las condiciones térmicas que se encuentran en la región. LMa1 y LVE son lagunas de temperatura moderada. No obstante, representan sitios con diferentes niveles de intervención antropogénica (como se mencionó anteriormente, LMa1 se encuentra en una zona alejada que no se utiliza para baños termales públicos, mientras que LVE es parte de las piletas del complejo termal). B9 es un sitio representativo de aquellos con condiciones de temperatura moderada-alta, LS3 es una pileta que representa condiciones de temperatura altas, mientras que LMi muestra condiciones de temperatura altas-extremas (temperaturas cercanas a las de ebullición del agua a

la altitud del lugar).

Las concentraciones de los elementos Na, Mg, K y Ca fueron bajas en todas las muestras. Las concentraciones de cloruro determinadas en todos los pozos están en el orden de las concentraciones normales para el agua dulce (entre 10 y 250 mg/L). Las concentraciones de sulfato, por el contrario, están en todos los casos (excepto para LMa1) por encima de los valores normales para el agua dulce (entre 2 y 150 mg/L), pero alejados del valor promedio del agua de mar (3000 mg/L).

4.2 Clonación del gen ARNr 16S

4.2.1. Análisis de las bibliotecas de clones

El ADN extraído de las muestras de agua de los cinco pozos se empleó como molde para amplificaciones por PCR utilizando cebadores para el gen ARNr 16S de bacterias, arqueas y korarqueas, tal cual se detalla en la Sección 3.6 de Materiales y Métodos. Las reacciones de PCR utilizando los cebadores Kor236F y Kor1236R, específicos para el filo *Korarchaeota*, dieron resultados negativos para todos los pozos. Los cebadores 8F y 1492R, específicos para el dominio *Bacteria*, produjeron amplificaciones con el ADN de las cinco muestras, mientras que la combinación de los cebadores 25F y 1492R, específica para el dominio *Archaea*, dio resultados positivos sólo con el ADN extraído de las aguas de B9, LS3 y LMi.

Las amplificaciones de los genes ARNr 16S, tanto de bacterias como de arqueas, fueron utilizadas para la construcción de librerías de clones. Luego de remover las secuencias de baja calidad, detectar y eliminar las secuencias quimeras (utilizando los programas Mallard y Bellerophone), las librerías que se utilizaron para los estudios de biodiversidad fueron de 198 clones de bacterias y 204 de arqueas. Estas 402 secuencias de más de 800 nucleótidos de extensión y sus secuencias relacionadas detectadas por comparación según BLASTn y descargadas de la base de datos de NCBI, fueron alineadas utilizando el programa ARB. Esta misma plataforma informática se utilizó para seleccionar las secuencias representantes de cada OTU al 97% de similitud (equivalente a una distancia evolutiva de 0,03). Más detalles sobre estos procedimientos pueden encontrarse en la Sección 3.7 de Materiales y Métodos.

Las Tablas 4.2 y 4.3 muestran las características numéricas y varios índices biológicos para las librerías de bacterias y de arqueas, respectivamente. Los porcentajes de cobertura de las

bibliotecas, según el parámetro de Good, son altos, en general; se determinaron porcentajes superiores al 90% en la mayoría de los casos y del 100% para dos de las tres bibliotecas de clones de arqueas. Estos resultados garantizan el correcto uso de los otros índices para la descripción y comparación de la riqueza, diversidad, equitabilidad y dominancia de las muestras. La descripción de los índices de diversidad utilizados se encuentra en la Sección 3.7 de Materiales y Métodos.

Tabla 4. 2. Características numéricas e índices biológicos de las bibliotecas de clones de bacterias

	LVE	LMa1	B9	LS3	LMi
Nº clones analizados	56	56	12	22	52
% Quimeras (descartadas)	9,7	13,4	4,2	18,5	10,3
OTUs (97%) ^a	12	4	3	4	5
Singletons ^b	3	2	2	2	2
Cobertura de la biblioteca ^c	91%	96%	83%	91%	96%
Shannon (H)	2,043	0,3857	0,5661	0,923	0,9994
Margalef	2,733	0,7453	0,8049	0,9705	1,0120
Dominancia (D) ^d	0,1684	0,8329	0,7083	0,4835	0,4438
Equitabilidad (J) ^e	0,8223	0,2782	0,5153	0,6658	0,6210
Berger-Parker ^f	0,3036	0,9107	0,8333	0,6364	0,5769
S Chao1 ^g	12	4	3	4	6

^a OTUs definidos al 97% de similitud entre las secuencias

^b OTUs representados solamente por una única secuencia

^c Porcentaje de cobertura de la biblioteca para OTUs definidos al 97% de similitud entre las secuencias (Good, 1953)

^d Según índice de Simpson

^e Según índice de Pielou

^f representa la abundancia del OTU más abundante

^g Estimador de la riqueza de Chao (Chao 1984)

La biblioteca de bacterias del punto LVE presenta la mayor riqueza de especies y mayor biodiversidad según los índices de Margalef y Shannon, respectivamente. Además, esa muestra tiene el mayor índice de equitabilidad y el menor índice de dominancia, lo que indica que las

secuencias están distribuidas de forma más homogénea en los OTUs.

Por el contrario, la biblioteca de clones de bacterias construida a partir del ADN extraído de la muestra de agua del punto LMa1 es la menos rica y diversa, mostrando los valores de índices de Margalef y Shannon más bajos entre los cinco puntos analizados. El índice de riqueza específica de Margalef es más bajo que en LVE, aún cuando se trata del mismo número de clones, debido a que estos se distribuyen en LMa1 en apenas cuatro OTUs. El índice de diversidad de Shannon es más bajo porque la distribución de las secuencias en estos cuatro OTUs es muy heterogénea, tal cual lo muestran los altos valores de los índices de dominancia de Simpson y de Berger-Parker.

La biblioteca de la muestra B9 tiene características similares a las de la biblioteca de LMa1 pero menos extremos; presenta un OTU dominante (alto índice de Berger-Parker) y el resto de las secuencias están distribuidas entre los otros dos OTUs detectados.

Las otras dos bibliotecas de bacterias muestran situaciones intermedias entre las representadas por LVE y LMa1. En ellas, las secuencias de clones están distribuidas en una forma relativamente homogénea en los OTUs (índices de dominancia y equitabilidad de LS3 y LMi entre 0,4838 y 0,6658).

Tabla 4. 3. Características numéricas e índices biológicos de las bibliotecas de clones de arqueas

	B9	LS3	LMi
Nº clones analizados	19	90	95
% Quimeras (descartadas)	0	0	0
OTUs (97%)^a	4	7	1
Singletons^b	0	3	0
Cobertura de la biblioteca^c	100%	97%	100%
Shannon (H)	1,194	0,805	0
Margalef	1,019	1,125	0
Dominancia (D)^d	0,3573	0,6086	1
Equitabilidad (J)^e	0,8615	0,4493	0
Berger-Parker^f	0,5263	0,7647	1
S Chao1^g	4	7	1

^a OTUs definidos al 97% de similitud entre las secuencias

^b OTUs representados solamente por una única secuencia

^c Porcentaje de cobertura de la biblioteca para OTUs definidos al 97% de similitud entre las secuencias (Good, 1953)

^d Según índice de Simpson

^e Según índice de Pielou

^f representa la abundancia del OTU más abundante

^g Estimador de la riqueza de Chao (Chao, 1984)

Tal cual se ha indicado, dos de las tres bibliotecas de clones de arqueas presentan una cobertura del 100%; esto significa que, según este análisis, toda la diversidad de la muestra fue detectada mediante la clonación del gen ARNr 16S. Además, las tres bibliotecas mostraron 0% de secuencias quimeras.

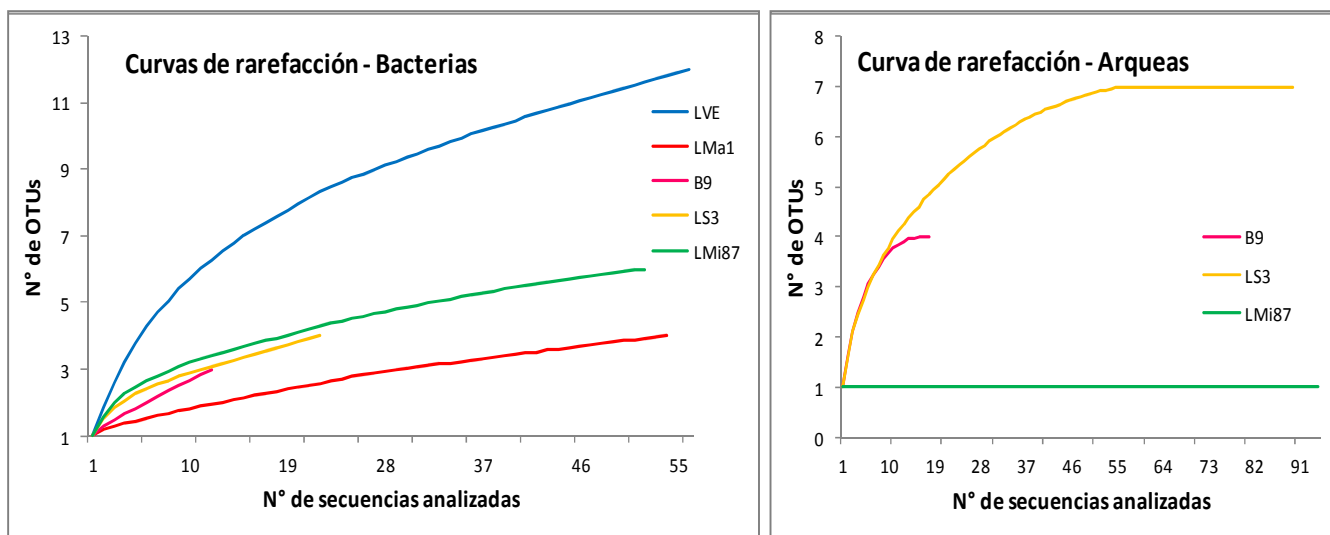
La biblioteca de arqueas del punto LMi es un ejemplo de “no diversidad”, donde todas las secuencias de clones pertenecen a un único OTU. Así, los índices de Shannon, Margalef y equitabilidad son 0 y los de dominancia de 1.

Las otras dos bibliotecas, a pesar de tener números de clones muy diferentes, pueden compararse porque sus porcentajes de cobertura son altos. La biblioteca de arqueas de B9 tiene mayor índice de Shannon que la de LS3 pero menor índice de Margalef. Probablemente esto se

deba a que LS3 presenta mayor número de OTUs (mayor riqueza específica) pero las secuencias de clones no están repartidas de forma homogénea; en consecuencia, la abundancia de estos OTUs no es la misma y esto hace que disminuya H. La biblioteca de B9 tiene menos OTUs pero sus secuencias están más homogéneamente distribuidas, lo que determina un alto índice de equitabilidad.

También se caracterizaron las bibliotecas de clones de bacterias y de arqueas a través de las respectivas curvas de rarefacción (Figura 4.3). Como se explicó en la Sección 3.7, este análisis permite hacer comparaciones entre el número de especies de distintos puntos aún cuando el tamaño de las muestras no sea igual.

Figura 4.3 Curvas de rarefacción de las bibliotecas de clones de bacterias y arqueas



La figura muestra que las curvas de rarefacción para las cinco bibliotecas de bacterias parecen alcanzar una meseta. Del mismo modo, las tres bibliotecas de clones de arqueas, incluyendo la del punto B9, que tiene menor cantidad de secuencias, también alcanzan una meseta. Este resultado sugiere que la diversidad de bacterias y arqueas ha sido cubierta en gran medida en el muestreo realizado. Además, el estimador de riqueza de Chao (S Chao 1) que se obtiene a partir del análisis de rarefacción (último parámetro de las Tablas 4.2 y 4.3) presenta valores iguales al número de OTUs observado (excepto para la biblioteca de bacterias del pozo LMi donde difiere apenas en un punto). Este dato, sumado a los otros ya analizados, confirma que el esfuerzo de muestreo fue suficiente para detectar toda la diversidad de las muestras mediante la técnica de clonación, secuenciación y selección de OTUs utilizada.

4.3 Biodiversidad en los pozos geotermales de Copahue según las secuencias de genes ARNr 16S encontradas

Las secuencias analizadas permitieron definir OTUs utilizando como punto de corte aproximadamente 0,03 de distancia filogenética, lo que equivale a un 97% de similitud entre las secuencias. La Tabla 4.4 muestra los OTUs detectados en cada pozo junto con la cantidad de clones que pertenecen a cada uno, la secuencia más cercana según BLASTn con su respectivo número de acceso y el porcentaje de similitud.

Tabla 4.4. OTUs de bacterias y arqueas detectados en las aguas de los cinco pozos geotermales de Copahue analizados

OTU	Nº de clones (%)	Secuencia más cercana por BLASTn	Nº de acceso	% Similitud
LVE_bact_d5	20 (36)	<i>Acinetobacter baumannii</i>	FN563422	100
LVE_bact_f5	2 (3)	<i>Pseudomonas stutzeri</i>	FR667891	99
LVE_bact_b11	7 (12)	<i>Thiomonas sp.</i>	AJ549219	99
LVE_bact_b5	2 (3)	<i>Massilia timonae</i>	NR026014	100
LVE_bact_c7	10 (18)	<i>Acidithiobacillus thiooxidans</i>	JQ034367	99
LVE_bact_a6	1 (2)	<i>Paracoccus sp.</i>	DQ985064	99
LVE_bact_g2	1 (2)	Clon obtenido de un cultivo de enriquecimiento para Fe reductores	FJ269053	99
LVE_bact_g10	6 (11)	<i>Acidiphilium sp.</i>	AY495956	99
LVE_bact_c6	6 (11)	<i>Anoxybacillus flavithermus</i>	EU816689	99
LVE_bact_c8	1 (2)	<i>Hydrogenobaculum sp.</i>	AJ320225	92
LMa1-bac_h3	51 (91)	<i>Thiomonas sp</i>	AJ549220	99
LMa1-bac_f2	1 (2)	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	AY169434	100
LMa1-bac_g5	3 (5)	<i>Acidithiobacillus sp.</i>	AY830697	99
LMa1-bac_h5	1 (2)	<i>Phyllobacterium sp.</i>	FJ178785	99
B9_bact_e5	1 (8)	Bacteria no cultivada	AB593908	96
B9_bact_b10	1 (8)	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	AY169434	100
B9_bact_d3	10 (84)	<i>Hydrogenobaculum sp</i>	AJ320225	92
B9_arch_f6	2 (10)	Arquea no cultivada	AB600329	99
B9_arch_h12	10 (53)	Arquea no cultivada	AY627859	96
B9_arch_d12	3 (16)	<i>Sulfolobales</i> sin cultivar	AF169011	96
B9_arch_b7	4 (21)	Arquea no cultivada	AB007307	86
LS3_bact_b8	14 (64)	<i>Pseudomonas putida</i> (ATCC17485)	D85994	99
LS3_bact_b12	6 (26)	<i>Achromobacter xylosoxidans</i>	AF439314	99
LS3_bact_h2	1 (5)	<i>Ochrobactrum lupini</i>	NR042911	99
LS3_bact_h10	1 (5)	<i>Mesorhizobium sp.</i> No cultivado	FJ529846	99
LS3-arch_e10	65 (72)	Arquea no cultivada	AY627859	96
LS3-arch_d11	5 (6)	<i>Sulfolobus tokodaii</i>	NR028609	96
LS3-arch_a7	1 (1)	<i>Acidianus sp.</i> ALE_1; <i>candidatus</i> "Acidianus copahuensis"	JQ513288	99
LS309-arch_a1	12 (13)	<i>Sulfolobales</i> sin cultivar	AF169011	95
LS3-arch_d9	5 (6)	Arquea no cultivada	DQ383368	94
LS3-arch_f5	1 (1)	<i>Vulcanisaeta distributa</i>	NR040876	95
LS3-arch_h5	1 (1)	<i>Thermocladium modestius</i>	NR040779	95

LMi_bact_f10	3 (6)	<i>Delftia acidovorans</i>	AB074256	99
LMi_bact_g10	17 (32)	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	AY169434	100
LMi_bact_f8	30 (58)	<i>Phyllobacterium</i> sp.	FJ178785	99
LMi_bact_a9	1 (2)	<i>Methylobacterium aquaticum</i> (DSM 16371)	AB252197	96
LMi_bact_h11	1 (2)	Clon obtenido de un cultivo de enriquecimiento para Fe reductores	FJ269061	99
LMi-arch_f1	95 (100)	Arquea no cultivada	DQ383368	94

Los datos de esta tabla muestran una marcada diferencia entre las especies de bacterias y arqueas detectadas en los pozos; a excepción de las once secuencias con un 92% de similitud con secuencias del género *Hydrogenobaculum* en B9 y LVE, un clon similar a *Methylobacterium aquaticum* (96% de similitud) en la muestra de LMi y una secuencia asociada en un 96% a una bacteria no cultivada en el pozo B9, las restantes 184 secuencias de bacterias presentan entre 99 y 100% de similitud con especies cultivadas. Por el contrario, las especies de arqueas detectadas están, en su gran mayoría, asociadas con bajos porcentajes de similitud a especies no cultivadas. La única secuencia con un 99% similar a una arquea cultivada es el clon LS3-arch-a7, relacionado con la especie *candidatus "Acidianus copahuensis"* que precisamente ha sido aislada en la zona de Copahue (Giaveno et al., 2013).

4.3.1. Bacterias

En un primer análisis de los OTUs de bacterias detectados en las aguas de los pozos geotermales de Copahue la Figura 4.4 los sitúa en su contexto filogenético. Tal cual se indicó en la Sección 3.7 de Materiales y Métodos, el árbol fue construido con el programa ARB, utilizando el algoritmo Neighbour-Joining y el filtro de corrección Junkes-Cantor. En la Figura 4.4, se nota claramente que los OTUs de bacterias de Copahue están distribuidos en solo tres filos, con amplio predominio de *Proteobacterias*. También puede verse, observando el código de color utilizado para cada pozo, que las especies están distribuidas de modo bastante heterogéneo y que no se agrupan en el árbol según el pozo al cual pertenecen.

La Tabla 4.5 muestra los OTUs de bacterias ordenados filogenéticamente según la herramienta Classifier de Ribosomal Database Project (RDP). Esta herramienta on line permite la clasificación de las secuencias de ARNr 16S en grupos filogenéticos (desde filo hasta género) utilizando un algoritmo diferente a los de BLASTn y ARB. Además, permite aplicar valores de corte al análisis, según el porcentaje de confianza de la clasificación. En este estudio se utilizaron las clasificaciones en grupos taxonómicos que mostraron una confianza mayor al 97%. Se incluyen en la Tabla 4.5 lugares en los cuales se han detectado secuencias similares a las de Copahue. Si bien se ha puesto mayor énfasis en aquellas especies más cercanas encontradas en ambientes naturales ácidos o de alta temperatura, es interesante indicar que muchas de las secuencias relacionadas con los OTUs de bacterias de los pozos se han encontrado también en ambientes tan diversos como la rizosfera, el aire limpio o en heridas humanas.

Figura 4.4 Árbol filogenético donde se destacan en color los OTUs de bacterias de las aguas de los cinco pozos geotermales de Copahue estudiados. Los porcentajes en los nodos indican el peso de esta topología sobre 1000 réplicas (bootstrap 1000). Las llaves de la derecha engloban los distintos grupos taxonómicos, destacándose género, orden (en algunos casos), clase y filo. La barra indica 0,01 de divergencia filogenética (número de mutaciones fijas por nucleótido).

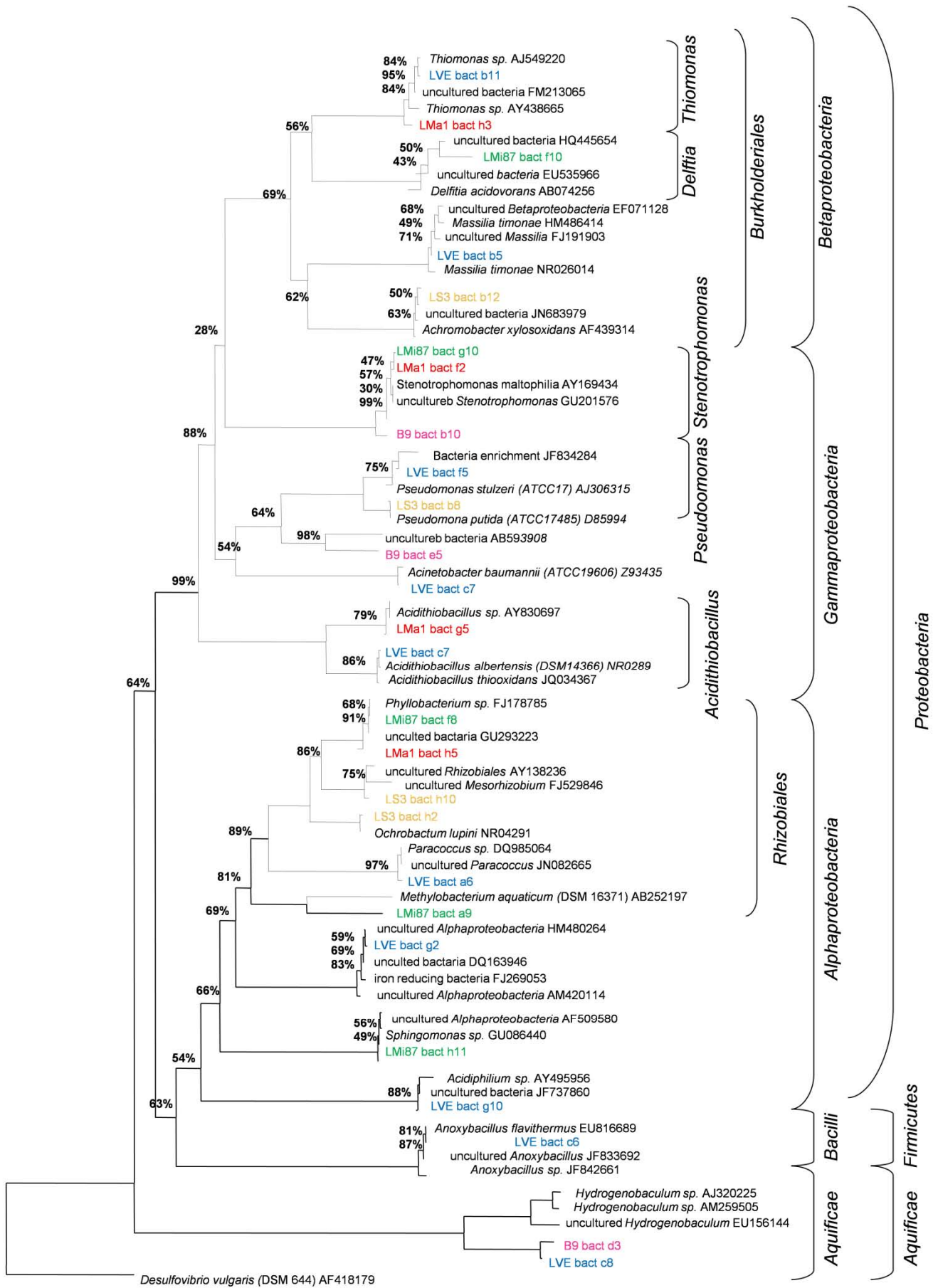


Tabla 4.5. Clasificación filogenética de los OTUs de bacteria encontrados en las muestras de agua de los cinco pozos geotermales analizados según RDP. Además se muestran la secuencia más cercana según BLASTn y los sitios en los cuales se han detectado secuencias similares, haciendo especial énfasis en ambientes con alguna condición extrema.

Clasificación filogenética según RDP (N° OTUs)	Nombre OTU	N° de clones (%)	Secuencia más cercana por BLASTn	N° de acceso	Similitud	Ambientes en donde fueron detectadas las secuencias más cercanas
Filo Proteobacteria (23)						
Proteobacteria sin clasific.	B9_bact_e5	1 (8)	Bacteria no cultivada	DQ264577	0.957	Agua en área tratada para biorremediación de CrO ₄ ⁻
Clase Betaproteobacteria (5)						
Orden Burkholderiales (5)						
Familia Alcaligenaceae (1)						
Género <i>Achromobacter</i> (1)	LS3_bact_b12	6 (26)	<i>Achromobacter xylosoxidans</i>	AF439314	0.997	Barros activados en planta de tratamiento de desechos. Sedimentos en de estuario contaminado con metales pesados del Río Xiangjiang en China, suelo contaminado con PAH. Humedales en DAM de Cu
Familia Comamonadaceae (1)						
Género <i>Delftia</i> (1)	LMi_bact_f10	3 (6)	<i>Delftia acidovorans</i>	AM180725	0.995	Suelos de bosques. Habitación limpia
Familia Oxalobacteraceae (1)						
Género <i>Massilia</i> (1)	LVE_bact_b5	2 (3)	<i>Massilia timonae</i>	NR026014	1.00	Sistema de distribución de agua potable
Familia Burkholderiales (2)						
Género <i>Thiomonas</i> (2)	LMa1-bac_h3	51 (91)	<i>Thiomonas</i> sp.	AJ549220	0.992	Drenajes ácidos de mina. Ambientes geotermales
	LVE_bact_b11	7 (12)	<i>Thiomonas</i> sp.	AJ549220	0.992	Drenajes ácidos de mina. Ambientes geotermales
Clase Gammaproteobacteria (8)						
Orden Xanthomonadales (3)						
Familia Xanthomonadaceae (3)						
Género <i>Stenotrophomonas</i> (3)	LMa1-bac_f2	1 (2)	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	AY169434	0.998	Ampliamente distribuido en todos los ambientes. Patógeno humano
	B9_bact_b10	1 (8)	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	AY169434	0.998	Ampliamente distribuido en todos los ambientes. Patógeno humano
	LMi_bact_g10	17 (32)	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	AY169434	0.998	Ampliamente distribuido en todos los ambientes. Patógeno humano

Orden Pseudomonadales (3)						
Familia Pseudomonadaceae (2)						
Género <i>Pseudomonas</i> (2)	LVE_bact_f5	2 (3)	<i>Pseudomonas stutzeri</i>	FR667891	0.998	Ampliamente distribuido en todos los ambientes.
	LS3_bact_b8	14 (64)	<i>Pseudomonas putida</i> (ATCC17485)	D85994	0.999	Barro atizado de una planta de tratamiento de aguas de desecho, zona volcánica de las montañas Kunlun en Asia, suelo contaminado con PAH en Asturias España
Familia Moraxellaceae (1)						
Género <i>Acinetobacter</i> (1)	LVE_bact_d5	20 (36)	<i>Acinetobacter baumannii</i>	FN563422	1.00	Ampliamente distribuido en todos los ambientes
Orden Acidithiobacillales (2)						
Familia Acidithiobacillaceae (2)						
Género <i>Acidithiobacillus</i> (2)	LMa1-bac_g5	3 (5)	<i>Acidithiobacillus</i> sp.	FJ915148	0.994	Drenajes ácidos de mina
	LVE_bact_c7	10 (18)	<i>Acidithiobacillus thiooxidans</i>	JQ034367	0.999	Drenajes ácidos de minas de sulfuros, Río Agrio
Clase Alphaproteobacteria (9)						
Orden Sphingomonadales (1)						
Familia Sphingomonadaceae (1)						
Género <i>Sphingomonas</i> (1)	LMi_bact_h11	1 (2)	Clon obtenido de un cultivo de enriquecimiento para Fe reductores	FJ269061	0.999	Suelo de arrozal contaminado con As en Hunan China
Orden Rhizobiales (5)						
Familia Brucellaceae (1)						
Género <i>Ochrobactrum</i> (1)	LS3_bact_h2	1 (5)	<i>Ochrobactrum lupini</i>	NR042911	0.999	Lago Dianchi de agua dulce China, ambientes contaminados con material fecal de cerdos, aguas superficiales contaminadas, humedales
Familia Methylobacteriaceae (1)						
Género <i>Methylobacterium</i> (1)	LMi_bact_a9	1 (2)	<i>Methylobacterium</i> sp.	HQ680432	0.962	Rizosfera
Familia Phyllobacteriaceae (3)						
Género <i>Mesorhizobium</i> (1)	LS3_bact_h10	1 (5)	<i>Mesorhizobium</i> sp. No cultivado	FJ529846	0.998	Ambiente ácido Río Tinto, columnas de lava en islas Azores y Hawaii
Género <i>Phyllobacterium</i> (2)	LMa1-bac_h5	1 (2)	<i>Phyllobacterium myrsinacearum</i>	AY785315	0.990	DAM de piritita en China, Sedimentos de ríos contaminados por la actividad minera
	LMi_bact_f8	30 (58)	<i>Phyllobacterium myrsinacearum</i>	AY785315	0.990	DAM de piritita en China, Sedimentos de ríos contaminados por la actividad minera

Orden Caulobacterales (1)						
Familia Caulobacteraceae (1)						
Caulobacteraceae sin clasific. (1)	LVE_bact_g2	1 (2)	Clon obtenido de un cultivo de enriquecimiento para Fe reductores	FJ269053	0.998	Ampliamente distribuido en ambientes acuáticos. Suelo de arrozal contaminado con As en Hunan China. Suelo contaminado con PAH
Orden Rhodobacterales (1)						
Familia Rhodobacteraceae (1)						
Género <i>Paracoccus</i> (1)	LVE_bact_a6	1 (2)	<i>Paracoccus</i> sp.	DQ985064	0.998	Aire. Ambientes marinos
Orden Rhodospirillales (1)						
Familia Acetobacteraceae (1)						
Género <i>Acidiphilium</i> (1)	LVE_bact_g10	6 (11)	<i>Acidiphilium</i> sp.	AY495956	0.995	Ambiente ácido Río Tinto. Drenaje ácido de mina en la faja pirítica ibérica. Lago ácido
Filo Firmicutes (1)						
Clase Bacilli (1)						
Orden Bacillales (1)						
Familia Bacillaceae (1)						
Género <i>Anoxybacillus</i> (1)	LVE_bact_c6	6 (11)	<i>Anoxybacillus flavithermus</i>	FN666242	0.997	Pozos geotermales en diferentes partes del mundo, sedimentos marinos
Filo Aquificae (2)						
Clases Aquificae (2)						
Orden Aquificales (2)						
Familia Aquificaceae (2)						
Genero <i>Hydrogenobaculum</i> (2)	B9_bact_d3	10 (84)	<i>Hydrogenobaculum</i> sp.	AJ320225	0.924	Parque Nacional Yellowstone, agua de pozos geotermales en Taiwan
	LVE_bact_c8	1 (2)	<i>Hydrogenobaculum</i> sp.	AJ320225	0.929	Parque Nacional Yellowstone, agua de pozos geotermales en Taiwan

Al analizar en forma global los OTUs de bacterias encontrados en las aguas de los cinco pozos se observa, como se ha dicho, que están afiliados filogenéticamente a sólo tres filos: Proteobacteria, Firmicutes y Aquificae. Los dos últimos filos mencionados están representados únicamente por un género cada uno: *Anoxybacillus* e *Hydrogenobaculum*, respectivamente. En el caso del filo Proteobacteria, la diversidad encontrada fue mayor, con catorce géneros repartidos en las clases Alpha-, Beta- y Gammaproteobacteria.

Al mirar la distribución de especies en cada pozo estudiado, se observa que LVE es el único pozo en el cual están representados los tres filos; esto concuerda con los índices biológicos mostrados en la Tabla 4.2 que le dan a este punto los mayores valores de biodiversidad. Por otro lado, no hay ningún género que haya sido detectado en los cinco pozos.

Únicamente las secuencias relacionadas con los géneros *Hydrogenobaculum* y *Thiomonas* y con la especie *Anoxybacillus flavithermus* detectadas en Copahue son cercanas a otras que fueron obtenidas en ambientes geotermales (Eder y Huber, 2002; Macur et al., 2004; Sayeh et al., 2010; Kozubal et al., 2012). En cambio, las secuencias relacionadas con los géneros *Acidithiobacillus*, *Acidiphilium* y también *Thiomonas* detectadas en Copahue, son semejantes a otras obtenidas principalmente en ambientes ácidos de temperaturas moderadas y, en particular, en drenajes ácidos de minas (DAM) (Johnson y Hallberg 2003; Hallberg et al., 2005). En Copahue se detectaron secuencias similares a *Mesorhizobium*, género típicamente asociado a la rizosfera de leguminosas; curiosamente, secuencias asociadas a este género también fueron encontradas en el Río Tinto (García Moyano et al., 2012), mundialmente famoso por su bajo valor de pH y alta concentración de Fe(III), y en los canales de lava en las islas Azores y Hawaii (sin publicar, información disponible bajo el número de acceso de BLAST HM445433).

Al realizar un análisis más detallado de la filogenia de las bacterias en las aguas de los pozos geotermales de Copahue encontramos:

Filo Proteobacteria

Como muestra el árbol filogenético de la Figura 4.4, la cantidad de especies en el filo *Proteobacteria* es mucho mayor a la de los otros filos. De acuerdo al análisis hecho con la herramienta Classifier de RDP (Tabla 4.5), todos los OTUs de este filo pudieron ser asignadas a algún género con 100% de confianza, excepto el representado por la secuencia B9-bact-e5. Para este clon, la asignación taxonómica dada por el programa fue:

B9-bact-e5: Bacteria 100%; Proteobacteria 100%; Gammaproteobacteria 57%;
Pseudomonadales 57%; Pseudomonadaceae 57%; *Azomonas* 52%.

Esta asignación concuerda con la posición del clon en el árbol filogenético de la Figura 4.4.

Betaproteobacteria

Se encontraron secuencias afiliadas a esta clase en los pozos LVE, LMa1, LS3 y B9. De los cuatro OTUs detectados, el que está relacionado con el género *Thiomonas* podría ser relevante para los objetivos de nuestro estudio de biodiversidad ya que se trata de un microorganismo que ha sido detectado en ambientes relacionados con la minería (Hallberg et al., 2005) y en diversos ambientes de origen geotermal, tanto ácidos como neutros, en su mayoría con altas concentraciones de As (Macur et al, 2004; Hamamura et al 2009; Engel et al. 2013). Como se muestra en las Tablas 4.4 y 4.5 las secuencias relacionadas con este género conforman el 91% de los clones de bacterias de la biblioteca de la pileta LMa1 y el 12% de la de LVE. Los otros tres OTUs de la clase *Betaproteobacteria* están asociados con 99% de similitud a especies de *Delftia acidovorans*, *Massilia timonae* y *Achromobacter xylosoxidans*. Este último microorganismo ha sido detectado en muchos ambientes con diversos tipos de contaminaciones, incluyendo humedales asociados al drenaje ácido de una mina de Cu (sin publicar, información disponible bajo el número de acceso de BLAST JQ769870) y suelo contaminado con hidrocarburos policíclicos aromáticos (PHA) (Strnad et al., 2011).

Gammaproteobacteria

Dentro de esta clase se detectaron especies pertenecientes a cuatro géneros. Las secuencias relacionadas con el género *Stenotrophomonas* representan el 2, 8 y 32% de los clones de los pozos LMa1, B9 y LMi, respectivamente. De hecho, ésta es la especie que se encuentra mejor distribuida en las muestras estudiadas (está presente en tres de los cinco pozos). *Stenotrophomonas* no es un género típico de zonas geotermales y aunque se trata de microorganismos que han sido detectados ampliamente en todo tipo de ambientes, son también patógenos humanos y quizás podría estar vinculado con la presencia antropogénica en la zona.

Dentro de esta clase filogenética, se detectaron secuencias de dos especies distintas de *Pseudomonas* en las muestras de agua de LVE y LS3 y de *Acinetobacter baumannii* en LVE. Estos microorganismos tampoco son específicos de ambientes geotermales habiéndoselos encontrado prácticamente en todo tipo de muestras ambientales.

El cuarto género representado en la clase Gammaproteobacteria es *Acidithiobacillus*, con un 5% de los clones de las aguas de LMa1 y un 18% de los de LVE. Estas bacterias no se encuentran frecuentemente en zonas geotermales sino que son típicas de ambientes ácidos de temperaturas moderadas y ricos en compuestos de azufre o altas concentraciones de Fe, como

los DAM, las colas de minas o ambientes naturales como el Río Tinto (González Toril, 2003; Johnson, 2003). No obstante, LVE y LMa1 son piletas con temperaturas algo superiores a los 30°C y valores de pH alrededor de 3 que son características fisicoquímicas compatibles con las necesarias para convertirse en un hábitat apropiado para este tipo de microorganismos.

Alphaproteobacteria

Dentro de esta clase las secuencias se clasificaron en seis OTUs correspondientes a seis géneros diferentes. En LMi se encontró un clon que según RDP, está afiliado con un 100% de confianza al género *Sphingomonas*; además, según BLAST, tiene un 99% de similitud con secuencias encontradas en un cultivo de enriquecimiento para microorganismos Fe-reductores (sin publicar).

En los pozos LMa1, LS3 y LMi se encontraron varios OTUs dentro de esta misma clase pero pertenecientes al orden *Rhizobiales*. Estos son microorganismos típicos de la rizosfera aunque secuencias de estas especies también se han encontrado en diversos ambientes naturales, incluyendo algunos de naturaleza ácida como el Río Tinto (García Moyano et al., 2011) o en el drenaje ácido de una mina de pirita en China (sin publicar, información disponible bajo el número de acceso de BLAST KC620700).

Las otras secuencias de la clase Alphaproteobacteria fueron detectadas en la muestra de aguas de LVE. Un OTU formado por el 2% de los clones fue especificado, según RDP, como un miembro sin clasificar de la familia Caulobacteraceae; según BLAST, este OTU presenta un 99% de similitud con otro clon encontrado en aquel mismo ensayo de enriquecimiento para microorganismos Fe-reductores en el cual se detectaron secuencias del género *Sphingomonas*. Las especies de esta familia son típicas de ambientes acuosos y también han sido detectadas en suelos contaminados con hidrocarburos policíclicos aromáticos (sin publicar, información disponible bajo el número de acceso de BLAST FQ658874).

Otro 2% de los clones de LVE fue afiliado por ambos programas al género *Paracoccus*; este género ha sido detectado en diferentes ecosistemas, desde aire limpio hasta ambientes marinos.

Por último, un 11% de los clones de la biblioteca de bacterias de LVE fue asociado al género *Acidiphilium* con un 99% de similitud. Estos microorganismos han sido detectados, casi exclusivamente, en ambientes (aguas, biofilms y suelos) de naturaleza ácida tales como zonas mineras y la Faja Pirítica Ibérica (González Toril et al. 2003; González Toril et al. 2011).

Filo Firmicutes

Este filo se encuentra representado en las aguas de un solo pozo geotermal de los estudiados en este trabajo de tesis y a través de un único género perteneciente a la clase Bacilli. Así, un 11% de las secuencias de bacterias de LVE resultaron ser 99% similares a *Anoxybacillus flavithermus*. Secuencias del gen ARNr 16S de esta especie han sido encontradas también en diversos ambientes geotermales en distintas partes del mundo (Hobel et al., 2004; Sayeh et al., 2010; secuencias sin publicar, información disponible bajo los números de acceso de BLAST EF222231 y FJ842661).

Filo Aquificae

En las aguas de dos de los cinco pozos se encontraron secuencias asociadas a un género de este filo, correspondiente a la clase Aquificae. Dichas secuencias, afiliadas al género *Hydrogenobaculum*, fueron detectadas tanto en las aguas de B9 y LVE pero con gran diferencia en la abundancia en cada uno de ellos: en B9 representan el 84% de los clones mientras que en LVE sólo son el 2%. Si bien la similitud entre las secuencias de *Hydrogenobaculum* sp. depositadas en la base de datos de GeneBank y las secuencias detectadas en Copahue es baja (aproximadamente 92%), el algoritmo de la herramienta de clasificación taxonómica de RDP las coloca dentro de este género con un 100% de confianza. Las especies del género *Hydrogenobaculum* son típicas de ambientes geotermales ácidos y han sido aisladas o detectadas por técnicas de biología molecular en varios pozos del Parque Nacional Yellowstone (Reysenbach et al., 2000; Romano et al., 2013).

4.3.2. Arqueas

Un análisis similar al de la Sección 4.3.1 fue realizado para la librería de clones de arqueas de los tres pozos donde se registraron amplificaciones con los cebadores para ese dominio. La Figura 4.5 muestra el árbol filogenético donde se destacan los OTUs de arqueas detectados en Copahue. Se observa cómo los OTUs de los pozos de Copahue tienden a formar ramas separadas dentro de las familias; esto sugiere que pueden tratarse de nuevas especies dentro de grupos taxonómicos ya conocidos.

Al igual que para los OTUs de bacteria, la Tabla 4.6 muestra la asignación filogenética de los OTUs de arqueas según la herramienta Classifier de RDP. En la tabla también se muestran las secuencias más cercanas detectadas en otros sitios junto con el porcentaje de similitud.

Figura 4.5 Árbol filogenético donde se destacan en color los OTUs de arqueas en las aguas de los pozos geotermales de Copahue donde se obtuvieron amplificaciones con los cebadores para este dominio. Los porcentajes en los nodos indican el peso de esta topología sobre 1000 réplicas (bootstrap 1000). Las llaves de la derecha engloban familias y filo. La barra indica 0,01 de divergencia filogenética (número de mutaciones fijas por nucleótido).

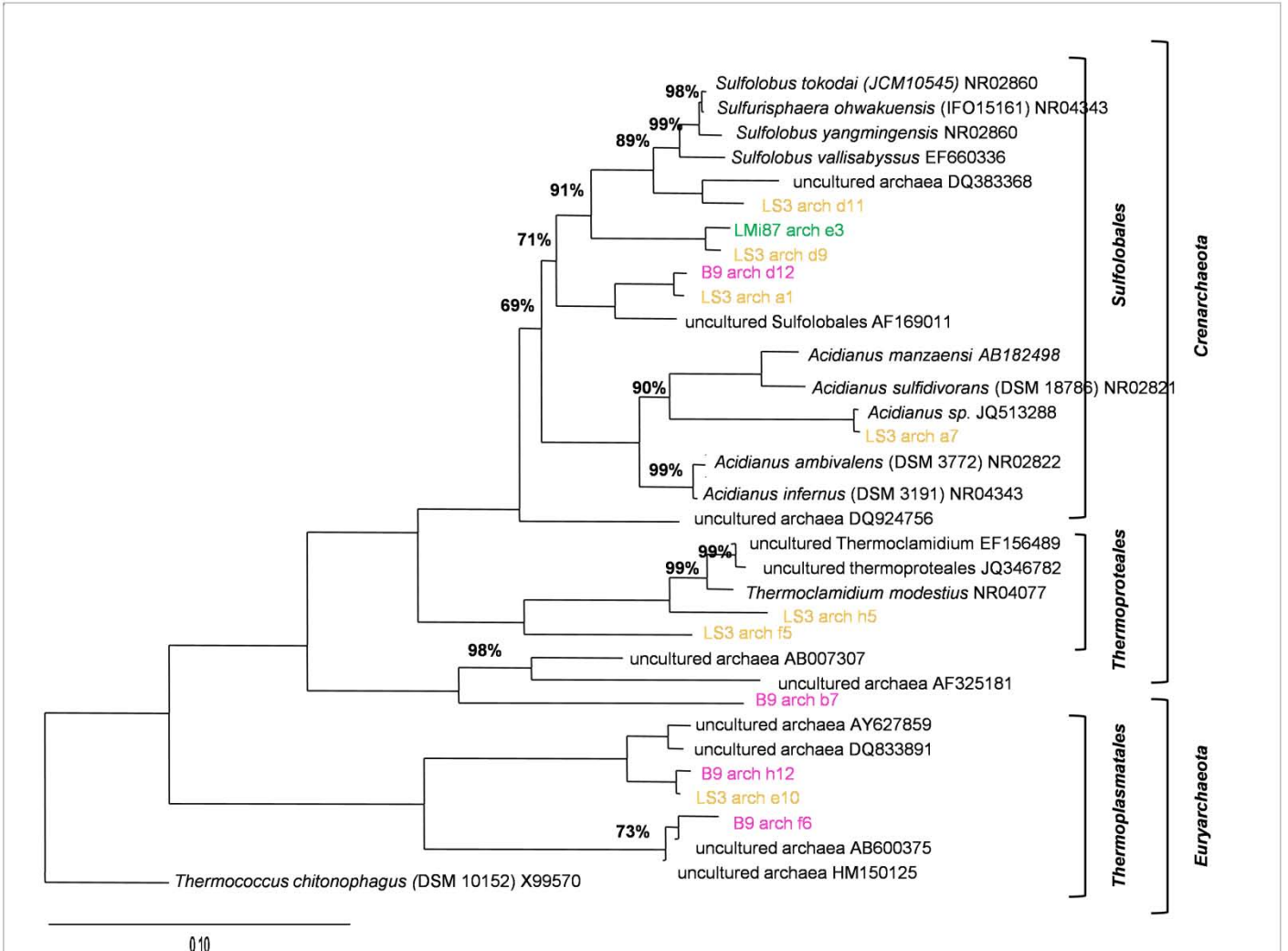


Tabla 4.6. Clasificación filogenética de los OTUs de arqueas encontrados en las muestras de agua de los pozos geotermales B9, LS3 y LMi según RDP. Además, se muestran la secuencia más cercana según BLASTn y los sitios en los cuales se han detectado secuencias similares. T: temperatura.

Clasificación filogenética según RDP (N° OTUs)	Nombre OTU	N° de clones (%)	Secuencia más cercana por BLASTn	N° de acceso	Similitud	Ambientes en donde fueron detectadas las secuencias más cercanas
Filo Crenarchaeota (9)						
Clase Thermoprotei (9)						
Thermoprotei sin clasific.(1)	B9-arch_b7	4 (21)	Arquea no cultivada	AB007307	0.860	Pozo geotermal en Kamchatka Rusia, sistema hidrotermal submarino, pozo termal en Japón
Orden Sulfolobales (6)						
Familia Sulfolobaceae (6)						
Género <i>Acidianus</i> (1)	LS3-arch_a7	1 (1)	<i>candidatus "Acidianus copahuensis"</i>	JQ513288	0.999	Zona geotermal de Copahue
Género <i>Sulfolobus</i> (5)						
	B9-arch_d12	3 (16)	Sulfolobales sin cultivar	AF169011	0.961	Valle geotermal Bei Tou en Taiwán. Arqueas usadas en reactor de alta T para biolixiviación de calcopirita
	LS3-arch_a1	12 (13)	Sulfolobales sin cultivar	AF169011	0.950	Valle geotermal Bei Tou en Taiwán. Arqueas usadas en reactor de alta T para biolixiviación de calcopirita
	LMi-arch_f1	95 (100)	Arquea no cultivada	DQ383368	0.940	Valle geotermal Bei Tou en Taiwán. Arqueas usadas en reactor de alta T para biolixiviación de calcopirita
	LS3-arch_d9	5 (6)	Arquea no cultivada	DQ383368	0.940	Valle geotermal Bei Tou en Taiwán. Arqueas usadas en reactor de alta T para biolixiviación de calcopirita
	LS3-arch_d11	5 (6)	<i>Sulfolobus tokodaii</i>	NR_028609	0.964	Área geotermal en Japón. Arqueas usadas en reactor de alta T para biolixiviación de calcopirita
Orden Thermoproteales (2)						
Familia Thermoproteaceae (2)						
Género <i>Thermocladium</i> (1)	LS3-arch_h5	1 (1)	<i>Thermocladium modestius</i>	NR040779	0.961	Área geotermal en Japón, pozo geotermal en PNY
Género <i>Vulcanisaeta</i> (1)	LS3-arch_f5	1 (1)	<i>Vulcanisaeta distributa</i>	NR040876	0.964	Área geotermal en Japón, área geotermal en Islandia, pozo geotermal en PNY

Filo Euryarchaeota (3)

Clase Thermoplasmata (3)

Orden Thermoplasmatales (3)

Thermoplasmatales sin clasific.(2)	B9-arch_f6	2 (10)	Arquea no cultivada	AB600329	0.999	Zona geotermal ácida en Japón
	B9-arch_h12	10 (53)	Arquea no cultivada	AY627859	0.960	Pozo geotermal ácido de alta temperatura en Taiwán
Familia “Thermoplasmatales” (1)						
Género <i>Thermogymnomonas</i> (1)	LS3-arch_e10	65 (72)	Arquea no cultivada	AY627859	0.960	Pozo geotermal ácido de alta T en Taiwán, pozo geotermal en Kamchatka Rusia, pozo geotermal en PNY

PNY: Parque Nacional Yellowstone.

Los OTUs de arqueas, en su gran mayoría, fueron asociados con bajos porcentajes de similitud a arqueas no cultivadas. La excepción más destacable es la del OTU representado por la secuencia LS3-arch-a7 que corresponde a la especie *candidatus* “*Acidianus copahuensis*”, aislada y descrita por nuestro grupo y que es autóctona de la zona de Copahue (Giaveno et al., 2013). Por otro lado, todas las secuencias de arqueas presentes en los pozos son similares a secuencias de arqueas detectadas en ambientes geotermales, algunos de los cuales presentan condiciones muy similares a las de Copahue.

Como puede verse en la Tabla 4.6 y en la Figura 4.5, las arqueas de las aguas de los pozos geotermales de Copahue se encuentran asociadas a dos de los filos más conocidos hasta hoy del dominio Archaea:

Filo Crenarchaeota

En total se hallaron nueve OTUs, todos pertenecientes a la clase Thermoprotei. La secuencia que representa el 21% de los clones de arqueas de B9 no pudo ser clasificada más allá de este nivel taxonómico por RDP; según BLASTn, se relaciona en un 86% con otras secuencias detectadas en ambientes geotermales de alta temperatura.

Orden Sulfolobales

Se detectaron seis OTUs en este nivel taxonómico. Cinco de estos, repartidos en las aguas de B9, LS3 y LMi, se afiliaron con el 100% de confianza al género *Sulfolobus* según la herramienta Classifier de RDP. El sexto OTU de este orden corresponde a la especie, ya mencionada, *candidatus* “*Acidianus copahuensis*”, que representa el 1% de los clones de arqueas de LS3. En las aguas de B9, las secuencias afiliadas a *Sulfolobus* representan un 16% de los clones de arqueas. El pozo LMi presenta una característica única: el 100% de los clones de arqueas pertenecen a un mismo OTU, asociado a este género con un 100% de confianza según RDP. En las aguas de LS3 se encontraron tres OTUs distintos afiliados al género *Sulfolobus*, siendo uno de ellos coincidente con el detectado en LMi. Tal como ocurre para el resto de los OTUs de arqueas, los afiliados al género *Sulfolobus* detectados en los tres pozos mostraron porcentajes de similitud entre 94 y 96% con las secuencias más cercanas detectadas por BLASTn. Solo uno de ellos presentó cierta similitud con una especie cultivada y caracterizada: el clon LS3-arch-d11 resultó ser 96% similar a *Sulfolobus tokodaii*; los otros se relacionaron con especies de *Sulfolobus* sin cultivar. Todas las secuencias de este género, tal cual era esperable, fueron obtenidas en diversos ambientes geotermales (sin publicar, información disponible bajo el número de acceso de BLAST GU256550). Además, todas ellas, a excepción de la relacionada

con *Sulfolobus tokodaii*, fueron detectadas también en un biorreactor de biolixiviación de calcopirita a 78°C y pH 1,6 (Mikkelsen et al., 2006).

Orden Thermoproteales

Se encontraron dos OTUs afiliados a este orden en las aguas del pozo LS3. Ambos mostraron un 95% de similitud con secuencias de las especies *Thermocladium modestius* y *Vulcanisaeta distributa*, respectivamente. Los dos tipos de especies fueron encontradas en diversos ambientes geotermales en distintas partes del mundo (Kato et al. 2011; sin publicar, información disponible bajo el número de acceso de BLAST EF156489).

Filo Euryarchaeota

Se encontraron tres OTUs en los pozos B9 y LSE, todos afiliados a la clase Thermoplasmata. En LS3, un 72% de los clones de arqueas se asociaron con un 100% de confianza, según RDP, al género *Thermogymnomonas* y resultaron ser 96% similares a un clon de arquea no cultivado detectado en varios pozos geotermales en diferentes partes del mundo. Si bien la especie no se ha aislado y no se conocen sus características fisiológicas, el hecho de haberse detectado en forma simultánea en diversos ambientes ácidos y de alta temperatura, sugiere que se trata de una arquea muy bien adaptada a sobrevivir en estas condiciones.

Los dos OTUs restantes de este filo fueron encontrados en las aguas de la laguna B9 y se trata de especies que no pudieron ser clasificadas más allá del nivel orden Thermoplasmatales. Ambos clones presentan un 96% de similitud con dos clones distintos de arqueas no cultivadas, pero ambos detectados en pozos geotermales en Taiwán y Japón (sin publicar, información disponible bajo el número de acceso de BLAST AY627859; Kato et al, 2011, respectivamente).

Un hecho para destacar es que la mayoría de las secuencias de arqueas detectadas en B9, tanto de los filos *Crenarchaeota* como *Euryarchaeota*, fueron pobremente clasificadas por la herramienta de RDP:

B9-arch-b7: Archaea 100%; Crenarchaeota 99%; Thermoprotei 99%; Thermoproteales 39%; Thermofilaceae 36%; *Thermofilum* 36%

B9-arch-d12: Archaea 100%; Crenarchaeota 100%; Thermoprotei 100%; Sulfolobales 100%; Sulfolobaceae 100%; *Sulfolobus* 98%

B9-arch-f6: Archaea 100%; Euryarchaeota 100%; Thermoplasmata 100%; Thermoplasmatales 100%; “Thermoplasmatales” 94%; *Thermogymnomonas* 94%

B9-arch-h12: Archaea 100%; Euryarchaeota 100%; Thermoplasmata 100%; Thermoplasmatales 100%; “Thermoplasmatales” 61%; *Thermogymnomonas* 61%

En el árbol de la Figura 4.5 se ve que los OTUs de B9 (de color rosa) forman ramas muy separadas y distantes, incluso de sus respectivas secuencias similares. Este es un indicio más de que puede tratarse de nuevas especies autóctonas de la zona.

4.4 Estudio semicuantitativo de la biodiversidad de los pozos geotermales: FISH y CARD-FISH

Tal cual se indicara previamente en la Sección 3.8 de Materiales y Métodos, el abordaje semicuantitativo del presente estudio de biodiversidad se realizó sobre muestras de agua de los pozos geotermales de Copahue fijadas *in situ*, utilizando la tinción general DAPI y las técnicas de hibridación de FISH y CARD-FISH (esta última únicamente para las muestras de agua del punto LMi). Se utilizaron sondas generales de dominio para bacterias y arqueas y algunas sondas específicas para grupos taxonómicos de bacterias (detectadas previamente por secuenciación) que se detallan en la Tabla 3.3 de la Sección 3.8 de Materiales y Métodos. Es importante destacar que las técnicas de hibridación *in situ* como FISH y CARD-FISH, no sólo brindan información cuantitativa sobre las especies presentes sino que también permiten relevar las especies metabólicamente activas en un determinado ecosistema en el momento de recolección de la muestra.

Para evaluar la hibridación inespecífica, tanto en las muestras de agua fijadas de los pozos LVE, LMa1, B9 y LSE con la técnica de FISH como en la muestra agua de LMi hibridada con la técnica CARD-FISH, se utilizó la sonda NON338. Los resultados en los cinco casos fueron negativos, por lo que se descartó la incidencia de hibridaciones inespecíficas en los recuentos.

La Tabla 4.7 resume los resultados obtenidos mediante las técnicas de hibridación empleadas y los recuentos hechos al microscopio de epifluorescencia.

Tabla 4. 7. Porcentajes de hibridación con las sondas empleadas basados en los recuentos obtenidos con el colorante DAPI. Las cuatro primeras muestras están hibridadas utilizando la técnica de FISH mientras que la última (LMi) se hibridó con CARD-FISH. En todos los casos se utilizaron los mismos protocolos de recuento y cálculo.

% Hibridación	LVE	LMa1	B9	LS3	LMi
EUB	84,0	86,1	1,2	3,7	2,2
ALF	2,0	<< 1%	HN	HN	1,9
ACD	1,7	<< 1%	-	-	-
BET	54,3	76,9	<< 1%	<< 1%	<< 1%
TM	45,8	HN	-	-	-
GAM	5,5	2,3	<< 1%	<< 1%	<< 1%
THIO	7,8	1,6	-	-	-
NTR712	HN	HN	HN	HN	HN
Aqui-1197	<< 1%	-	<< 1%	-	-
ARCH	4,5	<< 1%	87,7	90,8	95,1
NON338	HN	HN	HN	HN	HN
Células/ml ^a	2,82x10 ⁸	1,52x10 ⁸	6,62x10 ⁸	2,13x10 ⁸	2,62x10 ⁸

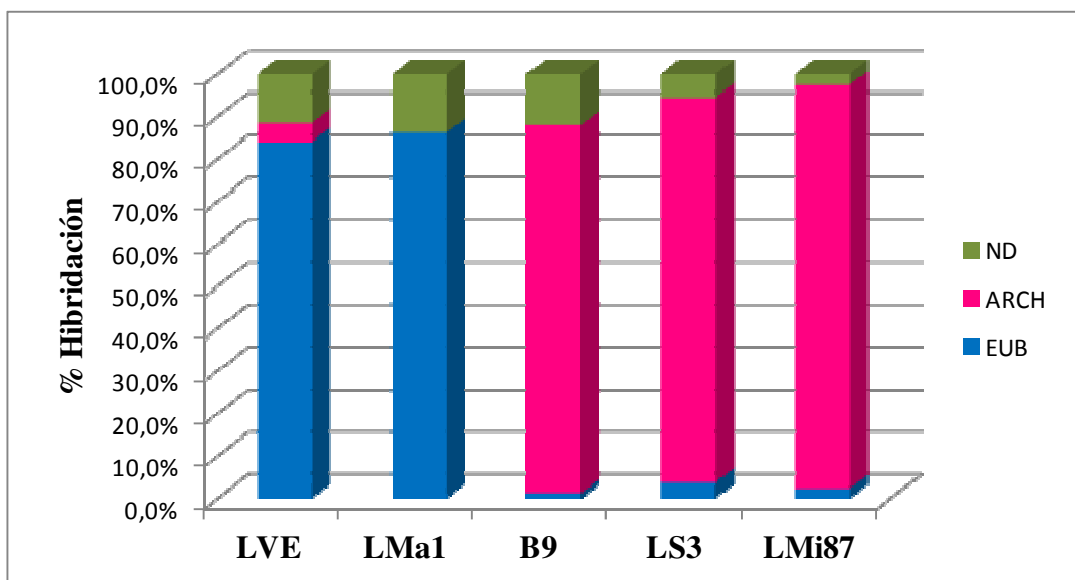
^a Calculado a partir de los recuentos de tinción con el colorante DAPI

HN: hibridación negativa

-: no se ensayó esa sonda en esa muestra

La concentración de microorganismos presentes en las muestras de aguas se estimó mediante recuentos al microscopio de epifluorescencia de las tinciones con el colorante DAPI. Las concentraciones celulares fueron del orden de 2–3x10⁸ células/mL para todos los pozos, a excepción de B9 cuyo recuento fue de 6,62x10⁸ cel/mL. Aunque las densidades celulares fueron similares para los cinco pozos, la Figura 4.6 muestra como la distribución de estos microorganismos en los dominios Bacteria y Archaea (de acuerdo a las hibridaciones de FISH y CARD-FISH con las sondas EUB338 y ARCH915 respectivamente) están diferenciadas en dos grupos bien marcados. Los puntos LVE y LMa1, ambos de temperaturas moderadas, presentan principalmente bacterias mientras que en B9, LS3 y LMi, pozos de temperaturas moderadas-altas a altas-extremas, se detectaron arqueas casi en su totalidad.

Figura 4.6 Porcentajes de hibridación con las sondas EUB338 y ARCH915 respecto del total de microorganismos detectados con el colorante DAPI. ND hace referencia al porcentaje de microorganismos detectados con DAPI, pero que no hibridaron con ninguna de las dos sondas de dominios utilizadas.



En LVE, uno de los pozos con mayor proporción de bacterias, se detectó una pequeña fracción de aproximadamente 4% de arqueas, mientras que el 12% de los microorganismos no pudo ser clasificado en ninguno de los dos dominios. En LMa1, el 86% de los microorganismos detectados con el colorante DAPI hibridó con la sonda general para bacterias y el 14% restante quedó como no identificado.

Entre los otros tres puntos, B9 presenta el menor porcentaje de bacterias (1%) y un 87% de representación de arqueas en la muestra. LMi, la muestra con las condiciones de temperatura más extremas, es la que presenta la mayor fracción de arqueas con un 95% de hibridación con la sonda ARCH.

Las Figuras 4.7 y 4.8 muestran algunas de las imágenes obtenidas en el microscopio de epifluorescencia a partir de las cuales se realizaron los recuentos y se obtuvieron los porcentajes de hibridación expresados en la Figura 4.6. En la Figura 4.7, se comparan las tinciones de DAPI y las hibridaciones de la sonda EUB para las muestras de los puntos LVE y LMa1. En la Figura 4.8, se comparan las tinciones de DAPI y las hibridaciones con la sonda ARCH para las muestras de los pozos B9, LS3 y LMi. En la fotografía de la tinción DAPI de la muestra del pozo LMi puede verse gran cantidad de material autofluorescente que hace muy difícil distinguir las células. Por este motivo, se decidió usar la técnica de CARD-FISH para las muestras de este

punto; como se ve en la fotografía, esta técnica permite aumentar la sensibilidad en la detección de la señal de las hibridaciones.

Figura 4.7 Fotografías tomadas con el microscopio de epifluorescencia de las tinciones de DAPI e hibridaciones con la sonda EUB para las muestras fijadas *in situ* de los pozos LVE y LMa1. En la imagen de LMa1 la sonda EUB utilizada para la hibridación estaba unida al fluorocromo ALEXA 488 y por eso las células hibridadas se ven de color verde.

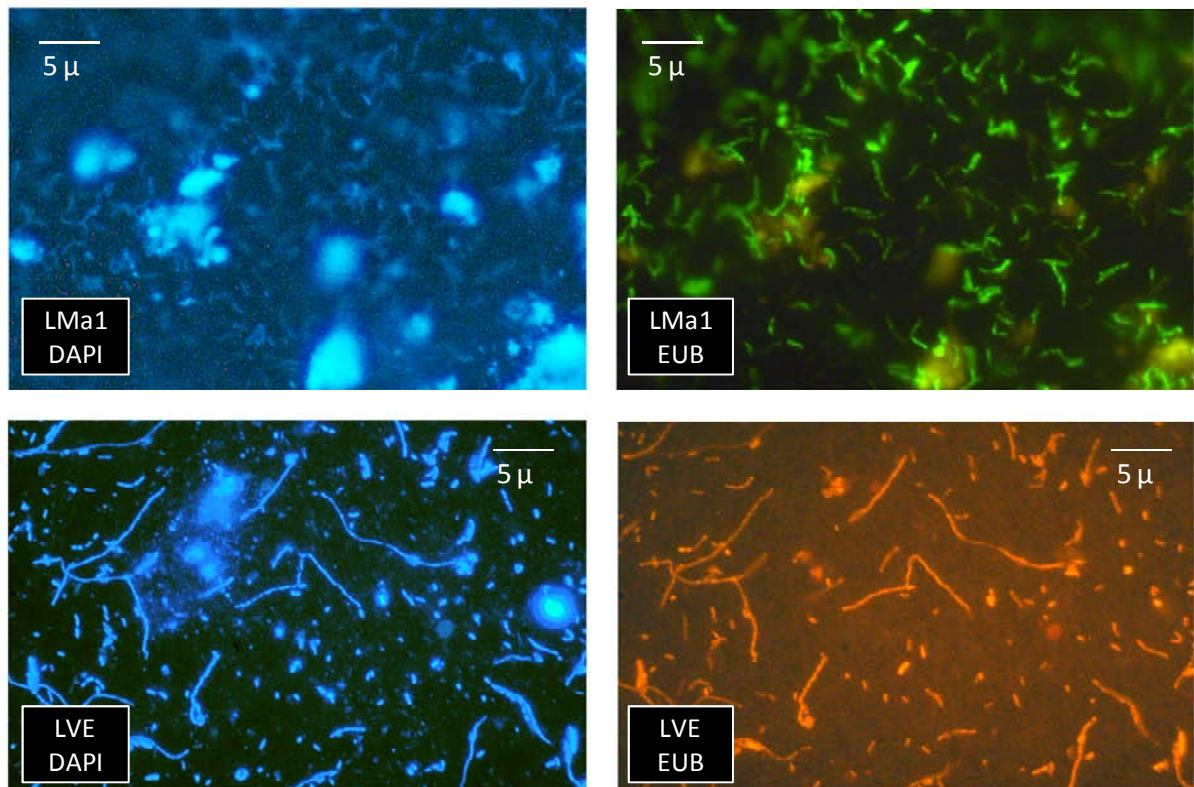
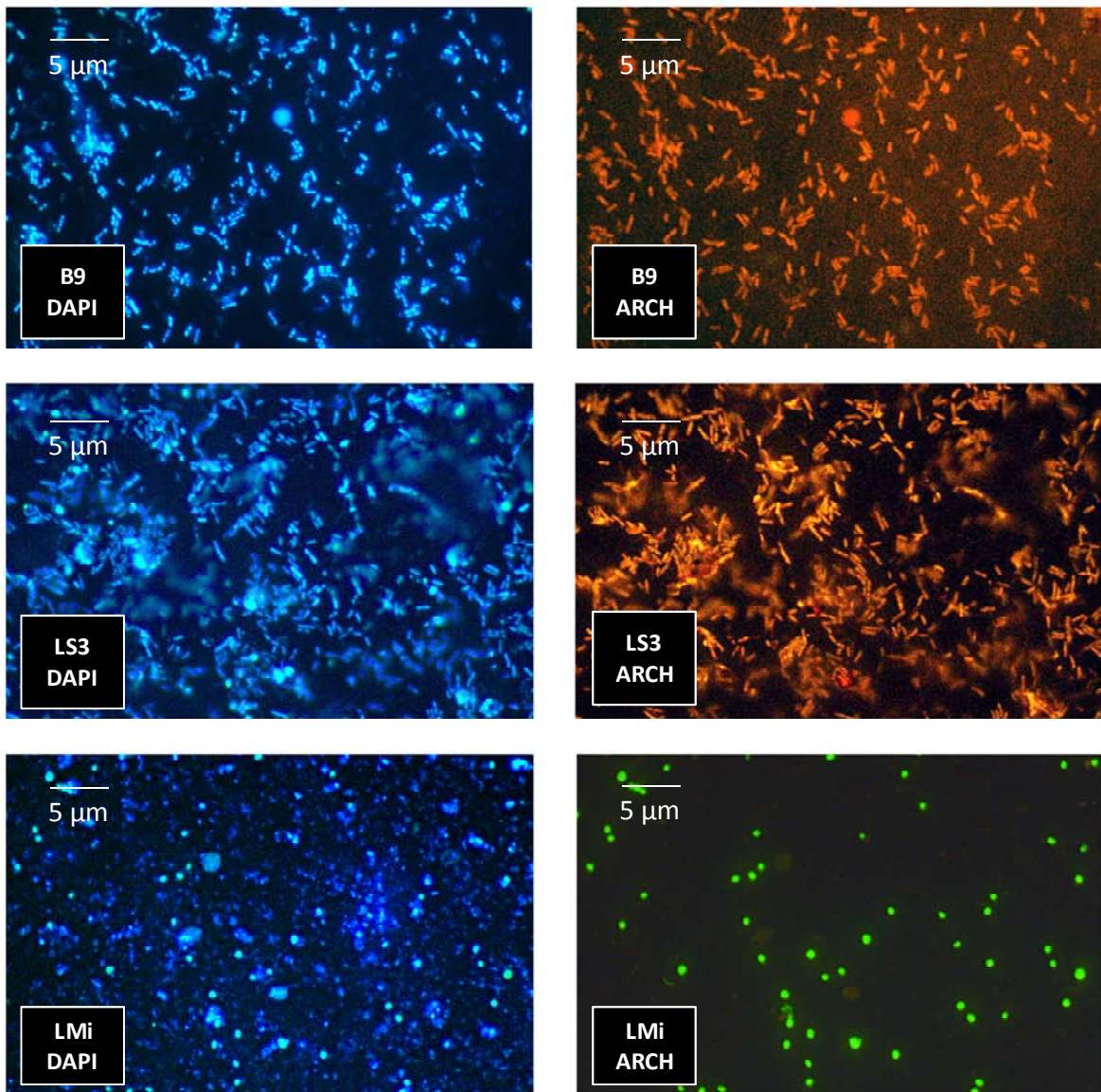


Figura 4.8 Fotografías tomadas con el microscopio de epifluorescencia de las tinciones de DAPI e hibridaciones con la sonda ARCH para las muestras fijadas *in situ* de los pozos B9, LS3 y LMi. La hibridación de LMi fue realizada mediante CARD-FISH donde el sustrato de la enzima unida a la sonda EUB utilizada estaba asociado al fluorocromo ALEXA 488 y por eso las células hibridadas se ven de color verde.



4.4.1. Bacterias

Para profundizar la caracterización semicuantitativa, y en función de los resultados obtenidos por clonación y secuenciación del gen ARNr 16S (Sección 4.3.1), se realizaron hibridaciones con sondas específicas para los grupos taxonómicos Nitrospira, Aquificae, Alpha, Beta y Gammaproteobacterias, *Thiomonas*, *Acidiphilum* y *Acidithiobacillus*.

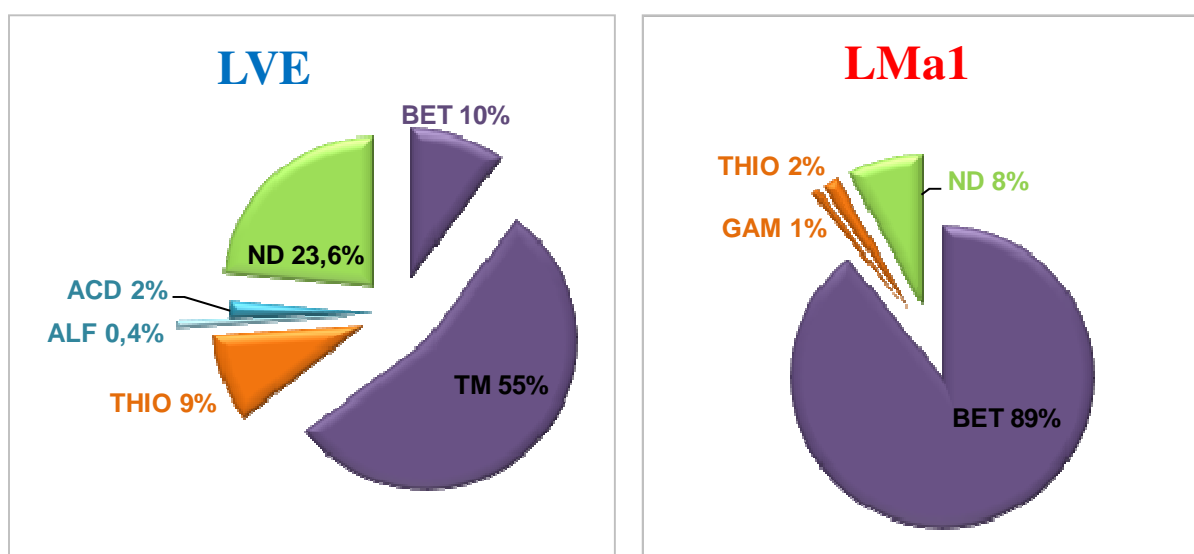
Todas las hibridaciones ensayadas con la sonda NTR, específica para el grupo Nitrospira, dieron resultados negativos. La sonda Aqu-1197, específica para el filo Aquificae, se probó en las muestras de aguas fijadas de los puntos B9 y LVE (los puntos en los cuales se encontraron especies de este filo según la información de secuenciación). Debido al bajo número de bacterias que presentan estas muestras, los porcentajes de hibridación obtenidos fueron menores al 1%.

Como se observa en la Tabla 4.7, las únicas muestras que dieron hibridaciones registrables con varias de las sondas específicas para los grupos taxonómicos de bacterias fueron LVE y LMa1. La muestra de agua del pozo LMi, para la cual se utilizó CARD-FISH, registró un 2,2% de hibridación con EUB y un 1,9% con ALF.

La Figura 4.9 muestra los porcentajes de hibridación obtenidos para LVE y LMa1 con las sondas de grupos taxonómicos de bacterias. Para la construcción de estos gráficos se tomó como 100% el valor de las hibridaciones con la sonda EUB. Así, ND representa el porcentaje de microorganismos que hibridaron con la sonda EUB pero que no fueron detectados con ninguna de las sondas específicas ensayadas.

El mismo tratamiento se hizo en el análisis de las hibridaciones con la sonda para la clase Alphaproteobacteria y su género *Acidiphilium* (ALF y ACD, respectivamente) y con la sonda para la clase Gammaproteobacteria y su género *Acidithiobacillus* (GAM y THIO, respectivamente). En este último caso y para la muestra LVE, la hibridación con THIO fue superior a la obtenida con GAM. Esta inconsistencia probablemente se deba a la inespecificidad de estas sondas para el ecosistema de los pozos de Copahue. Debido a que la señal con la sonda THIO fue muy buena (mejor que la que se obtuvo con la sonda GAM), se decidió tomar su resultado para la construcción del gráfico circular de la Figura 4.9.

Figura 4.9 Porcentajes de hibridación para sondas específicas para grupos taxonómicos de bacterias considerando la hibridación con EUB como el 100%. Las abreviaturas utilizadas para las sondas se explican en el texto. ND (verde) representa la fracción de microorganismos que hibridaron con la sonda general de bacterias pero no pudieron ser detectados con ninguna de las sondas específicas. Los restantes colores utilizados corresponden a las sondas específicas para las clases filogenéticas. **Naranja:** Gammaproteobacteria, **Violeta:** Betaproteobacteria, **Celeste:** Alphaproteobacteria.



Los pozos LVE y LMa1 presentan una distribución similar de bacterias en clases, con una clara prevalencia en ambos de Betaproteobacteria y un porcentaje menor de Gammaproteobacteria.

A continuación se describirá la distribución de bacterias en clases filogenéticas de acuerdo a la técnica FISH, de modo similar a lo que se hizo en la Sección 4.3.1 para los resultados de clonación y secuenciación del gen ARNr 16S de bacterias.

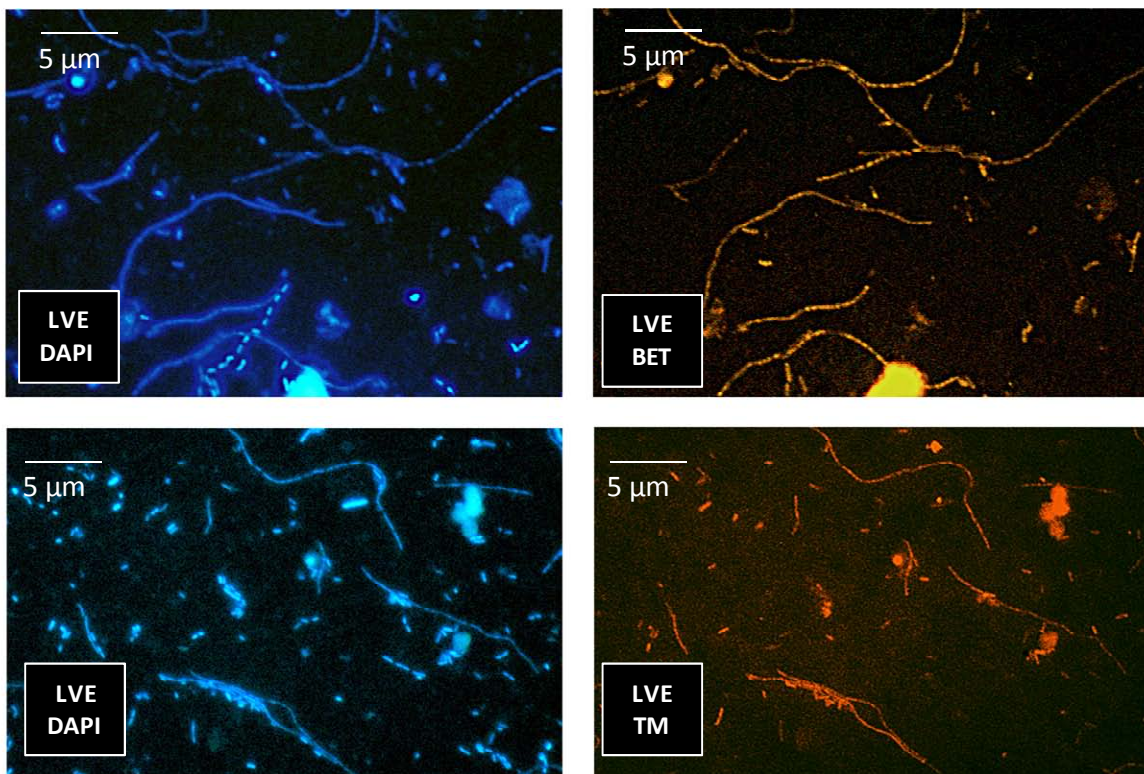
Betaproteobacteria

Los porcentajes de bacterias que corresponden a esta clase filogenética fueron del 89% para LMa1 y del 65% para LVE. Dado que en el análisis de los genes ARNr 16S de estos dos puntos se encontraron secuencias relacionadas con el género *Thiomonas*, se utilizaron las sondas TM1G0138 y TM1G0238 (TM), desarrolladas por Hallberg et al. (2005), específicas para este género. Para la muestra de LMa1, las sondas TM dieron señal de hibridación por debajo del

límite de detección. En cambio, en la muestra de agua de LVE, un 55% de las bacterias presentes hibridó con estas sondas, dejando un 10% de las bacterias que hibridaron con la sonda BET sin clasificar.

La Figura 4.10 muestra fotografías tomadas con el microscopio de epifluorescencia de la muestra de LVE teñidas con DAPI e hibridadas con las sondas BET y TM. En las imágenes de la tinción de DAPI pueden verse células de distinta morfologías; cadenas de células largas y finas, bacilos más cortos dispuestos de a dos o en filas y al menos dos tipos diferentes de bacilos sueltos. Muchos de estos microorganismos de diferentes morfologías hibridaron con la sonda específica para Betaproteobacteria. Las cadenas finitas y algunos de los bacilos sueltos (probablemente células que se desprendieron de las cadenas) también hibridaron con las sondas TM, específicas para *Thiomonas*.

Figura 4.10 Imágenes de epifluorescencia de muestras de agua fijadas *in situ* del punto LVE teñidas con el colorante DAPI e hibridadas con las sondas específicas para la clase Betaproteobacteria (BET) y el género *Thiomonas* (TM).



Gammaproteobacteria

En LMa1 un 2% de las bacterias detectadas por FISH hibridó con la sonda THIO, específica para el género *Acidithiobacillus*; quedando un 1% de las bacterias como gamaproteobacterias sin clasificar. En LVE la hibridación con la sonda THIO fue del 9%.

Alphaproteobacteria

Por su hibridación con la sonda ALF, se detectaron bacterias de esta clase en las muestras de agua de LVE y LMi (Tabla 4.7). En LMi se encontró por CARD-FISH que un 2,2% de los microorganismos detectados por DAPI hibridó con la sonda EUB y un 1,9% lo hizo con la sonda ALF. Así, se deduce que prácticamente el 100% de las bacterias presentes en esta fumarola pertenecen a la clase Alphaproteobacteria. Como puede observarse en la Figura 4.9, en LVE, un 2,4% de las bacterias fueron detectadas con la sonda ALF. La mayoría de estas (2%) hibridó con la sonda específica para el género *Acidiphilium* (ACD), dejando un 0,4% de alfaproteobacterias sin clasificar.

4.4.2. Arqueas

Para las muestras de los pozos B9, LS3 y LMi, con mayoría de arqueas, también se intentó realizar una caracterización semicuantitativa más profunda a nivel taxonómico; para ello, se utilizaron sondas correspondientes a los filos de arqueas *Crenarchaeota* y *Euryarchaeota* y al género *Sulfolobus*. A pesar de haber utilizado muchas de las sondas descritas en bibliografía, no se detectaron hibridaciones con señal significativa.

4.5 Análisis estadístico de los datos fisicoquímicos y de diversidad en los pozos geotermales de Copahue

Para evaluar las relaciones entre los parámetros fisicoquímicos determinados en las aguas de los cinco pozos de Copahue estudiados y los datos de biodiversidad (OTUs designados, recuentos de DAPI y porcentajes de hibridación), se realizaron dos análisis canónicos de correspondencia (ACC).

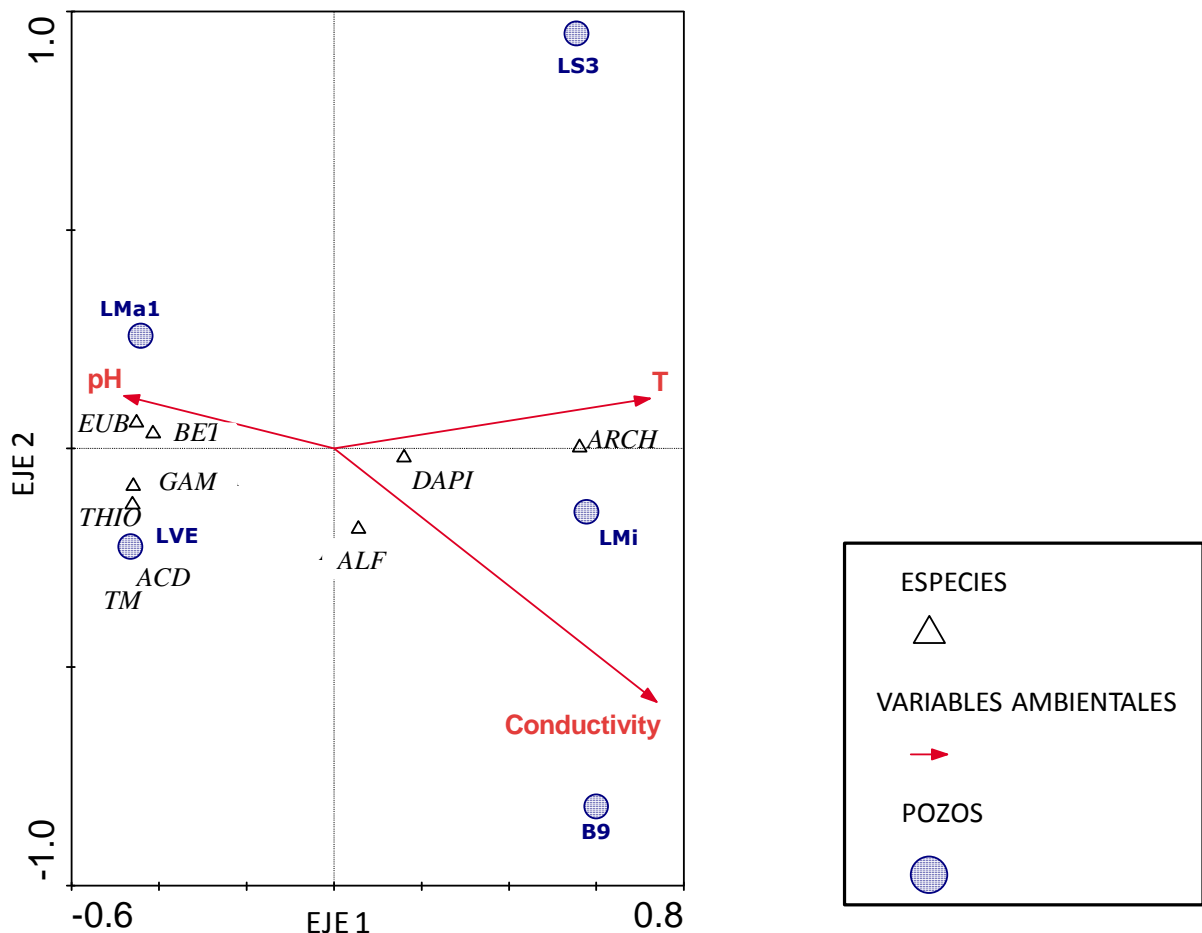
A través de las herramientas de análisis estadístico que ofrece el programa CANOCO se comprobó que muchos de los parámetros fisicoquímicos determinados en las aguas de Copahue estaban fuertemente correlacionados a la hora de explicar la variabilidad biológica de los pozos estudiados. Así, las variables que explicaban el mayor porcentaje de la varianza del sistema resultaron ser temperatura, pH y conductividad, y fueron las que se utilizaron como variables explicativas (de aquí en adelante, denominadas variables ambientales). La selección de estas variables tiene sentido físico ya que la gran mayoría de las variables que el programa detectó como correlacionadas entre sí, eran las concentraciones de aniones y cationes que, en los valores detectados en las aguas de los pozos de Copahue, no presentan ningún efecto biológico sobre la diversidad de las comunidades microbianas y cuyo comportamiento puede ser representado por la conductividad.

En función de una interpretación más adecuada de los gráficos que se muestran a continuación, se aclara la nomenclatura y simbología que utiliza el programa CANOCO. Los valores de recuentos de DAPI y los porcentajes de hibridación FISH o CARD-FISH con todas las sondas utilizadas se consideraron como especies (representadas en los gráficos por triángulos) en el ACC de la Figura 4.11. En cambio, en el ACC de la Figura 4.12, se consideraron como especies la ausencia o presencia de los OTUs de bacterias acidófilas y todos los OTUs de arqueas.

Tal cual fuera explicado en la Sección 3.9 de Materiales y Métodos, en este tipo de gráficos la intensidad de la correlación entre las especies (representadas por triángulos) y las muestras (los pozos de Copahue representados por puntos azules) con las variables ambientales se mide a través de la proyección perpendicular de estos puntos sobre las flechas rojas de dichas variables (mayor la longitud del segmento determinado por la intersección, mayor la correlación entre esa muestra o especie y la variable ambiental). La intensidad de la correlación entre especies y muestras se mide por la distancia lineal entre sus símbolos.

En el ACC de la Figura 4.11 se muestran los dos primeros ejes porque éstos permiten explicar mayoritariamente (87,2%) la varianza del sistema. La correlación entre especies y variables ambientales es muy fuerte para el primer eje y más débil para el segundo (100% y 36,8%, respectivamente). El valor propio (eigenvalue) para el eje 1 es de 0,872 indicando que el gradiente construido con el juego de datos utilizado es fuerte y válido. El test de Monte Carlo arrojó un coeficiente P de 0,0350 para el eje 1 indicando una buena correlación entre los datos de FISH y las variables ambientales.

Figura 4.11 Análisis canónico de correspondencia (ACC) de los recuentos de microorganismos realizados con el colorante DAPI y los porcentajes de hibridación con todas las sondas utilizadas (especies) y las variables ambientales temperatura, pH y conductividad. Los nombres de las sondas TM y ACD (de los géneros *Thiomonas* y *Acidiphilium*, respectivamente) fueron ligeramente desplazados para evitar el solapamiento, debido a que sus símbolos se encuentran debajo del que indica al pozo LVE, indicando una correlación total.



El gráfico muestra que el eje 1 se correlaciona positivamente con la temperatura y negativamente con el pH. El eje 2 explica solo un 2,1% de la varianza del sistema y muestra apenas una pequeña correlación negativa con la conductividad. Las muestras y las especies están bien distribuidas a lo largo del eje 1. Los pozos B9, LS3 y LMi se correlacionan positivamente con el aumento en la temperatura y en la conductividad y negativamente con el aumento de pH.

El porcentaje de hibridación con la sonda de arqueas (ARCH) está fuertemente correlacionado con el aumento de temperatura y conductividad. Es por eso que los puntos azules que representan los pozos B9, LS3 y LMi, se encuentran del mismo lado del gráfico y correlacionados de la misma manera con estas variables ambientales y especies. Los puntos de los pozos LMa1 y LVE se encuentran del otro lado del gráfico, ya que se correlacionan negativamente con el eje 1 y están muy cerca de los símbolos de la sonda EUB y de las otras de los distintos grupos taxonómicos de bacterias.

Los símbolos de las sondas específicas para los géneros *Thiomonas* y *Acidiphilium* (TM y ACD respectivamente) están debajo del punto del pozo LVE ya que estas sondas hibridaron únicamente con las muestras de agua de este sitio. El triángulo correspondiente a la sonda específica para *Alphaproteobacteria* (ALF) se encuentra entre los puntos de LVE y LMi ya que en ambos pozos se detectó aproximadamente un 2% de hibridación con esta sonda. Por último, la concentración de microorganismos, representada a través de los recuentos de DAPI, se encuentra a una distancia intermedia entre los símbolos de las sondas EUB y ARCH, aunque más cerca de esta última, ya que las poblaciones del dominio *Archaea* fueron algo superiores a las de *Bacteria*.

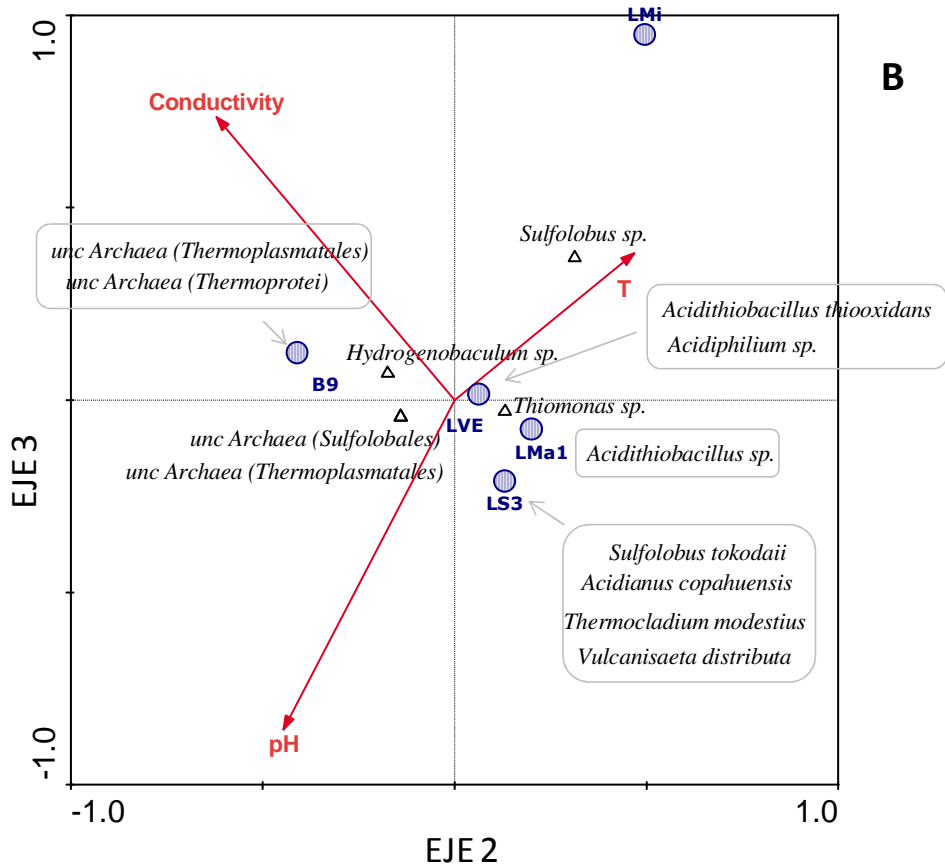
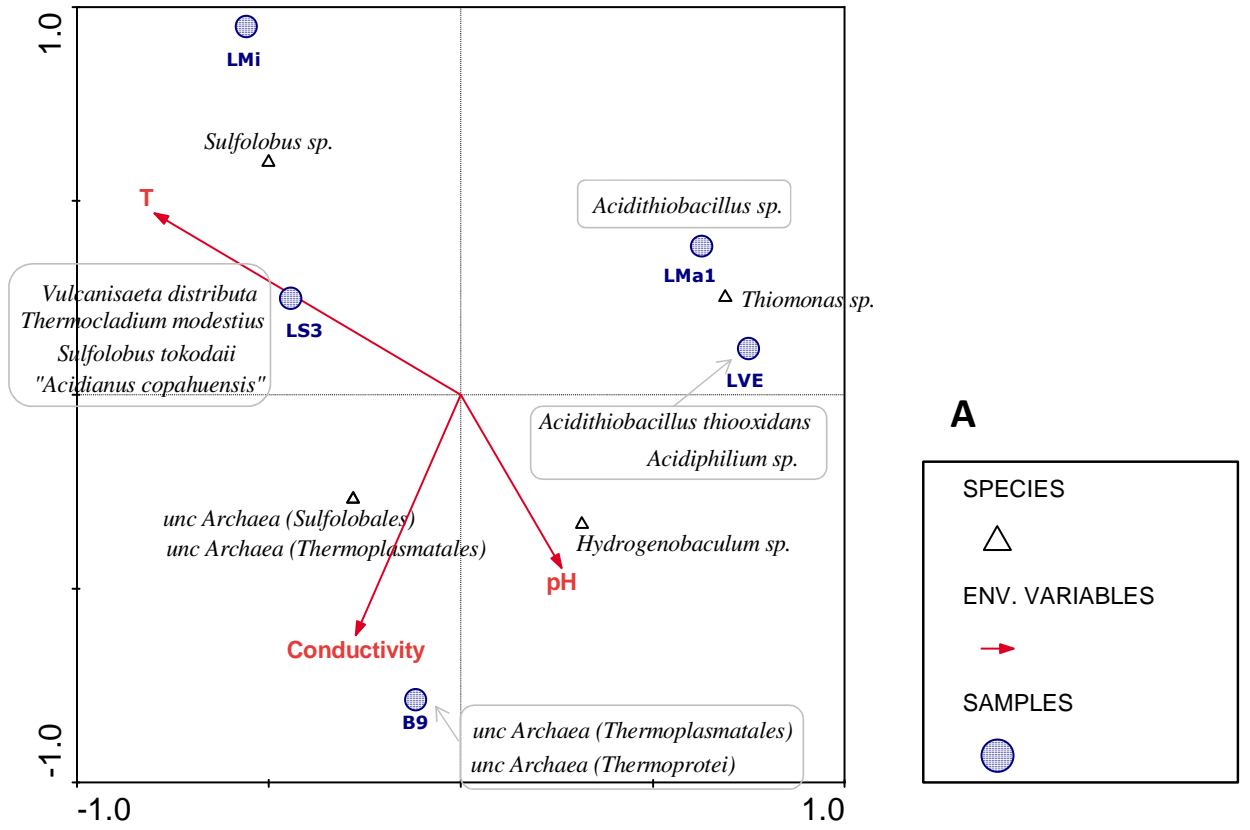
La Figura 4.12 muestra un ACC similar, pero en este caso se utilizaron como especies (triángulos) la presencia o ausencia de los OTUs relacionados con bacterias acidófilas y todos los OTUs de arqueas encontrados. Para este ACC, se necesitaron tres ejes para explicar el 77,1% de la varianza del sistema: el gráfico correspondiente a los ejes 1 y 2 se observa en la Figura 4.12 A y el de los ejes 2 y 3 en la Figura 4.12 B. La correlación entre especies (presencia o ausencia de OTUs) y variables ambientales fue para los tres ejes de 0,996. Los valores propios (eigenvalue) que indican la fuerza de los gradientes construidos por el programa, fueron de 0,896, 0,631 y 0,389 para los tres ejes analizados, respectivamente. El test de Monte Carlo arrojó un coeficiente P de 0,1910 para el eje 1 y de 0,1310 para la suma de todos los ejes.

En el gráfico de ACC de la Figura 4.12, la correlación de los pozos respecto de las variables ambientales y, en particular, temperatura y pH, es aún más clara que en el gráfico de la Figura 4.11. Se observa cómo los cinco pozos se acomodan en el gráfico de acuerdo al aumento en la temperatura de sus aguas y al aumento en los valores de pH. LMi y LS3 están cerca de los

OTUs relacionados con arqueas termófilas. El punto que representa a B9 está asociado a dos grupos de OTUs de arqueas termófilas: uno, de especies que están presentes únicamente en B9 y cuyo triángulo cae debajo del símbolo de este punto, y otro que también está correlacionado con LS3 y se encuentra a mitad de distancia entre ambos puntos. En forma similar, el triángulo que representa el OTU asociado con las bacterias acidófilas *Hydrogenobaculum* se encuentra entre los símbolos de B9 y LVE ya que secuencias relacionadas con este género fueron encontradas en ambos pozos. Recordemos que en este análisis no se consideró la cantidad de secuencias de cada OTU detectadas en los pozos, sino únicamente la presencia o ausencia de los mismos. Al igual que en el gráfico de la Figura 4.11, del otro lado del gráfico se encuentran los puntos LVE y LMa1 que correlacionan negativamente con el aumento de temperatura y positivamente con el aumento de pH. Además, estos puntos están rodeados por los OTUs de bacterias acidófilas.

En la Figura 4.12 B se muestra la correlación de pozos, especies y variables ambientales para los ejes 2 y 3. Las relaciones entre las especies y los pozos son similares, pero la distribución a lo largo de los ejes cambia y no es clara. Aparentemente, la variable ambiental pH tiene una fuerte influencia en ambos ejes y como los cambios en los valores de pH en las aguas de los pozos son muy pequeños, esto no permite que las especies puedan separarse bien a lo largo de estos ejes.

Figura 4.12 ACC donde se muestra la correlación entre la presencia o ausencia de OTUs de bacterias acidófilas y todos los OTUs de arqueas (especies, representadas con triángulos) con las variables ambientales temperatura, pH y conductividad. A: representación de ejes 1 y 2 que explican el 61,5% de la varianza. B: representación de ejes 2 y 3 que explican el 77,1% acumulativo de la varianza total. Los microorganismos en los recuadros grises fueron detectados en los pozos a cuyos símbolos están más cerca. Sus triángulos no se ven porque están ubicados debajo de los puntos azules, lo que demuestra correlación total.



4.6 Discusión

4.6.1. Influencia de las características fisicoquímicas del ambiente en la biodiversidad

La principal característica del área geotermal de Copahue es la acidez de sus aguas: los pozos estudiados presentan valores de pH entre 2,0 y 3,2. A pesar de que no se detectaron concentraciones significativas de metales pesados en solución, puede verse en la Tabla 4.5 que algunas de las secuencias de gen ARNr 16S obtenidas a partir del ADN de las comunidades microbianas de los pozos, resultaron ser similares a especies resistentes a altas concentraciones de metales pesados (y también a hidrocarburos). Así, estos microorganismos podrían ser potencialmente interesantes y útiles para aplicaciones en biohidrometalurgia y biorremediación.

El hierro suele ser un importante componente de sistemas geotermales, especialmente en los de características ácidas, en los cuales suele tener una gran influencia sobre la biodiversidad microbiana (Amaral-Zettler et al., 2011; Benson et al., 2011). Sin embargo, en nuestro estudio este metal no parece jugar un papel significativo en la definición de la estructura de las comunidades microbianas. Según pudimos comprobar con los ACC realizados, la concentración de hierro no quedó seleccionada como una de las variables con alguna influencia en la distribución de las especies o en la asociación de los distintos pozos geotermales. En los análisis estadísticos realizados, las variables ambientales que determinaron la estructura de las comunidades microbianas de Copahue resultaron ser temperatura, pH y conductividad, siendo la primera la de mayor impacto. Esto es diferente a lo encontrado en algunos pozos geotermales del Parque Nacional Yellowstone, donde la composición química tiene un impacto mucho más fuerte que la temperatura sobre la constitución de las comunidades microbianas (Mathur et al., 2007). En dicho lugar, aplicando técnicas de secuenciación masiva sobre pozos con distintas características fisicoquímicas y distinta composición mineralógica de sus sedimentos, se demostró que la diversidad microbiológica varía en cada uno de ellos principalmente de acuerdo a la geoquímica del ambiente (Inskeep et al., 2010). Del mismo modo, en un trabajo similar hecho sobre drenajes ácidos de minas, donde se utilizaron programas estadísticos y la tecnología de microarrays, se determinó que las características ambientales eran las que modulaban la estructura de la comunidad microbiana (Xie et al., 2010). Según los resultados de estos autores, las concentraciones crecientes de S, Mg, Cu, Ni, Co, B y La, fueron las que mostraron mayor correlación positiva con la estructura de la comunidad microbiana frente a otras variables como

concentraciones de Fe, Al, P, V, Y, Zr y Sc.

En el caso de los pozos geotermales de Copahue, la temperatura es la variable con mayor efecto sobre la estructura de la comunidad microbiana, tanto al analizar los datos de FISH y CARD-FISH como los de presencia/ausencia de especies acidófilas y arqueas. En ambos casos, los puntos estudiados quedaron divididos por esa variable en dos grupos bien marcados: por un lado, los pozos de temperatura moderada (LVE y LMa1, con 31,5 y 36,0°C, respectivamente) y, por otro, los pozos de mayor temperatura (B9, LS3 y LMi, con 40,5, 54,3 y 87,0°C, respectivamente). Como se mencionó anteriormente, los resultados de FISH y CARD-FISH no sólo dan información semicuantitativa de las comunidades procariotas, sino que, además, ponen de manifiesto las especies, y sus respectivas abundancias, que se encuentran viables en el ambiente en el momento de recolección de las muestras.

Los dos pozos del primer grupo presentan una estructura de comunidad procariota muy similar. Ambos están colonizados prácticamente por completo por bacterias, destacándose géneros como *Thiomonas*, *Acidithiobacillus* y *Acidiphilium*; estos géneros están más relacionados con ambientes ácidos del tipo de drenajes ácidos de mina que con ambientes geotermales similares a Copahue.

Al avanzar en el gradiente de temperatura, se ubica el pozo B9 que presenta condiciones de temperatura moderadas-altas. Según lo visto a través de las hibridaciones de FISH (Figura 4.6), este pozo se encuentra colonizado principalmente por arqueas. Aun así, es interesante destacar que el análisis de su librería de clones de bacterias reveló una marcada cantidad de secuencias relacionadas con el género *Hydrogenobaculum*. Miembros de este género han sido encontrados en otras zonas geotermales ácidas, algunas veces relacionadas al ciclo del As (Donahoe-Christiansen et al., 2004; Hamamura et al., 2009; Burgess et al., 2012). No obstante, en nuestro caso no se detectaron concentraciones apreciables de As, mientras que otros estudios geoquímicos realizados en el área reportaron concentraciones muy bajas (Parker et al., 2008; Farnfield et al., 2012).

Al continuar avanzando sobre la flecha de la variable temperatura en los ACC se encuentra el pozo LS3. Si bien este pozo presenta alta temperatura y un altísimo porcentaje de hibridación con la sonda ARCH, en el ACC de la Figura 4.11 parecería alejado de estas variables. Es posible que este comportamiento pueda explicarse considerando el menor valor de conductividad que presenta este punto (Tabla 4.1). Recordemos que la correlación entre puntos y variables ambientales se mide por la proyección perpendicular de los primeros sobre el vector de los segundos (flechas rojas en el gráfico). Así, la proyección del punto de LS3 sobre la flecha que representa la conductividad cae en valores negativos de esta variable y esto justificaría su

posición en el gráfico. Por otro lado, se ve claramente en el ACC de la Figura 4.12 como LS3 correlaciona positivamente con los OTUs de arqueas.

En el extremo de alta temperatura encuentra el punto LMi, que, como mencionamos anteriormente, es en realidad una pequeña fumarola que desprende vapor y agua a temperaturas cercanas a la de ebullición del agua en las condiciones de presión atmosférica del lugar. LMi presenta las correlaciones más fuertes con la temperatura y la conductividad (positivas) y con el pH (negativa). Estas características ambientales extremas se reflejan en su composición microbiana formada casi exclusivamente por un único OTU de arqueas relacionado con el género *Sulfolobus*.

4.6.2. Diversidad procariota en las aguas de los pozos geotermales de Copahue

La Figura 4.13 (gráficos A-E) muestra una recopilación de los resultados obtenidos para las aguas de los cinco pozos estudiados, tanto a través de las técnicas semicuantitativas de FISH y CARD-FISH, como por la abundancia de los OTUs y su clasificación en grupos filogenéticos hecha con la información provista por clonación y secuenciación del gen ARNr 16S de bacterias y arqueas. Esta representación gráfica permite una mejor comparación entre los datos obtenidos por ambas técnicas y resalta la importancia de cada uno de los grupos de microorganismos en los distintos pozos.

Los gráficos de anillos en el centro de las figuras muestran la distribución de los microorganismos de cada pozo en los dominios *Bacteria* y *Archaea* usando las sondas EUB 338 (I+II+III) y ARCH 915. Estos porcentajes de hibridación están basados en los recuentos de DAPI. Aquí ND representa la fracción de microorganismos teñidos con DAPI pero no detectados con ninguna de las dos sondas de dominio. Los porcentajes de hibridación de las sondas específicas de grupos taxonómicos de bacterias se calcularon considerando la hibridación con EUB como el total. En estos gráficos circulares, ubicados a la derecha, ND representa la fracción de bacterias que hibridaron con EUB pero no fueron detectadas con ninguna de las sondas específicas utilizadas. Las bibliotecas de clones del gen ARNr 16S de bacterias y arqueas se muestran en gráficos circulares a la izquierda de las imágenes. Estos representan la abundancia de los OTUs respectivos. Para dar identidad a estos OTUs se utilizó el nivel más específico de la clasificación taxonómica que pudo alcanzarse (>97% de confianza) según la herramienta Classifier de RDP. Para los OTUs de bacteria, los diferentes colores indican las

clases filogenéticas, manteniendo los mismos colores que para las sondas de clases utilizadas en FISH. **Naranja:** *Gammaproteobacteria*, **Violeta:** *Betaproteobacteria*, **Celeste:** *Alphaproteobacteria*, **Rojo:** Aquificae, **Verde brillante:** Bacilli (Firmicutes) Para arqueas, se muestran en distintos colores los niveles taxonómicos más específicos que pudieron alcanzarse según la clasificación taxonómica de RDP (>97% de confianza).

Figura 4.13 Diversidad procariota en las aguas de los pozos geotermales de Copahue de acuerdo a los resultados obtenidos mediante las técnicas de hibridación *in situ* FISH y CARD-FISH y secuenciación del gen ARNr 16S de bacterias y arqueas. Las abreviaturas y colores utilizados se explican en el texto. A: LVE, B: LMa1, C: B9. D: LS3, E: LMi.

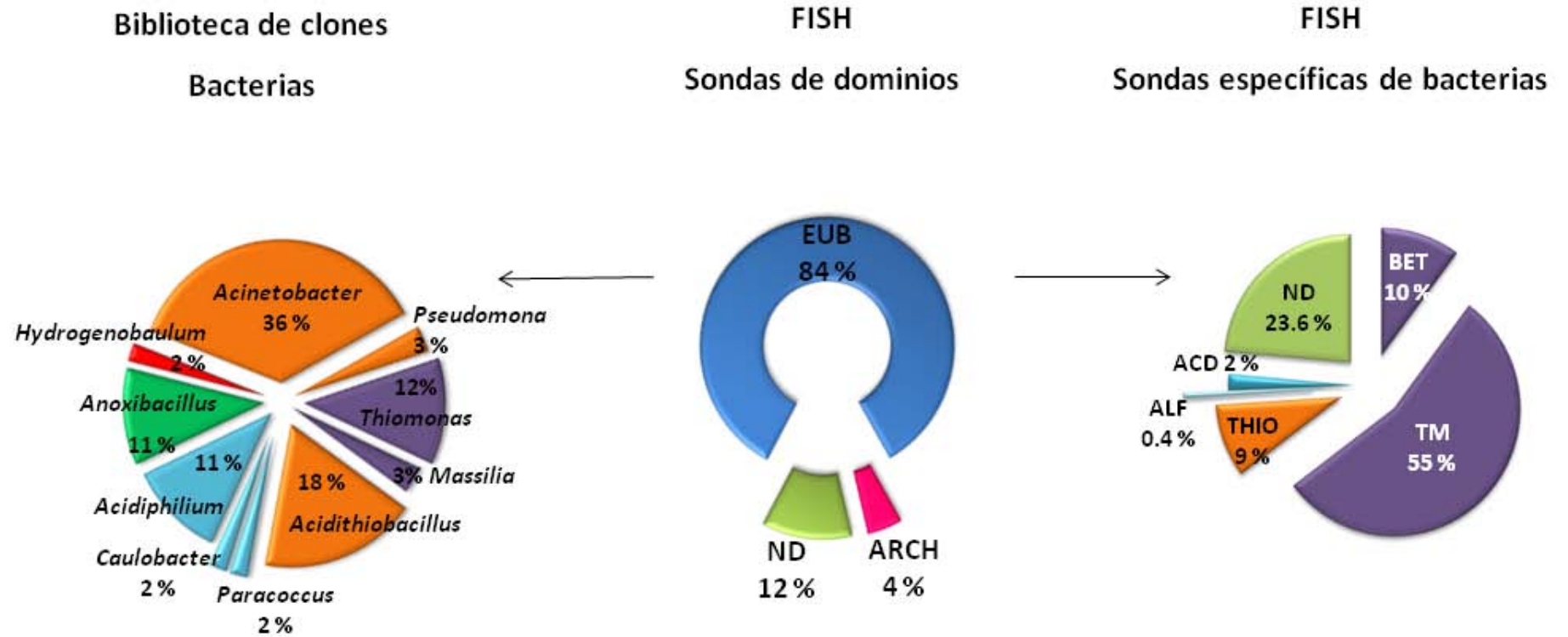


Figura 4. 13 A

LVE
31.5°C

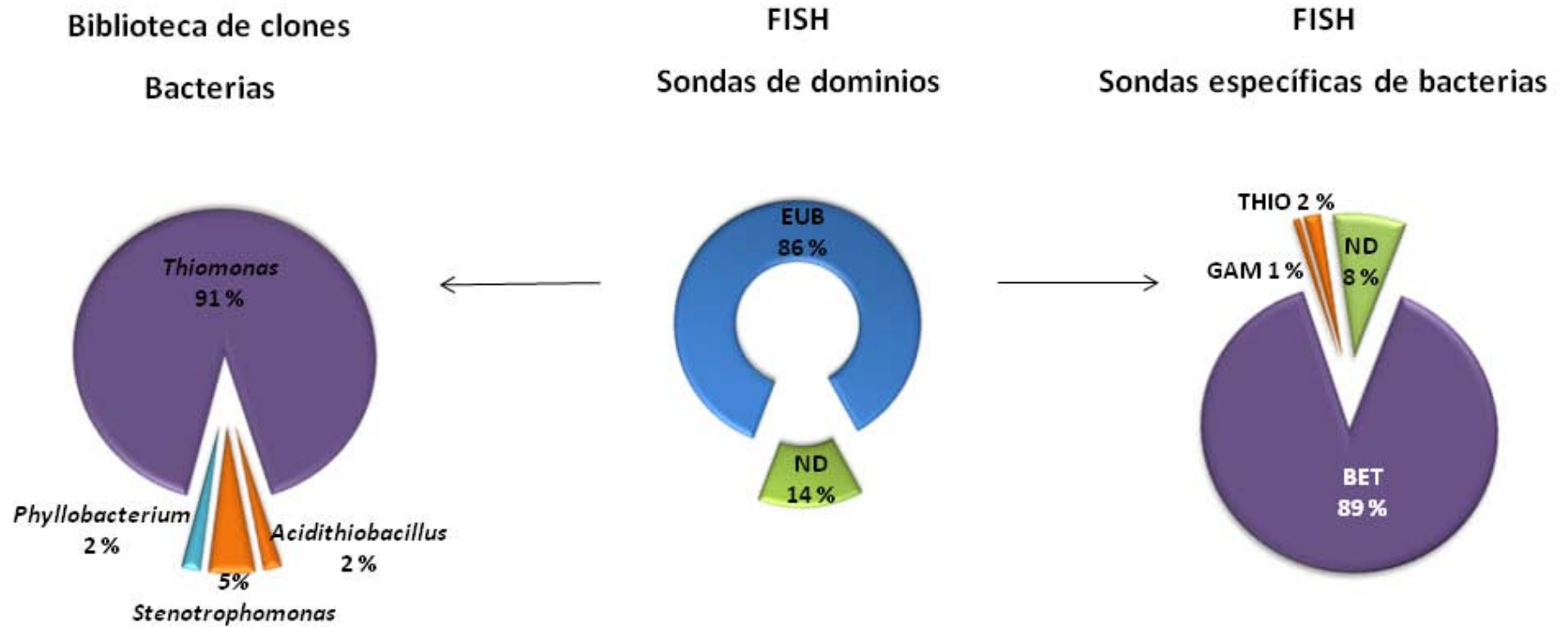


Figura 4. 13 B

LMa1
36,0 °C

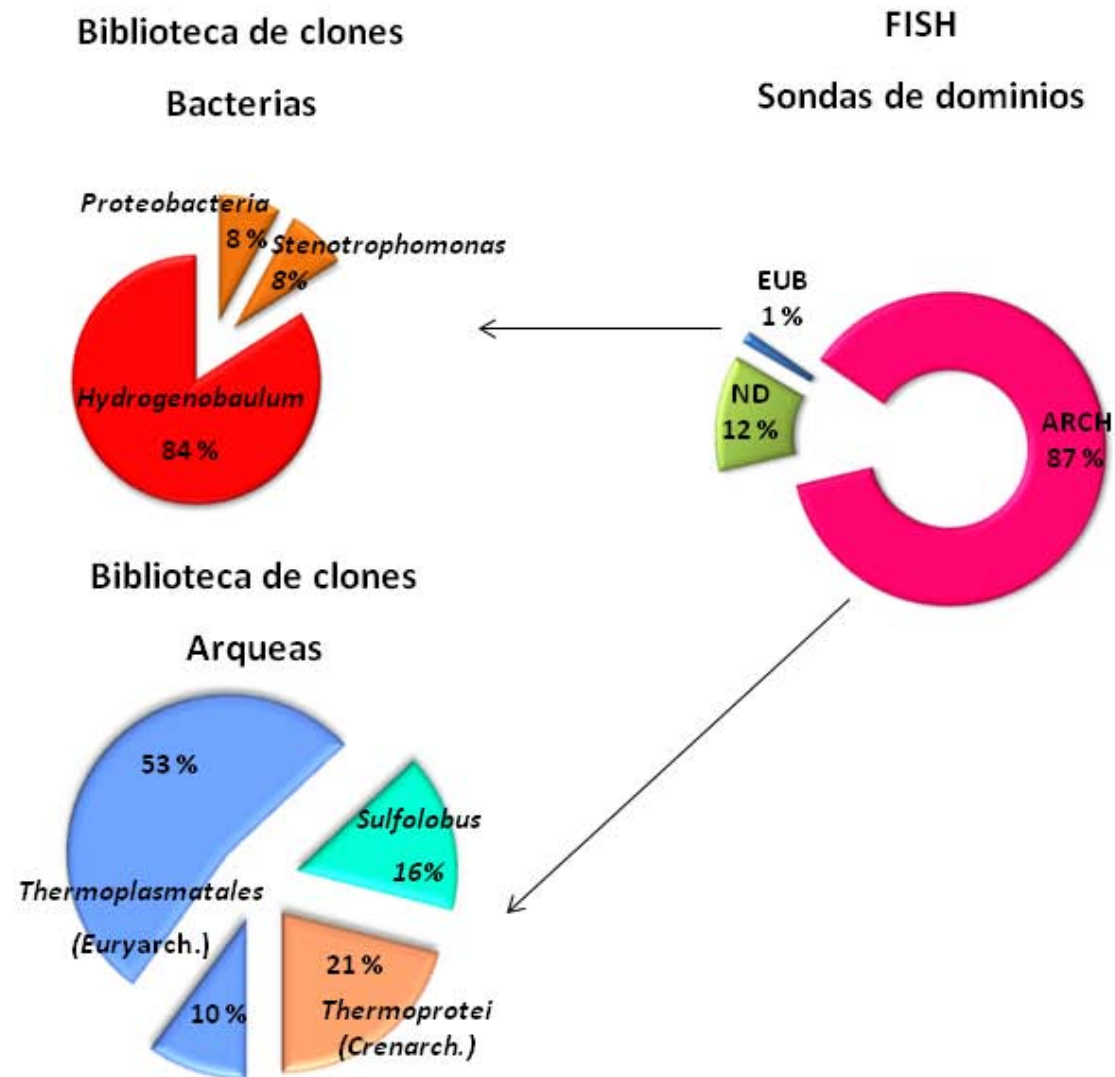


Figura 4. 13 C

B9
40.5°C

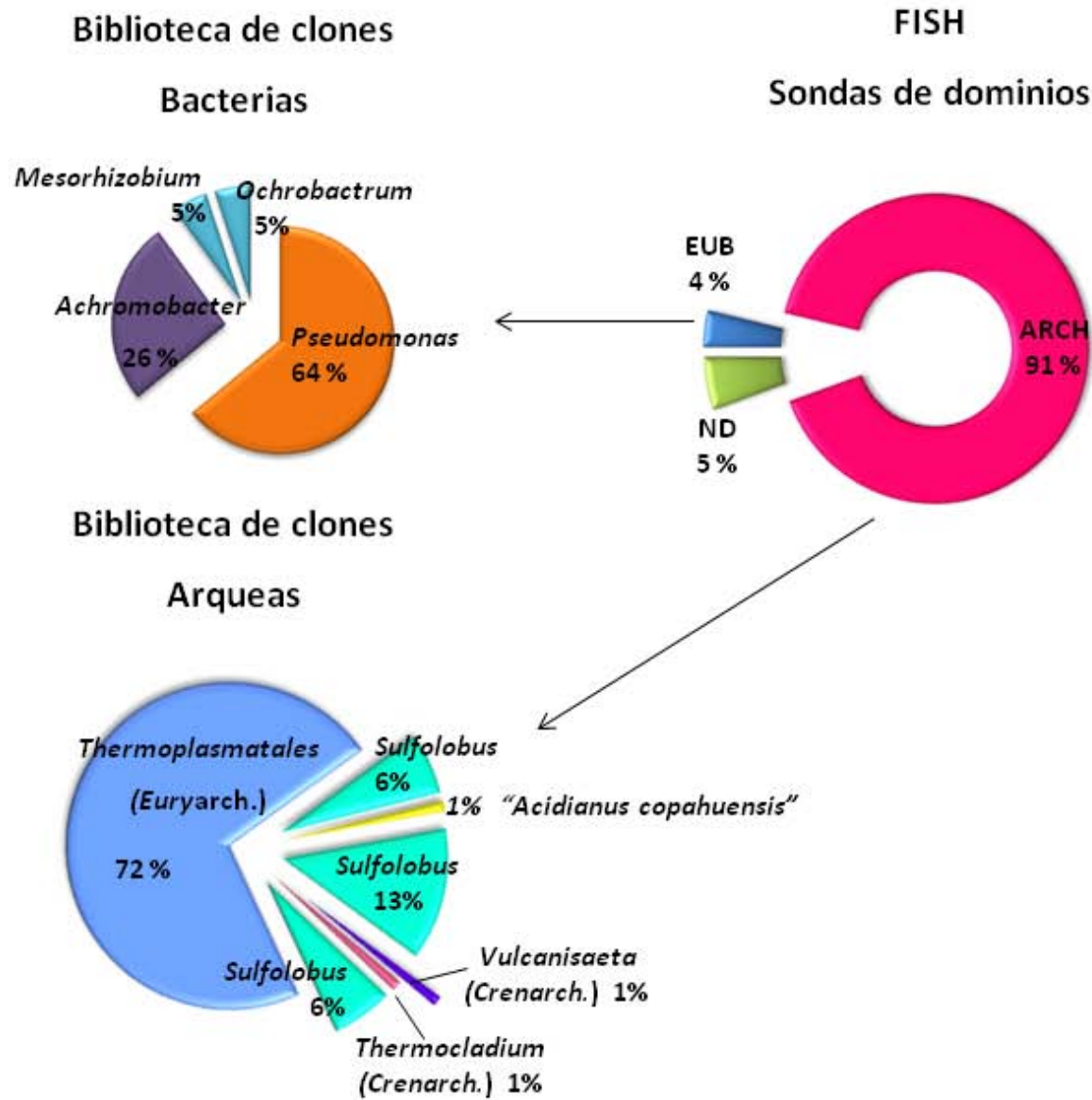


Figura 4. 13 D

LS3
54.3°C

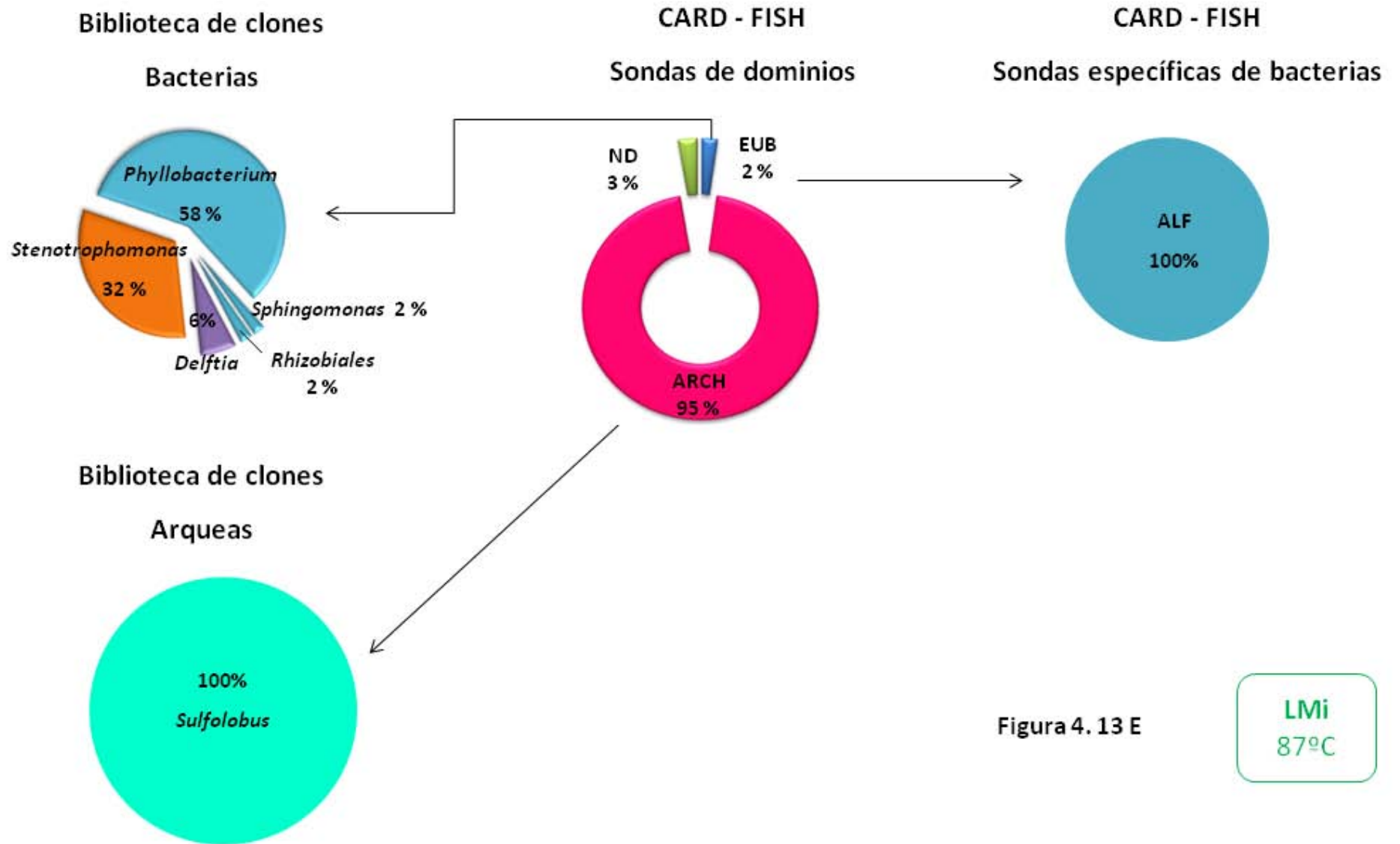


Figura 4. 13 E

LMI
87°C

La comunidad procariota de Copahue presenta una biodiversidad muy rica en microorganismos acidófilos y termófilos. Dentro del dominio Bacteria, las especies del género *Hydrogenobaculum* pertenecientes al filo Aquificae, son las que más han sido reportadas en otros ambientes geotermales similares. La similitud de estas secuencias con las de los miembros aislados y caracterizados del género es baja, del orden del 92% de acuerdo a BLASTn; aun así, fueron clasificadas dentro del género *Hydrogenobaculum* con el 100% de confianza según la herramienta Classifier de RDP. Esta diferencia entre las secuencias de las especies conocidas del género y las detectadas en Copahue podría ser la justificación de la ausencia de hibridación al utilizar la sonda Aqui-1197, específica para el filo Aquificae. Para comprobarlo se utilizó la herramienta Probe de ARB verificando que las secuencias de Copahue no presentaban la diana de esta sonda. En cualquier caso, la población del género *Hydrogenobaculum* en los pozos de Copahue, parece ser muy baja o tal vez con escasa viabilidad; precisamente, los datos de FISH revelan que en el pozo B9 la fracción total de bacterias es apenas del 1% mientras que en el pozo LVE, si bien las bacterias son mayoría, la comunidad está dominada por beta y gammaproteobacterias. En el futuro próximo, y fuera del alcance de este trabajo de tesis, se espera diseñar nuevas sondas para el filo Aquificae que incluyan secuencias detectadas en Copahue.

En nuestro estudio no se encontraron otras especies del filo Aquificae, como *Sulfurihydrogenibium*, *Hydrogenobacter*, *Thermocrinis* o *Desulfurobacterium*, que también suelen estar presentes en ambientes geotermales (Reysenbach et al., 2000; Hall et al., 2008; Hamamura et al., 2009; Burgess et al., 2012; Kozubal et al., 2012). Es probable que esto se deba a que estas especies de Aquificae, se desarrollan mayoritariamente en condiciones de pH neutro, e incluso algunas de ellas presentan valores de pH óptimos de crecimiento ligeramente alcalino.

El tipo de bacterias encontradas en los pozos de mayores temperaturas resultó llamativo. En lugar de hallar especies termófilas, detectadas principalmente en ambientes geotermales, nuestros resultados muestran que las poblaciones bacterianas de LS3 y LMi están compuestas por especies ubicuas como *Delftia*, *Stenotrophomonas* y *Pseudomonas*. Recordemos que en los pozos de mayor temperatura el recuento de bacterias fue muy bajo (Figuras 4.3 y 4.13 C, D y E) y, por ende, podría suponerse que estas especies de bacterias detectadas por PCR no son una parte importante de la estructura de la comunidad, o tal vez, ni siquiera estén metabólicamente activas. Por otro lado, la detección de secuencias de especies como aquellas, podría estar relacionada con la presencia del hombre y de animales en las zonas cercanas a los muestreos realizados.

Aunque la detección de aquellas especies podría atribuirse a la alta sensibilidad de la reacción

de PCR (capaz de amplificar aun ínfimas cantidades de ADN molde presente en a las muestras, o incluso en los reactivos utilizados para la extracción del material genético) tal cual ha sido presentado en otros reportes en situaciones semejantes (Tanner et al., 1998; Kitchin et al., 1990; Sarkar et al., 1990), se descartaron posibles problemas de contaminación en la reacción de PCR ya que los controles blanco de las mismas dieron siempre resultados negativos.

En las piletas LVE y LMa1 de temperatura moderada, la diversidad bacteriana resultó ser muy parecida a la detectada en ambientes ácidos de mina, con secuencias estrechamente relacionadas a las de bacterias de los géneros *Acidithiobacillus*, *Thiomonas* y *Acidiphilium*, tal como fue descrito por Hallberg y colaboradores (2005) en una mina metalífera en la parte norte de Gales. Una diferencia notable entre las comunidades generalmente detectadas en lugares relacionados con la actividad minera y las encontradas en Copahue, es que en las aguas de los pozos no se detectaron secuencias de especies Fe-oxidantes. Esto puede entenderse al observar la Tabla 4.1, donde se ve que las concentraciones de Fe medidas son bajas. Sin embargo, en la zona hay reportes de aislamiento de especies Fe-oxidantes, tales como *Acidithiobacillus ferrooxidans*, *Leptospirillum ferrooxidans* y *Ferroplasma acidiphilium* (Lavalle et al., 2005; Chiacchiarini et al., 2010).

Las comunidades de bacterias de LVE y LMa1 presentan algunas diferencias. En LMa1 se detectaron únicamente cuatro OTUs y el lugar parece estar dominado por especies relacionadas con el género *Thiomonas* y en menor cantidad con el género *Acidithiobacillus*. De acuerdo a las hibridaciones realizadas con la sonda específica TM, LVE también estaría dominada por *Thiomonas*, pero según la información obtenida por secuenciación, esta comunidad es más diversa, con doce OTUs; muchos de ellos están relacionados con especies asociadas a la presencia del hombre y animales, como *Acinetobacter*, *Massilia* y *Pseudomonas*. Una posible explicación para esta diferencia en las comunidades microbianas de dos lugares con características fisicoquímicas similares, podría deberse a que LVE, como ya mencionamos, forma parte del complejo de baños geotermales de uso terapéutico y tiene un alto nivel de intervención antropogénica, mientras que LMa1 se encuentra a algunos kilómetros de distancia, en un área actualmente libre de actividad humana y presencia de animales. En LVE se detectó aproximadamente un 4% de hibridación con la sonda ARCH, pero no fue posible obtener amplificaciones del gen ARNr 16S de arqueas a pesar de haber usado una gran cantidad de cebadores descritos en literatura para este dominio.

La detección de las especies relacionadas con el género *Thiomonas* requiere un comentario más detallado. Una vez conocida la presencia de secuencias relacionadas con este género en las muestras de LVE y LMa1, se utilizaron las sondas TM1G0138 y TM1G0238, específicamente

diseñadas por Hallberg y col. (2005), para intentar su cuantificación. Como ya mencionamos al hablar de los resultados de FISH, sólo se obtuvieron hibridaciones claras con estas sondas para las muestras de LVE. Ante la sorpresa de este resultado y sabiendo que las secuencias encontradas en los dos pozos eran muy similares entre sí, procedimos a chequear fehacientemente la similitud de las secuencias, y, en segunda instancia, a verificar la complementariedad de bases entre las sondas y sus sitios diana en las secuencias de *Thiomonas* de Copahue. A partir de una matriz de similitud realizada con el programa ARB, comprobamos que las secuencias relacionadas con el género *Thiomonas* encontradas en ambos pozos eran 99% homólogas. Utilizando la herramienta Probe de ARB comprobamos que ninguna de las secuencias de *Thiomonas* de Copahue poseían el sitio diana para la sonda TM1G0138. A pesar de ser muy parecidas, las secuencias del pozo LVE presentaban el blanco exacto para la sonda TM1G0238, mientras que las de LMa1 tenían una base a mitad de la secuencia de la sonda con la que no había complementariedad (un mismach central). Probablemente esta diferencia en una posición clave sea la responsable de que la sonda no se aparee bien con su diana y produzca una muy mala señal de hibridación. Para solucionar este inconveniente, aunque fuera de los objetivos de este trabajo de tesis, se diseñará una nueva sonda para la cual se incluyan las secuencias de *Thiomonas* halladas en Copahue.

La comunidad de arqueas encontradas en los pozos de Copahue también presenta algunas peculiaridades. Como se ve en las Figuras 4.3 y 4.13 C, D y E, tres de los cinco pozos relevados están dominados por arqueas. Mientras que más del 96% de las secuencias de bacterias resultaron ser, como mínimo, 97% similares a especies cultivadas y caracterizadas, la gran mayoría de las secuencias de arqueas encontradas resultaron tener menos del 97% de similitud con secuencias de especies cultivadas; incluso, en muchos casos presentaron esos porcentajes de similitud, o inferiores, con secuencias de especies no cultivadas (Tablas 4.4 y 4.6).

El árbol filogenético de la Figura 4.5 muestra otro resultado que representa las particularidades de las arqueas de Copahue; se observa cómo los OTUs marcados con colores forman ramas separadas dentro de las clases filogenéticas ya conocidas. Si bien en este estudio no podemos afirmar que las arqueas encontradas pertenezcan a nuevos linajes ancestrales ubicados en la raíz del árbol de la vida, como ocurre en algunos otros ambientes extremos, nuestros resultados sugieren que las arqueas encontradas podrían ser nuevas especies autóctonas y exclusivas de esta zona geotermal argentina. Así, Copahue resulta ser un hábitat muy interesante para la búsqueda de nuevas especies extremófilas. Un ejemplo del potencial del lugar, es el descubrimiento de la arquea *candidatus "Acidianus copahuensis"* aislada a partir de muestras de diversos pozos de Copahue. Esta nueva especie termoacidófila se caracteriza por

una amplia flexibilidad en sus condiciones de crecimiento y una gran diversidad metabólica, por lo cual es capaz de crecer en condiciones aeróbicas y anaeróbicas a expensas de diversos sustratos como S, tetrionato, Fe(II) e H₂ (Giaveno et al., 2013). Estas características la convierten en un potencial candidato para mejorar aplicaciones en biolixiviación y/o biominería.

Un indicio muy importante de las potenciales aplicaciones en estas áreas biotecnológicas para las arqueas extremófilas de la zona, puede verse al analizar los OTUs afiliados con el género *Sulfolobus* en la Tabla 4.6. Secuencias similares a cuatro de los cinco OTUs de este género fueron detectadas también en un estudio realizado mediante técnicas cultivo independientes para relevar la diversidad de arqueas en un biorreactor de biolixiviación de calcopirita a 78°C y pH 1,6 (Mikkelsen et al., 2006). Aunque las especies presentes en los pozos de Copahue parecen no ser exactamente las mismas que se detectaron en este trabajo, la similitud en las condiciones fisicoquímicas del biorreactor y de los pozos sugeriría que las especies de *Sulfolobus* de Copahue, una vez cultivadas, probablemente puedan ser usadas en operaciones de biolixiviación/biooxidación a altas temperaturas.

Una vez analizados los datos obtenidos por secuenciación del gen ARNr 16S de las arqueas de Copahue, intentamos cuantificar los distintos grupos taxonómicos presentes utilizando varias sondas para los filos Crenarchaeota y Euryarchaeota y para el género *Sulfolobus* descritas en bibliografía. Como mencionamos en el final de la Sección 4.4.2, ninguna de las sondas ensayadas dio resultados positivos. Debido a esto decidimos comprobar con el programa ARB los blancos y dianas de las sondas y las secuencias de arqueas de Copahue. De ese modo se encontró que ninguna de las muchas sondas descritas en bibliografía era complementaria de las secuencias encontradas en los pozos. Seguramente esto se deba a que las arqueas de Copahue son especies nuevas, filogenéticamente distanciadas de las reportadas hasta hoy. Así, se intentaron diseñar sondas para detectar los grupos taxonómicos de arqueas que encontramos en Copahue, principalmente los filos Crenarchaeota y Euryarchaeota y el orden *Sulfolobales*. No obstante, esto no fue posible ya que la herramienta Probe de ARB no pudo encontrar una combinación de 18 a 20 nucleótidos que sea específica para alguno de estos grupos taxonómicos.

Con el objetivo de caracterizar mejor la biodiversidad encontrada en los pozos geotermales de Copahue, realizamos algunas comparaciones con la biodiversidad de otros sitios similares reportados. Estrictamente, la biodiversidad debería compararse basándose en los índices biológicos, pero en la mayoría de los trabajos publicados dichos índices no se encuentran disponibles. Por otro lado, es poco frecuente encontrar trabajos en los cuales se hayan utilizados técnicas que brinden información cuantitativa. Por estos dos motivos, las comparaciones se

realizaron principalmente basándonos en la cantidad de secuencias detectadas de las diferentes especies reportadas.

Uno de los trabajos escogidos para este análisis es el publicado por Reysenbach y col. (2000) sobre Calcite Spring, una serie de fumarolas de pH neutro y temperatura de aproximadamente 83°C, en el Parque Nacional Yellowstone. Los autores reportaron que aproximadamente el 95% de los microorganismos presentes eran bacterias asociadas a un linaje nuevo dentro del orden Aquificales (resultado obtenido por hibridación con una sonda específica para Aquificales diferente a la utilizada en este trabajo y confirmado por secuenciación del gen ARNr 16S). Dentro de la biblioteca de clones de arqueas encontraron un 40% de secuencias relacionadas con un filotipo particular de korarqueotas, un 17% de clones relacionados con *Pyrobaculum islandicum* y otro 17% relacionado con *Desulfococcus mobilis*. Estos resultados son muy diferentes de lo encontrado para la fumarola LMi exclusivamente compuesta las arqueas del género *Sulfolobus*. Según estos resultados, el pH tendría una gran influencia en la estructura de la comunidad microbiana, aún para ambientes que presentan condiciones extremas de temperatura similares. Al igual que en LMi, en Calcite Spring no se encontraron secuencias relacionadas con el filo Euryalchaeota, lo cual es esperable ya que las especies de este grupo no se caracterizan por ser resistentes a condiciones extremas de temperatura. Benson y col. (2011) realizaron un estudio muy completo sobre fumarolas sulfuradas, no sulfuradas y otras ricas en Fe en diferentes parques geotermales (Parque Nacional Yellowstone y Parque Nacional Lassen en Estados Unidos y Parque Nacional Volcanes en Hawaii). Todas las fumarolas analizadas eran de alta temperatura (entre 65 y 93°C) y valores de pH entre 2,5 y 6,9. Según los autores el filo Crenarchaeota fue el dominante en todas las fumarolas estudiadas y las especies del género *Sulfolobus* predominaron en los sitios ricos en S y en Fe, mientras que en los no sulfurados la mayoría de las secuencias se correspondían con crenarqueas sin cultivar. En ese estudio encontraron que la diversidad de arqueas disminuía al aumentar la temperatura. El mismo comportamiento fue detectado en los pozos de Copahue, llegando al caso extremo de LMi donde se encontró una única especie de arqueas y los índices de diversidad dieron el valor de cero. Al analizar las comunidades de bacterias, se observan diferencias entre los resultados de Benson y los que se presentaron en este estudio. Según estos autores, la mayoría de las bacterias detectadas en todas las fumarolas estaban relacionadas con especies no cultivadas asociadas con los géneros *Alicyclobacillus*, *Chloroflexi*, *Thermoanaerobacter*, *Leptospirillum* y *Ferrimicrobium*; sin embargo, ninguno de esos géneros fue detectado en los pozos estudiados.

En el campo geotermal con características ácidas de Ohwakudani (Hakone, Japón), las especies de arqueas encontradas por Kato y colaboradores (2011) fueron similares a las de

Copahue, pero su distribución y abundancia resultó ser algo diferente. En las muestras tomadas en fumarolas de alta temperatura, las especies del filo Crenarchaeota fueron predominantes (situación similar a la encontrada en LMi) pero en este caso los géneros más abundantes fueron *Vulcanisaeta* y *Caldivirga*, con una menor contribución de *Sulfolobus*. En las muestras recolectadas en pozos de temperaturas menos extremas, se encontraron secuencias relacionadas con la clase Thermoplasmata del filo Euryarchaeota, tal cual encontramos en B9 y LS3. A diferencia de los que ocurre en los pozos de LMa1 y LVE, estos autores encontraron que en las muestras de temperatura moderada del parque Ohwakudani predominaban arqueas relacionadas con los géneros termófilos *Metallosphaera* y *Acidianus*. Otra diferencia notoria entre las librerías de clones de los dos parques geotermales es que en la japonesa la gran mayoría de las secuencias de arqueas presentaban porcentajes de similitud entre el 96 y 99% con especies cultivadas, mientras que en Copahue la mayoría de los clones de arqueas parece no tener parientes cultivados cercanos e incluso tampoco no cultivados cercanos, sugiriendo que se trata de nuevas especies autóctonas.

También fue analizado el trabajo publicado por Aditiawati y colaboradores en 2009 sobre el campo geotermal Kawah Hujan B en Indonesia; este campo geotermal parece ser muy similar al de Copahue en cuanto a sus características fisicoquímicas por tratarse de un área rica en compuestos de azufre, con altas concentraciones de sulfatos, valores de pH alrededor de 2 y altas temperaturas. En este caso, los autores encontraron que la gran mayoría de las especies microbianas estaban afiliadas a los grupos Proteobacteria (*Aeromonas*, *Pesudomonas*, *Xenorhabdus* y *Enterobacter*), Firmicutes (principalmente *Alycyclobacillus*) y Crenarchaeota. En general, esto es similar a lo encontrado en los pozos de Copahue, aunque en éstos la única representación del filo Firmicutes se detectó en LVE, con un 11% de secuencias relacionadas con el género *Anoxybacillus*.

4.6.3. Posibles metabolismos procariotas presentes en los pozos geotermales de Copahue

Con el objetivo de realizar una primera aproximación a los posibles metabolismos procariotas presentes en las aguas de los pozos geotermales de Copahue, la Tabla 4.7 recoge las principales características metabólicas de las especies cultivadas y caracterizadas, más cercanas de los OTUs detectados en nuestro estudio. Para ampliar lo más posible el espectro, consideramos como especies cercanas hasta un 0,900 de similitud en una búsqueda utilizando la base de datos de RDP. Como vimos en las tablas anteriores, los OTUs de arqueas no presentan secuencias muy cercanas cultivadas, algunos de ellos ni siquiera dentro del amplio rango de similitud que utilizamos en este análisis y, por ende, no podemos obtener ninguna información a partir de ellos. La Tabla 4.7 muestra que potencialmente existiría una amplia variedad de metabolismos presentes en las aguas de los pozos.

Tabla 4.7. Especies cultivadas más cercanas (hasta una similitud de 0,900 en una búsqueda en RDP) de los OTUs de bacterias y arqueas encontrados en los cinco pozos de Copahue estudiados y sus principales características metabólicas. Para las que corresponda, se muestra también el número de depósito en colecciones de cepas. (T) representa “cepa tipo” (type strain).

Nombre OTU	N° de clones (%)	Especie aislada más cercana	N° de acceso	Similitud	Características metabólicas de las especies aisladas
LVE_bact_d5	20 (36)	<i>Acinetobacter baumannii</i>	AY738399	1.000	Aeróbico. Quimioheterótrofo. Capaz de producir biofilms
LVE_bact_f5	2 (3)	<i>Pseudomonas stutzeri</i>	EU741072	0.998	Quimioheterótrofo. Existen especies desnitrificantes y otras fijadoras de N ₂ . Metaboliza alta variedad de contaminantes. Resistente a altas concentraciones de metales pesados. Algunas cepas pueden utilizar tiosulfato como fuente de energía.
LVE_bact_b11	7 (12)	<i>Thiomonas sp.</i>	AJ549219	0.999	Aeróbico. Acidófilo moderado. Quimiolitautótrofo facultativo o mixótrofo. Crece a partir de algunos sulfuros metálicos, H ₂ S o S. Alta resistencia a metales tóxicos
LVE_bact_b5	2 (3)	<i>Massilia timonae</i>	AY445911	1.000	Aeróbico. Quimioheterótrofo. Tendencia a agregarse y formar biofilms
LVE_bact_c7	10 (18)	<i>Acidithiobacillus thiooxidans</i> (T); ATCC19377	Y11596	0.999	Aeróbico. Acidófilo. Quimiolitautótrofo obligado. Oxida compuestos de S. Fija CO ₂ . Alta resistencia a metales tóxicos.
LVE_bact_a6	1 (2)	<i>Paracoccus sp.</i>	AB008114	0.998	Quimioheterótrofo. Capaz de degradar insecticidas organofosforados.
LVE_bact_g2	1 (2)	<i>Caulobacter henricii</i> ; ATCC15253	AB008532	0.962	Aeróbico. Oligotrófico.
LVE_bact_g10	6 (11)	<i>Acidiphilium sp.</i>	AF376026	0.995	Aeróbico. Acidofilo. Quimioorganotrófo obligado. Oxida compuestos de S.
LVE_bact_c6	6 (11)	<i>Anoxybacillus flavithermus</i>	EU816689	0.997	Anaerobio facultativo. Termófilo. Quimioorganotrófo. Alcalinotolerante.
LVE_bact_c8	1 (2)	<i>Hydrogenobaculum sp</i>	AM259503	0.929	Aeróbico. Acidofilo. Termófilo. Oxida H ₂ , compuestos de As y de S. Requiere S o tiosulfato para crecer. Fija CO ₂ .

LMa1-bac_h3	51 (91)	<i>Thiomonas sp</i>	AY438665	0.992	Aeróbico. Acidófilo moderado. Quimiolitautótrofo facultativo o mixótrofo. Crece a partir de algunos sulfuros metálicos, H ₂ S o S°. Alta resistencia a metales tóxicos
LMa1-bac_f2	1 (2)	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	AB167179	0.998	Quimioheterótrofo. Usa NO ₃ ⁻ como aceptor de electrones en ausencia de O ₂ . Alta resistencia a metales tóxicos.
LMa1-bac_g5	3 (5)	<i>Acidithiobacillus sp.</i>	AY830897	0.994	Aeróbico. Acidófilo. Quimiolitautótrofo obligado. Oxida compuestos de S. Fija CO ₂ . Alta resistencia a metales tóxicos.
LMa1-bac_h5	1 (2)	<i>Phyllobacterium myrsinacearum</i> (T); STM 948	AY785315	1.000	Aeróbico. Quimioheterótrofo.
B9_bact_e5	1 (8)	<i>Pseudomonas sp.</i>	FJ436427	0.957	Quimioheterótrofo. Usa NO ₃ ⁻ como aceptor de electrones en ausencia de O ₂ .
B9_bact_b10	1 (8)	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	JF330158	0.999	Quimioheterótrofo. Usa NO ₃ ⁻ como aceptor de electrones en ausencia de O ₂ . Alta resistencia a metales tóxicos.
B9_bact_d3	10 (84)	<i>Hydrogenobaculum sp</i>	AM259503	0.924	Aeróbico. Acidófilo. Termófilo. Oxida H ₂ , compuestos de As y de S. Requiere S o tiosulfato para crecer. Fija CO ₂ .
B9_arch_f6	2 (10)	No hay secuencias cercanas cultivadas			
B9_arch_h12	10 (53)	No hay secuencias cercanas cultivadas			
B9_arch_d12	3 (16)	<i>Sulfolobus sp</i>	GU256550	0.928	Aeróbico obligado. Acidófilo. Termófilo. Quimiolitautótrofo facultativo. Oxida compuestos orgánicos y de S.
B9_arch_b7	4 (21)	No hay secuencias cercanas cultivadas			
LS3_bact_b8	14 (64)	<i>Pseudomonas putida</i>	FJ472859	0.999	Aeróbico. Quimioheterótrofo. Capaz de degradar solventes orgánicos.
LS3_bact_b12	6 (26)	<i>Achromobacter xylosoxidans</i>	AF439314	0.997	Aeróbico. Quimioheterótrofo.
LS3_bact_h2	1 (5)	<i>Ochrobactrum anthropi</i> ; DSM 14396	AM114400	0.999	Aeróbico obligado. Quimioheterótrofo..
LS3_bact_h10	1 (5)	<i>Mesorhizobium sp.</i>	AB265160	0.998	Aeróbico. Quimioheterótrofo. Fija N ₂ .
LS3-arch_e10	65 (72)	No hay secuencias cercanas cultivadas			

LS3-arch_d11	5 (6)	<i>Sulfolobus tokodaii</i>	AB022438	0.964	Aeróbico obligado. Acidofilo. Termófilo. Quimiolitoautótrofo facultativo. Oxida compuestos orgánicos y de S.
LS3-arch_a7	1 (1)	<i>candidatus "Acidianus copahuensis"</i>	JQ513288	0.999	Aeróbico facultativo. Acidofilo. Termófilo. Quimiolitoautótrofo facultativo. Oxida Fe y compuestos de S. Crece en anaerobiosis a expensas de H ₂ , S y/o Fe.
LS3-arch_a1	12 (13)	<i>Sulfolobus sp.</i>	JN944177	0.925	Aeróbico obligado. Acidofilo. Termófilo. Quimiolitoautótrofo facultativo. Oxida compuestos orgánicos y de S.
LS3-arch_d9	5 (6)	<i>Sulfolobus sp.</i>	GU256550	0.918	Aeróbico obligado. Acidofilo. Termófilo. Quimiolitoautótrofo facultativo. Oxida compuestos orgánicos y de S.
LS3-arch_f5	1 (1)	<i>Vulcanisaeta distributa</i> ; DSM 14429	AB063630	0.964	Anaeróbico. Acidófilo moderado. Hipertermófilo. Quimioheterótrofo. Utiliza S ⁰ y tiosulfato como aceptores de electrones.
LS3-arch_h5	1 (1)	<i>Thermocladium modestius</i> (T); JCM 10088	JCM 10088	0.961	Anaeróbico. Acidófilo moderado. Hipertermófilo. Quimioheterótrofo. Utiliza S ⁰ y tiosulfato como aceptores de electrones.
LMi_bact_f10	3 (6)	<i>Delftia acidovorans</i>	AB074256	0.995	Aeróbico. Quimioheterótrofo.
LMi_bact_g10	17 (32)	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	AY841799	1.000	Quimioheterótrofo. Usa NO ₃ ⁻ como aceptor de electrones en ausencia de O ₂ . Alta resistencia a metales tóxicos.
LMi_bact_f8	30 (58)	<i>Phyllobacterium myrsinacearum</i> (T); STM 948	AY785315	1.000	Aeróbico. Quimioheterótrofo.
LMi_bact_a9	1 (2)	<i>Methylobacterium aquaticum</i> (T); DSM 16371;	AB252197	0.962	Aeróbico. Quimioheterótrofo.
LMi_bact_h11	1 (2)	<i>Sphingomonas sp.</i>	DQ176453	1.000	Aeróbico. Capaz de usar diversos contaminantes como fuente de C como PAH
LMi-arch_f1	95 (100)	<i>Sulfolobus sp.</i>	GU256550	0.918	Aeróbico obligado. Acidofilo. Termófilo. Quimiolitoautótrofo facultativo. Oxida compuestos orgánicos y de S.

Las bacterias presentes en LVE muestran cierta diversidad fisiológica. Se detectó una importante cantidad de secuencias relacionadas con especies capaces de oxidar compuestos de azufre como *Hydrogenobaculum* sp., *Thiomonas* sp., *Acidithiobacillus thiooxidans* y *Acidiphilium* sp. La obtención de energía a partir de la oxidación de azufre tendría aún mayor peso en las aguas de LVE cuando se observan los resultados de FISH según los cuales *Thiomonas* y *Acidithiobacillus* representan el 64% de las bacterias viables presentes. *Hydrogenobaculum* y *Acidithiobacillus* son géneros de bacterias quimiolitioautótrofas y podríamos suponer que las especies de LVE relacionadas con estos géneros forman parte de los productores primarios del ecosistema. Un 3% de los clones de este pozo presenta una similitud mayor al 99% con *Pseudomonas stutzeri*. Si bien el género *Pseudomonas* está compuesto principalmente por especies aeróbicas heterótrofas, se han encontrado algunos aislados ambientales de *Ps. stutzeri* capaces de oxidar en forma anaeróbica tiosulfato a tetracionato (Sorokin et al., 1999), y así, estas especies también podrían estar contribuyendo al ciclo del azufre en el ecosistema de este punto. A pesar de que la temperatura registrada en las aguas de LVE fue de 31,5°C, dos de los OTUs encontrados están relacionados con las especies termófilas: *Hydrogenobaculum* y *Anoxybacillus flavithermus* (2 y 11% de los clones detectados, respectivamente).

En LMa1 las especies relacionadas con el género *Thiomonas* parecen ser las dominantes (representan el 91% de los clones y, aunque no fueron efectivamente detectadas por FISH utilizando las sondas específicas TM1G0138 + TM1G0238 de acuerdo a lo explicado en la Sección 4.6.2, podría sugerirse que están incluidas dentro las betaproteobacterias presentes). Así, puede suponerse que el metabolismo mixotrófico y la oxidación de compuestos de azufre serían de los más importantes en este ecosistema. Las especies del género *Acidithiobacillus*, también detectadas por FISH como microorganismos viables, contribuirían a la oxidación de compuestos de azufre y formarían parte de los productores primarios de la comunidad microbiana. En esta pileta resulta sorprendente que el 98% de los clones detectados muestren alta similitud (del orden del 99%) con especies con alta resistencia a metales tóxicos. Si bien en este trabajo no detectamos concentraciones apreciables de ninguna especie metálica tóxica, la presencia de especies capaces de resistirlas contribuye a nuestra idea de la adaptabilidad de las comunidades microbianas y de sus potenciales biotecnológicas en el área de la biominería y la biorremediación de metales pesados.

En la pileta B9 resulta difícil plantear los posibles metabolismos presentes debido a que, según nuestros resultados de hibridación, el 84% de los microorganismos son arqueas y de éstas, de acuerdo a lo mostrado en la Tabla 4.7, el 84% no presentan especies cercanas cultivadas. Aún

así, podemos inferir que el metabolismo aeróbico y la oxidación de compuestos de azufre son importantes, debido a la presencia de especies relacionadas con los géneros *Hydrogenobaculum* y *Sulfolobus*.

En LS3, las bacterias representan solamente el 4% de los microorganismos presentes y, según las especies cercanas cultivadas, todas serían aeróbicas quimioheterótrofas. Un 5% de los clones de bacterias está relacionado con el género *Mesorhizobium*. Si bien estas bacterias son clásicos habitantes de la rizosfera, especializados en la fijación de N₂, Ghosh y Roy (2006) encontraron especies capaces de oxidar azufre. Como muestran las hibridaciones de FISH, las arqueas son los microorganismos preponderantes en este pozo. Todas las secuencias relacionadas con estas son especies termófilas o hipertermófilas, acidófilas, capaces de oxidar compuestos orgánicos y de azufre. Además, *candidatus "Acidianus copahuensis"* es capaz de oxidar hierro y de desarrollarse en condiciones anaeróbicas a expensas de Fe, S o H₂. LS3 es el único punto en el cual se detectaron especies estrictamente anaeróbicas como *Vulcanisaeta distributa* y *Thermocodium modestius*. Estas arqueas también estarían involucradas en el ciclo del S, ya que utilizan S y tiosulfato como aceptores de electrones. Es importante destacar que el 72% de los clones de arqueas de este pozo no presentan especies cercanas cultivadas y, por ende, no conocemos sus características metabólicas ni su rol en la geoquímica del lugar.

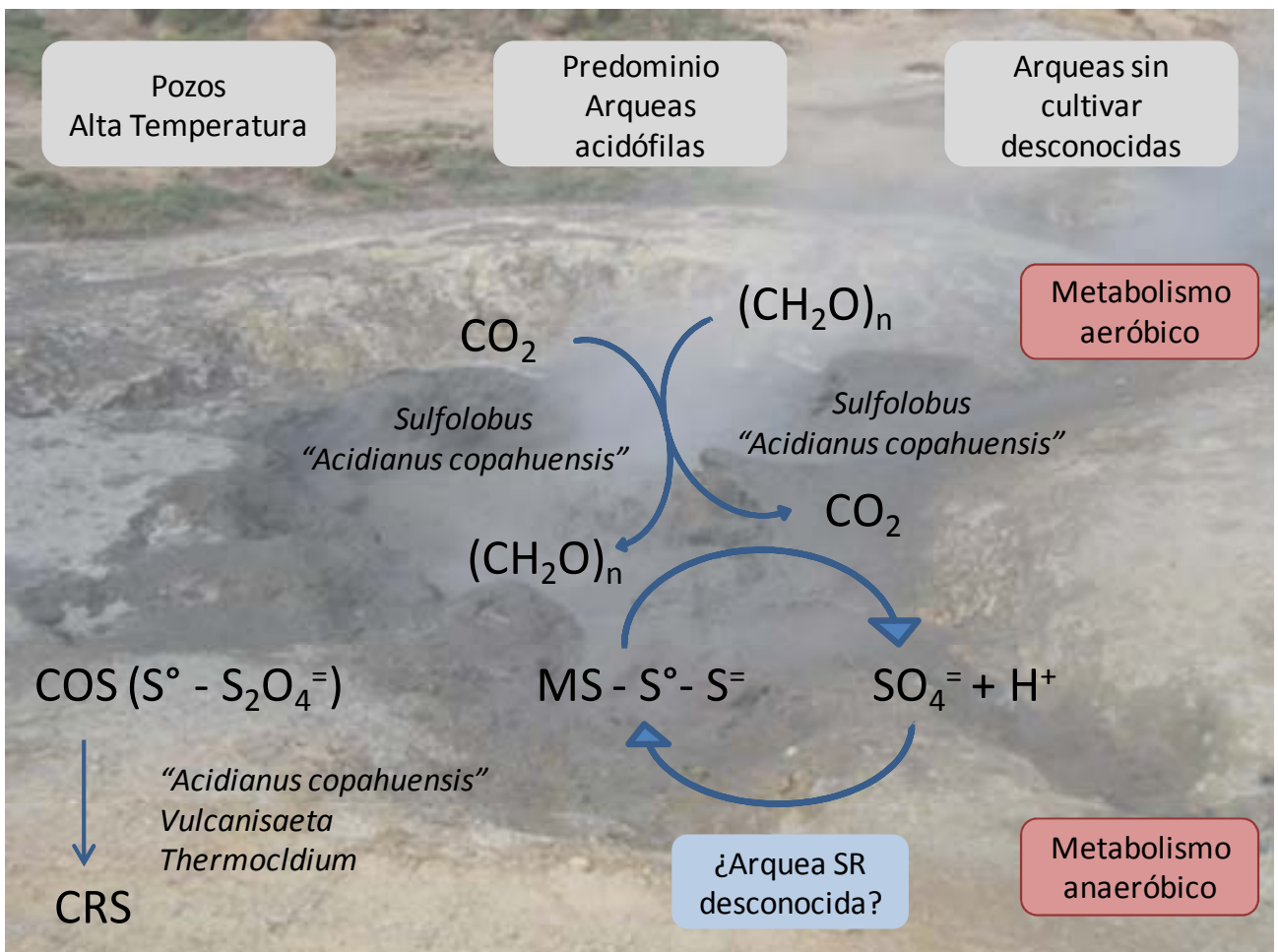
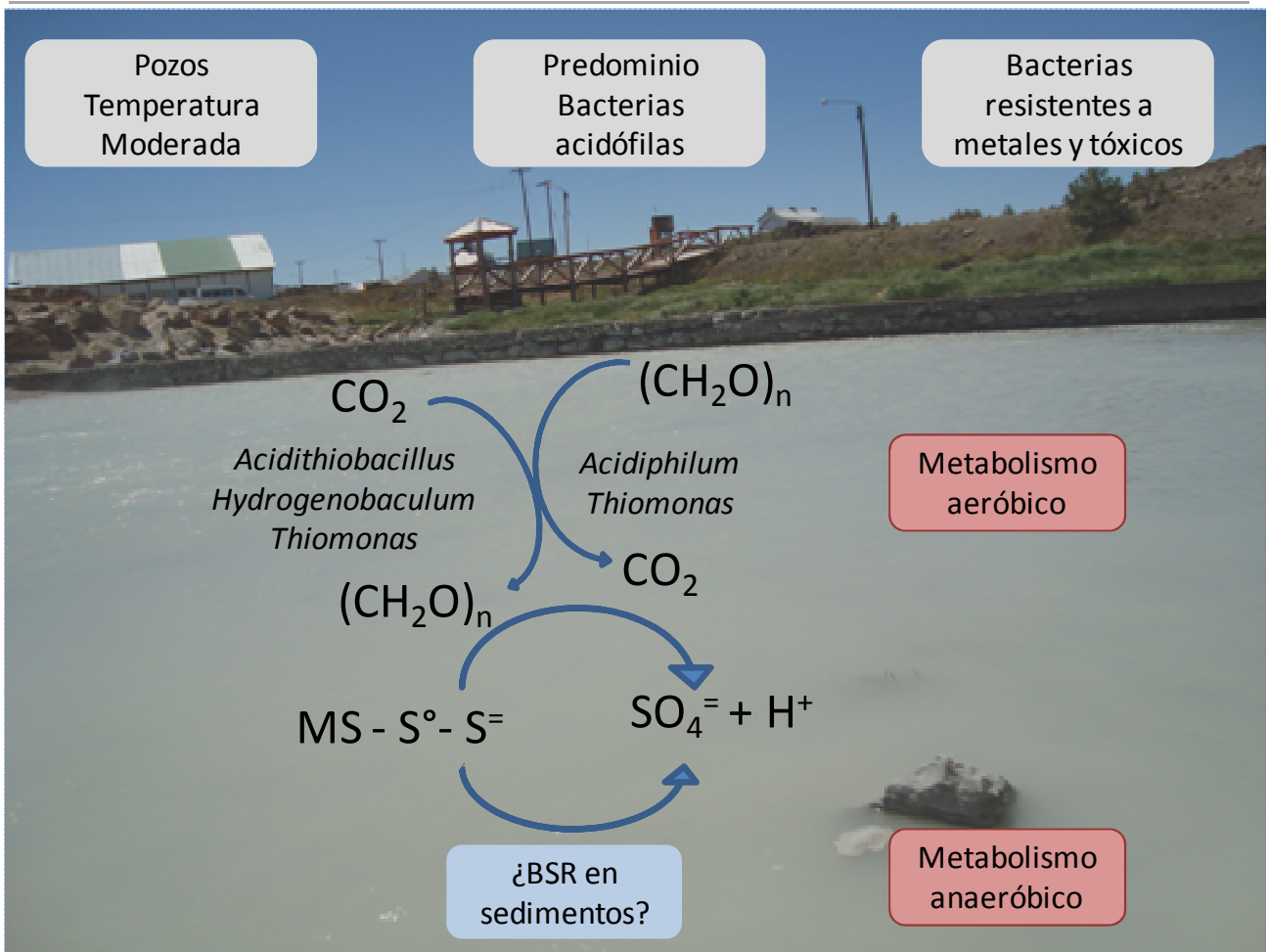
En LMi, las bacterias son una pequeña fracción de los microorganismos presentes y aparecen todas relacionadas con especies aeróbicas quimioheterótrofas. El único OTU de arquea detectado está asociado con el género *Sulfolobus*; este género agrupa especies quimioheterótrofas facultativas que oxidan compuestos de azufre. De acuerdo a nuestros resultados de CARD-FISH, las arqueas representan el 95% de los microorganismos viables de la comunidad de LMi; por lo tanto, el tipo de metabolismo que presentan las especies del género *Sulfolobus* debe jugar un papel muy importante en el ecosistema y la geoquímica de esta fumarola.

Como mencionamos al principio de la sección, este trabajo es una primera aproximación a las posibles capacidades metabólicas y a su influencia en la geomicrobiología del lugar. Para profundizar en el conocimiento del tema deberían realizarse otras aproximaciones diferentes: desde el aspecto meta-ómico, a través de estudios de metagenómica, metatranscriptómica y metaproteómica, y a través del aislamiento y caracterización de los microorganismos que se encuentran en cada uno de los pozos geotermales.

Luego de este análisis de los posibles metabolismos presentes, y a la luz de los objetivos del presente trabajo, uno de los principales hallazgos a destacar es que en todos los pozos habría una presencia importante de especies acidófilas, termófilas y capaces de oxidar compuestos de

azufre. Así, estos resultados permitirían elaborar ideas sobre algunos aspectos de la geoquímica de Copahue. La actividad volcánica ha generado a lo largo del tiempo la acumulación de diversos compuestos de azufre, que sirven de fuente de energía a muchas de las especies microbianas del ecosistema. La oxidación de estos compuestos libera protones, lo que contribuye a mantener el nivel de acidez de los pozos y lagunas hidrotermales. Estas mismas actividades metabólicas permitirían explicar las elevadas concentraciones de aniones sulfato que se han detectado en las aguas de los pozos estudiados. Como resaltamos a lo largo de esta Sección, los resultados obtenidos permitieron clasificar los pozos estudiados en dos grupos según la temperatura de sus aguas. En estos dos grupos parece desarrollarse el mismo modelo geomicrobiológico pero llevado a cabo por diferentes especies. En los puntos de temperatura moderada, la oxidación de azufre estaría a cargo de especies mesófilas, como *Acidithiobacillus* y *Thiomonas*. Al aumentar la temperatura del ambiente, la oxidación del azufre parece estar catalizada por especies termófilas, como *Hydrogenobaculum* y diversas especies de arqueas, en particular las del género *Sulfolobus* y *candidatus "Acidianus copahuensis"*. La Figura 4.14 muestra un modelo metabólico preliminar para los pozos de temperatura moderada y de temperatura alta, resaltando el metabolismo de los compuestos de azufre que parece ser el más importante en el área de Copahue

Figura 4.14 Esquemas de los posibles modelos geomicrobiológicos presentes en los pozos de moderada y alta temperatura de Copahue según los microorganismos encontrados. En ambos casos se destacan especialmente los microorganismos asociados al ciclo del azufre, por ser los más importantes en cada uno de los ecosistemas. BSR: bacterias sulfato reductoras. MS: sulfuro metálico. $(\text{CH}_2\text{O})_n$ compuesto orgánico. COS: compuestos oxidados de azufre. CRS: compuestos reducidos de azufre.



4.7 Consideraciones sobre el trabajo realizado y la biodiversidad de las aguas de los pozos geotermales de Copahue

- ◆ Las técnicas de biología molecular utilizadas, clonación y secuenciación del gen ARNr 16S e hibridaciones FISH y CARD-FISH, permitieron describir la biodiversidad del sistema geotermal de Copahue, tanto en forma cualitativa como semicuantitativa. La información provista por ambas metodologías resultó coherente y complementaria.
- ◆ La temperatura es el factor que tiene mayor influencia sobre la estructura de la comunidad de los pozos geotermales estudiados y los divide en dos grupos: LVE y LMa1 de temperatura media y B9, LS3 y LMi de temperaturas moderadas-altas a altas extremas.
- ◆ Los pozos de temperatura moderada están dominados por bacterias, principalmente por géneros asociados a los ambientes ácidos extremos y relacionados con el ciclo del azufre, como *Thiomonas*, *Acidithiobacillus* y *Acidiphilium*. En ellos se encontró muy baja o nula presencia de arqueas.
- ◆ La única especie bacteriana termófila asociada al metabolismo del azufre detectada en Copahue y que también se ha encontrado en otros ambientes geotermales, es *Hydrogenobaculum*.
- ◆ Los pozos de mayor temperatura están casi completamente colonizados por arqueas. La mayoría de estas presentan bajos porcentajes de similitud con especies no cultivadas, lo que nos lleva a pensar que se trata de nuevas especies autóctonas de la zona.
- ◆ Entre los metabolismos microbianos que suponemos pueden encontrarse presentes en los pozos, se destacan aquellos propios de especies acidófilas y relacionadas con el metabolismo del azufre
- ◆ El relevamiento realizado permitió conocer la diversidad y estructura de las comunidades microbianas en este ambiente extremo y sus relaciones con las características fisicoquímicas del lugar. La presencia de especies del ciclo de azufre permite asegurar una fuerte influencia sobre la geoquímica del ambiente.

- ♦ La detección de especies extremófilas posiblemente aún no descritas, convierte a la zona geotermal de Copahue en un ambiente de sumo interés para la búsqueda de microorganismos útiles para desarrollar nuevos procesos biotecnológicos u optimizar los ya existentes, en particular, en áreas como la biorremediación y la biominería.

Referencias – Sección 4

- Aditiawati P., Yohandini H., Madayanti F., Akhmaloka A. (2009) Microbial diversity of acidic hot spring (Kawah Hujan B) in geothermal field of Kamojang area, West Java-Indonesia. *Open Microbiol J* 3: 58–66.
- Amaral-Zettler L.A., Zettler E.R., Theroux S.M., Palacios C., Aguilera A., Amils R. (2011) Microbial community structure across the tree of life in the extreme Río Tinto. *ISME J* 5: 42–50.
- Benson C.A., Bizzoco R.W., Lipson D.A., Kelley S.T. (2011) Microbial diversity in nonsulfur, sulfur and iron geothermal steam vents. *FEMS Microbiol Ecol* 76: 74–88.
- Burgess A.E., Unrine J.M., Mills G.L., Romanek C.S., Wiegel J. (2012) Comparative geochemical and microbiological characterization of two thermal ponds in the Uzon Caldera, Kamchatka, Russia. *Microbiol Ecol* 63: 471–489.
- Chao A. (1984) Non-parametric estimation of the number of classes in a population. *Scand J Stat* 11: 265–270.
- Chiacchiarini P., Lavalle L., Giaveno A., Donati E. (2010) First assessment of acidophilic microorganisms from geothermal Copahue–Caviahue system. *Hydrometallurgy* 104: 334–341.
- Donahoe-Christiansen J., D'Imperio S., Jackson C.R., Inskeep W.P., McDermott T.R. (2004) Arsenite-oxidizing *Hydrogenobaculum* strain isolated from an acid-sulfate-chloride geothermal spring in Yellowstone National Park. *Appl Environ Microb* 70: 1865–1868.
- Engel A.S., Johnson L.R.; Porter M.L. (2013) Arsenite oxidase gene diversity among Chloroflexi and Proteobacteria from El Tatio Geysir Field, Chile. *FEMS Microbiol Ecol* 83: 745–756.
- Eder W., Huber R. (2002) New isolates and physiological properties of the *Aquificales* and description of *Thermocrinis albus* sp. nov. *Extremophiles* 6: 309–318.
- Farnfield H.R., Marcillab A.L., Warda N.I. (2012) Arsenic speciation and trace element Analysis of the volcanic río Agrio and the geothermal waters of Copahue, Argentina. *Sci Total Environ* 433: 371–378.
- Garcia Moyano A., Gonzalez Toril E., Aguilera A., Amils R. (2012) Comparative microbial ecology study of the sediments and the water column of the Río Tinto, an extreme acidic environment. *FEMS Microbiol Ecol* 81: 303–314.
- Ghosh W., Roy P. (2006) *Mesorhizobium thiograngeticum* sp. nov., a novel sulfur-oxidizing

chemolithoautotroph from rhizosphere soil of an Indian tropical leguminous plant. *Int J Syst Evol Microb* 56: 91–97.

Giaveno M.A., Urbietta M.S., Ulloa R., González Toril E., Donati E.R. (2013) Physiologic versatility and growth flexibility as the main characteristics of a novel thermoacidophilic *Acidianus* strain isolated from Copahue geothermal area in Argentina. *Microbial Ecol* 65: 336–346.

Gonzalez Toril E., Aguilera A., Souza Egipsy V., Lopez Pamo E., Sanchez España J., Amils R. (2011) Geomicrobiology of an acid mine effluent, La Zarza-Perrunal (Iberian Pyritic Belt, Spain). *Appl Environ Microbiol* 77: 2685–2694.

Gonzalez Toril E., Llobet Brossa E., Casamayor E.O., Amann R., Amils R. (2003) Microbial ecology of an extreme acidic environment, the Tinto River. *Appl Environ Microb* 69: 4853–4865.

Good I.J. (1953) The population frequencies of species and the estimation of population parameters. *Biometrika* 40: 237–264.

Hall J.R., Mitchell K.R., Jackson Weaver O., Kooser A.S., Cron B.R., Crossey L.J., Takacs-Vesbach C.D. (2008) Molecular characterization of the diversity and distribution of a thermal spring microbial community by using rRNA and metabolic genes. *Appl Environ Microb* 74: 4910–4922.

Hallberg K.B., Coupland K., Kimura S., Johnson D.B. (2005) Macroscopic streamer Growths in acidic, metal-rich mine waters in North Wales consist of novel and remarkably simple bacterial communities. *Appl Environ Microb* 72: 2022–2030.

Hamamura N., Macur R.E., Korf S., Ackerman G., Taylor W.P., Kozubal M., Reysenbach A.L., Inskeep W.P. (2009) Linking microbial oxidation of arsenic with detection and phylogenetic analysis of arsenite oxidase genes in diverse geothermal environments. *Environ Microbiol* 11: 421–431.

Hobel C.F.V., Marteinson V.T., Hauksdottir S., Fridjonsson O.H., Skirnisdottir S., Hreggvidsson G.O., Kristjansson J.K. (2004) Accessing novel amylase genes in silent thermophile diversity by low nutrient enrichment. *World J Microbiol Biotechnol* 20: 801–809.

Inskeep W.P., Rusch D.B., Jay Z.J., Herrgard M.J., Kozubal M.A. (2010) Metagenomes from High-Temperature Chemotrophic Systems Reveal Geochemical Controls on Microbial Community Structure and Function. *PLoS ONE*. 5(3): e9773.

doi:10.1371/journal.pone.0009773.

Johnson D.B., Hallberg K. (2003) The microbiology of acidic mine waters. *Res Microbiol* 154: 466–473.

Kato S., Itoh T., Yamagishi A. (2011) Archaeal diversity in a terrestrial acidic spring field revealed by a novel PCR primer targeting archaeal 16S rRNA genes. *FEMS Microbiol Lett* 319: 34–43.

Kitchin P.A., Szotyori Z., Fromholz C., Almond N. (1990) Avoidance of PCR false positives. *Nature* 344: 201–211.

Kozubal M.A., Macur R.E., Jay Z.J., Beam J.P., Malfatti S.A. (2012) Microbial iron cycling in acidic geothermal springs of Yellowstone National Park: integrating molecular surveys, geochemical processes, and isolation of novel Fe-active microorganisms. *Front Microbiol* 3: 1–16.

Lavalle L., Chiacchiarini P., Pogliani C., Donati E. (2005) Isolation and characterization of acidophilic bacteria from Patagonia, Argentina. *Process Biochem* 40: 1095–1099.

Macur R.E., Langner B., Kocar D., Inskeep W.P. (2004) Linking geochemical processes with microbial community analysis: successional dynamics in an arsenic-rich, acid-sulphate-chloride geothermal spring. *Geomicrobiol* 2: 163-177.

Mathur J., Bizzoco R.W., Ellis D.G., Lipson D.A., Poole A.W., Levine R., Kelley S.T. (2007) Effects of abiotic factors on the phylogenetic diversity of bacterial communities in acidic thermal springs. *Appl Environ Microb* 73: 2612–2623.

Mikkelsen D., Kappler U., McEwan A.G., Sly L.I. (2006) Archaeal diversity in two thermophilic chalcopyrite bioleaching reactors. *Environ Microbiol* 8: 2050–2056.

Parker S.R., Gammons C.H., Pedrozo F.L., Wood S.A. (2008) Diel changes in metal concentrations in a geogenically acidic river: Rio Agrio, Argentina. *J Volcanol Geoth Res* 178: 213–223.

Reysenbach A.L., Ehringer M., Hershberger K. (2000) Microbial diversity at 83°C in Calcite Springs, Yellowstone National: another environment where *Aquificales* and “*Korarchaeota*” coexist. *Extremophiles* 4: 61–67.

Romano C., D’Imperio S., Woyke T., Mavromatis K., Lasken R., Shock E. L., McDermott T. (2013) Comparative genomic analysis of phylogenetically closely-related *Hydrogenobaculum*

sp. from Yellowstone National Park. *Appl Environ Microb* doi: 10.1128/AEM.03591-12.

Sarkar G., Sommer S.S. (1990) Shedding light on PCR contamination. *Nature* 343: 27–27.

Sayeh R., Birrien J.L., Alain K., Barbier G., Hamdi M., Prieur, D. (2010) Microbial diversity in Tunisian geothermal springs as detected by molecular and culture-based approaches. *Extremophiles* 14: 501–514.

Strnad H., Ridl J., Paces J., Kolar M., Vlcek C., Paces V. (2011) Complete genome sequence of the haloaromatic acid-degrading bacterium *Achromobacter xylosoxidans* A8. *J Bacteriol* 193: 791–792.

Sorokin D.Y., Teske A., Robertson L.A., Kuenen G. (1999) Anaerobic oxidation of thiosulfate to tetrathionate by obligately heterotrophic bacteria, belonging to the *Pseudomonas stutzeri* group. *FEMS Microbial Ecol* 30: 113–123.

Tanner M.A., Goebel B.M., Dojka M.A., Pace N.R. (1998) Specific Ribosomal DNA Sequences from Diverse Environmental Settings Correlate with Experimental Contaminants. *Appl Environ Microb* 64: 3110–3113.

Xie J., He Z., Liu X., Liu X., Van Nostrand J.D., Deng Y., Wu L., Zhou J., Qiu G. (2010) GeoChip-based analysis of the functional gene diversity and metabolic potential of microbial communities in acid mine drainage. *Appl Environ Microb* 77: 991–999.



Sección 5

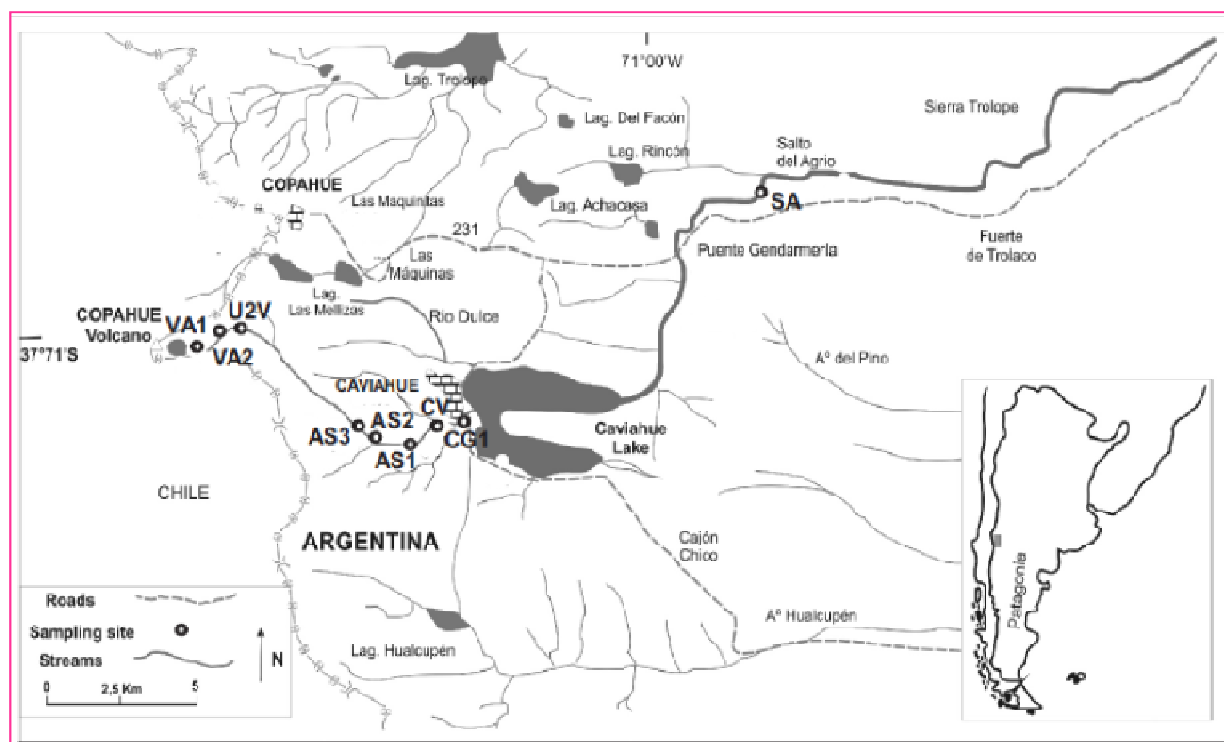
Biodiversidad procariota en las aguas del Río Agrío

5.1. Ubicación y características fisicoquímicas de las muestras

En la Sección 2 de este trabajo se presentaron y describieron en forma general los sitios elegidos para el relevamiento de la diversidad microbiana en la zona geotermal de Copahue-Caviahue. En esta sección se detallarán los lugares puntuales seleccionados a lo largo del Río Agrio y las características particulares de las muestras recolectadas.

Con el objetivo de realizar una descripción de la biodiversidad en las aguas del Río Agrio, se tomaron muestras de la columna de agua en diversos puntos de su recorrido: las vertientes cerca del cráter del volcán Copahue, varios puntos a lo largo del Río Agrio Superior (RAS) donde desembocan cursos de agua tributarios provenientes de corrientes de deshielo, dos de las cascadas más importantes, el Lago Caviahue y la cascada Salto del Agrio perteneciente al Río Agrio Inferior (RAI). La Figura 5.1 muestra un mapa de la región donde se resaltan los sitios de recolección de muestras de agua para el estudio de la biodiversidad del Río Agrio.

Figura 5.1 Mapa de la región Copahue-Caviahue donde se marcan los puntos del Río Agrio donde se recolectaron muestras. La nomenclatura de los puntos de muestreo se indican en la Tabla 5.1.



La Tabla 5.1 muestra la nomenclatura utilizada en el trabajo para cada uno de los puntos de muestreo y sus principales características. Los valores de conductividad y de concentración de Fe muestran que a lo largo del río se produce una dilución, seguramente debida al aporte de aguas de deshielo. Este efecto es mucho más marcado cuando el río desemboca en el Lago Caviahue y emerge el RAI.

Tabla 5.1 Locación y características fisicoquímicas de la columna de agua en los puntos muestreados a lo largo del Río Agrio.

Punto de muestreo (abreviatura)	Locación GPS	T (°C)	pH	Conductividad (µS/cm)	Fe (mg/L)
Vertiente Río Agrio Sur (VA1)	37°51'23"S, 71°09'04"W	53,0	1,0	47200	540
Vertiente Río Agrio Norte (VA2)	37°51'19"S, 71°09'09"W	29,0	1,0	15450	560
Unión dos vertientes (U2V)	-	9,0	1,5	10690	470
Río Agrio Superior 1 (AS1)	-	6,8	2,0	3870	26
Río Agrio Superior 2 (AS2)	-	9,9	2,0	19860	111
Río Agrio Superior 3 (AS3)	-	8,0	1,7	11690	201
Cascada del Gigante (CG1)	37°53'11"S, 71°04'15"W	18,0	2,0	3560	32
Cabellera de la Virgen (CV)	37°52'59"S, 71°04'00"W	15,9	2,0	3290	30
Lago Caviahue (LC)	37°53'14"S, 71°02'46"W	8,3	2,0	946	7
Salto del Agrio (SA)	37°48'43"S, 70°55'31"W	16,9	3,6	516	3

La temperatura y el pH también muestran cambios marcados a medida que el Río Agrio descende por la ladera del volcán Copahue. El sitio de la vertiente VA1 muestra la temperatura más elevada. En VA2, unos metros más abajo se registraron valores más bajos, probablemente debido al efecto de las bajas temperaturas de la zona de alta montaña. Los valores de pH en ambas vertientes son los más bajos registrados en todo el río, y se corresponden con la cercanía a las fuentes geotermales que las originan. En campañas de muestreo posteriores, las temperaturas y valores de pH registrados en estos sitios fueron del orden de 70°C y aproximadamente 0,5, respectivamente, probablemente debido al resurgimiento de la actividad volcánica en la zona luego del año 2010. El valor de temperatura registrado para el punto U2V es marcadamente más bajo, lo que probablemente se deba a que el punto de toma de muestra está algo alejado de las afluentes geotermales del río, en una zona permanentemente rodeada de

nieve. Corriente abajo, en los sitios AS1, AS2 y AS3 es lógico encontrar valores de temperatura mucho más bajos debido a que en esta zona el cauce del Río Agrío es continuamente invadido por corrientes tributarias producto del deshielo. Este mismo efecto se observa en los valores de pH, que ascienden a 2 y se mantienen aproximadamente constantes en este valor hasta el Lago Caviahue, definiendo la naturaleza marcadamente ácida del río en todo su curso. A la altura de las cascadas, CG1 y CV, la temperatura del agua toma un valor cercano a los 16°C que se mantiene incluso después que el RAI sale del Lago Caviahue.

En base a estos datos, se seleccionaron cuatro puntos representativos y para ellos se presentarán los resultados del estudio de la biodiversidad procariota. Estos puntos, sobre el Río Agrío Superior, son los siguientes: VA2 y U2V de la zona de la naciente geotermal, AS3 de la zona de recepción de cursos tributarios y CV de la zona de las cascadas antes de la desembocadura del río en el Lago Caviahue. La Tabla 5.2 muestra una caracterización más completa, donde se indican las concentraciones de metales y aniones encontrados en estos cuatro puntos. Por otro lado, la Figura 5.2 muestra fotografías de los lugares de muestreo tomadas durante las campañas de Diciembre de 2009 y 2010.

Tabla 5.2. Parámetros fisicoquímicos de las aguas de los cuatro puntos seleccionados del Río Agrío Superior. Las concentraciones de metales y aniones están expresadas en mg/L. ND significa no detectado por la técnica de espectrofotometría de absorción atómica utilizada.

Punto de muestreo	T (°C)	pH	Conductividad (µS/cm)	Fe	% Fe (II)	% Fe (III)
VA2	29,0	1,0	15450	560	~ 100	~ 0
U2V	9,0	1,5	10690	470	~ 100	~ 0
AS3	6,7	1,7	11690	111	65	35
CV	15,9	2,0	3290	30	78	22

Punto de muestreo	Ca	Zn	Na	Mg	Mn	K	SO ₄ ²⁻	Cl ⁻
VA2	10,00	0,75	515,0	459,00	8,70	315,00	6226,1	6780,2
U2V	7,00	ND	452,0	375,00	7,20	275,00	2467,1	3567,3
AS3	10,31	0,17	107,3	35,11	2,59	34,21	3274,3	4,7
CV	6,76	ND	29,5	18,33	1,66	10,51	875,4	589,7

De los cuatro puntos seleccionados, VA2 es el que presenta las condiciones más extremas, con temperatura más alta, valor de pH más bajo, mayor conductividad y mayores concentraciones de todos los metales y aniones medidos. La unión de las dos vertientes del Río Agrio (U2V), ubicada unos metros corriente abajo, también presenta valores altos de concentración de metales y aniones. En AS3 y, especialmente, en CV, las concentraciones de metales y aniones están afectadas por el efecto de dilución ya mencionado y muestran una disminución gradual respecto de los primeros puntos de muestreo.

En los dos puntos cercanos a las vertientes del RAS se detectaron las máximas concentraciones de Fe y prácticamente el 100% se encuentra como Fe(II). En los otros dos puntos corriente abajo, la concentración de Fe disminuye (en forma marcada en CV) y se registra un aumento en la proporción de Fe oxidado. Este comportamiento del Fe podría explicarse considerando que, en los puntos más cercanos a las vertientes geotermales, se produce la acción de las aguas ácidas sobre los minerales de hierro generando Fe(II) soluble. A medida que el RAS se diluye río abajo, la concentración de Fe total disminuye, pero también las condiciones se hacen menos extremas en temperatura y pH y consecuentemente podría aumentar la oxidación de Fe(II) a Fe(III), parcialmente abiótica pero fundamentalmente catalizada por acción biológica. La concentración total también puede disminuir corriente abajo por la eventual precipitación de compuestos férricos a medida que aumenta la concentración de Fe(III) y los valores de T y pH.

Además de los metales que se muestran en la Tabla 5.2, se midieron las concentraciones de Cd, Zn, Cu, Ni, Pb, Co y Cr, pero resultaron estar por debajo del valor de detección de la técnica utilizada.

El RAS presenta concentraciones de metales y aniones mucho más elevadas de las que se registraron para los pozos geotermales de Copahue (ver Tabla 4.1 de la Sección 4). Las concentraciones de los aniones sulfato y cloruro son particularmente elevadas en algunos de los puntos estudiados.

Figura 5.2 Imágenes de los puntos del Río Agrio Superior donde se recolectaron muestras para el análisis de la diversidad. Las fotografías fueron tomadas durante las campañas de Diciembre de 2008 y 2009.



Vertiente
Norte

VA2



Unión dos
Vertientes

U2V





Río Agrio
Superior

AS3



Cascada
Cabellera de la
Virgen
CV



5.2. Clonación del gen ARNr 16S

5.2.1. Análisis de las bibliotecas de clones

A partir del ADN extraído de las muestras de agua de los cuatro puntos seleccionados del RAS se realizaron amplificaciones utilizando cebadores para el gen ARNr 16S de bacterias, arqueas y korarqueas, tal cual se detalla en la Sección 3.6 de Materiales y Métodos. Los cebadores 8F y 1492R, específicos para el dominio Bacteria, y los cebadores 25F y 1492R, específicos para el dominio Archaea, produjeron amplificaciones con el ADN de las cuatro estaciones de muestreo. Las reacciones de PCR utilizando los cebadores Kor236F y Kor1236R, específicos para el filo Korarchaeota, dieron resultados negativos para todos los puntos.

Las amplificaciones de los genes ARNr 16S, tanto de bacterias como de arqueas, se utilizaron para la construcción de librerías de clones. Luego de remover las secuencias de baja calidad, detectar y eliminar las secuencias quimeras (utilizando los programas Mallard y Bellerophone), las librerías que se utilizaron para los estudios de biodiversidad del RAS fueron de 152 clones de bacterias y 244 de arqueas. Estas 396 secuencias de más de 800 nucleótidos, fueron incluidas en la base de datos de ARB de más de 50.000 estructuras primarias homólogas del gen ARNr 16S y fueron alineadas mediante la herramienta de edición. La base de datos de ARB fue actualizada añadiendo secuencias relacionadas detectadas por comparación mediante BLASTn. Esta misma plataforma informática se utilizó para seleccionar las secuencias representantes de cada OTU al 97% de similitud (equivalente a una distancia evolutiva de 0,03). Estos procedimientos se describen con mayor detalle en la Sección 3.7 de Materiales y Métodos.

Las Tablas 5.3 y 5.4 muestran las características numéricas y varios índices biológicos calculados para las librerías de bacterias y de arqueas, respectivamente. Los porcentajes de cobertura de las bibliotecas de bacterias, según el parámetro de Good, son relativamente altos (entre el 86 y el 95%). En el caso de las bibliotecas de clones de arqueas, las coberturas alcanzadas son mucho mayores, cercanas al 100% para tres de las cuatro bibliotecas de clones construidas. Estos resultados garantizan el correcto uso de los índices biológicos para la descripción y comparación de la riqueza, diversidad, equitabilidad y dominancia de las muestras. La descripción de los índices de diversidad utilizados se encuentra en la Sección 3.7 de Materiales y Métodos.

Tabla 5.3. Características numéricas e índices biológicos de las bibliotecas de clones de bacterias.

	VA2	U2V	AS3	CV
Nº clones analizados	55	37	51	9
% Quimeras (descartadas)	17	12	7	0
OTUs (97%)^a	15	9	14	4
Singletons^b	4	2	7	1
Cobertura de la biblioteca^c	93%	95%	86%	89%
Shannon (H)	2,427	1,555	2,188	1,273
Margalef	3,494	2,216	3,306	1,365
Dominancia (D)^d	0,1074	0,3484	0,1480	0,3086
Equitabilidad (J)^e	0,8963	0,7077	0,8292	0,9183
Berger-Parker^f	0,1818	0,5676	0,2549	0,4444
S Chao1^g	15	9	25	5

^a OTUs definidos al 97% de similitud entre las secuencias

^b OTUs representados solamente por una única secuencia

^c Porcentaje de cobertura de la biblioteca para OTUs definidos al 97% de similitud entre las secuencias (Good, 1953)

^d Según índice de Simpson

^e Según índice de Pielou

^f Representa la abundancia del OTU más abundante

^g Estimador de la riqueza de Chao (Chao, 1984)

En general, las cuatro bibliotecas de clones de bacterias presentan valores similares en los índices de diversidad de Shannon y Margalef. La distribución de las especies parece ser también relativamente homogénea en todos los puntos, lo que se refleja en los altos valores del índice de equitabilidad J (cerca de 1) y bajos valores del índice de dominancia D (más cercanos a 0). Además, el índice de Berger-Parker también presenta un valor bajo, lo que demuestra que en ninguno de los cuatro casos existe un OTU claramente dominante en la distribución.

Como mencionamos, las bibliotecas de bacterias de todos los puntos parecen tener un comportamiento similar según los índices biológicos analizados; no obstante, VA2 es el punto con los valores de índices de diversidad (Shannon y Margalef) más altos y la distribución más homogénea. En el punto U2V los índices de dominancia y de Berger-Parker son algo mayores que para los otros puntos, lo que indica que existe algún OTU con mayor cantidad de especies, como se comprobará más adelante en la Tabla 5.5. La biblioteca de bacterias de AS3 presenta el menor índice de cobertura, debido a que con prácticamente el mismo número de secuencias analizadas que VA2, posee casi el doble de OTUs representados por una única secuencia (singletons). Otro parámetro que indica que el esfuerzo de muestreo para este punto no cubrió la diversidad total, es el estimador de la riqueza de Chao que presenta un valor muy superior al de los OTUs detectados. Finalmente, para el punto CV, si bien la biblioteca de bacterias está construida con pocos clones, la cobertura de la diversidad es aceptable y el número de OTUs encontrados difiere únicamente en una unidad con el valor esperado según el estimador de Chao. Así, puede aceptarse que aún con pocos clones analizados, la diversidad de bacterias de CV ha sido cubierta por este análisis.

Las bibliotecas de clones de arqueas de los cuatro puntos del RAS estudiados también presentan características similares entre sí, pero completamente distintas a las de las bibliotecas de bacterias. Para el caso de arqueas, como puede verse en la Tabla 5.4, los índices de diversidad de Shannon y Margalef presentan valores menores que para las bibliotecas de bacterias, mientras que los valores de los índices de dominancia son mucho mayores y los de equitabilidad son menores en todos los casos. Para las cuatro bibliotecas de clones de arqueas los índices de Berger-Parker son muy altos (cerca de 1), lo que indica que en todos los puntos existe un OTU claramente dominante de la diversidad de arqueas. Para estas bibliotecas la cobertura fue muy buena y el número de OTUs encontrados es igual o difiere solo en una unidad con el estimado por el parámetro de Chao.

Tabla 5.4. Características numéricas e índices biológicos de las bibliotecas de clones de arqueas

	VA2	U2V	AS3	CV
Nº clones analizados	45	58	84	57
% Quimeras (descartadas)	0	0	1	1
OTUs (97%)^a	4	2	3	2
Singletons^b	3	1	0	0
Cobertura de la biblioteca^c	93%	98%	100%	100%
Shannon (H)	0,3182	0,0871	0,2245	0,08832
Margalef	0,7881	0,2463	0,4514	0,2473
Dominancia (D)^d	0,8726	0,9661	0,9082	0,9655
Equitabilidad (J)^e	0,2295	0,1257	0,2043	0,1274
Berger-Parker^f	0,9333	0,9828	0,9524	0,9825
S Chao1^g	4	3	3	3

^a OTUs definidos al 97% de similitud entre las secuencias

^b OTUs representados solamente por una única secuencia

^c Porcentaje de cobertura de la biblioteca para OTUs definidos al 97% de similitud entre las secuencias (Good, 1953)

^d Según índice de Simpson

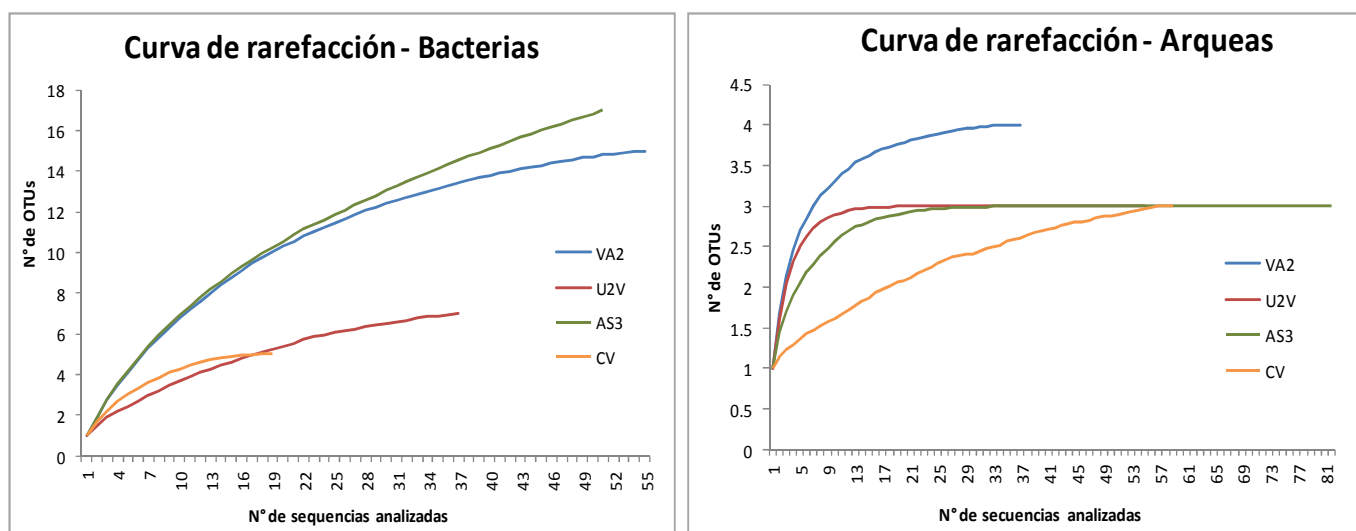
^e Según índice de Pielou

^f representa la abundancia del OTU más abundante

^g Estimador de la riqueza de Chao (Chao, 1984)

Para completar el análisis, las bibliotecas de clones de bacterias y de arqueas se caracterizaron a través de las respectivas curvas de rarefacción (Figura 5.3). Tal cual se explicó en la Sección 3, este análisis permite hacer comparaciones entre el número de especies de distintos puntos, aún cuando el tamaño de las muestras no sea igual.

Figura 5.3 Curvas de rarefacción de las bibliotecas de clones de bacterias y arqueas para los cuatro puntos del Río Agrio Superior estudiados.



Las curvas de rarefacción de bacterias para los puntos VA2, U2V y CV tienden a alcanzar una meseta, indicando que la diversidad estimada ha sido cubierta en el muestreo. Esta misma conclusión se obtuvo al comparar el número de OTUs encontrado para estos puntos y los valores arrojados por el estimador de Chao para cada uno de ellos. En cambio, la curva de rarefacción de la biblioteca de bacterias para el punto AS3 parece aún algo alejada de la meseta indicando que la diversidad de este punto no estaría totalmente cubierta por este muestreo. Por esa razón, hemos considerado que el análisis realizado para este punto a partir de los datos de clonaje del gen ARNr 16S no es completo.

Las curvas para las bibliotecas de arqueas alcanzan una meseta para los cuatro puntos confirmando que la diversidad de las muestras fue cubierta mediante la técnica de clonación y secuenciación del gen ARNr 16S utilizada.

5.3. Biodiversidad en las aguas del Río Agrío Superior según las secuencias de genes ARNr 16S encontradas

A partir de las secuencias del gen ARNr 16S de bacterias y arqueas obtenidas por amplificación del ADN genómico extraído de las muestras de agua del RAS, se definieron OTUs utilizando como punto de corte aproximadamente 0,03 de distancia filogenética; este punto de corte equivale a un 97% de similitud entre las secuencias. La Tabla 5.5 muestra estos OTUs junto con la cantidad de clones que pertenecen a cada uno de ellos, la secuencia más cercana según BLASTn, con su respectivo número de acceso y el porcentaje de similitud con el que dichas secuencias se vinculan al OTU del RAS.

Tabla 5.5. OTUs de bacteria y arqueas detectados en las aguas de los cuatro puntos del Río Agrío Superior analizados.

	OTU	N° de clones (%)	Secuencia más cercana por BLASTn	N° de acceso	% Similitud
VA2 Bacteria	VA2 bac f10	5 (9)	<i>Acidithiobacillus ferrivorans</i>	NR074660	99
	VA2 bac g8	9 (16)	<i>Acidithiobacillus albertensis</i>	NR028982	99
	VA2 bac h9	2 (4)	<i>Acidithiobacillus thiooxidans</i>	DQ834372	99
	VA2 bac g11	5 (9)	Gammaproteobacteria sin cultivar	KC620856.	97
	VA2 bac d7	2 (4)	Gammaproteobacteria sin cultivar	JF737911	98
	VA2 bac f7	3 (5)	<i>Acidiphilium</i> sp.	EU003879	98
	VA2 bac a9	4 (7)	Firmicutes sin cultivar	EF612377	95
	VA2 bac d5	10 (17)	<i>Sulfobacillus</i> sin cultivar	HQ730680	97
	VA2 bac a11	1 (2)	<i>Ferrimicrobium</i> sp.	HM769774	94
	VA2 bac e9	1 (2)	Acidimicrobiaceae sin cultivar	HQ317068	99
	VA2 bac d8	2 (4)	Actinobacteria sin cultivar	DQ906069	97
	VA2 bac h12	1 (2)	Actinobacteria sin cultivar	AJ575548	97
	VA2 bac b5	1 (2)	<i>Nocardioides</i> sp.	HQ398377	99
	VA2 bac c12	7 (13)	<i>Leptospirillum ferrooxidans</i>	AB510907	99
	VA2 bac a3	2 (4)	Planctomycetes sin cultivar	DQ906078	99
VA2 Arquea	VA2 arch f7	1 (2)	Thermoplasmatales sin cultivar	EF396244	99
	VA2 arch e11	42 (94)	<i>Ferroplasma acidiphilum</i>	NR028183	97
	VA2 arch f10	1 (2)	Thermoplasmatales sin cultivar	FJ228382	99
	VA2 arch a11	1 (2)	Euryarchaeota sin cultivar	FN862215	99
U2V Bacteria	U2V bac e9	3 (8)	<i>Acidithiobacillus ferrivorans</i>	NR074660	99
	U2V bac f10	21 (57)	<i>Acidithiobacillus albertensis</i>	NR028982	99
	U2V bac b3	2 (6)	Gammaproteobacteria sin cultivar	KC620784	95
	U2V bac f1	1 (3)	Firmicutes sin cultivar	EF612377	95
	U2V bac h2	2 (6)	<i>Sulfobacillus</i> sin cultivar	HQ730680	98
	U2V bac g10	3 (8)	<i>Sulfobacillus thermosulfidooxidans</i>	EU419198	99
	U2V bac a5	2 (6)	<i>Ferrimicrobium</i> sin cultivar	EU376021	96
	U2V bac f9	1 (3)	Acidimicrobiaceae sin cultivar	HQ317068	99
	U2V bac f4	2 (6)	<i>Leptospirillum ferriphilum</i>	EF025341	99
U2V Arquea	U2V arch f10	2 (3)	Thermoplasmatales sin cultivar	EF396244	99
	U2V arch e12	57 (97)	<i>Ferroplasma acidiphilum</i>	NR028183	99
AS3 Bacteria	AS3 bac e7	3 (6)	<i>Acidithiobacillus ferrivorans</i>	NR074660	99
	AS3 bac h10	13 (25)	<i>Acidithiobacillus albertensis</i>	NR028982	99
	AS3 bac g4	9 (17)	<i>Acidithiobacillus thiooxidans</i>	FJ998186	99
	AS3 bac d10	2 (4)	Gammaproteobacteria sin cultivar	KC620856	97
	AS3 bac c10	1 (2)	<i>Pseudomonas</i> sp.	FJ889562	99
	AS3 bac f7	1 (2)	<i>Cupriavidus metallidurans</i>	NR074704	99

	OTU	N° de clones (%)	Secuencia más cercana por BLASTn	N° de acceso	% Similitud
	AS3 bac a11	3 (6)	Bacillales sin cultivar	EU419142	93
	AS3 bac g3	1 (2)	<i>Alicyclobacillus</i> sin cultivar	KC172317	93
	AS3 bac c2	1 (2)	Firmicutes sin cultivar	KC620769	99
	AS3 bac e8	1 (2)	<i>Sulfobacillus</i> sin cultivar	EF612371	99
	AS3 bac a7	1 (2)	<i>Acidimicrobiaceae</i> sin cultivar	DQ906064	99
	AS3 bac e9	9 (18)	<i>Leptospirillum ferrooxidans</i>	AF356835	97
	AS3 bac h7	5 (10)	<i>Leptospirillum ferriphilum</i>	EF025341	99
	AS3 bac b6	1 (2)	Planctomycetes sin cultivar	DQ906078	99
AS3	AS3 arch d2	2 (2)	<i>Thermogymnomonas</i> sin cultivar	KC537696	96
Arquea	AS3 arch a6	80 (96)	<i>Ferroplasma acidiphilum</i>	NR028183	99
	AS3 arch g11	2 (2)	Thermoplasmatales sin cultivar	FJ228391	99
CV	CV bac h8	2 (22)	<i>Acidithiobacillus ferrivorans</i>	NR074660	99
Bacteria	CV bac g11	1 (11)	<i>Acidithiobacillus albertensis</i>	NR028982	99
	CV bac c11	4 (45)	<i>Acidithiobacillus thiooxidans</i>	JQ820325	99
	CV bac b9	2 (22)	<i>Acidiphilium</i> sin cultivar	JF737860	100
CV	CV arch e8	54 (95)	<i>Ferroplasma acidiphilum</i>	NR028183	99
Arquea	CV arch c1	3 (5)	<i>Ferroplasma</i> sin cultivar	KC537453	97

La gran mayoría de las secuencias de bacterias y de arqueas detectadas en el RAS presentan similitudes entre el 97 y el 99% con secuencias detectadas en otros estudios y, en muchos de los casos, con secuencias de especies cultivadas y caracterizadas. Esto es particularmente llamativo para las arqueas debido a que la representación de secuencias de este dominio en las bases de datos suele ser muy pobre y las secuencias de arqueas encontradas, particularmente en ambientes extremos, suelen mostrar bajos porcentajes de similitud con las secuencias depositadas.

5.3.1. Bacterias

La Figura 5.4 muestra la ubicación en el árbol filogenético de los OTUs de bacterias detectados en RAS. En este árbol puede verse que los OTUs de bacterias se ubican a lo largo de todo el árbol y están representados dentro de cinco filos: Proteobacteria, Firmicutes, Actinobacteria, Nistrosphira y Planctomycetes. Dentro de estos, Proteobacteria es el que tiene mayor cantidad de OTUs, en particular, asociados con el género *Acidithiobacillus*.

Para completar el análisis de los filotipos encontrados en el RAS, la Tabla 5.6 muestra los OTUs de bacterias ordenados filogenéticamente según la herramienta Classifier de Ribosomal Database Project (RDP). Esta herramienta on line permite la clasificación de las secuencias de ARNr 16S en grupos filogenéticos (desde filo hasta género) utilizando un algoritmo diferente a los de BLASTn y ARB. Además, permite aplicar valores de corte al análisis, según el porcentaje de confianza de la clasificación. En este estudio se utilizaron las clasificaciones en grupos taxonómicos que mostraron una confianza mayor al 97%. En la Tabla 5.6 se incluye información sobre los lugares donde se han detectado secuencias similares, con mayor énfasis en aquellas especies más cercanas encontradas en ambientes con condiciones similares a las del RAS. Dicha información se obtuvo a partir de lo publicado en la base de datos de NCBI y puede accederse a partir de los números de acceso de las respectivas secuencias.

Figura 5.4 Árbol filogenético donde se destacan los OTUs de bacterias detectados en las aguas de los cuatro puntos del RAS estudiados. Las llaves de la derecha engloban los distintos grupos taxonómicos, destacándose género, familia (en algunos casos), clase y filo. La barra indica 0,01 de divergencia filogenética (número de mutaciones fijas por nucleótido).

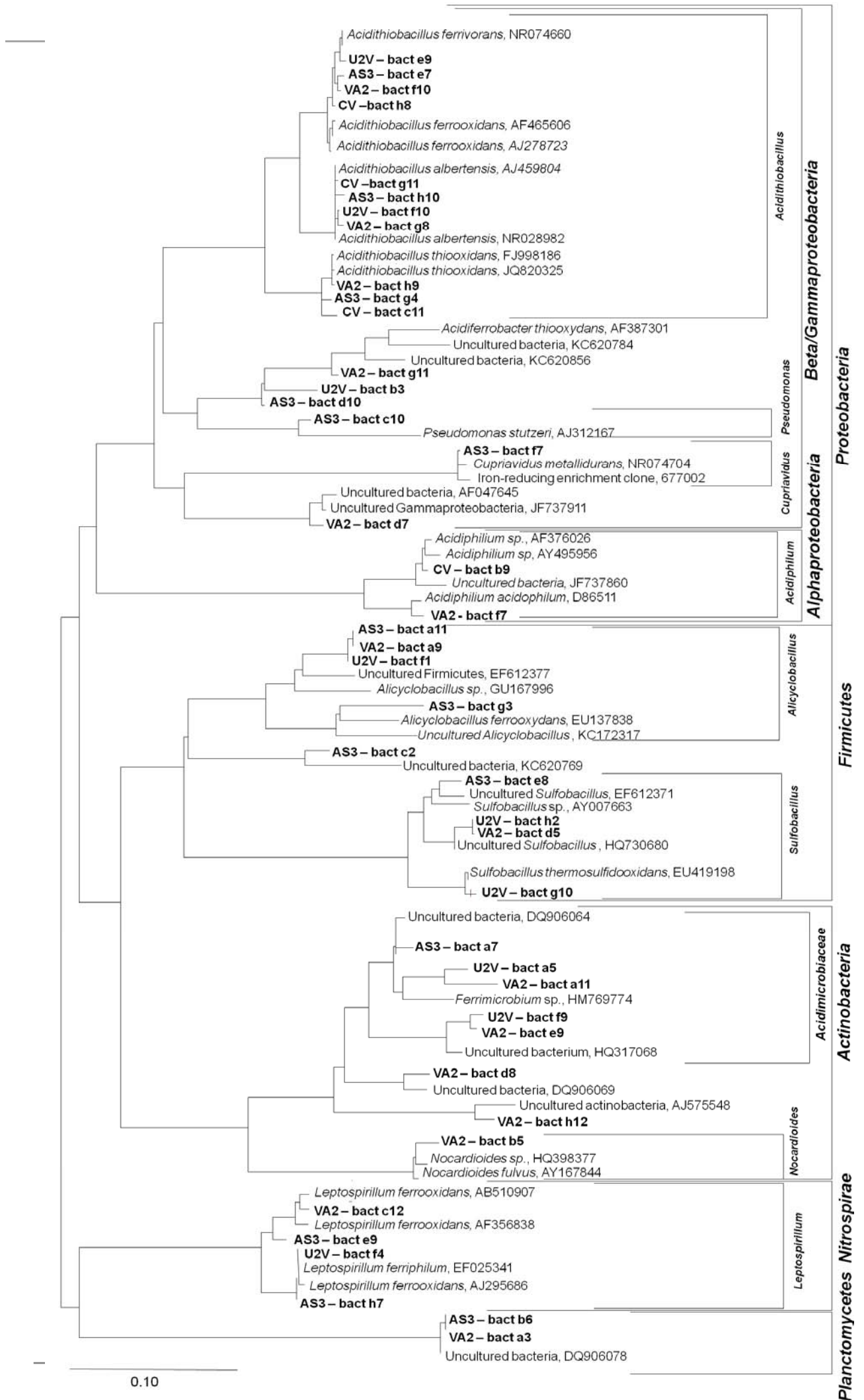


Tabla 5.6. Clasificación filogenética según RDP de los OTUs de bacteria encontrados en las muestras de agua de los cuatro puntos del Río Agrio Superior analizados. Para cada OTU se muestran la secuencia más cercana según BLASTn y los sitios en los cuales se han detectado secuencias similares, haciendo especial énfasis en ambientes con características similares a las del Río Agrio.

Clasificación filogenética según RDP (N° OTUs)	Nombre OTU	N° de clones (%)	Secuencia más cercana por BLASTn	N° de acceso	Similitud	Ambientes en donde fueron detectadas las secuencias más cercanas
Dominio <i>Bacteria</i> (40)						
Filo Proteobacteria (19)						
..Clase Betaproteobacteria (1)						
Orden Burkholderiales (1)						
Familia Burkholderiaceae (1)						
....Género <i>Cupriavidus</i> (1)	AS3_bact_f7	1 (2)	<i>Cupriavidus metallidurans</i>	NR074704	99	Agua de mar en zona afectada por actividad humana en China, aguas pesadas, sistema de distribución de agua potable, sedimentos del volcán submarino Kazan en mar Mediterraneo Este, sedimentos de estuario contaminado
..Clase Gammaproteobacteria (16)						
..Gammaproteobacteria sin clasific (3)	VA2-bac_g11	5 (9)	Bacteria no cultivada	KC620784	97	Aguas y biofilms de Río Tinto, cola de mina de Pb-Zn abandonada, DAM de pirita en China
	U2V-bac_b3	2 (6)	Bacteria no cultivada	KC620784	95	Aguas y biofilms de Río Tinto, cola de mina de Pb-Zn abandonada, DAM de pirita en China
	AS3_bact_d10	2 (4)	Bacteria no cultivada	KC620784	97	Aguas y biofilms de Río Tinto, cola de mina de Pb-Zn abandonada, DAM de pirita en China
...Orden Acidithiobacillales (11)						
....Familia Acidithiobacillaceae (11)						
....Género <i>Acidithiobacillus</i> (11)	VA2-bac_f10	5 (9)	<i>Acidithiobacillus ferrivorans</i>	NR074660	99	Aguas y biofilms de Río Tinto, DAR en zona rica en Fe en Antártida, DAM de pirita en China, mina de carbón abandonada
	VA2-bac_g8	9 (16)	<i>Acidithiobacillus albertensis</i>	NR028982	99	DAM de pirita y sulfuros en distintas provincias en China, Pozos geotermales de Copahue, sistema de cavernas ácidas Frasassi en Italia

	VA2-bac_h9	2 (4)	<i>Acidithiobacillus thiooxidans</i>	DQ834372	99	Planta de biolixiviación en pilas en Zambia, sedimentos de río Xiangjian en China contaminado con metales pesados
	U2V-bac_e9	3 (8)	<i>Acidithiobacillus ferrivorans</i>	NR074660	99	Aguas y biofilms de Río Tinto, DAR en zona rica en Fe en Antártida, DAM de pirita en China, mina de carbón abandonada
	U2V-bac_f10	21 (57)	<i>Acidithiobacillus albertensis</i>	NR028982	99	DAM de pirita y sulfuros en distintas provincias en China, pozos geotermales de Copahue, sistema de cavernas ácidas Frasassi en Italia
	AS3_bact_e7	3 (6)	<i>Acidithiobacillus ferrivorans</i>	NR074660	99	Aguas y biofilms de Río Tinto, DAR en zona rica en Fe en Antártida, DAM de pirita en China, mina de carbón abandonada
	AS3_bact_h10	13 (25)	<i>Acidithiobacillus albertensis</i>	NR028982	99	DAM de pirita y sulfuros en distintas provincias en China, columna de biolixiviación de U, pila de biolixiviación de Cu
	AS3_bact_g4	9 (17)	<i>Acidithiobacillus thiooxidans</i>	FJ998186	99	Planta de biolixiviación en pilas en Zambia, reactor de biolixiviación de suelo contaminado con metales pesados, sedimentos de río Xiangjian contaminado con metales pesado en China
	CV_bac_h8	2 (22)	<i>Acidithiobacillus ferrivorans</i>	NR074660	99	Aguas y biofilms de Río Tinto, DAR en zona rica en Fe en Antártida, DAM de pirita en China, DAM en La Zarza-Perrunal en Faja Pirítica Ibérica en España
	CV_bac_g11	1 (11)	<i>Acidithiobacillus albertensis</i>	NR028982	99	DAM de pirita y sulfuros en distintas provincias en China, pozos geotermales de Copahue, columna de biolixiviación de U
	CV_bac_c11	4 (45)	<i>Acidithiobacillus thiooxidans</i>	JQ820325	99	Planta de biolixiviación en pilas en Zambia, sedimentos de río Xiangjian en China contaminado con metales pesados, pozos geotermales de Copahue
...Orden Pseudomonadales (1)						
....Familia Pseudomonadaceae (1)						
.....Género <i>Pseudomonas</i> (1)	AS3_bact_c10	1 (2)	<i>Pseudomonas</i> sp.	FJ889562.1	99	Suelo congelado en área de montañas Kunlum en China, suelo contaminado con Cr(VI) bioremediado, profundidad del mar, suelo contaminado con PAH en España
...Orden Xanthomonadales (1)						
....Familia Xanthomonadaceae (1)						
....Xanthomonadaceae sin clasific(1)	VA2-bac_d7	2 (4)	Gammaproteobacteria sin cultivar	JF737911	99	Aguas y biofilms de Río Tinto

..Clase Alphaproteobacteria (2)						
...Orden Rhodospirillales (2)						
....Familia Acetobacteraceae (2)						
.....Género <i>Acidiphilium</i> (2)	VA2-bac_f7	3 (5)	<i>Acidiphilium</i> sp.	EU003879	98	Aguas y biofilms de Río Tinto, DAM en La Zarza-Perrunal en Faja Pirítica Ibérica España
	CV_bac_b9	2 (22)	Bacteria sin cultivar	JF737860	100	Pozos geotermales de Copahue, aguas y biofilms de Río Tinto, DAM de Hg en California EEUU, DAM en La Zarza-Perrunal en Faja Pirítica Ibérica España
.Filo Firmicutes (9)						
.Firmicutes sin clasific (1)	AS3_bact_c2	1 (2)	Bacteria sin cultivar	KC620769	99	DAM en China, cola de mina de Pb-Zn
..Clase Clostridia (4)						
...Orden Clostridiales (4)						
....Familia Clostridiales (4)						
.....Género <i>Sulfobacillus</i> (4)	VA2-bac_d5	10 (17)	<i>Sulfobacillus</i> sin cultivar	HQ730680	98	Aguas y biofilms de Río Tinto, zonas ácidas hidrotermales en Australia y en volcán Monte Hood en EEUU
	U2V-bac_g10	3 (8)	<i>Sulfobacillus thermosulfidooxidans</i>	EU419198	99	Pila de biolixiviación de sulfuros de Cu, DAM en China, zonas ácidas hidrotermales en el volcán Monte Hood en EEUU, aguas y biofilms de Río Tinto
	U2V-bac_h2	2 (6)	<i>Sulfobacillus</i> sin cultivar	HQ730680	98	Aguas y biofilms de Río Tinto, zonas ácidas hidrotermales en Australia y en volcán Monte Hood en EEUU
	AS3_bact_e8	1 (2)	<i>Sulfobacillus</i> sin cultivar	EF612371	99	Aguas y biofilms de Río Tinto, cola de mina de Pb-Zn abandonada, zonas ácidas hidrotermales en Australia y en volcán Monte Hood en EEUU, reactor de biolixiviación de pirita
..Clase Bacilli (4)						
...Orden Bacillales (4)						
..Bacillales sin clasific(3)	VA2-bac_a9	4 (7)	Firmicutes sin cultivar	EF612377	95	Zonas ácidas hidrotermales en el volcán Monte Hood en EEUU, DAM de Cu, DAM de Pb-Zn, DAM en La Zarza-Perrunal en Faja Pirítica Ibérica en España, depósitos de cenizas volcánicas en la isla Miyake en Japón
	U2V-bac-f1	1 (3)	Firmicutes sin cultivar	EF612377	95	Zonas ácidas hidrotermales en el volcán Monte Hood en EEUU, DAM de Cu, DAM de Pb-Zn, DAM en La Zarza-Perrunal en Faja Pirítica Ibérica en España, depósitos de cenizas volcánicas en la isla Miyake en Japón

	AS3_bact_a11	3 (6)	Bacteria sin cultivar	EU419142	93	Zonas ácidas hidrotermales en el volcán Monte Hood en EEUU, DAM de Cu, DAM de Pb-Zn, DAM en La Zarza-Perrunal en Faja Pirítica Ibérica en España, cola de mina de Pb-Zn abandonada
....Familia Alicyclobacillaceae (1)						
	AS3_bact_g3	1 (2)	<i>Alicyclobacillus ferrooxydans</i>	NR044413	93	suelo de zona geotermal en Islandia y en PNY, pila de biolixiviación de sulfuros metálicos, zona de solfataras en China
.Filo "Actinobacteria" (8)						
..Clase Actinobacteria (8)						
...sub Clase Acidimicrobiae (7)						
...Orden Acidimicrobiales (7)						
...sub Orden "Acidimicrobineae"(7)						
....Familia Acidimicrobiaceae (5)						
....Acidimicrobiaceae sin clasific (3)						
	VA2-bac_e9	1 (2)	Bacteria sin cultivar	HQ317068	99	DAR en zona rica en Fe en Antártida, lago ácido en mina de piritita en Alemania, aguas y biofilms de Río Tinto, DAM de carbón en EEUU
	U2V-bac_f9	1 (3)	Bacteria sin cultivar	HQ317068	99	Drenaje ácido de roca en zona rica en Fe en Antártida, lago ácido en mina de piritita en Alemania, Aguas y biofilms de Río Tinto, DAM de carbón en EEUU
	AS3_bact_a7	1 (2)	Bacteria sin cultivar	DQ906064	99	Rizosfera de plantas en zona expuesta a DAM, cola de mina de Pb-Zn en China, aguas y biofilms de Río Tinto, DAR en zona rica en Fe en Antártida, efluente ácido de mina en La Zarza-Perrunal en faja Pirítica ibérica en España
	VA2-bac_a11	1 (2)	<i>Ferrimicrobium</i> sp.	HM769774	94	Aguas y biofilms de Río Tinto, zonas ácidas hidrotermales en el volcán Monte Hood en EEUU, DAM de Cu, biorreactor para oxidación de Fe(II)
	U2V-bac_a5	2 (6)	Bacteria sin cultivar	EU376021	96	Aguas y biofilms de Río Tinto, biofilm en una caverna de origen geotermal ácido en Wyoming EEUU
....Familia "Acidimicrobineae" (1)						
	VA2-bac_h12	1 (2)	Actinobacteria sin cultivar	AJ575548	97	Agua de mar, lago ácido en mina de piritita en Alemania, DAM de piritita en China
	VA2-bac_d8	2 (4)	Actinobacteria sin cultivar	DQ906069	98	Rizoosfera de plantas adaptadas a DAM, efluente ácido de mina en La Zarza-Perrunal en faja Pirítica ibérica en España, suelo de pantano ácido en Alemania, lago ácido en mina de piritita en Alemania
...sub Clase Actinobacteridae (1)						

...Orden Actinomycetales (1)						
...sub Orden Propionibacterineae (1)						
....Familia Nocardioidaceae (1)						
....Género <i>Nocardioides</i> (1)	VA2-bac_b5	1 (2)	<i>Nocardioides sp.</i>	HQ398377	99	DAM de pirita en China, distintos ambientes marinos, suelo antártico
.Filo "Nitrospira" (4)						
..Clase "Nitrospira" (4)						
...Orden "Nitrospirales" (4)						
....Familia "Nitrospiraceae" (4)						
....Género <i>Leptospirillum</i> (4)	VA2-bac_c12	7 (13)	<i>Leptospirillum ferrooxidans</i>	NR074963	99	Depósitos de cenizas volcánicas en la isla Miyake en Japón, aguas y biofilms de Río Tinto, DAM en La Zarza-Perruniel en Faja Pirítica Ibérica en España
	U2V-bac_f4	2 (6)	<i>Leptospirillum ferriphilum</i>	EF025341	99	DAM en China, cola de mina de Pb-Zn abandonada, biorreactores de oxidación de minerales sulfurados, columna de biolixiviación de U
	AS3_bact_e9	9 (18)	<i>Leptospirillum ferrooxidans</i>	AF356835	97	Aguas y biofilms de Río Tinto, DAM en La Zarza-Perruniel en Faja Pirítica Ibérica,
	AS3_bact_h7	5 (10)	<i>Leptospirillum ferriphilum</i>	EF025341	99	DAM en China, cola de mina de Pb-Zn abandonada, biorreactores de oxidación de minerales sulfurados, columna de biolixiviación de U
.Filo "Planctomycetes" (1)						
."Planctomycetes" sin clasific (1)	AS3_bact_b6	1 (2)	Bacteria sin cultivar	DQ906078	99	Aguas y biofilms de Río Tinto, rizosfera de plantas en zona expuesta a DAM
	VA2 bac a3	2 (4)	Bacteria sin cultivar	DQ906078	99	Aguas y biofilms de Río Tinto, rizosfera de plantas en zona expuesta a DAM

DAR: drenaje ácido de roca

DAM: drenaje ácido de minas

En un análisis global de los OTUs de los cuatro puntos de muestreo seleccionados del RAS, puede verse que, mayoritariamente, pertenecen a los mismos grupos taxonómicos. Así, el árbol filogenético de la Figura 5.4 y la Tabla 5.6 muestran que son muchos los grupos taxonómicos en los cuales se encuentran los OTUs de todos los puntos, especialmente de VA2, U2V y AS3. CV presenta únicamente cuatro OTUs y éstos están afiliados a grupos en los cuales también se encuentran OTUs de los otros tres puntos superiores. Los ejemplos más claros se dan para los géneros *Acidithiobacillus* (en los 4 sitios se detectaron secuencias relacionadas con tres especies distintas), *Sulfobacillus* y *Leptospirillum* que parecen estar muy bien representados a lo largo de todo el RAS.

Secuencias similares a las descubiertas en los puntos del RAS estudiados, han sido halladas en ambientes con características similares a las del RAS. La gran mayoría de las secuencias presentan altos porcentajes de similitud con otras encontradas en las aguas, biofilms y sedimentos del Río Tinto en Huelva, España, o en diversos drenajes ácidos de minas o zonas impactadas por la actividad minera en distintas partes del mundo (Hallberg et al., 2010; González Toril et al., 2011; García Moyano et al., 2012; Dold et al., 2013). Es particularmente interesante observar que secuencias de OTUs que no han podido ser clasificados taxonómicamente más allá de clases o familias, presentan similitudes del 99% con secuencias detectadas únicamente en este tipo de ambientes ácidos. Por otro lado, la última columna de la Tabla 5.6 muestra que secuencias cercanas a OTUs de muy diferente clasificación taxonómica han sido detectadas en los mismos lugares, siempre de naturaleza ácida y generalmente relacionados a la actividad minera.

A continuación se describe en más detalladamente la filogenia de las especies de bacterias encontradas en el RAS:

Filo Proteobacteria

En el árbol filogenético de la Figura 5.4 y en la Tabla 5.6 donde se muestra la clasificación taxonómica de los OTUs de acuerdo a RDP, se observa que este filo es el más representado en el RAS, con diecinueve OTUs en distintos grupos taxonómicos de las clases Alpha-, Beta- y Gammaproteobacteria.

Betaproteobacteria

Dentro de esta clase se detectó una única secuencia en el punto AS3, perteneciente a la familia Burkholderiaceae y al género *Cupriavidus*. Esta secuencia presenta un 99% de similitud con secuencias de *Cupriavidus metallidurans* detectadas en diversos sistemas acuáticos, la mayoría de ellos contaminados o afectados por actividades humanas (sin publicar, información disponible bajo los números de acceso de BLAST JN845637 y KC002530).

Gammaproteobacteria

Esta es la clase taxonómica más representada en el RAS, con dieciséis OTUs, de los cuales la mayoría están afiliados al género *Acidithiobacillus*.

Según la herramienta Classifier de RDP, tres OTUs representados por un 9% de las secuencias de VA2, un 6% de las de U2V y un 4% de las de AS3, no pudieron ser clasificadas más allá del taxón clase. Es interesante notar que estos tres OTUs presentan similitudes del orden del 95 al 97% con el mismo clon obtenido en un estudio realizado en el drenaje ácido producido en una mina de pirita en China (trabajo sin publicar, información obtenida de NCBI bajo el número de acceso de secuencia KC620784). Además, las secuencias de los tres OTUs presentan similitudes con secuencias obtenidas de aguas y biofilms del Río Tinto (García Moyano et al., 2011) y de los desechos de una mina de Pb y Zn abandonada (Tan, 2008). Teniendo en cuenta estos resultados, si bien no se conocen las características fisiológicas y metabólicas de esta gammaproteobacteria, seguramente se trate de una especie nueva ampliamente distribuida y adaptada a vivir en condiciones ácidas y de alta concentración de metales.

Dentro del género *Acidithiobacillus* se detectaron once OTUs, distribuidos en los cuatro sitios analizados. En base a lo que puede observarse en el árbol filogenético de la Figura 5.4 y según las comparaciones realizadas con la base de datos de NCBI utilizando el algoritmo BLASTn, en el RAS hay presentes tres especies de este género: *A. ferrivorans*, *A. albertensis* y *A. thiooxidans* (detectadas con un 99% de similitud en todos los casos). Es importante aclarar que la diferencia filogenética entre las distintas especies del género *Acidithiobacillus* son difíciles de resolver a nivel de secuencia del gen ARNr 16S. En particular, las especies *A. thiooxidans* y *A. albertensis* son muy similares, tanto filogenéticamente como en relación a sus características fisiológicas y metabólicas. La clasificación de las especies de este género utilizada en este trabajo se basa en las posiciones de las secuencias en el árbol filogenético (ver Figura 5.4) y en las similitudes obtenidas por comparación de las secuencias con las de la base

de datos de NCBI utilizando el algoritmo BLASTn.

Las secuencias similares a las de los OTUs del género *Acidithiobacillus* fueron detectadas en ambientes relacionados con la actividad minera, tales como: colas de mina, drenajes ácidos de minas, pilas y/o reactores de biolixiviación de minerales sulfurados. Secuencias de especies pertenecientes a este género fueron reportadas en muchísimos trabajos publicados, como los de He et al., 2007; Nareshkumar et al., 2008 y Qiu et al., 2011. En particular, muchas de las secuencias que mostraron mayores similitudes con los *Acidithiobacillus* de Copahue no se encuentran publicadas y la información puede encontrarse bajo los números de acceso de NCBI KC620814, FM213076, JQ820325 y FJ998186. También se encontraron secuencias similares a los *Acidithiobacillus* del Río Agrio en ambientes ácidos naturales, tales como el Río Tinto (García Moyano et al., 2012), las cavernas de Frasassi en Italia (Macaladi et al., 2007), drenajes ácidos de roca ricos en Fe en la Antártida (Dold et al., 2013), los pozos geotermales de Copahue (este trabajo de tesis) y suelos o cursos de agua ácidos contaminados con metales pesados (trabajos sin publicar, información obtenida de NCBI bajo los números de acceso de secuencia JF906976 y JQ034367).

Las secuencias relacionadas con especies del género *Acidithiobacillus* sumaron, para los sitios U2V, AS3 y CV, más del 50% de los clones de bacterias (78% en el caso de CV). En VA2 se encontró un 4% de las secuencias relacionadas con *A. ferrivorans*, un 16% con *A. albertensis* y un 4% con *A. thiooxidans*. El sitio U2V está dominado por *A. albertensis* (57% de los clones de bacteria). El predominio de secuencias relacionadas a un mismo OTU justifica el valor más elevado del índice de Berger Parker que se observa para U2V en la Tabla 5.3. En este punto también se encontró que el 8% de los clones de bacteria estaban relacionados con *A. ferrivorans*. En AS3 se detectaron las tres especies, también con predominio de *A. albertensis* (25% de los clones de bacteria), seguido de *A. thiooxidans* (17% de los clones de bacteria) y *A. ferrivorans* (6% de los clones de bacteria). En CV el 45% de los clones de bacteria se relacionan con *A. thiooxidans*, el 22% con *A. ferrivorans* y el 11% con *A. albertensis*.

También dentro de la clase Gammaproteobacteria se encontró en el punto AS3 una secuencia afiliada al género *Pseudomonas*. En VA2, se detectaron dos secuencias pertenecientes a la familia Xanthomonadaceae que resultaron ser 99% similares a una secuencia encontrada en aguas y biofilms del Río Tinto (García Moyano et al., 2012).

Alphaproteobacteria

En esta clase se hallaron dos OTUs, uno en VA2 (5% de los clones) y otro en CV (22% de los clones), ambos afiliados al género *Acidiphilium* y con altos porcentajes de similitud (entre 98 y 100%) con un clon obtenido en un estudio comparativo de la biodiversidad en aguas y biofilms de Río Tinto (García Moyano et al., 2012), con otras secuencias encontradas en distintos drenajes ácidos (González Toril et al., 2011; Santofimia et al., 2013, trabajo sin publicar, información obtenida de NCBI bajo el número de acceso de secuencia KC541487) e incluso en las aguas de los pozos geotermales de Copahue (descriptas en la Sección 4 de este trabajo). Como se observa en el árbol filogenético de la Figura 5.4, las secuencias representantes de ambos OTUs se afilian con otras secuencias del género *Acidiphilium*.

Filo Firmicutes

Se detectaron nueve OTUs dentro de este filo, ubicados en los sitios VA2, U2V y AS3.

En AS3 se detectó una secuencia que no pudo ser clasificada más allá del nivel de filo según el algoritmo de RDP. Según BLASTn, esta misma secuencia presenta un 99% de similitud con otra detectada en un estudio de diversidad realizado en el drenaje ácido de la mina de pirita Tong Ling en China (trabajo sin publicar, información obtenida de NCBI bajo el número de acceso de secuencia KC620769). Muchas de las secuencias detectadas en el presente estudio del RAS muestran muy alta homología con secuencias detectadas en la prospección de la biodiversidad, aún sin publicar, presente en ese drenaje ácido en China.

Los restantes ocho OTUs se distribuyen en dos clases taxonómicas:

Clostridia

Los cuatro OTUs clasificados dentro de este grupo taxonómico están asociados con el género *Sulfobacillus*. En VA2, 17% de los clones de bacteria presentan un 98% de similitud con una secuencia de *Sulfobacillus* sin cultivar. En U2V, 6% de los clones de bacterias presentan la misma similitud con la misma secuencia. En este punto de muestreo, se detectó otro OTU dentro de este género que representa el 8% de los clones de bacteria y está asociado, según BLASTn, a *Sulfobacillus thermosulfidooxidans* con 99% de similitud. En AS3, 2% de las secuencias se relaciona con una secuencia diferente de *Sulfobacillus*. Todas las secuencias relacionadas a las representantes de los OTUs detectados en Copahue fueron obtenidas en los mismos ambientes: aguas y biofilms de Río Tinto (Sánchez Andrea et al., 2011; Souza Egipsy et al., 2011), zonas hidrotermales con características ácidas en el Monte Hood en Estados Unidos (trabajo sin

publicar, información obtenida de NCBI bajo el número de acceso EU419198), drenajes ácidos de minas en distintas partes del mundo y operaciones biomineras, tanto a nivel de pilas como de biorreactores de lixiviación (Mendez et al., 2008; Watkin et al., 2009; Liu et al., 2011).

Bacilli

Dentro de los cuatro OTUs de esta clase filogenética, tres no pudieron ser clasificados más allá de este taxón, siempre según la herramienta Classifier de RDP. Estos OTUs se encuentran en tres de los sitios analizados y representan el 7% de los clones de bacteria en VA2, el 3% en U2V y el 6% en AS3. Las secuencias representantes de los OTUs de VA2 y U2V presentan un 95% de similitud con una secuencia reportada como *Firmicutes* sin cultivar en un trabajo de caracterización de la comunidad de bacterias presentes en la cola de una mina abandonada de Pb y Zn (Mendez et al., 2008). Ambas secuencias son similares a otras encontradas en zonas hidrotermales con características ácidas en el Monte Hood en Estados Unidos (trabajo sin publicar, información obtenida de NCBI bajo el número de acceso de secuencia EU419142) y en drenajes ácidos de minas en distintas partes del mundo (He et al., 2008; Breuker et al., 2009; González Toril et al., 2011, trabajo sin publicar, información obtenida de NCBI bajo el número de acceso de secuencia JF766469). En el caso de la secuencia representante del OTU de AS3, la similitud es menor (93%) con secuencias de bacterias sin cultivar que han sido detectadas en los mismos lugares que las de VA2 y U2V indicados más arriba.

El OTU restante de esta clase fue detectado en AS3 y, según RDP, se clasifica como perteneciente al género *Alicyclobacillus* con 100% de confianza. De acuerdo a la comparación con la base de datos de NCBI, la secuencia presenta un bajo porcentaje de similitud (93%) con *Alicyclobacillus ferrooxydans*. Estos resultados podrían indicar que se trata de una nueva especie dentro de este género.

La taxonomía descrita para los filotipos del filo Firmicutes puede comprobarse observando en el árbol filogenético de la Figura 5.4.

Filo Actinobacteria

En este taxón se detectaron ocho OTUs pertenecientes a la clase Actinobacteria y divididos en dos subclases:

Acidimicrobidae

En esta subclase se detectaron siete de los ocho OTUs de este filo. Tres de ellos, compuestos por una secuencia cada uno detectadas en los puntos VA2, U2V y AS3, se reportan como pertenecientes a la familia Acidimicrobiaceae sin haber podido ser clasificados más profundamente. Las secuencias representantes de los OTUs de VA2 y U2V presentan un 99% de similitud con una secuencia de bacteria sin cultivar obtenida de un drenaje ácido de roca en las islas Shetland del Sur en la Antártida (Dold et al., 2013). Además, ambas secuencias se relacionan con otras encontradas en el Río Tinto y en diversos drenajes ácidos de minas (Mirete et al., 2007; García Moyano et al., 2012, Lu et al., 2013). Según puede verse en el árbol filogenético de la Figura 5.4, el OTU de AS3, que RDP también agrupa dentro de Acidimicrobiaceae sin clasificar (AS3-bact_a7), está alejado de los de VA2 y U2V, pero como indica la Tabla 5.6, se relaciona con secuencias encontradas en lugares muy semejantes, incluso en el mismo drenaje ácido de roca en la Antártida indicado más arriba.

Dentro de la familia Acidimicrobiaceae también se detectaron dos OTUs, uno en VA2 y el otro en U2V, asociados con un 100% de confianza al género *Ferrimicrobium*. El primero presenta un 94% de similitud con una secuencia de *Ferrimicrobium* sp. presente en un biorreactor de oxidación de Fe(II) con potenciales aplicaciones en biolixiviación y en la depuración de drenajes ácidos (Mazuelos et al., 2012). Al igual que la mayor parte de los OTUs designados en el RAS, éste también presenta similitud con secuencias detectadas en distintos ambientes con fuerte impacto de la actividad minera. El segundo OTU asociado al género *Ferrimicrobium* tiene un 96% de similitud con secuencias de bacterias sin cultivar detectadas en biofilms en el Río Tinto y en biofilms encontrados en una caverna de aguas ácidas de origen geotermal (Souza Egipsy et al., 2011; García Moyano et al., 2012; trabajo sin publicar, información obtenida de NCBI bajo el número de acceso de secuencia EU038010). Analizando las bajas similitudes arrojadas en la comparación con secuencias depositadas utilizando BLASTn y la clasificación dada por RDP, podría suponerse que estos OTUs representan nuevas especies dentro del género *Ferrimicrobium*.

En la familia Acidimicrobinae, aún dentro de la subclase Acidimicrobidae, se encontraron dos OTUs en el sitio VA2. Uno de ellos, que representa al 2% de los clones de bacteria de este

punto, no pudo ser mejor clasificado y se asocia, con un 97% de similitud a secuencias de Actinobacteria sin cultivar detectadas en hábitats diversos como agua de mar (Tang et al., 2011) y también en ambientes con impacto minero (Lu et al., 2010; Santofimia et al., 2013; Lu et al., 2013). El otro OTU fue clasificado como perteneciente al género *Aciditerrimonas* y presenta un alto porcentaje de similitud con diversas secuencias encontradas en ambientes ácidos generalmente afectados, directa o indirectamente, por la actividad minera (Mirete et al., 2007; Lu et al., 2010; González Toril et al., 2011).

Actinobacteridae

En esta subclase se detectó un único OTU en el sitio VA2 (2% de los clones de bacteria de este punto). Este OTU está asociado al género *Nocardioides* y presenta un 99% de similitud con secuencias detectadas en diversos ambientes marinos y también en un drenaje ácido de minas.

Filo Nitrospira

En los tres puntos más cercanos al origen del RAS se detectaron cuatro OTUs de este filo, todos clasificados como pertenecientes al género *Leptospirillum* con 100% de confianza de acuerdo a RDP. En VA2, 13% de los clones de bacteria mostró 99% de similitud con la secuencia de *Leptospirillum ferrooxidans*. En U2V, 6% de los clones de bacteria se asoció con 99% de similitud a la secuencia de *Leptospirillum ferriphilium*. En AS3, se encontraron dos OTUs clasificados dentro de este género: uno representa el 18% de los clones de bacterias y tiene 97% de similitud con *L. ferrooxidans*, mientras que el otro, que representa un 10% de los clones, se asocia con 99% de similitud a la misma secuencia de *L. ferriphilium* que el OTU correspondiente de U2V. Como era de esperar para las especies del género *Leptospirillum*, todas las secuencias relacionadas con las de los OTUs del RAS clasificadas dentro de este filo fueron encontradas en drenajes ácidos de minas, ambientes fuertemente impactados por la minería, bioprocesos relacionados con la lixiviación u oxidación de minerales sulfurados o metales pesados y/o en el Río Tinto (García Moyano et al., 2007; Mendez et al., 2008; Yin et al. 2008; González Toril et al., 2011; Qiu et al., 2011; García Moyano et al., 2012; Santofimia et al., 2013; trabajos sin publicar, información obtenida de NCBI bajo los números de acceso de secuencia DQ469238, DQ661637, KC620860).

Filo Planctomycetes

En este filo se encontraron dos OTUs, uno en VA2 (4% de los clones de bacteria) y otro en AS3 (2% de los clones de bacteria). Ambos OTUs presentan un 99% de similitud con una secuencia de una bacteria no cultivada encontrada en un estudio realizado sobre la rizosfera de plantas adaptadas a crecer en ambientes afectados por drenajes ácidos de minas y también en la rivera del Río Tinto (Mirete et al., 2007).

5.3.2. Arqueas

En esta sección se presenta un análisis para los OTUs de arqueas detectados en los cuatro puntos estudiados del RAS, similar al que se realizó en la sección anterior para los OTUs de bacterias. La Figura 5.5 muestra un árbol filogenético donde se destacan los once OTUs de arqueas detectados en los puntos del RAS estudiados. La Tabla 5.7 muestra la clasificación filogenética de estos OTUs de acuerdo a la herramienta Classifier de RDP junto con las secuencias de arqueas más cercanas a los OTUs de RAS según la comparación con la base de datos de NCBI utilizando el algoritmo BLASTn y los lugares donde estas secuencias fueron previamente detectadas. Esta información se obtuvo a partir de lo publicado en la base de datos de NCBI y puede accederse a partir de los números de acceso de las respectivas secuencias.

Figura 5.5 Árbol filogenético donde se destacan los OTUs de arqueas encontrados en las muestras de agua de puntos del Río Agrio Superior estudiados. Las llaves de la derecha engloban los distintos grupos taxonómicos, en este caso únicamente orden y filo. La barra indica 0,01 de divergencia filogenética (número de mutaciones fijas por nucleótido).

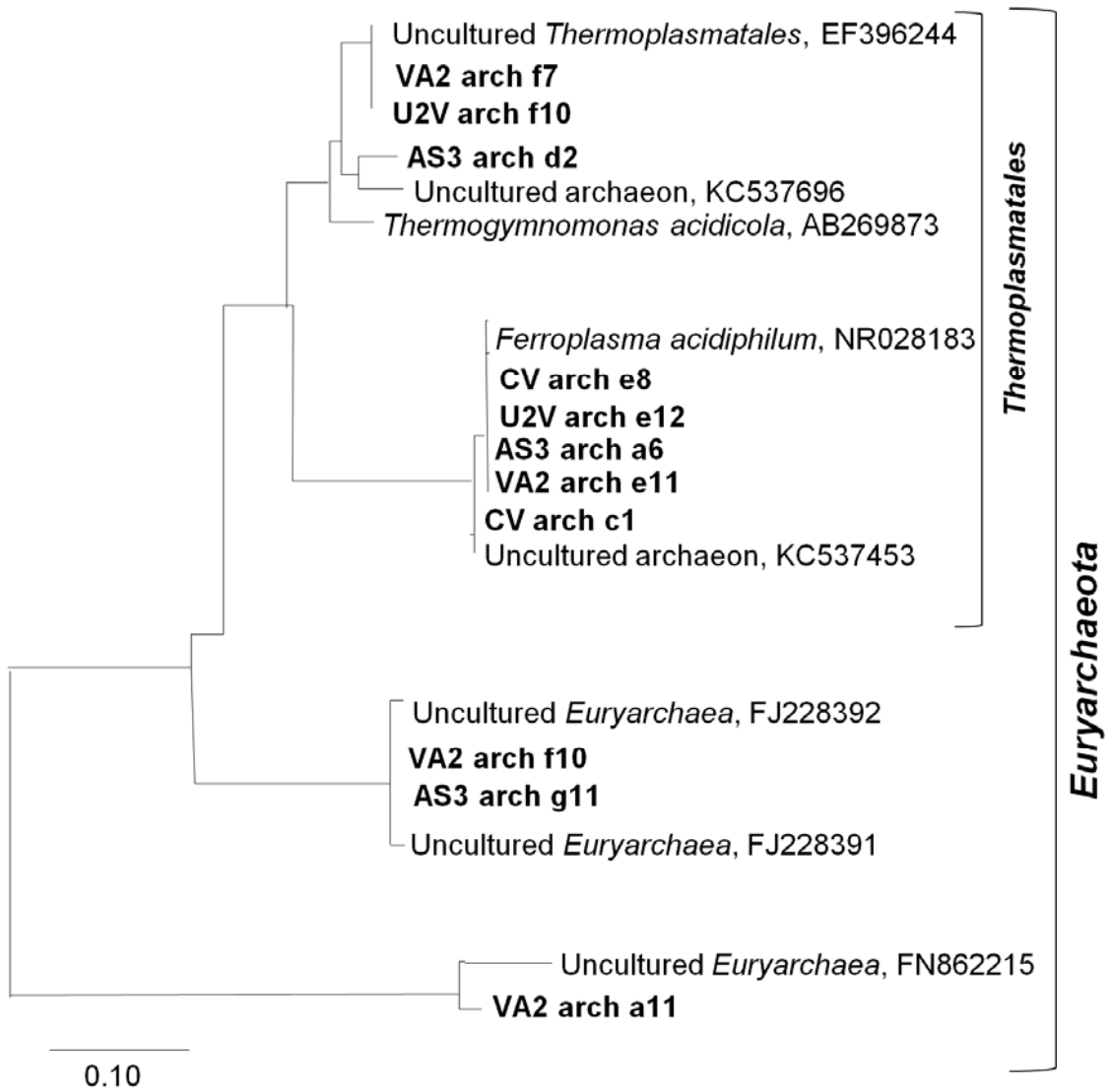


Tabla 5.7. Clasificación filogenética según RDP de los OTUs de arqueas encontrados en las muestras de agua de los cuatro puntos del Río Agrio Superior analizados. Para cada OTU se muestran la secuencia más cercana según BLASTn y los sitios en los cuales se han detectado secuencias similares, haciendo especial énfasis en ambientes con características similares a las del Río Agrio.

Clasificación filogenética según RDP (N° OTUs)	Nombre OTU	N° de clones (%)	Secuencia más cercana por BLASTn	N° de acceso	Similitud	Ambientes en donde fueron detectadas las secuencias más cercanas
Dominio Archaea (11)						
Filo Euryarchaeota (11)						
.Euryarchaeota sin clasific (3)	VA2-arch_f10	1 (2)	Euryarchaeota sin cultivar	FJ228382	99	DAM de Cu abandonadas en distintas partes del mundo, sedimentos ricos en As en DAM en Francia, sedimentos en laguna ácida en una mina en Alemania, sedimentos en Río Tinto,
	VA2_arch_a11	1 (2)	Euryarchaeota sin cultivar	FN862215	99	Aguas y biofilms en Río Tinto
	AS3-arch_g11	2 (2)	Euryarchaeota sin cultivar	FJ228391	99	DAM de Cu abandonadas en distintas partes del mundo, sedimentos ricos en As en DAM en Francia, sedimentos en laguna ácida en una mina en Alemania, sedimentos en Río Tinto,
Clase Thermoplasmata (8)						
...Orden Thermoplasmatales (8)						
Thermoplasmatales sin clasific (2)	VA2-arch_f7	1 (2)	Thermoplasmatales sin cultivar	EF396244	99	Manantiales ácidos en Japón, DAM en La Zarza-Perrunal en Faja Pirítica Ibérica España, DAM de pirita en China, aguas y biofilms en Río Tinto, DAM de Cu abandonada en Huelva España
	U2V-arch_f10	2 (3)	Thermoplasmatales sin cultivar	EF396244	99	Manantiales ácidos en Japón, DAM en La Zarza-Perrunal en Faja Pirítica Ibérica España, DAM de pirita en China, aguas y biofilms en Río Tinto, DAM de Cu abandonada en Huelva España
Familia Thermoplasmatales (1)						
....Género <i>Thermogymnomonas</i> (1)	AS3-arch_d2	2 (2)	Arquea sin cultivar	KC537696	96	DAM de pirita en China, manantiales ácidos en Japón, sedimentos ricos en As en DAM en Francia

Familia Ferroplasmaceae (5)

Género <i>Ferroplasma</i> (5)	VA2-arch_e11	42 (94)	<i>Ferroplasma acidiphilum</i>	NR028183	97	DAM de Cu y Pb-Zn en China, pila de biolixiviación en mina de Cu en distintas partes del mundo, aguas y sedimentos de Río Tinto,
	U2V-arch_e12	57 (97)	<i>Ferroplasma acidiphilum</i>	NR028183	99	DAM de Cu y Pb-Zn en China, pila de biolixiviación en mina de Cu en distintas partes del mundo, aguas y sedimentos de Río Tinto,
	AS3-arch_a6	80 (96)	<i>Ferroplasma acidiphilum</i>	NR028183	99	DAM de Cu y Pb-Zn en China, pila de biolixiviación en mina de Cu en distintas partes del mundo, aguas y sedimentos de Río Tinto,
	CV arch e8	54 (95)	<i>Ferroplasma acidiphilum</i>	NR028183	99	DAM de Cu y Pb-Zn en China, pila de biolixiviación en mina de Cu en distintas partes del mundo, aguas y sedimentos de Río Tinto,
	CV-arch_c1	3 (5)	Arquea sin cultivar	KC537453	97	Aguas y biofilms en Río Tinto, DAM de pirita en China

DAM: drenaje ácido de minas

En la Figura 5.5 y en la Tabla 5.7, se observa que la población de arqueas del RAS está constituida, según este análisis de diversidad procariota, únicamente por especies del filo Euryarchaeota. De los once OTUs encontrados, tres no pudieron ser clasificados más allá de este primer nivel filogenético. Dos de ellos pertenecen a la naciente del Río Agrio (VA2) y cada uno representa el 2% de las arqueas de ese punto. Estos OTUs, designados como VA2-arch_f10 y VA2-arch_g11, parecen tener un origen filogenético muy diferente ya que se encuentran en ramas bien separadas del árbol de la Figura 5.5. Ambos OTUs presentan un 99% de similitud con secuencias de arqueas detectadas en otros estudios. Las secuencias relacionadas con el primero de los OTUs de euryarqueas sin clasificar de VA2, fueron detectadas en diferentes sitios con fuerte impacto minero alrededor del mundo (Volant et al., 2012; Kay et al., 2013; trabajo sin publicar, información obtenida de NCBI bajo el número de acceso de secuencia KC537592) y también en sedimentos del Río Tinto (García Moyano et al., 2007). Las secuencias relacionadas con el otro OTU de VA2, se detectaron únicamente en aguas y sedimentos de Río Tinto (Amaral Zettler et al., 2011). El tercero de estos OTUs de euryarqueas sin clasificar pertenece al sitio AS3 (también representa el 2% de las arqueas de ese punto) y es semejante a VA2-arch_f10, como puede comprobarse según su ubicación en el árbol filogenético de la Figura 5.5. Las secuencias con las que se relaciona este OTU del sitio AS3 son las mismas que el de VA2 y, por ende, han sido detectadas previamente de los mismos ambientes con características ácidas.

Los ocho OTUs de arqueas restantes pertenecen al orden Thermoplasmatales, dentro de la clase Thermoplasmata. Dos de estos, uno detectado en VA2 y otro en U2V, fueron clasificados por RDP sólo hasta el nivel de orden y ambos presentan una similitud del 99% con la misma secuencia de Thermoplasmatales sin cultivar y con otras que han sido detectadas en diversos ambientes con características ácida, tanto naturales como relacionadas con la explotación minera (Rowe et al., 2007; González Toril et al., 2011; Kato et al., 2011; Sanchez Andrea et al., 2011; Souza Egipsy et al., 2011; trabajo sin publicar, información obtenida de NCBI bajo el número de acceso de secuencia KC537629).

De la misma forma que ocurría para los OTUs de bacteria del RAS, varios de los OTUs de arqueas que han sido detectados en más de uno de los sitios analizados, y que no pudieron ser clasificados con más del 97% de confianza por el algoritmo de RDP, presentan altos porcentajes de similitud con secuencias detectadas en otros ambientes con características similares a las del Río Agrio, principalmente, la elevada acidez, naturales o producto de la actividad minera. Probablemente, estas secuencias pertenezcan a nuevas arqueas ubicuas de ambientes ácidos que aun no han sido cultivadas ni caracterizadas.

En AS3, se encontró que 2% de las secuencias de arqueas estaban afiliadas con 100% de confianza al género *Thermogymnomonas* y presentaban similitudes de alrededor del 96% con secuencias de arquea sin cultivar detectada en el drenaje ácido de una mina de pirita en China (trabajo sin publicar, información obtenida de NCBI bajo el número de acceso de secuencia KC537696), en drenajes ácidos de minas ricos en As (Volant et al., 2012) y en manantiales naturales ácidos en Japón (Kato et al., 2011).

Finalmente, los cinco OTUs restantes fueron clasificados como pertenecientes al género *Ferroplasma*. Estos OTUs representan entre el 94% y el 100%, de las secuencias de arqueas detectadas en los cuatro puntos del RAS y muestran muy altos porcentajes de similitud con secuencias de *Ferroplasma acidiphilum*. Esta arquea ha sido encontrada en muchos drenajes ácidos de minas y en pilas de biolixiviación en distintas partes del mundo y también en las aguas y sedimentos del Río Tinto (Xiao et al., 2008; Huang et al., 2011; García Moyano et al., 2012; trabajos sin publicar, información obtenida de NCBI bajo los números de acceso de secuencia KC537454 y KC852077). Dentro de este género, 5% de las secuencias de arqueas de CV se relacionaron con un 97% de similitud con una secuencia de arquea sin cultivar encontrada en el mismo drenaje ácido de mina de pirita en China (mencionada anteriormente, trabajos sin publicar, información obtenida de NCBI bajo los números de acceso de secuencia KC537453) y también con secuencias detectadas en el Río Tinto (García Moyano et al., 2012).

5.4. Estudio semicuantitativo empleando hibridaciones CARD-FISH de la biodiversidad de las aguas del Río Agrio Superior.

Con el fin de conocer en forma semicuantitativa la distribución de la diversidad procariota a lo largo del Río Agrio Superior y de cuantificar los microorganismos viables pertenecientes a diversos grupos taxonómicos, se realizaron hibridaciones *in situ* con las muestras de agua de los puntos estudiados. Debido a la baja biomasa presente en todas las muestras de agua tomadas a lo largo del río y a la existencia de material autofluorescente que dificultaba la visualización y los recuentos al microscopio de epifluorescencia, se utilizó para las hibridaciones *in situ* la variante catalizada CARD-FISH.

Basados en los datos obtenidos por secuenciación del gen ARNr 16S para los cuatro puntos del RAS, y en la disponibilidad de sondas que pudieran ser utilizadas para CARD-FISH, se realizaron las hibridaciones utilizando las sondas para los dominios Bacteria y Archaea, las clases Alfaproteobacteria, Betaproteobacteria y Gammaproteobacteria y la clase Nitrospira. Por el mismo motivo indicado más arriba, es decir, las dificultades con las hibridaciones y los recuentos provocados por la baja biomasa y el material particulado autofluorescente que dificultaba la visualización de las muestras, los recuentos con la tinción DAPI y las hibridaciones realizadas con las sondas EUB (I+II+III) no se utilizaron en el análisis. Los porcentajes de hibridación se calcularon dividiendo los recuentos de cada sonda específica por la suma de los recuentos de todas las sondas utilizadas, tal cual se ha descrito en la Sección 3.8.1 de Materiales y Métodos.

Para evaluar la posible interferencia de hibridación inespecífica se utilizó la sonda NON338. Los resultados en las nueve muestras fueron negativos, por lo que se descartó la incidencia de hibridaciones inespecíficas en los recuentos.

La Tabla 5.8 resume los resultados obtenidos en los recuentos hechos al microscopio de epifluorescencia. Las abreviaturas de los nombres de las sondas son las mismas que se utilizan en todo el trabajo y que se especifican en la Tabla 3.3 de la Sección 3.8 de Materiales y Métodos.

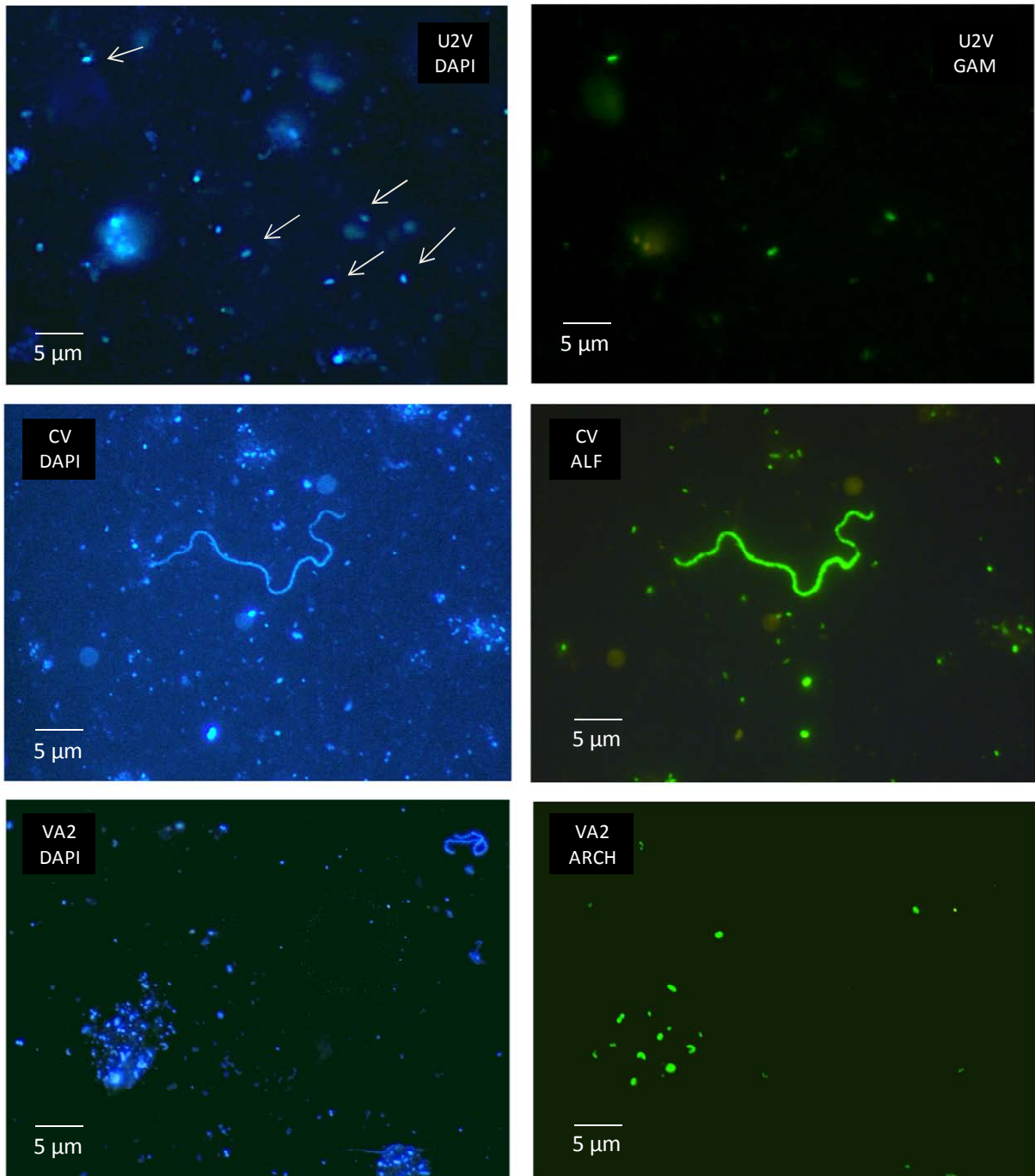
Tabla 5.8. Resultados de las hibridaciones CARD-FISH para las muestras de aguas fijadas *in situ* de los puntos de Río Agrio Superior. La primera columna muestra la concentración de células procariotas. Las siguientes columnas muestran los porcentajes de hibridación con las sondas utilizadas.

	Células/mL^a	% ALF	% BET	% GAM	% NTR	% ARCH
VA2	1,65x10 ⁶	23,82	<< 1	30,60	5,33	40,25
U2V	2,04x10 ⁶	30,64	<< 1	24,36	4,71	40,28
AS3	3,32x10 ⁶	35,09	12,38	30,35	1,89	52,89
CV	2,90x10 ⁶	23,49	4,70	16,99	<< 1	54,82

^a calculado como la suma de los recuentos de las hibridaciones de todas las sondas utilizadas y referido al volumen de muestra fijado

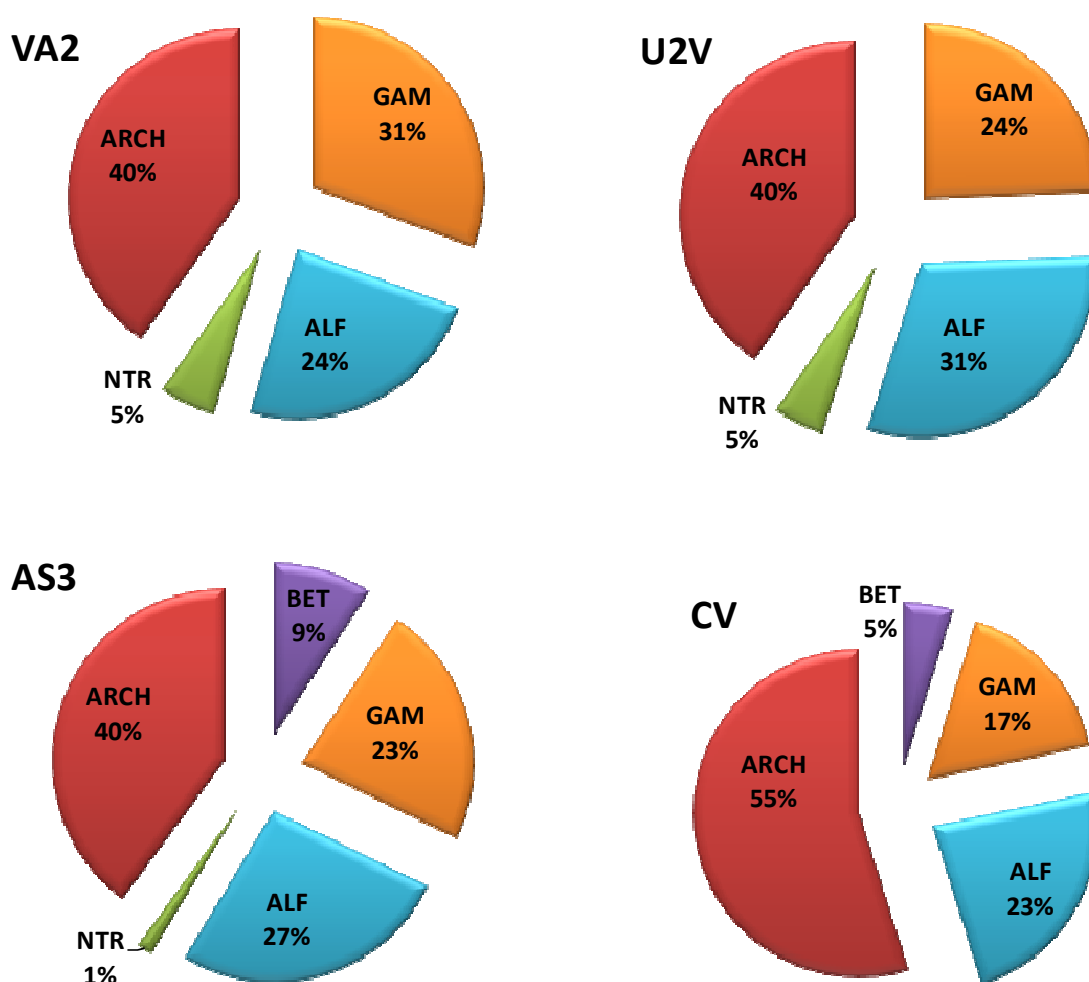
La concentración celular parece mantenerse aproximadamente constante a lo largo de todo el RAS. Estos valores numéricos confirman que, efectivamente, la biomasa de células planctónicas en el Río Agrio Superior es baja. Esto concuerda con las imágenes de epifluorescencia que se exhiben en la Figura 5.6. En particular, la primera serie de imágenes refleja la dificultad que mostraron la mayor parte de las hibridaciones realizadas en las muestras del Río Agrio a la hora de hacer los recuentos al microscopio. Si bien la técnica de CARD-FISH permitió mejorar las hibridaciones, las tinciones con DAPI resultaron muy difíciles de cuantificar, y por este motivo finalmente se descartaron para calcular la concentración total de microorganismos en las aguas.

Figura 5.6 Imágenes de epifluorescencia de muestras de agua de los puntos U2V, CV y VA2 fijadas *in situ* e hibridadas utilizando la técnica CARD-FISH



Para facilitar la visualización y la comparación de los resultados de las hibridaciones con las sondas de los distintos grupos taxonómicos que se muestran en la Tabla 5.8, se construyó la Figura 5.7, donde se muestran los porcentajes de hibridación con las distintas sondas en los puntos del RAS expresados en la forma de gráficos circulares.

Figura 5.7 Gráficos circulares que representan los porcentajes de hibridación obtenidos en los puntos del Río Agrio Superior. Los porcentajes fueron calculados como se indica en el texto y se detalla en la Sección 3.8 de Materiales y Métodos.



En términos generales, y según los resultados de las hibridaciones realizadas, la distribución de microorganismos es muy similar en todos los puntos del Río Agrio Superior estudiados. La mayor parte de los procariotas parece repartirse entre arqueas y miembros de las clases Alpha- y Gammaproteobacteria. Las proporciones de especies viables de estos grupos, detectadas con las sondas utilizadas, parecen mantenerse aproximadamente constantes en todo el curso del RAS. Las especies viables del grupo *Nitrospira* se detectaron en muy baja proporción en la parte superior del RAS y desaparecen río abajo. Por el contrario, las especies de la clase Betaproteobacteria parecen no estar presentes en la primera parte del RAS (sitios de muestreo VA2 y U2V) aunque fueron detectadas, en porcentajes que no superan el 9%, en el tramo inferior del RAS.

En un análisis de hibridación por CARD-FISH realizado sobre los restantes puntos del Río Agrio (que no se incluyeron finalmente dentro de esta tesis) se confirmaron las tendencias descritas para los puntos del RAS; una alta proporción de arqueas, seguido de Alpha- y Gammaproteobacteria y aumento de las Betaproteobacteria en los puntos inferiores del río.

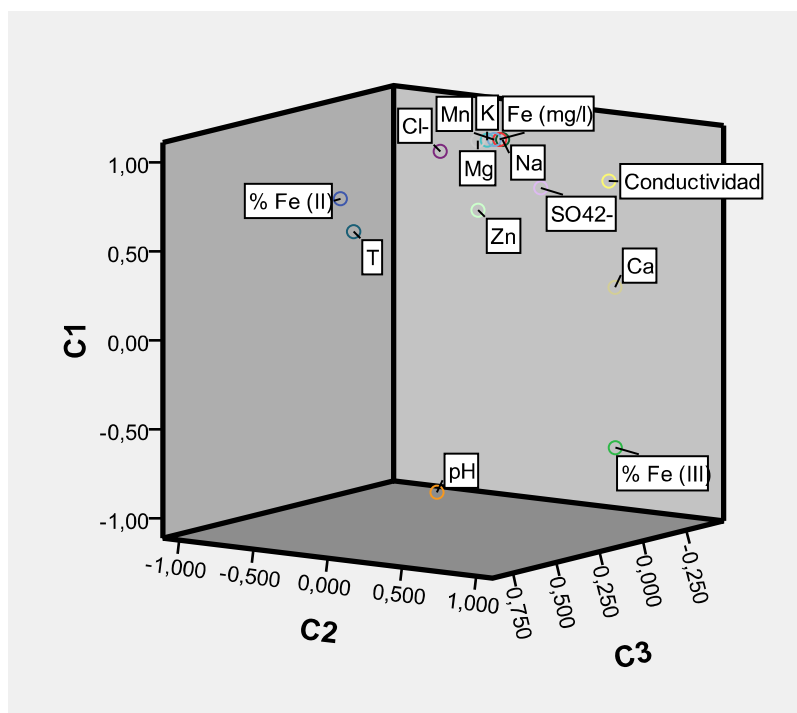
Debido a la baja concentración celular detectada en todos los puntos y a la complicación adicional que implica el uso de la técnica de hibridación CARD-FISH, no se realizaron hibridaciones con sondas específicas para otros grupos taxonómicos de bacterias o arqueas.

5.5. Análisis estadístico de los datos fisicoquímicos y de diversidad en las aguas del Río Agrio Superior

Con el fin de evaluar las relaciones que pudieran existir entre los parámetros fisicoquímicos medidos en los cuatro puntos estudiados del RAS y los datos biológicos obtenidos mediante CARD-FISH y secuenciación del gen ARNr 16S, se realizaron una serie de análisis estadísticos utilizando dos métodos diferentes: análisis de componentes principales (ACP) y análisis canónicos de correspondencia (ACC).

Para conocer las relaciones entre los parámetros fisicoquímicos medidos (Tabla 5.2) y determinar cuáles eran los más relevantes para el sistema del Río Agrio Superior se realizó un ACP que se muestra en la Figura 5.8. Los tres componentes representados gráficamente permiten explicar el 100% de la varianza del sistema. Este análisis muestra que el comportamiento de la mayoría de los aniones y cationes está correlacionado positivamente, y, como es esperable, es similar al de la conductividad. A su vez, estos parámetros parecen tener una correlación negativa, respecto de los componentes principales, con el pH. Por otro lado, el pH se correlaciona positivamente con el porcentaje de Fe(III) y negativamente con el de Fe(II).

Figura 5.8 Análisis de componentes principales de los parámetros fisicoquímicos medidos en las aguas del Río Agrío Superior.

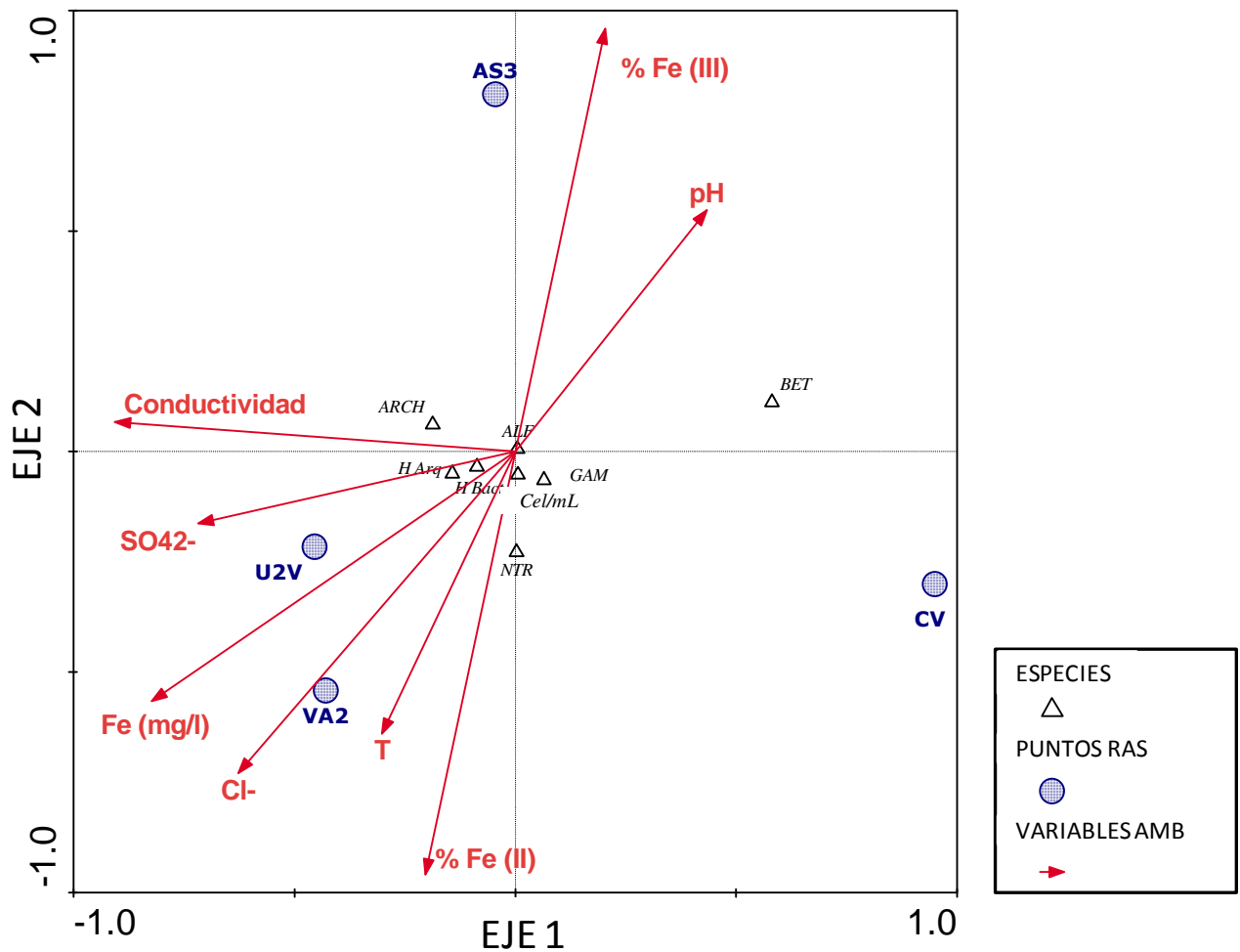


En base a los resultados de este ACP, se decidió utilizar como variables explicativas (de ahora en más, variables ambientales) para los análisis canónicos de correspondencia, los parámetros fisicoquímicos que mostraron algún comportamiento diferencial: temperatura, pH, conductividad, concentración de Fe total (por presentar la mayor concentración de todos los metales determinados y ser el de mayor relevancia microbiológica en un sistema como el del Río Agrío), porcentajes de Fe(II) y Fe(III) y las concentraciones de los aniones cloruro y sulfato (por presentar valores llamativamente elevados).

En el ACC de la Figura 5.9 se grafican algunos de los datos biológicos numéricos obtenidos en función de las mencionadas variables ambientales. Según la nomenclatura del programa, se consideraron especies (representadas en los gráficos por triángulos) a los valores del índice de Shannon para las bibliotecas de bacterias y arqueas (simbolizadas como H Bact y H Arq respectivamente), a los recuentos celulares y a los porcentajes de hibridaciones CARD-FISH con todas las sondas utilizadas. En el ACC de la Figura 5.10, se consideró como especies la ausencia o presencia de los OTUs de bacterias y arqueas de los cuatro puntos. Tal cual se explicó en la Sección 3.9 de Materiales y Métodos, en este tipo de gráficos la intensidad de la

correlación entre las especies (representadas por triángulos) y las muestras (en este caso, los cuatro puntos estudiados del RAS representados por círculos azules) con las variables ambientales, se mide con la proyección perpendicular de estos puntos sobre las flechas rojas de dichas variables (mayor la longitud del segmento determinado por la intersección, mayor la correlación entre esa muestra o especie y la variable ambiental). La intensidad de la correlación entre especies y muestras se mide por la distancia lineal entre sus símbolos.

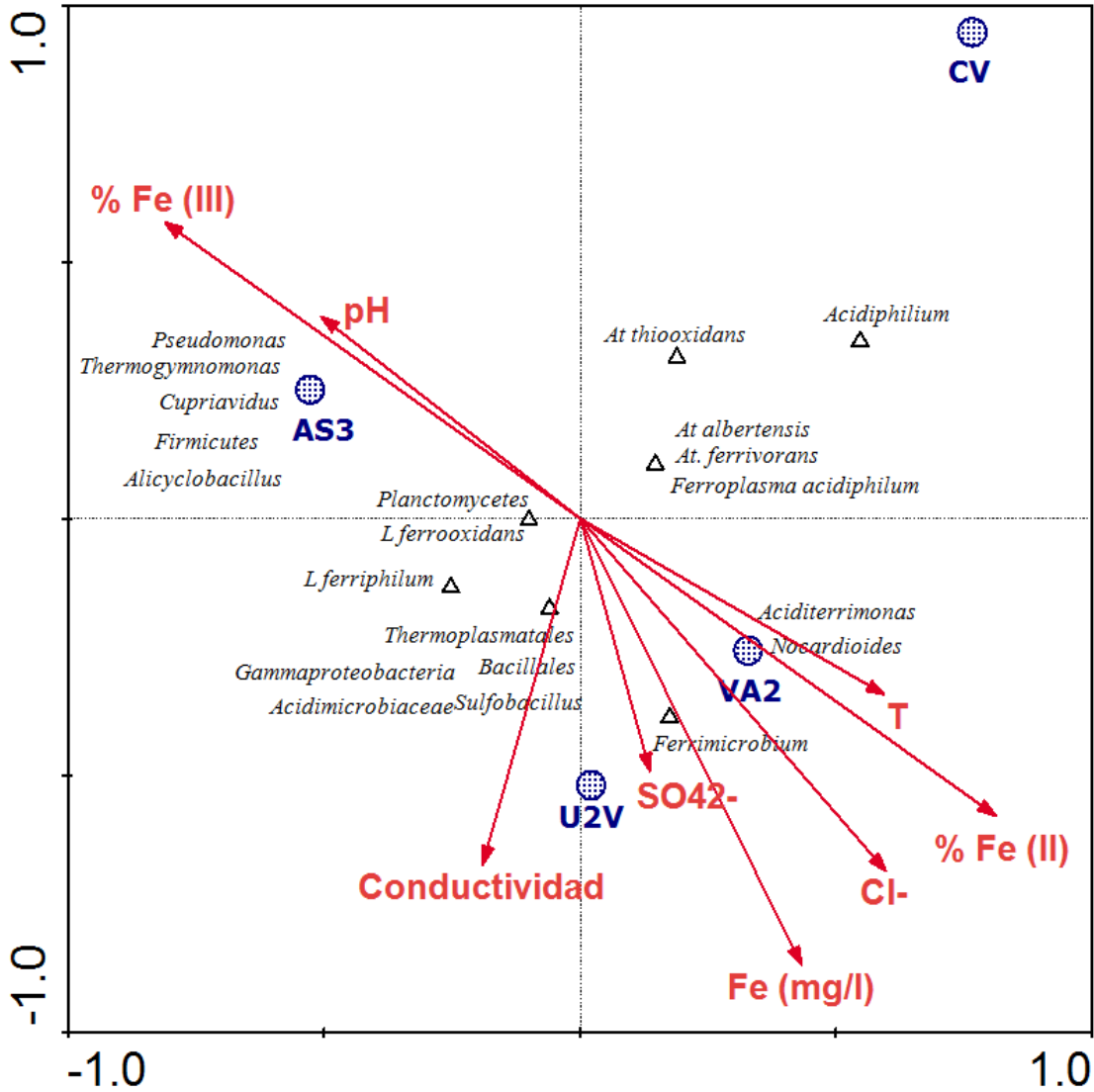
Figura 5.9 Análisis canónico de correspondencia (ACC) de los datos biológicos numéricos (índices de diversidad de Shannon para las bibliotecas de bacterias y arqueas (H Bact y H Arq, respectivamente), recuentos celulares y porcentajes de hibridación con las sondas utilizadas) con respecto a las variables ambientales más representativas del Río Agrio Superior.



El gráfico muestra que los datos biológicos (especies, representadas por los triángulos) no presentan una correlación marcada con los parámetros fisicoquímicos (variables ambientales, representadas por flechas rojas) ni muestran ningún tipo de distribución preferencial en los puntos del RAS. Los triángulos que representan las especies se encuentran agrupados en el centro del gráfico debido a que, independientemente de en qué punto se hayan medido y bajo qué condiciones ambientales, sus valores son muy similares en todos los casos. El símbolo que más se aleja del origen de los ejes es el que representa el porcentaje de hibridación con la sonda específica para Betaproteobacteria (BET). Esto se debe a que, de los cuatro puntos del RAS que se analizaron en este ACC, se detectó hibridación con esta sonda sólo en dos, AS3 y CV, tal cual se muestra en la Tabla 5.8 y en la Figura 5.7. La correlación negativa de BET con las variables ambientales como temperatura, conductividad, concentración de aniones y Fe y la correlación positiva con el aumento de pH, resalta que las especies de la clase Betaproteobacteria aparecen en el RAS cuando las condiciones ambientales se tornan menos extremas.

De igual modo, tampoco se observa una distribución marcada de los sitios del RAS respecto de las variables ambientales y su posición en el gráfico parece estar principalmente influida por la dilución que se da a medida que el RAS desciende por la ladera del volcán Copahue y por la diferencia en los porcentajes de Fe(II) y Fe(III) de cada punto muestreado. El punto a AS3, a diferencia de los otros, presenta una fuerte correlación positiva con el eje 2 debido a la combinación de la correlación positiva con el porcentaje de Fe(III) (y por ende negativa con el porcentaje de Fe(II)) y la correlación negativa con el aumento de temperatura. El punto CV aparece alejado de los otros por su menor correlación con la conductividad. Ambos puntos se correlacionan positivamente con el aumento de pH y negativamente con el aumento de la concentración de Fe. La relación de los puntos con las variables ambientales en el ACC de la Figura 5.9 muestra como a medida que el RAS baja por la ladera del volcán Copahue sufre una dilución y las condiciones fisicoquímicas de sus aguas se tornan menos extremas.

Figura 5.10 Análisis canónico de correspondencia (ACC) entre la ausencia/presencia de los OTUs de bacterias y arqueas con respecto a las variables ambientales más representativas del Río Agrio Superior.



El gráfico de la Figura 5.10 permite destacar algunos agrupamientos entre los diferentes OTUs de bacterias y arqueas encontrados en los cuatro puntos del RAS y las condiciones ambientales de los mismos.

Este análisis muestra como los puntos VA2 y U2V, muy cercanos en el recorrido del RAS y con características ambientales similares, se correlacionan positivamente con las concentraciones de aniones, Fe y la conductividad y negativamente con el pH y porcentaje de Fe (III). AS3 se ubica en el cuadrante opuesto en el gráfico debido a que presenta la mayor

correlación positiva de las cuatro muestras con el porcentaje de Fe(III), mientras que los otros puntos tienen correlación positiva con el porcentaje de Fe(II). Tal cual se describió para el ACC de la Figura 5.9, el punto CV se aparta de esta distribución, probablemente debido a que presenta valores de conductividad y de concentración de Fe total marcadamente menores que los otros puntos (Tabla 5.2).

Los símbolos de VA2, U2V y AS3 se encuentran aproximadamente a la misma distancia de los mismos OTUs (lo que indica la misma intensidad de correlación). La única diferencia la generan los cinco OTUs que se encuentran a la izquierda del círculo azul que representa a AS3, y cuyos triángulos caen por debajo de este ya que sólo fueron encontrados en este punto. Los OTUs con los que se correlaciona CV también lo hacen con las otras muestras lo que indica que en este sitio no aparecen especies nuevas.

Es importante destacar que en el análisis estadístico multivariable realizado las tres especies de *Acidithiobacillus* detectadas en el RAS, *Ferroplasma* y *Acidiphilum* se agrupan en el mismo cuadrante, lo que indica que presentan correlaciones similares con las variables ambientales. Además, estos OTUs se encuentran a una distancia equivalente de los cuatro puntos estudiados, indicando que también presentan una correlación similar con ellos. Por el contrario, otros OTUs, como los de *Leptospirillum*, *Planctomyces* o *Thermoplasmatales*, se ubican en el cuadrante opuesto, mostrando una correlación diferente con las variables ambientales, y alejados del punto CV donde no fueron encontrados.

Los valores de correlación entre especies y variables, los valores propios (eigenvalues) y los coeficientes P del test de Monte Carlo para ambos ejes en los dos ACC construidos, no fueron demasiado buenos señalando que entre las especies (datos biológicos numéricos tanto como OTUs), muestras y variables ambientales de los cuatro puntos estudiados del RAS no hay una correlación altamente significativa.

5.6. Discusión

5.6.1. Influencia de las características fisicoquímicas del ambiente en la biodiversidad del Río Agrio.

El Río Agrio es un curso de agua de características ácidas debido a su origen volcánico geotermal; a partir de dos vertientes muy cercanas al cráter del volcán Copahue (VA1 y VA2) que aportan descargas de H_2SO_4 , HCl y HF (Gammons et al., 2005). El pH en las vertientes presenta un valor de 1 (habiéndose registrado incluso valores menores en otras campañas) y aumenta hasta 2 a medida que el RAS desciende por la montaña. En el Salto del Agrio, aproximadamente a 20 Km de la naciente, y luego de haber recibido la influencia de varios cursos tributarios de naturaleza menos ácida como el Río Blanco y el Río Rojo, el pH alcanza un valor de 3,6. Las aguas del río presentan alto contenido de metales en solución, principalmente Fe, y muy alta concentración de aniones como cloruros y sulfatos. En el origen del RAS la temperatura es más alta (aunque bastante menor que la que había sido detectada en otros muestreos) que en el resto de río debido a la influencia de las vertientes geotermales. A medida que el RAS desciende por la ladera del volcán Copahue, recibe aguas de deshielo (en la zona cerca de los puntos de recolección de muestra que hemos denominado AS1, AS2 y AS3) por lo que la temperatura de las aguas disminuye; posteriormente registra un ligero ascenso en la zona de las cascadas, antes de la desembocadura del RAS en el Lago Caviahue.

Analizando estudios hidrogeoquímicos que se han realizado sobre el Río Agrio (Gammons et al., 2005) y también los valores de pH, concentraciones de metales y aniones expresados en la Tabla 5.1, se puede concluir que a medida que desciende por la ladera del volcán Copahue, el RAS sufre una dilución progresiva, que se hace aún más drástica al desembocar en el Lago Caviahue. Al comparar las conductividades medidas en los distintos puntos del RAS y del Lago Caviahue, se observa una significativa dilución del RAS al entrar al lago. Este comportamiento también fue registrado por otros autores que realizaron diversos estudios en la zona (Pedrozo et al., 2008; Varekamp, 2008).

A pesar de este defecto de dilución, el pH de las aguas del Río Agrio se mantiene ácido incluso a muchos Km de distancia del origen geotermal y luego de haber recibido un gran volumen de aguas de deshielo. En el caso del Río Tinto en España, el pH de sus aguas se conserva ácido en todo su recorrido debido a que la gran cantidad de Fe(III) presente forma un

sistema buffer que permite mantener estas condiciones. Como ya mencionamos, en el Río Agrio la concentración de Fe es comparativamente muy baja y el caudal demasiado alto, como para que el principal mecanismo de mantenimiento de la acidez sea el mismo que en el Río Tinto. Posiblemente, esa condición de pH ácido se mantenga gracias a la actividad de microorganismos oxidantes del azufre sobre los compuestos reducidos del azufre que provienen de la actividad volcánica de la región.

En nuestro estudio de la biodiversidad en el RAS no encontramos una correspondencia apreciable entre las especies identificadas y las características fisicoquímicas de los puntos en los que fueron encontrados. Esta hipótesis fue reforzada por el resultado de los análisis canónicos de correspondencia realizados con programas especializados en bioestadística. El ACC de la Figura 5.9 no mostró una buena correlación entre los datos biológicos numéricos medidos y la variación en los parámetros ambientales. Esto es consistente con valores de porcentajes de hibridación con las distintas sondas ensayadas, recuentos celulares e índices de Shannon similares para todos los puntos analizados.

Si bien se encontraron prácticamente los mismos OTUs en los cuatro puntos analizados, el ACC de la Figura 5.10 muestra algún agrupamiento preferencial de ciertos OTUs de bacterias y arqueas con las variables ambientales. Tal cual se mencionó más arriba, los OTUs de *Acidithiobacillus*, *Acidiphilum* y *Ferroplasma* se correlacionan de la misma manera con las variables ambientales. Así, el agrupamiento de los OTUs pareciera indicar que las condiciones ambientales que se dan en el RAS determina un hábitat apropiado para el desarrollo de estas especies que se encuentran presentes en los cuatro puntos estudiados. Otras especies importantes en el RAS, como *Leptospirillum*, *Sulfobacillus* o Thermoplasmatales, parecen correlacionarse de manera diferente con las variables ambientales y establecerse en los primeros tramos del RAS pero no en la zona cercana al punto CV.

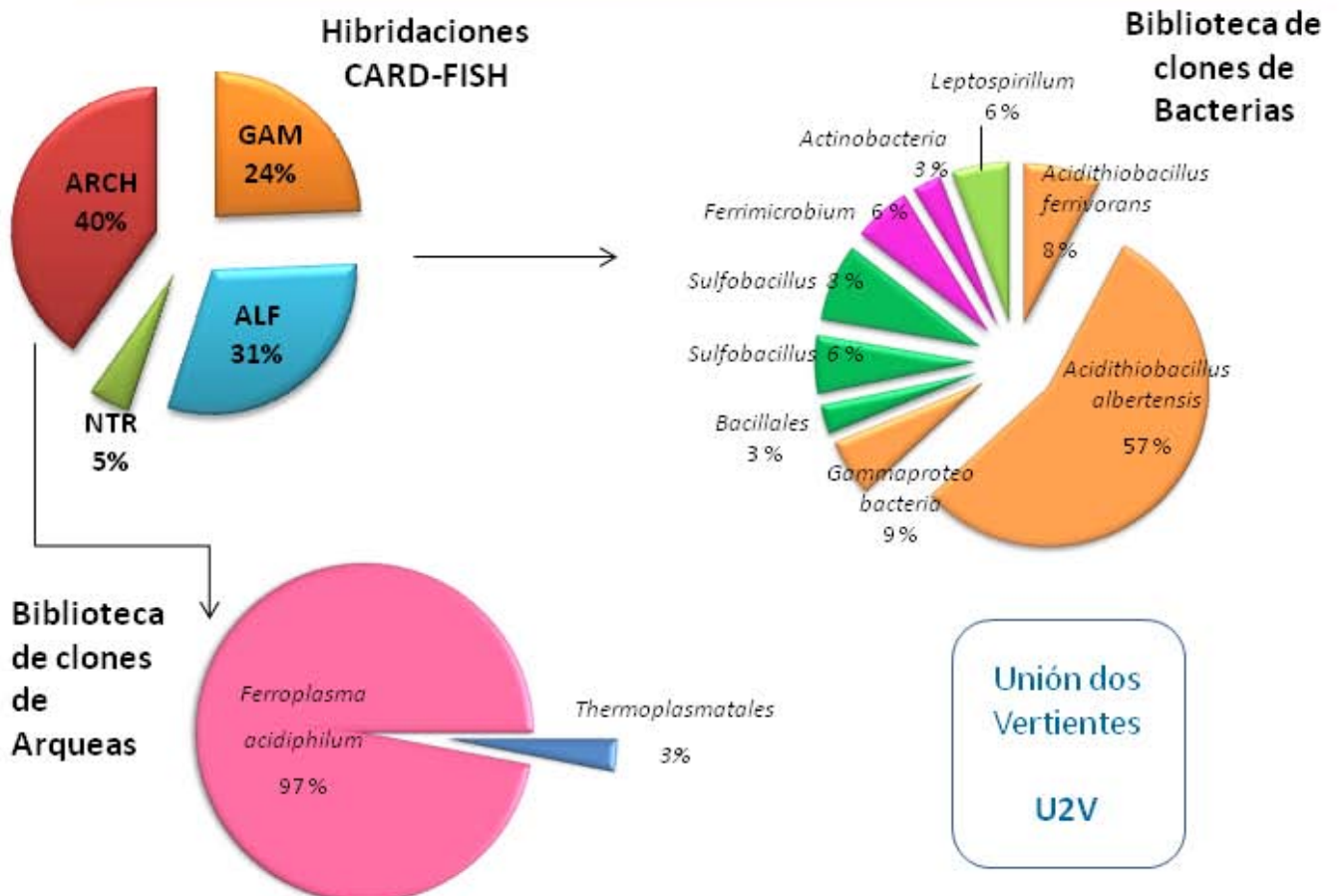
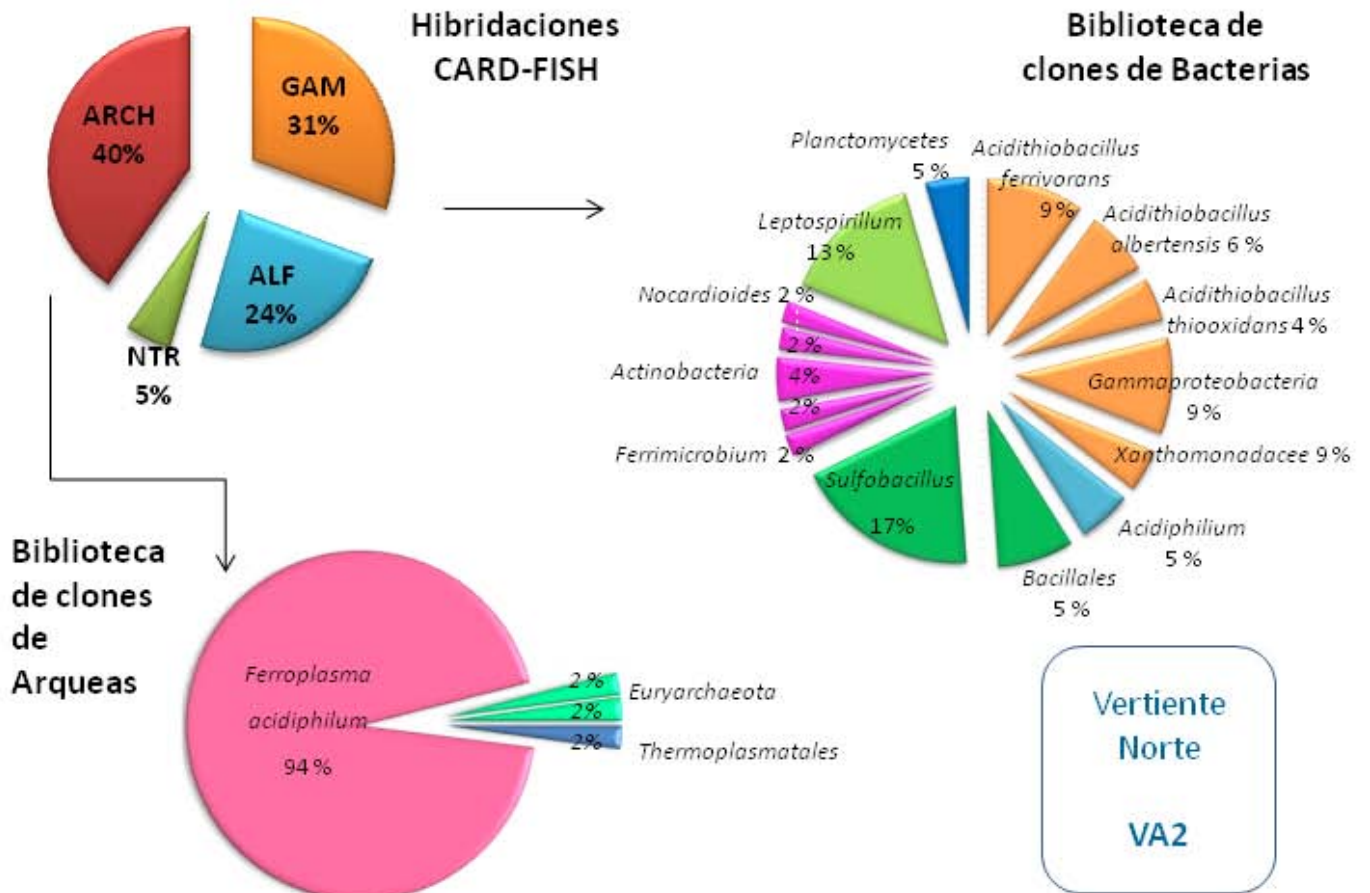
A pesar del origen geotermal del Río Agrio, las temperaturas registradas en esta campaña de muestreo y a lo largo del curso del RAS fueron moderadas, aún en el punto VA2 cerca de unas de las nacientes. Las especies encontradas en dichos puntos se desarrollan a temperaturas moderadas (algunos son psicrotolerantes, como *A. ferrivorans*, capaz de crecer a temperaturas tan bajas como 4°C (Hallberg et al., 2010)) y son colonizadores habituales de ambientes ácidos mesófilos. En el RAS no se encontraron secuencias del filo Crenarchaeota, caracterizado por especies adaptadas para crecer en condiciones más extremas de temperatura y que son las especies dominantes de las comunidades de arqueas de los pozos de Copahue (Sección 4 de este trabajo de tesis). En el RAS se detectaron únicamente secuencias de arqueas pertenecientes al

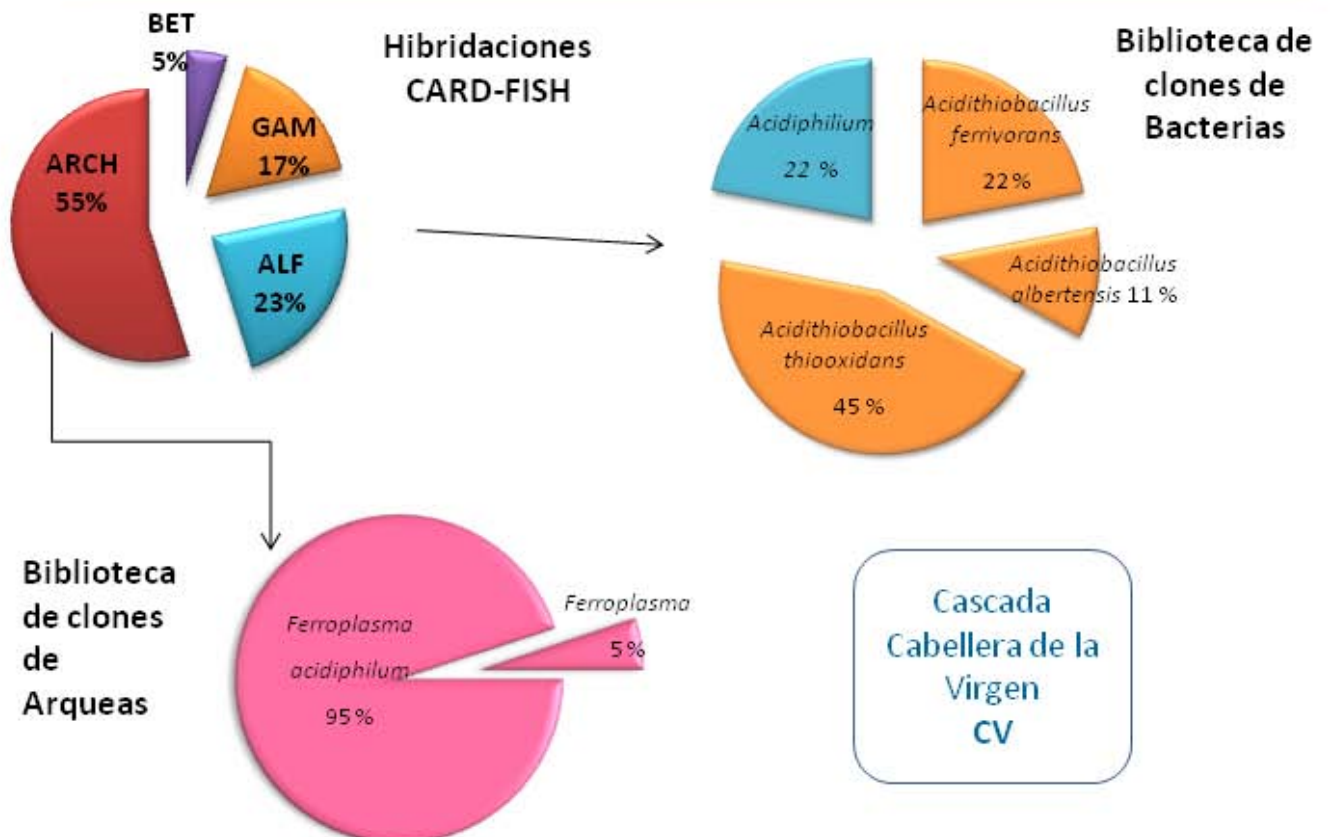
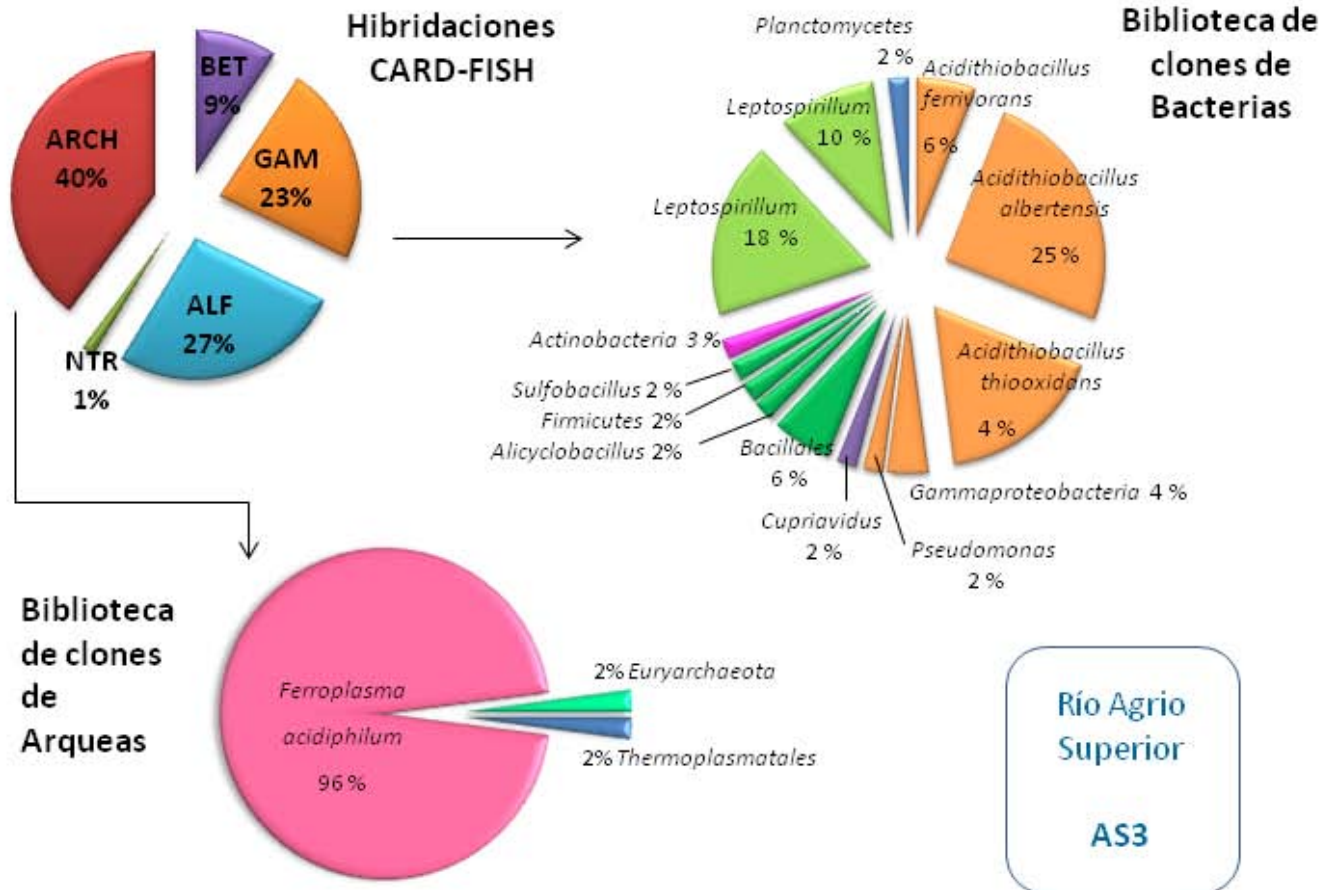
filo Euryarchaeota, que presenta especies menos resistentes a altas temperaturas. La gran mayoría de arqueas detectadas en los cuatro pozos se relacionaron con *Ferroplasma acidiphilum*; una especie descrita por Golyshina y colaboradores (2000) como una arquea mesofila, acidófila y oxidante de Fe y de pirita y que fuera aislada de una planta piloto de biolixiviación.

5.6.2. Diversidad procariota en las aguas del Río Agrio Superior

Uno de los objetivos de este trabajo es comparar los resultados obtenidos con las dos técnicas cultivo independiente utilizadas para el estudio de la biodiversidad procariota (hibridaciones CARD-FISH y abundancia de OTUs). Para tal fin se construyó la Figura 5.11, que muestra una recopilación de los resultados obtenidos mediante estas dos técnicas de biología molecular cultivo independiente para las aguas de los cuatro puntos del RAS estudiados. Las bibliotecas de clones del gen ARNr 16S de bacterias y arqueas se muestran en gráficos circulares que representan la abundancia de los OTUs respectivos. Para dar identidad a estos OTUs, se utilizó el nivel más específico de la clasificación taxonómica que pudo alcanzarse (>97% de confianza) con la herramienta Classifier de RDP. Para los OTUs de bacteria los diferentes colores indican filos o clases filogenéticas, manteniendo los mismos colores que para las sondas de clases utilizadas en CARD-FISH. **Naranja:** *Gammaproteobacteria*, **Celeste:** *Alphaproteobacteria*, **Violeta:** *Betaproteobacteria*, **Verde claro:** *Nitrospira*, **Verde brillante:** *Firmicutes*, **Rosa:** *Actinobacteria*, **Azul:** *Planctomycetes*. En el caso de los OTUs de arqueas se muestran en distintos colores los niveles taxonómicos más específicos que pudieron alcanzarse según la misma herramienta de clasificación (>97% de confianza).

Figura 5.11 Representación gráfica que condensa la información obtenida mediante hibridaciones CARD-FISH y secuenciación del gen ARNr 16S de bacterias y arqueas para los cuatro puntos del Río Agrio Superior estudiados con mayor profundidad.





La diversidad microbiana del Río Agrio está compuesta por un número relativamente bajo de especies. Las arqueas y bacterias detectadas en los cuatro puntos corresponden a microorganismos capaces de desarrollarse en las condiciones ambientales del RAS (pH bajo, alta conductividad y alta concentración de sulfato). Muchas de estas especies, como las de los géneros *Acidithiobacillus*, *Leptospirillum*, *Acidiphilum*, *Sulfobacillus* y *Ferroplasma* han sido detectadas, aisladas y cultivadas a partir de muestras de ambientes con condiciones similares, como el Río Tinto (González Toril et al., 2003) y ambientes ácidos productos de la actividad minera (Johnson y Hallberg, 2003), particularmente donde, una vez finalizada la explotación, se ha producido el abandono de las minas o su cierre de modo inadecuado (Mendez et al., 2008; Tan et al., 2009). A pesar de esto, la alta abundancia de especies del género *Ferroplasma*, aun mayor que la de otros oxidantes del hierro o del azufre, no había sido reportada antes para ambientes ácidos de las características del RAS y resulta realmente llamativa e interesante.

Los ríos de naturaleza ácida como el Río Agrio, son un tipo de ambiente extremo muy poco común y, a excepción del Río Tinto en Huelva, España, que ha sido estudiado exhaustivamente, existen muy pocos reportes de biodiversidad en este tipo de ambientes. Una de las razones es que estos sitios no son abundantes ni frecuentes pero, además, en algunos casos como en el del Río Agrio y la zona de Copahue-Caviahue, los muestreos están limitados a pocas semanas durante el verano debido a las dificultades para el acceso en otras épocas del año.

Por el contrario, existen numerosos estudios realizados sobre la biodiversidad de diferentes minas y sus drenajes ácidos, tanto utilizando técnicas de cultivo, como cultivo independiente. Esta podría ser una de las razones por las cuales existen muchas más especies reportadas en hábitats relacionados con la actividad minera que en ambientes naturales extremos como el que representa Copahue.

La Figura 5.11 muestra como las comunidades procariotas planctónicas mantienen su estructura y diversidad a lo largo del RAS. Los análisis canónicos de correspondencia (Figuras 5.9 y 5.10) indican que no hay ninguna correlación preponderante entre los parámetros fisicoquímicos de cada punto y la distribución de las especies.

En primera instancia, encontramos que la concentración de microorganismos es aproximadamente la misma a lo largo de todo el Río Agrio ($2,5 \times 10^6$ células/mL). Esta concentración, aunque baja, es semejante a la encontrada en las aguas del Río Tinto utilizando una técnica similar (González Toril et al., 2003) y mayor a la reportada para algunos drenajes ácidos de minas (Edwards et al., 1999).

De acuerdo a los recuentos realizados a partir de las hibridaciones CARD-FISH, la mayoría

de los procariotas se reparten entre arqueas, alfas y gammaproteobacterias. Si consideramos las especies detectadas por clonación y secuenciación del gen ARNr 16S, las principales bacterias detectadas pertenecen a los géneros *Acidithiobacillus*, *Acidiphilum*, *Leptospirillum* y *Sulfobacillus* y, en menor medida, al filo *Actinobacterias*. Dentro de las arqueas, el género *Ferroplasma* es ampliamente dominante. Aun conociendo estas tendencias generales, vale la pena discutir con algo más de profundidad algunos aspectos de la diversidad encontrada en cada punto.

VA2 y U2V poseen comunidades procariotas muy similares. Si bien los dos puntos presentan diferencia en las temperaturas de sus aguas (en VA2 se registraron 29°C, mientras que en U2V, algunos metros corriente abajo, se registraron 9°C), ésta no parece influir en los microorganismos que se encuentran en ambos sitios, aunque es importante señalarse que ambas temperaturas son adecuadas para el desarrollo de muchos procariotas mesófilos, tales como los detectados a lo largo el RAS. Según los resultados de las hibridaciones CARD-FISH con las sondas utilizadas, ambos puntos presentan prácticamente la misma distribución de los microorganismos. En ambos sitios se detectó un porcentaje similar de clones de bacteria que fueron clasificadas únicamente como Gammaproteobacterias y mostraron similitudes con una secuencia de bacteria sin cultivar reportada en el drenaje ácido de la mina Tong Ling de pirita en China (sin publicar). La reiterada presencia de secuencias de este tipo, que no pueden ser clasificadas con mayor precisión dentro de los grupos taxonómicos establecidos pero que se asemejan a secuencias reportadas muy similares en ambientes ácidos, sugiere que se trata de nuevas especies ubicuas, adaptadas al desarrollo en condiciones de elevada acidez en cualquier lugar del mundo, y que aún no se ha podido aislar ni caracterizar.

La hibridación con la sonda ALF reveló que, aproximadamente, un cuarto de los microorganismos viables de estos dos primeros puntos del RAS pertenecen a la clase Alphaproteobacteria. En la biblioteca de clones de bacteria de VA2 todas las secuencias de esta clase encontradas presentaron alta similitud con secuencias del género *Acidiphilium* previamente detectadas en el Río Tinto. Es esperable encontrar especies de este género en ambientes ácidos donde haya también presentes especies quimiolitioautótrofas obligadas de oxidantes del Fe y/o del S tales como *Acidithiobacillus* o *Leptospirillum* (Schippers, 2007). Las especies del género *Acidiphilium* son heterótrofas y consumen los sustratos orgánicos que puedan acumularse en el medio y que resultan tóxicos para los autótrofos (Johnson, 1995). En la biblioteca de clones de U2V no se encontraron especies afiliadas a la clase Alphaproteobacteria.

Los dos primeros puntos del RAS también presentan un porcentaje similar de sus bibliotecas

de clones de bacterias representados por especies de los filos Firmicutes y Actinobacteria. Dentro del primero, la mayoría de las especies pertenecen al género *Sulfobacillus*. De acuerdo a lo reportado por Bond y colaboradores (2000), estos microorganismos suelen constituir entre 6 y 8% de las comunidades microbianas que habitan los drenajes ácidos de minas, que es similar a lo detectado en el RAS. Para el segundo, en la familia Acidimicrobiaceae se detectaron secuencias que presentan 99% de similitud con una secuencia de bacteria sin cultivar detectada en un drenaje ácido de roca en una zona rica en Fe en la Antártida (Dold et al., 2013). Nuevamente aquí nos encontramos con especies que no presentan una clasificación taxonómica definida, pero que se encuentran en ambientes con características ácidas similares. Las especies del orden Acidimicrobiales, dentro del cual se encuentran la mayoría de las actinobacterias del RAS son, también, un componente frecuente de las comunidades de bacterias detectadas en los drenajes ácidos de minas (Bond et al., 2001; Bond et al., 2000).

La diversidad de estos dos puntos se completa con la detección de 5% de hibridación con la sonda NTR (específica para el grupo Nitrospira) y de secuencias que presentan 99% de similitud con *L. ferrooxidans* y *L. ferriphilum*. Bond reportó en sus estudios de los años 2000 y 2001 sobre diversidad de diferentes drenajes ácidos de minas que *L. ferrooxidans* es la especie más importante del grupo Nitrospira encontrada en estos ambientes. En VA2, donde el valor de pH es 1, las especies de este género se ven metabólicamente favorecidas para la oxidación de Fe respecto de las del género *Acidithiobacillus*, cuyas rutas para esta actividad metabólica se encuentran inhibidas a valores de pH inferiores a 1,3 (Schippers et al., 2007). Aun así, las especies del género *Acidithiobacillus* parecen ser más abundantes que las de *Leptospirillum*, probablemente debido a que los compuestos de azufre (que pueden ser metabolizados por los primeros pero no por los segundos) son más abundantes en el RAS que el Fe(II) (única fuente de energía de *Leptospirillum*).

En el sitio AS3, la diversidad de bacterias es muy similar a la de los puntos río arriba indicando que son arrastradas por la corriente y que, pueden desarrollarse sin inconvenientes aún con la modificación de los parámetros fisicoquímicos que ha sufrido el río. Además, se suman algunas especies que no habían sido detectadas río arriba, que podrían provenir de los cursos de agua tributarios que llegan al RAS en esta zona. Entre estas, se destacan la aparición de especies de la clase Betaproteobacteria detectadas con las hibridaciones CARD-FISH, y representadas en la biblioteca de clones de bacterias por secuencias afiliadas al género *Cupriavidus*. Además, aparecen tres secuencias más no detectadas río arriba: una relacionada con *Pseudomonas*, otra clasificada como Firmicutes que presentan 99% de similitud con una

secuencia de bacteria sin cultivar también detectada en el drenaje ácido de la mina TongLing de pirita en China (sin publicar) y la tercera afiliada según RDP al género *Alicyclobacillus* pero que, según BLASTn, presenta solo un 93% de similitud con secuencias de este género. El OTU de este punto clasificado como perteneciente al filo Planctomycetes, que también fue detectado en VA2, es otro ejemplo de las secuencias pobremente clasificadas según la taxonomía actual pero que presentan muy alta similitud con secuencias encontradas en o ambientes con características similares a las del RAS.

En AS3, se detectó una disminución en el porcentaje de microorganismos que hibridaron con la sonda NTR. Según los resultados de la secuenciación del gen ARNr 16S, las únicas especies del filo Nitrospira encontradas, pertenecen al género *Leptospirillum*; este género está compuesto por microorganismos mesófilos, quimiolitotótrofos obligados que obtienen energía sólo de la oxidación de Fe(II). Es probable que la disminución en la cantidad de *Leptospirillum* esté vinculada con la disminución de la concentración de Fe que sufre el RAS a esta altura de su curso.

En CV se registró una importante disminución de la diversidad microbiana respecto de los otros tres puntos del RAS; de todos modos, las especies que se encuentran en este punto son las mismas que ya se habían detectado río arriba. En las hibridaciones CARD-FISH, se registra un aumento en el porcentaje de arqueas, una disminución en los porcentajes de los otros grupos taxonómicos y la desaparición de la señal de la sonda NTR. A nivel de secuencias del gen ARNr 16S, únicamente se detectaron secuencias afiliadas al género *Acidithiobacillus* (correspondientes a las tres especies ya encontradas río arriba: *At. ferrivorans*, *At. albertensis* y *At. thiooxidans*) que comprenden el 78% de la biblioteca de clones de bacterias y al género *Acidiphilum* que corresponden al 22% restante. Este último porcentaje es similar al detectado por CARD-FISH con la sonda ALF. Tal cual se discutió más arriba, CV presenta condiciones ambientales menos extremas; en particular, el valor de pH de 2 que se alcanza en este punto es cercano al pH óptimo de crecimiento de las especies de *Acidithiobacillus* y *Acidiphilum* encontradas, lo que parece favorecer el establecimiento de estos miembros de la comunidad en este punto del RAS.

En CV no se detectaron secuencias de la clase Betaproteobacteria que pudieran ser adjudicadas al 5% de microorganismos de esta clase que hibridaron con la sonda BET. En la Tabla 5.3 puede constatarse que la cobertura de la diversidad de bacterias de CV por la biblioteca construida es del 89%, por lo que puede que las betaproteobacterias estén dentro de las especies que no fueron cubiertas por dicha biblioteca. La desaparición de la hibridación con la sonda NTR y de las secuencias de *Leptospirillum*, puede comprenderse al considerar la fuerte

caída de la concentración de Fe en las aguas de este punto (Tabla 5.2); esta condición seguramente favorezca el crecimiento de especies oxidantes de azufre, como las del género *Acidithiobacillus* frente a *Leptospirillum*. Además, debe considerarse que *At. ferrivorans* tiene la capacidad de desarrollarse a temperaturas más bajas (similares a las del final del curso del RAS) que las especies de *Leptospirillum* (Hallberg et al., 2010).

Tal cual sugiere la combinación de los resultados de hibridación CARD-FISH con la sonda ARC y secuenciación del gen ARNr 16S de arqueas, las especies del género *Ferroplasma*, con similitud entre el 97 y 99% con *Ferroplasma acidiphilum*, son dominantes en todos los puntos estudiados. Las arqueas representan entre el 40 y el 55% de los microorganismos detectados en el RAS por hibridaciones CARD-FISH. Las bibliotecas de clones de arqueas indican que entre el 94 y el 100% de las secuencias detectadas pertenecen al género *Ferroplasma*. Algunos resultados similares se encontraron en estudios realizados sobre las comunidades microbianas de diferentes ambiente ácidos. Por ejemplo, en el drenaje ácido de la mina Fankou de Pb y Zn en China, también se detectó por técnicas cultivo independiente que las arqueas asociadas a *F. acidiphilum* eran una parte importante de la comunidad procariota (Huang et al., 2011). Resultados similares se han reportado en varios estudios sobre ambientes de naturaleza ácida y temperatura moderada aunque con características geoquímicas diferentes; en ellos se ha encontrado que las arqueas del género *Ferroplasma* son dominantes (Golyshina y Timmis, 2005). Desde hace ya unos años se sabe que las arqueas del género *Ferroplasma* son microorganismos ubicuos en los ambientes ácidos y que cumplen un rol importante en el ciclo geoquímico del Fe y de los sulfuros metálicos en estos ambientes; la razón es que parecen estar mejor adaptados que las bacterias con características metabólicas similares, para desarrollarse a temperaturas moderadas o ligeramente altas (rango de temperatura de crecimiento 15 a 45°C, con una valor óptimo de 35°C (Golyshina et al., 2000)), bajos valores de pH y en presencia de altas concentraciones de Fe(II), Fe total y otros metales en solución, (Edwards et al., 2000). La diferencia entre lo reportado para estos ambientes y lo que ocurre en el RAS queda de manifiesto en esta conclusión tomada del trabajo de Edwards y colaboradores y que luego profundizaron Golyshina y Timmis en su trabajo de 2005; hasta el momento las especies del género *Ferroplasma* habían sido detectadas como dominantes sólo en los ambientes con las condiciones ya descritas; sin embargo, en el RAS estas condiciones se cumplen sólo parcialmente debido a que, si bien el valor de pH es suficientemente bajo, la temperatura es moderada en la vertiente y luego decrece rápidamente; por otro lado, las concentraciones de Fe son bastante bajas a lo largo de buena parte de su recorrido. De todos modos, *Ferroplasma* logra

ser el microorganismo dominante en el RAS. Actualmente, y fuera de los alcances de esta tesis, se está intentando el aislamiento y caracterización de esta especie de arqueas para estudiar con detalle sus particularidades metabólicas que le permiten ser dominante aún bajo estas condiciones.

De acuerdo a nuestros resultados, el efecto que parece primar en la construcción de la estructura de las comunidades procariotas que habitan las aguas del RAS es el arrastre que se produce por la propia corriente del río; este efecto produce que las especies procariotas se distribuyan más o menos homogéneamente en todo su curso, aunque aquellas que encuentran condiciones adecuadas pueden desarrollarse en mayor medida. Así, en las nacientes geotermales del RAS, y gracias a las condiciones ambientales aportadas por la actividad volcánica de la zona, tendría origen la biodiversidad que se encuentra en todo el río. En este trabajo se constató que, según los índices biológicos calculados (Tabla 5.3), VA2 es el sitio con mayor diversidad; y que las especies que allí se encuentran son arrastradas por la corriente y luego son detectadas en los puntos río abajo donde encuentren condiciones propicias para su desarrollo. Esta conclusión es, seguramente, solo válida para los microorganismos planctónicos presentes en las aguas (los únicos analizados en los muestreos realizados para este trabajo de tesis) pero, probablemente difiera para los microorganismos que se desarrollan en forma estanca, adheridos a rocas y a sedimentos en las distintas zonas del río, donde las condiciones fisicoquímicas pueden ser diferentes a las de la corriente.

Con el fin de caracterizar mejor la biodiversidad procariota encontrada en el Río Agrio, realizamos algunas comparaciones con la biodiversidad reportada en ambientes similares. Como mencionamos al comienzo de la discusión, los ríos ácidos son ambientes muy poco comunes, por lo cual la mayor parte de los estudios de biodiversidad en sitios con características fisicoquímicas similares a las del RAS están hechos sobre ambientes impactados por la actividad minera. El río ácido más conocido y estudiado en el mundo es el Río Tinto, que corre sobre la Faja Pirítica Ibérica en Huelva en España. La biodiversidad del Río Tinto ha sido profundamente estudiada y caracterizada por diversos autores desde hace mucho tiempo (López Archilla et al., 2001; Aguilera y Amils, 2004; Aguilera et al., 2006; Amils et al., 2007; Aguilera et al., 2007; González Toril et al., 2010). Como hemos resaltado a lo largo de esta sección, y según puede verse en los sitios donde han sido reportados previamente las secuencias similares a las del RAS (Tablas 5.6 y 5.7), el Río Agrio presenta grandes similitudes respecto a su biodiversidad con el Río Tinto. En uno de los trabajos más importantes sobre la diversidad en este río naturalmente ácido, publicados por González Toril y colaboradores (2003), se destaca que el principal grupo

de bacterias presentes está constituido por diferentes especies del género *Leptospirillum*, las cuales llegan a comprender alrededor del 65% de los microorganismos detectados por técnicas de hibridación *in situ* utilizando sondas específicas. El siguiente grupo taxonómico mejor representado en el Río Tinto es el de *Gammaproteobacteria*, dentro del cual predomina *At. ferrooxidans* y no se encontraron secuencias relacionadas con *At. thiooxidans* o *At. albertensis*. Esta fuerte presencia de especies acidófilas oxidantes del Fe, a diferencia de lo que se encontró en RAS dominado por especies oxidantes del S, puede comprenderse al comparar las concentraciones de Fe detectadas en ambos ríos ácidos. El Río Tinto posee una concentración del orden de 1000mg/L de Fe mientras que en el Río Agrio la concentración de Fe es aproximadamente la mitad en el origen y decae rápidamente a medida que el río fluye pendiente abajo. Aun así, se han aislado cepas de *L. ferrooxidans* y *A. ferrooxidans* a partir de muestras de agua del Río Agrio (Lavalle et al., 2005).

En el Río Tinto, la proporción de betaproteobacterias detectadas por hibridación fue muy pequeña (casi por debajo del límite de detección para la mayoría de las estaciones muestreadas) y no se encontraron secuencias del gen ARNr 16S que estuvieran afiliadas a esta clase. En el Río Agrio también es muy baja la presencia de betaproteobacterias. A pesar de no haberse detectado prácticamente secuencias afiliadas a esta clase, resulta llamativo que hayan sido detectadas por hibridación con la sonda BET en los puntos inferiores del RAS, donde las condiciones son menos extremas. Por último, en el Río Tinto la proporción de arqueas reportadas es del orden del 20%, mucho menor al detectado en el RAS. Las especies de arqueas encontradas en el río español son, al igual que en el Río Agrio, miembros del orden Thermoplasmatales y en particular del género *Ferroplasma*, pero fueron detectadas en proporciones mucho menores.

En otro ambiente ácido de origen natural es el lago Kawan Ijen, en Indonesia, que da origen al río Banyuutih, también de características ácidas. Allí, las secuencias del gen ARNr 16S de bacterias encontradas no están relacionadas con las especies de bacterias acidófilas detectadas en el RAS (Löhr et al., 2006). Probablemente, esto se deba a que los valores de pH en dicho lago y río son demasiado bajos (del orden de 0,5) lo que provoca que los microorganismos de los géneros *Acidithiobacillus* y *Leptospirillum* resulten inviables, a pesar de las altas concentraciones de Fe reportadas. En estos puntos de acidez extrema, se detectaron varias secuencias de arqueas, principalmente afiliadas con especies del dominio Crenarchaeota.

En un estudio realizado sobre colas de diferentes minas que generaban drenajes ácidos, usando técnicas cuantitativas de biología molecular (principalmente qPCR e hibridaciones FISH y CARD-FISH) se encontró, que, a diferencia de lo que ocurre en el RAS, la cantidad de

bacterias detectadas por ambas técnicas siempre fue superior a la de arqueas (Kock et al., 2008). Considerando las bacterias, los resultados obtenidos por estos autores son comparables a los que presentamos en este trabajo para el RAS, donde según la prevalencia de los respectivos OTUs, el género *Acidithiobacillus* se encontró, en todos los sitios, mejor representado que *Leptospirillum* y éste mejor que *Sulfobacillus* y *Acidiphilum*.

Por último, en un trabajo donde se caracteriza la geomicrobiología de un efluente ácido de mina sobre la Faja Pirítica Ibérica (González Toril et al., 2011), de origen esencialmente anaeróbico y con bajo potencial redox y cuyo oxígeno disponible se incrementa a medida que aflora, se reportaron las principales especies de bacterias detectadas en el RAS (*Acidithiobacillus*, *Leptospirillum* y en menor medida *Acidiphilum*) en aquellos sitios del drenaje donde las condiciones ambientales permitían su desarrollo.

5.6.3. Posibles metabolismos procariotas presentes en las aguas del Río Agrio Superior

La Tabla 5.9 recoge las principales características metabólicas de las especies cultivadas y caracterizadas más cercanas a los OTUs de bacterias y arqueas detectados en los cuatro puntos analizados. Para ampliar lo más posible el espectro, consideramos como especies cercanas aquellas hasta con un 0,900 de similitud en una búsqueda utilizando la base de datos de RDP. Algunos OTUs del RAS presentan similitudes cercanas al 99% con secuencias depositadas en la base de datos de NCBI obtenidas en estudios sobre ambientes ácidos muy similares al RAS; no obstante, estos mismos OTUs no poseen representantes cultivados incluso disminuyendo la similitud hasta 0,900.

Tabla 5.9. OTUs de bacterias y arqueas detectados en las aguas de los cuatro puntos del Río Agrío Superior estudiados en mayor profundidad y las especies cultivadas más cercanas (hasta una similitud de 0,900 en una búsqueda en RDP), junto con los números de acceso de estas secuencias en la base de datos de NCBI, el porcentaje de similitud según RDP y sus principales características metabólicas. (T) significa “cepa tipo” (type strain) de esa especie.

Nombre OTU	N° de clones (%)	Especie aislada más cercana	N° de acceso	Similitud según RDP	Características metabólicas de las especies aisladas
VA2 bac f10	5 (9)	<i>Acidithiobacillus ferrivorans</i> (T)	AF376020	0,996	Anaerobio facultativo. Acidófilo, menos extremo que otras especies de <i>Acidithiobacillus</i> . Quimiolitotoautótrofo obligado. Oxida compuestos de S y Fe(II). Fija CO ₂ . Psicrotolerante
VA2 bac g8	9 (16)	<i>Acidithiobacillus albertensis</i> (T)	AJ459804	0,996	Aeróbico. Acidófilo. Quimiolitotoautótrofo obligado. Oxida compuestos de S. Fija CO ₂ .
VA2 bac h9	2 (4)	<i>Acidithiobacillus thiooxidans</i>	DQ834372.1	0,998	Aeróbico. Acidófilo. Quimiolitotoautótrofo obligado. Oxida compuestos de S. Fija CO ₂ .
VA2 bac g11	5 (9)	No hay secuencias cercanas cultivadas			
VA2 bac d7	2 (4)	No hay secuencias cercanas cultivadas			
VA2 bac f7	3 (6)	<i>Acidiphilium acidophilum</i> (T)	D86511	0,994	Aeróbico. Acidófilo. Quimioorganótrofo obligado. Oxida compuestos de S.
VA2 bac a9	4 (7)	No hay secuencias cercanas cultivadas			
VA2 bac d5	10 (17)	<i>Sulfobacillus thermotolerans</i>	JF510470	0,959	Aeróbico. Acidófilo. Mixótrofo. Oxida compuestos de S y de Fe(II) en presencia de sustratos orgánicos.
VA2 bac a11	1 (2)	<i>Ferrimicrobium acidiphilium</i> (T)	AF251436	0,954	Aeróbico. Acidófilo. Heterótrofo obligado. Oxida Fe(II). No oxida compuestos de S. Anaeróbicamente reduce Fe (III). Mesófilo
VA2 bac e9	1 (2)	No hay secuencias cercanas cultivadas			
VA2 bac d8	2 (4)	<i>Aciditerrimonas ferrireducens</i> (T)	AB517669	0,951	Aeróbico. Acidófilo. Heterótrofo. Termófilo moderado. Puede crecer anaeróbica y autotróficamente por reducción de Fe(III). No oxida Fe(II)
VA2 bac h12	1 (2)	No hay secuencias cercanas cultivadas			
VA2 bac b5	1 (2)	<i>Nocardioides sp</i>	AJ549287	0,994	Aeróbico obligado. Heterótrofo. Mesófilo.
VA2 bac c12	7 (13)	<i>Leptospirillum ferrooxidans</i> (T)	X86776	0,990	Aerobio. Acidófilo. Quimiolitotoautótrofo obligado. Oxida Fe(II). No oxida compuestos de S. Fija CO ₂ . Mesófilo. Fija N ₂ . Alta resistencia a metales tóxicos.
VA2 bac a3	2 (4)	No hay secuencias cercanas cultivadas			

VA2 arch f7	1 (2)	No hay secuencias cercanas cultivadas			
VA2 arch e11	42 (94)	<i>Ferroplasma acidiphilum</i> (T)	AJ224936	0,977	Anaerobio facultativo. Quimiolitotrofo o mixotrofo. Oxida Fe(II) y pirita. No oxida S ni otros sulfuros metálicos. Anaeróticamente reduce Fe(III) en presencia de fuente orgánica. Termófilo moderado
VA2 arch f10	1 (2)	No hay secuencias cercanas cultivadas			
VA2 arch a11	1 (2)	No hay secuencias cercanas cultivadas			
U2V bac e9	3 (8)	<i>Acidithiobacillus ferrivorans</i> (T)	AF376020	0.998	Anaerobio facultativo. Acidófilo, menos extremo que las otras especies de <i>Acidithiobacillus</i> . Quimiolitotrofo obligado. Oxida compuestos de S y Fe(II). Fija CO ₂ . Psicrotolerante
U2V bac f10	21 (57)	<i>Acidithiobacillus albertensis</i> (T)	AJ459804	0.999	Aeróbico. Acidófilo. Quimiolitotrofo obligado. Oxida compuestos de S. Fija CO ₂ .
U2V bac b3	2 (6)	No hay secuencias cercanas cultivadas			
U2V bac h2	2 (6)	<i>Sulfobacillus sp.</i>	AY140239	0.960	Anaeróbico facultativo. Acidófilo. Mixotrofo. Oxida Fe(II), S y sulfuros metálicos. Termófilo moderado. Produce esporas.
U2V bac g10	3 (8)	<i>Sulfobacillus thermosulfidooxidans</i> (T)	DSM 9293	0.994	Anaeróbico facultativo. Acidófilo. Mixotrofo. Oxida Fe (II), S y sulfuros metálicos. Anaeróticamente reduce Fe (III). Termófilo moderado. Produce esporas. Alta resistencia a metales pesados.
U2V bac a5	1 (3)	<i>Ferrimicrobium acidiphilum</i> (T)	AF251436	0,962	Aeróbico. Acidófilo. Heterótrofo obligado. Oxida Fe(II). No oxida compuestos de S. Anaeróticamente reduce Fe (III). Mesófilo.
U2V bac f9	1 (3)	No hay secuencias cercanas cultivadas			
U2V bac f4	2 (6)	<i>Leptospirillum ferriphilum</i>	GU168010	0.997	Aeróbico. Acidófilo. Quimilitotrofo obligado. Oxida Fe (II). No oxida compuestos de S. Fija CO ₂ . No fija N ₂ . Termotolerante. Alta resistencia a metales tóxicos.
U2V arch f10	2 (3)	No hay secuencias cercanas cultivadas			
U2V arch e12	57 (97)	<i>Ferroplasma acidiphilum</i> (T)	AJ224936	0,999	Anaerobio facultativo. Quimiolitotrofo o mixotrofo. Oxida Fe (II) y pirita. No oxida S ni otros sulfuros metálicos. Anaeróticamente reduce Fe(III) en presencia de fuente orgánica. Termófilo moderado

AS3 bac e7	3 (6)	<i>Acidithiobacillus ferrivorans</i> (T)	AF376020	0,992	Anaerobio facultativo. Acidófilo, menos extremo que las otras especies de <i>Acidithiobacillus</i> . Quimioliotoautótrofo obligado. Oxida compuestos de S y Fe(II). Fija CO ₂ . Psicrotolerante
AS3 bac h10	13 (25)	<i>Acidithiobacillus albertensis</i> (T)	AJ459804	0,998	Aeróbico. Acidófilo. Quimioliotoautótrofo obligado. Oxida compuestos de S. Fija CO ₂ .
AS3 bac g4	9 (17)	<i>Acidithiobacillus thiooxidans</i>	FJ998186	0,994	Aeróbico. Acidófilo. Quimioliotoautótrofo obligado. Oxida compuestos de S. Fija CO ₂ .
AS3 bac d10	2 (4)	No hay secuencias cercanas cultivadas			
AS3 bac c10	1 (2)	<i>Pseudomonas stutzeri</i>	AJ270455	0,999	Aeróbico. Heterótrofo. Existen especies desnitrificantes y otras fijadoras de N ₂ . Metaboliza alta variedad de contaminantes. Resistente a altas concentraciones de metales pesados. Algunas cepas pueden utilizar tiosulfato como fuente de energía.
AS3 bac f7	1 (2)	<i>Cupriavidus metallidurans</i>	AY860234	0,997	Anaerobio. Quimioliotoautótrofo facultativo. Fija CO ₂ . Oxida compuestos de S e H ₂ . No puede crecer con azúcares sencillos, pero si sus derivados ácidos vía ciclo TCA o similares. Alta resistencia a metales pesados. Puede obtener C y energía a partir de fuentes recalitrantes como alcoholes, aldehídos y cetonas de cadena corta. Mesófilo.
AS3 bac a11	3 (6)	No hay secuencias cercanas cultivadas			
AS3 bac g3	1 (2)	<i>Alicyclobacillus</i> sp.	KC684530	0,950	Anaeróbico facultativo. Acidófilo obligado. Heterótrofo. Algunas especies son capaces de oxidar S. Termófilo. Capaz de formar esporas en condiciones adversas
AS3 bac c2	1 (2)	No hay secuencias cercanas cultivadas			
AS3 bac e8	1 (2)	<i>Sulfobacillus thermotolerans</i>	JF510470	0,976	Aeróbico. Acidófilo. Mixótrofo. Oxida compuestos de S y de Fe(II) en presencia de sustratos orgánicos. Termófilo moderado. Produce esporas.
AS3 bac a7	1 (2)	No hay secuencias cercanas cultivadas			
AS3 bac e9	9 (18)	<i>Leptospirillum ferrooxidans</i>	AF356835	0,980	Aeróbico. Acidófilo. Quimioliotoautótrofo obligado. Oxida Fe (II). No oxida compuestos de S. Fija CO ₂ . Mesófilo. Fija N ₂ . Alta resistencia a metales tóxicos..
AS3 bac h7	5 (10)	<i>Leptospirillum ferriphilum</i>	GU168010	0,998	Aeróbico. Acidófilo. Quimilitoautótrofo obligado. Oxida Fe (II). No oxida compuestos de S. Fija CO ₂ . No fija N ₂ . Termotolerante. Alta resistencia a metales tóxicos.
AS3 bac b6	1 (2)	No hay secuencias cercanas cultivadas			
AS3 arch d2	2 (2)	<i>Thermogymnomonas acidicola</i> (T)	AB269873	0,926	Aeróbico. Acidófilo. Heterótrofo. Termófilo.

AS3 arch a6	80 (96)	<i>Ferroplasma acidiphilum</i> (T)	AJ224936	0,998	Anaerobio facultativo. Quimiolitotrofo o mixotrofo. Oxida Fe (II) y pirita. No oxida S ni otros sulfuros metálicos. Anaeróticamente reduce Fe(III) en presencia de fuente orgánica. Termófilo moderado
AS3 arch g11	2 (2)	No hay secuencias cercanas cultivadas			
CV bac h8	2 (22)	<i>Acidithiobacillus ferrivorans</i> (T)	AF376020	0,995	Anaerobio facultativo. Acidófilo, menos extremo que las otras especies de <i>Acidithiobacillus</i> . Quimiolitotrofo obligado. Oxida compuestos de S y Fe(II). Fija CO ₂ . Psicrotolerante
CV bac g11	1 (11)	<i>Acidithiobacillus albertensis</i> (T)	AJ459804	0,998	Aeróbico. Acidófilo. Quimiolitotrofo obligado. Oxida compuestos de S. Fija CO ₂ .
CV bac c11	4 (45)	<i>Acidithiobacillus thiooxidans</i>	JQ820325	0,987	Aeróbico. Acidófilo. Quimiolitotrofo obligado. Oxida compuestos de S. Fija CO ₂ .
CV bac b9	2 (22)	<i>Acidiphilium acidophilum</i> (T)	D86511	0,958	Aeróbico. Acidófilo. Quimiorganótrofo obligado. Oxida compuestos de S.
CV arch e8	54 (95)	<i>Ferroplasma acidiphilum</i> (T)	AJ224936	0,998	Anaerobio facultativo. Quimiolitotrofo o mixotrofo. Oxida Fe (II) y pirita. No oxida S ni otros sulfuros metálicos. Anaeróticamente reduce Fe(III) en presencia de fuente orgánica. Termófilo moderado
CV arch c1	3 (5)	<i>Ferroplasma</i> sp.	JF891386	0,973	Anaerobio facultativo. Quimiolitotrofo, mixotrofo o heterótrofo. Oxida Fe (II) y pirita. Anaeróticamente reduce Fe(III) en presencia de fuente orgánica. Termófilo moderado

Como discutimos a lo largo de esta sección, la diversidad procariota planctónica que se encuentra en el RAS parece estar determinada por las especies que se encuentran en el origen del río. Por esta razón, en todo el curso del RAS se encuentran presentes prácticamente los mismos metabolismos procariotas. En primer lugar, debe resaltarse que el 99% de las secuencias del gen ARNr 16S encontradas en el RAS, presentan elevados porcentajes de similitud con microorganismos cultivados y caracterizados como aeróbicos y acidófilos. Además, los OTUs de bacterias y arqueas del RAS se asemejan mayoritariamente a microorganismos que son quimiolitautótrofos, facultativos u obligados, y capaces de obtener energía, principalmente, a expensas de la oxidación de compuestos de azufre o de la oxidación de Fe(II). La gran cantidad de especies con capacidad metabólica para oxidar compuestos de azufre, ya sea bajo condiciones autotróficas o mixotróficas, permiten explicar en buena medida las altas concentraciones de sulfatos detectadas en el RAS (Tabla 5.2).

Al analizar el ecosistema del RAS, podemos ubicar en el rol de productores primarios a microorganismos tales como *Acidithiobacillus*, *Leptospirillum* y *Ferroplasma*, que son capaces de fijar CO₂ ambiental y así generar biomasa. El RAS es un ambiente con baja carga de materia orgánica y, debido a esto, muchas de las especies detectadas tienen la capacidad de desarrollarse a través de un metabolismo quimiolitautótrofo; en cambio, no abundan las especies heterótrofas estrictas. *Acidiphilum* es un ejemplo de bacteria heterótrofa con capacidad para oxidar compuestos de azufre que es esperable encontrar en un ecosistema con las características del RAS. Como mencionamos anteriormente, esta bacteria suele acompañar a acidófilos autótrofos obligados, ya que se encarga de metabolizar los compuestos orgánicos que resultan letales para los últimos. Por otro lado, 2% de las secuencias de la biblioteca de clones de VA2 y 3% de la U2V, lugares en los cuales las concentraciones de Fe son suficientemente elevadas, presentan similitudes (entre 0,954 y 0,962, respectivamente, utilizando el algoritmo de RDP) con secuencias de *Ferrimicrobium acidiphilum*. Esta bacteria heterótrofa obligada obtiene energía a partir de la oxidación de Fe(II) y no es capaz de oxidar compuestos de azufre. Por esa razón, al igual que otros oxidadores de Fe(II) incapaces de oxidar azufre, probablemente desaparece en puntos río abajo, donde la concentración de Fe disminuye. La diversidad metabólica de las bacterias del RAS se completa con especies del género *Sulfobacillus*, que oxidan compuestos de azufre o Fe(II) con el aporte de materia orgánica. La única especie quimiolitautótrofa estricta que se desarrolla únicamente a expensas de la oxidación de Fe(II) detectada en el RAS es *Leptospirillum*. Dado que en el RAS la concentración de Fe no es tan alta como en otros ambientes de características similares, es lógico que esta bacteria, al igual

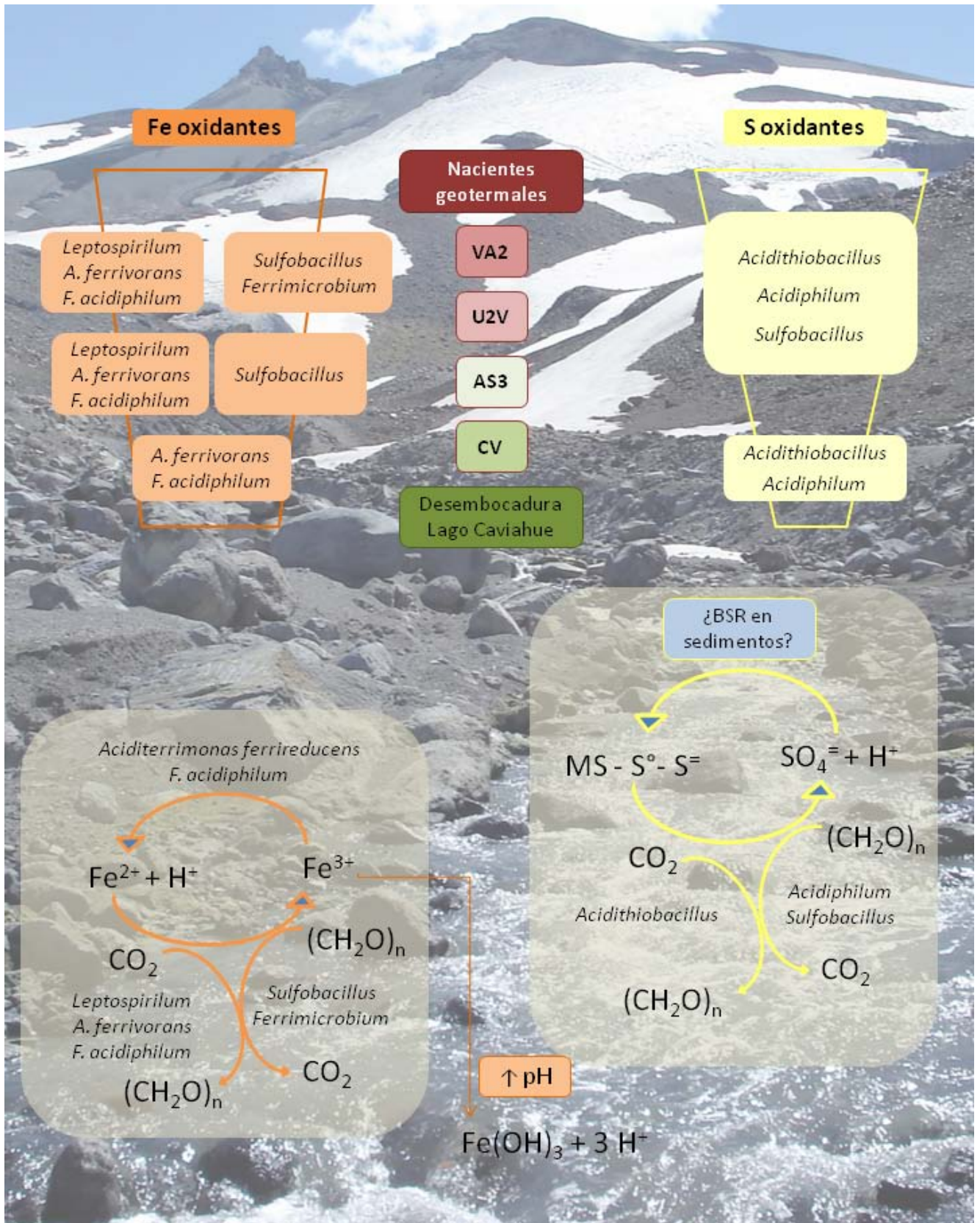
que aquellas semejantes a *Ferrimicrobium acidiphilum*, no se haya encontrado en alta proporción y desaparezca hacia el final del curso del RAS.

Las arqueas del RAS poseen características metabólicas muy similares a las de las bacterias. Entre el 94 y 100% de las secuencias de las bibliotecas de clones de arqueas de los cuatro puntos estudiados se asocian a *Ferroplasma acidiphilum* que es una especie capaz de oxidar Fe (II) y pirita en forma autotrófica o mixotrófica. Teniendo presente que las especies del género *Ferroplasma* también pueden desarrollarse anaeróbicamente reduciendo Fe(III) con aporte de materia orgánica (Golyshina et al., 2010), es altamente probable que se encuentre presente no sólo en las aguas y zonas aeróbicas del Río Agrio, sino también en los sedimentos donde la concentración de O₂ suele ser menor. Su presencia, así como la de otras especies hierro reductoras, contribuiría a mantener suficientemente bajos los niveles de Fe(III), tal cual se ha detectado a lo largo del curso del RAS. La comprobación de esta hipótesis, fuera del ámbito de este trabajo de tesis, será fundamental para completar el conocimiento sobre la geomicrobiología del RAS.

Este análisis de los posibles metabolismos presentes en el RAS, realizado por comparación de las características de las especies cultivadas más cercanas a los OTUs encontrados, nos permite elaborar algunas ideas sobre la geomicrobiología del tramo superior del Río Agrio. La naciente del río, que se da a partir de dos fuentes geotermales de origen volcánico, produce la acumulación de Fe(II) y, sobre todo, de diversos compuestos de azufre. La oxidación química de estos compuestos pero esencialmente su catálisis a través de la gran cantidad de especies microbianas oxidantes del azufre encontradas en el RAS, contribuye a mantener el bajo pH del sistema. Esta misma actividad metabólica permite dar una interpretación ecológica a las altas concentraciones de sulfato que fueron detectadas. La condición de acidez extrema del origen del RAS es ligeramente modificada a medida que el río baja por la ladera del volcán Copahue, principalmente por la afluencia de corrientes de deshielo, pero se mantiene en valores ácidos sin modificar sustancialmente la biogeoquímica del ambiente ni las especies procariotas que lo colonizan, debido a que los compuestos de azufre aun son abundantes. Según nuestros resultados, las especies más importantes de la comunidad microbiana del RAS provienen de las nacientes geotermales y son arrastradas por la corriente río abajo, donde algunas de ellas logran desarrollarse en condiciones más favorables. Además, debido al aumento del caudal existe un marcado efecto de dilución (por contribución de los afluentes de deshielo) que afecta las concentraciones de los iones. En el caso particular de la concentración de Fe, cuya disminución también puede deberse a eventuales precipitaciones de compuestos férricos insolubles, produce

un serio efecto sobre los microorganismos que sobreviven únicamente a expensas de la oxidación de Fe (*Leptospirillum* y *Ferrimicrobium*) que desaparecen en la parte final del río. Tal cual se mencionó anteriormente, este análisis releva las características metabólicas de las especies plantónicas del RAS. Es probable que en los biofilms y sedimentos en las márgenes del río se desarrollen esas mismas especies, pero también otras de características metabólicas complementarias a las especies localizadas en las aguas, entre ellas, bacterias o tal vez arqueas sulfato reductoras. La Figura 5.12 resume de forma esquemática los principales metabolismos y las especies que los llevan a cabo en el recorrido del RAS.

Figura 5.12 Representación de los principales metabolismos y especies procariotas que se encuentran a lo largo del Río Agrio Superior. La parte superior de la imagen intenta esquematizar la disminución de las especies que se produce a lo largo del recorrido del río. Las bacterias oxidantes del Fe prácticamente desaparecen en la parte final del río, cuando la concentración de Fe disminuye, pero las arqueas relacionadas con *Ferroplasma acidiphilum* se mantienen aproximadamente en los mismos porcentajes en todo el RAS. Las especies oxidantes del S se mantienen en aproximadamente el mismo número y diversidad a lo largo del RAS.



5.7. Consideraciones sobre el trabajo realizado y la biodiversidad de las aguas del Río Agrio Superior

- ◆ Las técnicas de biología molecular utilizadas, clonación y secuenciación del gen ARNr 16S e hibridaciones CARD-FISH, permitieron describir la biodiversidad del Río Agrio Superior, tanto en forma cualitativa como semicuantitativa. La información provista por ambas metodologías resultó, en general, consistente y complementaria.
- ◆ Los metabolismos procariotas predominantes en el Río Agrio Superior son los de especies acidófilas, quimiolitioautótrofas o mixótrofas, capaces de oxidar compuestos de azufre y de Fe(II).
- ◆ Todas las bacterias encontradas a lo largo del Río Agrio Superior son acidófilas y están relacionadas con las especies asociadas a los minerales sulfurados y a los drenajes ácidos de minas tales como *Acidithiobacillus*, *Leptospirillum*, *Sulfobacillus* y *Acidiphilum*.
- ◆ El grupo Nitrospira, únicamente representado por las especies del género *Leptospirillum*, que es dominante en muchos ambientes similares al Río Agrio, en este caso es muy poco abundante y desaparece en el último punto estudiado, donde la concentración de hierro cae abruptamente. Precisamente, en esos sitios donde la concentración de Fe se hace más escasa, se observa predominancia de microorganismos oxidantes del azufre.
- ◆ Las arqueas son un componente muy importante de la comunidad microbiana del Río Agrio Superior y se encuentran representadas predominantemente por Euryarchaeotas del género *Ferroplasma*. Esta arquea se encontró en una proporción significativa a lo largo de todo el tramo del río estudiado, incluso en los sitios donde la temperatura y la concentración de Fe son bastante inferiores a las presentes en los ambientes donde ese género fue anteriormente reportado como dominante.
- ◆ Se detectaron OTUs de bacterias y arqueas que no pudieron ser clasificados taxonómicamente dentro de los grupos que se conocen actualmente, pero que mostraron elevados porcentajes de similitud con especies detectadas y reportadas en otros ambientes ácidos, naturales o derivados de la actividad minera, en diferentes partes del mundo. Estos OTUs podrían representar nuevas especies acidófilas ubicuas

en esos ambientes y no exclusivas de Copahue.

- ◆ Los porcentajes de arqueas, alfa y gammaproteobacterias, detectados por hibridaciones CARD-FISH y las especies detectadas en la naciente del Río Agrio, se mantienen aproximadamente constantes a lo largo del curso de Río Agrio Superior. Las betaproteobacterias aparecen en los dos puntos, corriente abajo, donde debido a la contribución de cursos de agua tributarios principalmente de origen de deshielo, las condiciones ambientales se vuelven menos extremas. También allí desaparecen algunas de las especies detectados en los primeros tramos del río.
- ◆ De acuerdo a los resultados obtenidos, los principales factores que determinan la distribución de las especies planctónicas a lo largo del Río Agrio Superior son la combinación entre un efecto de arrastre de la corriente y el eventual desarrollo de las especies de acuerdo a las condiciones de cada lugar. Esto impidió observar una correlación clara entre la biodiversidad de cada punto y sus características fisicoquímicas.
- ◆ La biodiversidad del Río Agrio Superior es semejante a la reportada en otros ambientes ácidos, naturales o generados por el impacto de la actividad minera, demostrando que las especies acidófilas reportadas son ubicuas en todos los hque presenten similares condiciones.
- ◆ Debido a la posibilidad de encontrar nuevas especies, o nuevas cepas de especies ya conocidas, mejor adaptadas a las condiciones extremas de este ambiente y con las características metabólicas mencionadas, el Río Agrio es un ambiente de sumo interés para la búsqueda de microorganismos útiles para desarrollar nuevos procesos biotecnológicos u optimizar ya existentes, en particular para el uso en biorremediación y biominería.

Referencias – Sección 5

Aguilera A., Zettler E., Gómez F., Amaral Zettler L., Rodríguez N., Amils R. (2007) Distribution and seasonal variability in the benthic eukaryotic community of Río Tinto (SW, Spain), an acidic, high metal extreme environment. *Systc App Microbiol* 30: 531–546.

Aguilera A., Manrubia S.C., Gómez F., Rodríguez N., Amils R. (2006) Eukaryotic community distribution and its relationship to water physicochemical parameters in an extreme acidic environment, Río Tinto (Southwestern Spain). *Appl Environ Microbiol* 72: 5325–5330.

Aguilera A., Amils R. (2004) Unexpected eukaryotic diversity in the Tinto River (SW Spain): An extreme acidophilic environment (2004). European Space Agency, (Special Publication) ESA SP, (545), pp. 163–164.

Amaral Zettler L.A., Zettler E.R., Theroux S.M., Palacios C., Aguilera A., Amils R. (2011) Microbial community structure across the tree of life in the extreme Rio Tinto. *ISME J* 5: 42–50.

Amils R., González Toril E., Fernández Remolar D., Gómez F., Aguilera A., Rodríguez N., Malki M., García Moyano A., Fairén A.G., de la Fuente V., Luis Sanz J. (2007) Extreme environments as Mars terrestrial analogs: The Rio Tinto case. *Planet Space Sci.* 55: 370–381.

Breuker A., Blazejak A., Bosecker K., Schippers A. (2009) Diversity of iron oxidizing bacteria from various sulfidic mine waste dumps. En: Donati E.R., Viera M.R., Tavani E.L., Giaveno A., Lavalle T.L., Chiacchiarini P.A. (Eds.). *Advanced Materials Research* 71–73: 47–50.

Bond P.L., Smriga S.P., Banfield J.F. (2001) Phylogeny of microorganisms populating a thick, subaerial, predominantly lithotrophic biofilm at an extreme acid mine drainage site. *Appl Environ Microbiol* 66: 3842–3849.

Bond P.L., Druschel G.K., Banfield J.F. (2000) Comparison of acid mine drainage microbial communities in physically and geochemically distinct ecosystems. *Appl Environ Microbiol* 66: 4962–4978.

Dold B., Gonzalez Toril E., Aguilera A., Lopez Pamo E., Cisternas M.E., Bucchi F., Amils R. (2013) Acid Rock Drainage and Rock Weathering in Antarctica: Important Sources for Iron Cycling in the Southern Ocean. *Environ Sci Technol* DOI: 10.1021/es305141b.

Edwards K.J., Bond P.L., Gihring T.M., Banfield J.F. (2000) An archaeal iron-oxidizing extreme acidophile important in acid mine drainage. *Science* 287: 1796–1799.

Edwards K.J., Gihring T.M., Banfield J.F. (1999) Seasonal variations in microbial populations and environmental conditions in an extreme acid mine drainage environment. *Appl Environ Microbiol* 65: 3627–3632.

Gammons C., Wood S., Pedrozo F., Varekamp J., Nelson B., Shope C., Baffico G. (2005) Hydrogeochemistry and rare earth element behavior in a volcanically acidified watershed in Patagonia, Argentina. *Chem Geol* 222: 249–267.

García Moyano A., González Toril E., Aguilera A., Amils R. (2012) Comparative microbial ecology study of the sediments and the water column of the Río Tinto, an extreme acidic environment. *FEMS Microbiol Ecol* 81: 303–314.

García Moyano A., González Toril E., Aguilera A., Amils R. (2007) Prokaryotic community composition and ecology of floating macroscopic filaments from an extreme acidic environment, Rio Tinto (SW, Spain). *Syst Appl Microbiol* 30: 601–614.

Golyshina O.V., Timmis K.N. (2005) *Ferroplasma* and relatives, recently discovered cell wall-lacking archaea making a living in extremely acid, heavy metal-rich environments. *Environ Microbiol* 7: 1277–1288.

Golyshina O.V., Pivovarova T.A., Grigory A., Karavaiko I., Kondrateva T.F., Moore E.R.B., Wolf Rainer A, Heinrich Lunsdorf A., Timmis K.N., Yakimov M.M., Golyshin P.N. (2000) *Ferroplasma acidiphilum* gen. nov., sp. nov., an acidophilic, autotrophic, ferrous-iron-oxidizing, cell-wall-lacking, mesophilic member of the *Ferroplasmaceae* fam. nov., comprising a distinct lineage of the *Archaea*. *Int J Syst Evol Microbiol* 50: 997–1006.

González Toril E., Aguilera A., Souza Egipsy V., Lopez Pamo E., Sanchez España J., Amils R. (2011) Geomicrobiology of an acid mine effluent, La Zarza-Perrunal (Iberian Pyritic Belt, Spain). *Appl Environ Microbiol* 77: 2685–2694.

González Toril E., Aguilera A., Rodríguez N., Fernández Remolar D., Gómez F., Díaz E., García Moyano A., Sanz J.L., Amils R. (2010) Microbial ecology of Río Tinto, a natural extreme acidic environment of biohydrometallurgical interest. *Hydrometallurgy* 104: 329–333.

González Toril E., Llobet.Brossa E., Casamayor E.O., Amann R., Amils R. (2003) Microbial ecology of an extreme acidic environment, the Tinto River. *Appl Environ Microbiol* 69: 4853–4865.

Hallberg K.B., González Toril E., Johnson D.B. (2010) *Acidithiobacillus ferrivorans*, sp. nov.; facultatively anaerobic, psychrotolerant iron-, and sulfur-oxidizing acidophiles isolated

from metal mine-impacted environments. *Extremophiles* 14: 9–19.

Harrison J.A.P. (1984) The acidophilic thiobacilli and other acidophilic bacteria that share their habitat. *Annu Rev Microbiol* 38: 265–292.

He Z., Xiao S., Xie X., Zhong H., Hu Y., Li Q., Gao F., Li G., Liu J., Qiu G. (2007) Molecular diversity of microbial community in acid mine drainages of Yunfu sulfide mine. *Extremophiles* 11: 305–314.

He Z., Xiao S., Xie X., Hu Y. (2008) Microbial diversity in acid mineral bioleaching systems of dongxiang copper mine and Yinshan lead-zinc mine. *Extremophiles* 12: 225–234.

Huang L., Zhou W., Hallberg K.B., Wan C., Li J., Shu W. (2011) Spatial and Temporal Analysis of the Microbial Community in the Tailings of a Pb-Zn Mine Generating Acidic Drainage. *Appl Environ Microbiol* 77: 5540–5544.

Johnson D.B. (1995) Selective solid media for isolating and enumerating acidophilic bacteria. *J Microbiol Meth* 23: 205–218.

Johnson D.B., Hallberg K. (2003) The microbiology of acidic mine waters. *Research in Microbiology* 154: 466–473.

Kato S., Itoh T., Yamagishi A. (2011) Archaeal diversity in a terrestrial acidic spring field revealed by a novel PCR primer targeting archaeal 16S rRNA genes. *FEMS Microbiol Lett* 319: 34–43.

Kay C.M., Rowe O.F., Rocchetti L., Coupland K., Hallberg K.B., Johnson D.B. (2013) Evolution of microbial 'streamer' growths in an acidic, metal-contaminated stream draining an abandoned underground copper mine. *Life* 3: 189–210.

Kock D., Schippers A. (2008) Quantitative microbial community analysis of three different sulfidic mine tailing dumps generating acid mine drainage. *Appl Environ Microbiol* 74: 5211–5219.

Lavalle L., Chiacchiarini P., Pogliani C., Donati E. (2005) Isolation and characterization of acidophilic bacteria from Patagonia, Argentina. *Process Biochem* 40: 1095–1099.

Liu Y., Yin H., Liang Y., Shen L., Liu Y., Fu X., Baba N., Zeng W., Qiu G., Liu X. (2011) Changes in the composition of an acid mine drainage microbial community upon successive transfers in medium containing low-grade copper sulfide. *Bioresour Technol* 102: 9388–9394.

López Archilla A.I., Marin I., Amils R. (2001) Microbial community composition and

ecology of an acidic aquatic environment: The Tinto River, Spain. *Microb Ecol.* 41: 20–35.

Löhr A.J., Laverman A.M., Braster M., van Straalen N.M., Röling W.F.M. (2006) Microbial communities in the world's largest acidic volcanic lake, Kawah Ijen in Indonesia, and in the Banyupahit river originating from it. *Microb Ecol* 52: 609–618.

Lu S., Gischkat S., Reiche M., Akob D.M., Hallberg K.B., Kusel K. (2010) Ecophysiology of Fe-cycling bacteria in acidic sediments. *Appl Environ Microbiol* 76: 8174–8183.

Lu S., Chourey K., Reiche M., Nietzsche S., Shah M.B., Neu T.R., Hettich R.L., Kusel K. (2013) Insights into the structure and metabolic function of microbes that shape pelagic iron-rich aggregates ('iron snow'). *Appl Environ Microbiol* 79: 4272–4281.

Macalady J.L., Jones D.S., Lyon E.H. (2007) Extremely acidic, pendulous cave wall biofilms from the Frasassi cave system, Italy. *Environ Microbiol* 9: 1402–1414.

Mazuelos A., Moreno J.M., Carranza F., Palomino C., Torres A., Villalobo E. (2012) Biotic factor does not limit operational pH in packed-bed bioreactor for ferrous iron biooxidation. *J Ind Microbiol Biotechnol* 39: 1851–1858.

Mendez M.O., Neilson J.W., Maier R.M. (2008) Characterization of a bacterial community in an abandoned semiarid lead-zinc mine tailing site. *Appl Environ Microbiol* 74: 3899–3907.

Mirete S., de Figueras C.G, Gonzalez Pastor J.E. (2007) Novel nickel resistance genes from the rhizosphere metagenome of plants adapted to acid mine drainage. *Appl Environ Microbiol* 73: 6001–6011.

Nareshkumar R., Nagendran R., Parvathi K. (2008) Bioleaching of heavy metals from contaminated soil using *Acidithiobacillus thiooxidans*: effect of sulfur/soil ratio. *World J Microbiol Biotechnol* 24 : 1539–1546.

Pedrozo F.L., Temporetti P.F., Beamud G., Diaz M.M. (2008) Volcanic nutrient inputs and trophic state of Lake Caviahue, Patagonia, Argentina. *J Volcanol Geoth Res* 178: 205–212.

Qiu G., Li Q., Yu R., Sun Z., Liu Y., Chen M., Yin H., Zhang Y., Liang Y., Xu L., Sun L., Liu X. (2011) Column bioleaching of uranium embedded in granite porphyry by a mesophilic acidophilic consortium. *Bioresour Technol* 102: 4697–4702.

Rowe O.F., Sanchez España J., Hallberg K.B., Johnson D.B. (2007) Microbial communities and geochemical dynamics in an extremely acidic, metal-rich stream at an abandoned sulfide mine (Huelva, Spain) underpinned by two functional primary production systems. *Environ*

Microbiol 9: 1761–1771.

Sánchez A.I., Rodríguez N., Amils R., Sanz J.L. (2011) Microbial diversity in anaerobic sediments at Rio Tinto, a naturally acidic environment with a high heavy metal content. *Appl Environ Microbiol* 77: 6085–6093.

Santofimia E., González Toril E., Lopez Pamo E., Gomariz M., Amils R., Aguilera A. (2013) Microbial diversity and its relationship to physicochemical characteristics of the water in two extreme acidic pit lakes from the Iberian Pyrite Belt (SW Spain). *PLoS ONE* 8: e66746. doi:10.1371/journal.pone.0066746.

Schippers A. (2007) Microorganisms involved in bioleaching and nucleic acid-based molecular methods for their identification and quantification. En: *Microbial Processing of Metal Sulfides*, Donati E., Sand W. (Eds.), Springer, Dordrecht, The Netherlands, pp. 3–33.

Souza Egipsy V., González Toril E., Zettler E., Amaral Zettler L., Aguilera A., Amils R. (2011) Prokaryotic community structure in algal photosynthetic biofilms from extreme acidic streams in Río Tinto (Huelva, Spain). *Int Microbiol* 11: 251–260.

Tan G.L., Shu W.S., Zhou W.H., Li X.L., Lan C.Y., Huang L.N. (2009) Seasonal and spatial variations in microbial community structure and diversity in the acid streamdraining across an ongoing surface mining site. *FEMS Microbiol Ecol* 70: 277–285

Tan G.L. (2008) Culturable and molecular phylogenetic diversity of microorganisms in an open-dumped, extremely acidic Pb/Zn mine tailings. *Extremophiles* 12: 657–664.

Tang K.W., Dziallas C., Grossart H.P. (2011) Zooplankton and aggregates as refuge for aquatic bacteria: protection from UV, heat and ozone stresses used for water treatment. *Environ Microbiol* 13: 378–390.

Varekamp J.C. (2008) The volcanic acidification of glacial Lake Caviahue, Province of Neuquen, Argentina. *J Volcanol Geoth Res* 178: 205–212

Volant A., Desoeuvre A., Casiot C., Lauga B., Delpoux S., Morin G., Personne J.C., Hery M., Elbaz Poulichet F., Bertin P.N., Bruneel O. (2012) Archaeal diversity: temporal variation in the arsenic-rich creek sediments of Carnoules Mine, France. *Extremophiles* 16: 645–657.

Watkin E.L., Keeling S.E., Perrot F.A., Shiers D.W., Palmer M.L., Watling H.R. (2009) Metals tolerance in moderately thermophilic isolates from a spent copper sulfide heap, closely related to *Acidithiobacillus caldus*, *Acidimicrobium ferrooxidans* and *Sulfobacillus*

thermosulfidooxidans. J Ind Microbiol Biotechnol 36: 461–465.

Xiao S., Xie X., Liu J., He Z., Hu Y. (2008) Compositions and structures of archaeal communities in acid mineral bioleaching systems of Dongxiang Copper Mine and Yinshan Lead-Zinc Mine, China. Curr Microbiol 57: 239–244.

Yin H., Cao L., Qiu G., Wang D., Kellogg L., Zhou J., Liu X., Dai Z., Ding J., Liu X. (2008) Molecular diversity of 16S rRNA and gyrB genes in copper mines. Arch Microbiol 189: 101–110.



Sección 6

Conclusiones Generales

6.1. Conclusiones generales sobre las técnicas y metodologías utilizadas

Las dos técnicas de biología molecular cultivo independiente utilizadas permitieron relevar la biodiversidad procariota presente en la zona geotermal de Copahue-Caviahue, en forma cualitativa y también semicuantitativa. La clonación y secuenciación de fragmentos de más de 800 nucleótidos de extensión de los genes ARNr 16S de bacterias y arqueas, permitió conocer los microorganismos presentes y su afiliación taxonómica, llegando en muchos de los casos, hasta el nivel de género y especie. Las hibridaciones FISH y CARD-FISH utilizando sondas generales y específicas para diferentes grupos taxonómicos permitieron tener una noción semicuantitativa de la distribución de los microorganismos. La información provista por las dos metodologías empleadas resultó coherente y compatible, y su combinación permitió delinear las estructuras de las comunidades procariotas que habitan los pozos geotermales de Copahue y el Río Agrío.

Las técnicas de secuenciación del gen ARNr 16S y las de hibridaciones FISH y CARD-FISH resultaron complementarias; la información aportada por la secuenciación permitió seleccionar las sondas apropiadas para detectar los microorganismos preponderantes en cada sitio y, en los casos donde no hubo sondas útiles disponibles en literatura, permitió ensayar *in silico* el diseño de nuevas sondas, específicas para los microorganismos de Copahue. Por su parte, las hibridaciones in situ dieron una referencia semicuantitativa a la información aportada por la secuenciación.

El uso de diferentes programas de alineamiento y comparación, y la referencia a distintas bases de datos (ARB, NCBI, BLASTn, RDP, greengenes) utilizados para realizar la clasificación taxonómica y filogenética de las secuencias obtenidas a partir del ADN genómico de las comunidades de Copahue, dieron mayor solidez los resultados obtenidos.

El uso de herramientas de bioestadística permitió identificar correlaciones entre los parámetros fisicoquímicos determinados en cada punto y la biodiversidad encontrada.

6.2. Conclusiones generales sobre la diversidad procariota en los pozos geotermales de Copahue y el Río Agrio. Similitudes y diferencias de la biodiversidad en los sitios de muestreo del sistema geotermal Copahue-Caviahe.

Los lugares estudiados, los pozos geotermales y el Río Agrio Superior, comparten sus características ácidas, pero se diferencian en otros parámetros fisicoquímicos que tienen impacto en la biodiversidad procariota de cada sitio. En la zona de los pozos geotermales se encontraron afloramientos de diferente temperatura, desde valores moderados (30 – 35°C) hasta valores extremos cercanos a la temperatura de ebullición del agua a la presión atmosférica del lugar. En el Río Agrio, la mayor temperatura registrada fue en la naciente (29°C); al alejarse de esta zona la temperatura desciende rápidamente y se estabiliza en un valor de aproximadamente 15°C. En los pozos geotermales, la temperatura es el factor que muestra mayor influencia en la estructura de las comunidades procariotas, dividiendo los pozos analizados en dos grupos: los de temperatura moderada dominados por bacterias y los de temperatura elevada dominados por arqueas. En cambio, en el Río Agrio, Superior la estructura de las comunidades que habitan los cuatro puntos estudiados es prácticamente la misma indicando que su presencia responde principalmente al efecto de arrastre de la corriente sumado, probablemente, al crecimiento preferencial de algunas especies a lo largo del río cuando las condiciones fisicoquímicas son las adecuadas.

En ambos ambientes se destacan principalmente especies acidófilas, mesófilas o termófilas, principalmente asociadas al ciclo del azufre. En los pozos geotermales la mayoría de las especies oxidantes del azufre detectadas tienen metabolismo mixótrofo mientras que las del Río Agrio Superior son esencialmente quimiolitautótrofas.

La baja concentración de hierro soluble en el ambiente determina su bajo impacto sobre la biodiversidad. Por esa razón, en los pozos geotermales no se detectaron especies Fe oxidantes obligadas como *Leptospirillum*. En el Río Agrio, donde la concentración de hierro es algo mayor, se encontraron secuencias de *Leptospirillum* y otras especies Fe oxidantes.

En los pozos geotermales de Copahue ubicados en zonas que se utilizan para los baños medicinales, se detectaron secuencias de especies claramente relacionadas con la presencia del hombre y/o animales (*Acinetobacter*, *Stenotrophomonas*, *Masilla*). Por el contrario, en el Río

Agrio, un ambiente que se mantiene prístino, no se encontraron especies asociadas al hombre.

La comunidad de arqueas detectadas en los pozos de Copahue muestra cierta diversidad (excepto en LMi donde se encontró una única especie), conteniendo varios OTUs de los filos *Crenarchaeota* y *Euryarchaeota*, y con una fuerte presencia de especies del orden *Sulfolobales*. En el Río Agrio la comunidad de arqueas está limitada a *Ferroplasma acidiphilum* con una presencia muy minoritaria de otros OTUs de *Euryarchaeas*. En el río no se encontraron *Crenarchaeotas*.

En los pozos geotermales de Copahue, la gran mayoría de las bacterias pudieron ser clasificadas al nivel de género y, además, presentaron altos porcentajes de similitud con especies cultivadas y caracterizadas. Las arqueas, en cambio, no mostraron alta homología con especies cultivadas y, en muchos casos, tampoco con secuencias no cultivadas. Estos resultados sugieren que los pozos de alta temperatura de Copahue son un reservorio de arqueas termófilas aún no aisladas ni caracterizadas y que parecen ser exclusivas de esta región. La situación en el Río Agrio Superior es diferente: se detectaron varios OTUs de bacterias y arqueas para los cuales no se obtuvo una clasificación taxonómica precisa pero que muestran altos porcentajes de similitud con especies detectadas (aunque no necesariamente cultivadas) en otros ambientes ácidos, naturales o relacionados con la minería, en diferentes partes del mundo. En este caso, se trataría de especies aún no aisladas ni caracterizadas pero que son ubicuas de ambientes ácidos.

Tal cual muestran los resultados del presente trabajo de Tesis Doctoral, la zona geotermal de Copahue-Caviahue es un hábitat que alberga nuevas especies de microorganismos, bacterias y arqueas, acidófilos, mesófilos y/o termófilos, involucrados en el ciclo del azufre; estos microorganismos, potencialmente, podrían ser usados para desarrollar nuevos procesos biotecnológicos u optimizar los ya existentes, en particular, aquellos vinculados con la biorremediación y la biominería. Es por eso que consideramos este trabajo como un primer paso hacia el aislamiento y la caracterización de estos microorganismos extremófilos que será la dirección en la que se aplicará el esfuerzo de nuestro grupo en el futuro próximo.

A partir del presente Trabajo de Tesis Doctoral surgieron las siguientes publicaciones científicas:

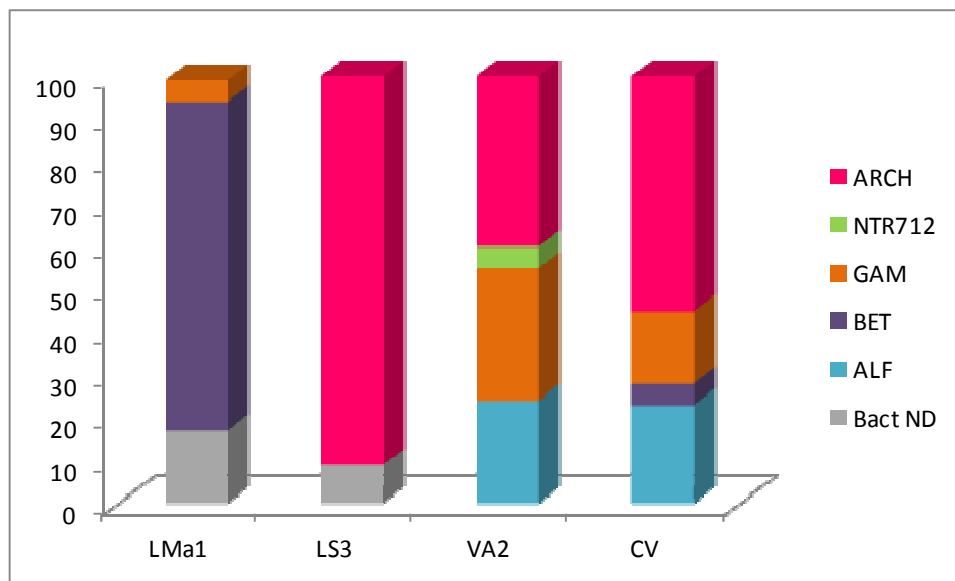
- ✓ Physiologic versatility and growth flexibility as the main characteristics of a novel thermoacidophilic *Acidianus* strain isolated from Copahue geothermal area in Argentina
Giaveno A., **Urbieta M.S.**, González Toril E., Donati E.
Microbial Ecology. 2013 65: 336-346
- ✓ First prokaryotic biodiversity assessment using molecular techniques of an acidic river in Neuquén, Argentina
Urbieta M.S., Giaveno A., González Toril E., Donati E.
Microbial Ecology. 2012 64: 91-104
- ✓ The influence of two thermophilic consortia on troilite (FeS) dissolution
Giaveno A., Pettinari G., González Toril E., Aguilera A., **Urbieta M.S.**, Donati E.
Hydrometallurgy. 2011 106: 19-25
- ✓ Digging into prokaryotic life of extreme environments: a molecular approach to bacteria and archaea biodiversity in Copahue geothermal region in Argentina and the factors driving it
Urbieta M.S., González Toril E., Giaveno A., Donati E.
En evaluación

Adenda: gráficos comparativos de la diversidad procariota en los pozos geotermales de Copahue y el Río Agrio Superior

Con el fin de comparar la biodiversidad procariota presente en los pozos geotermales de Copahue y el Río Agrio se escogieron dos puntos representativos de cada zona: la laguna LMa1, como ejemplo de ambiente geotermal de temperatura moderada, el pozo LS3 como ejemplo de ambiente geotermal de alta temperatura, el punto VA2, nacimiento del Río Agrio y el punto CV en el tramo final del Río Agrio Superior.

En la Figura 1 se muestra una comparación de la diversidad en términos de los resultados semicuantitativos obtenidos por FISH y CARD-FISH.

Figura 1. Representación gráfica de la biodiversidad en los pozos geotermales de Copahue y el Río Agrio Superior en base a los resultados obtenidos por técnicas de hibridación *in situ* (FISH y CARD-FISH)



Las Figuras 2 y 3 muestran el mismo tipo de gráficos donde se representan la diversidad en base a los resultados de secuenciación del gen ARNr 16S de bacterias y arqueas. Para la laguna LS3 no se incluyeron en la comparación los resultados de la secuenciación de la biblioteca de clones de bacterias, por representar estas un porcentaje muy bajo de la comunidad procariota del sitio (Figura 1) y, además, por tratarse de especies mayoritariamente relacionadas con la ecología del suelo y no de ambientes

termales con abundante presencia de minerales de azufre y hierro.

La Figura 2 es una representación más general de las bacterias y arqueas de cada punto según su afiliación taxonómica filo o clase. En la Figura 3 se muestra la misma información destacando los géneros de bacterias y arqueas más relevantes para la microbiología de ambas zonas.

Figura 2. Representación gráfica de la biodiversidad en los pozos geotermales de Copahue y el Río Agrio Superior en base al los resultados obtenidos por secuenciación de los genes ARNr 16S de bacterias y arqueas. Las diferentes porciones de las barras indican los filos/clases taxonómicos encontrados en cada punto.

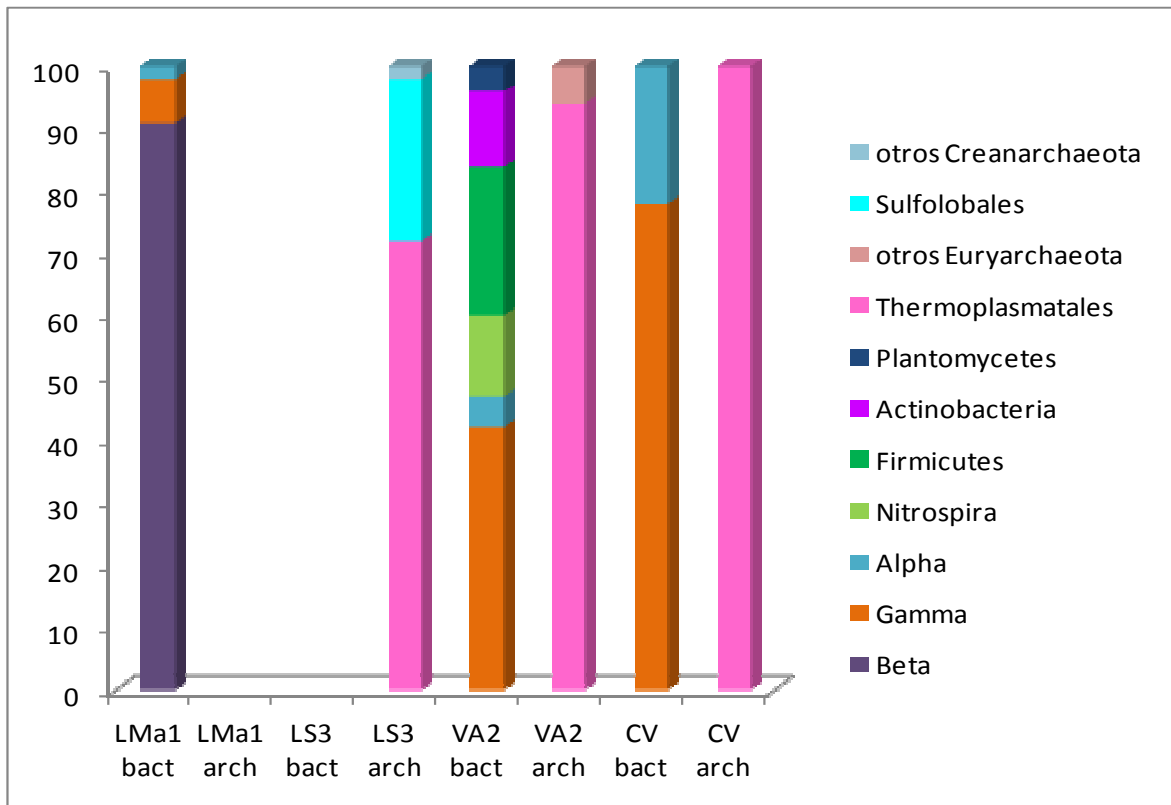
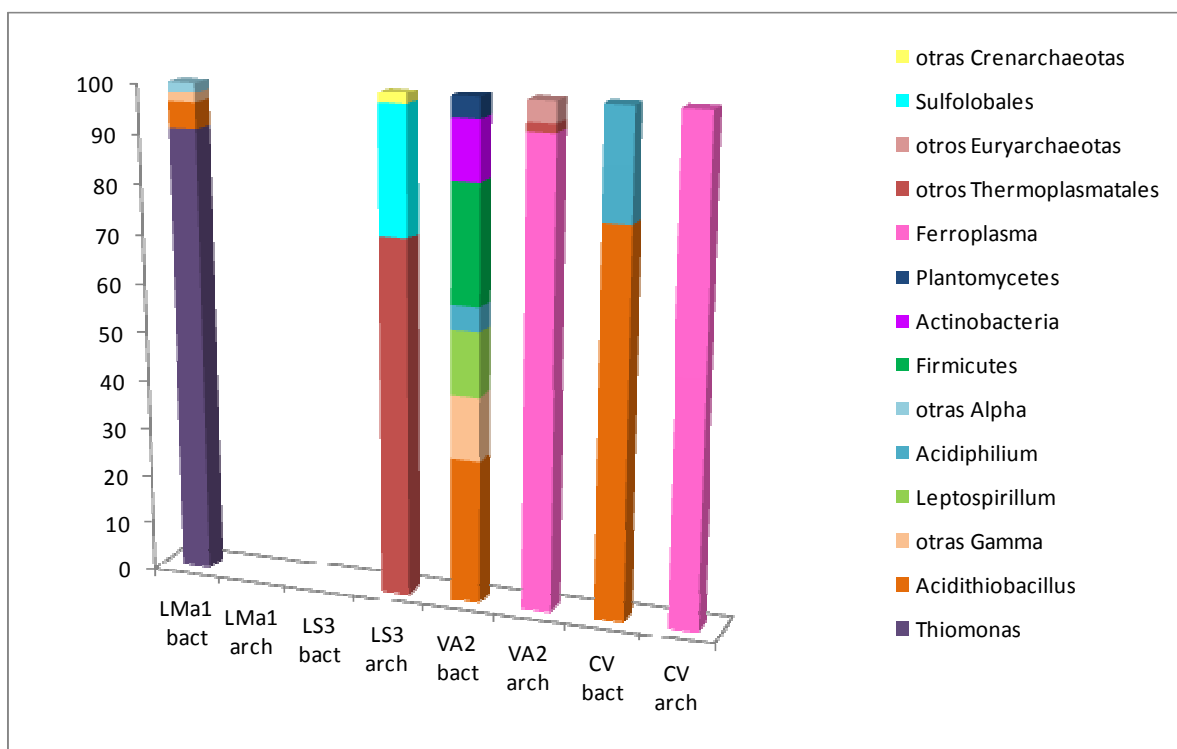


Figura 3. Representación gráfica de la biodiversidad en los pozos geotermales de Copahue y el Río Agrío Superior en base al los resultados obtenidos por secuenciación de los genes ARNr 16S de bacterias y arqueas. En este caso se muestran los géneros más representativos para la microbiología del ambiente.



Las tres figuras presentadas permiten concluir que las estructuras de las comunidades procariontas son diferentes en los pozos geotermales y en el Río Agrío. Si bien tanto en el RAS como en los pozos de alta temperatura las arqueas parecen tener un papel predominante, mucho mayor en los segundos que en el primero (Figura 1), al analizar las especies en cada sitio se ve claramente que su composición es diferente (Figuras 2 y 3). En el Río Agrío prácticamente la totalidad de las arqueas parecen estar afiliadas al género *Ferroplasma*, mientras que en los pozos de alta temperatura, en este caso representados por LS3, la comunidad de arqueas está compuesta por Thermoplasmatales y Sulfolobales.

Respecto de las bacterias, en los tres gráficos se ve claramente que las especies presentes en los pozos de temperatura moderada y en las aguas del RAS son diferentes, con fuerte dominio de betaproteobacterias, especialmente del género *Thiomonas*, en los pozos y de gamaproteobacterias, en particular del género *Acidithiobacillus*, en las aguas del RAS.