

UNIVERSIDAD DE CHILE

FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS Y FARMACÉUTICAS



“Cianofagos del sistema hidrotermal Porcelana (Región de los Lagos, Chile): diversidad, abundancia y asociación con cianobacterias termófilas de la subsección V”

Tesis presentada a la Universidad de Chile para optar al grado académico de
Magíster en Bioquímica área de especialización en Bioquímica Ambiental y Memoria
para optar al título profesional de Bioquímico por:

FABIAN ROBERTO PINTO MARCHANT

Director de Tesis: Beatriz Díez Moreno

SANTIAGO DE CHILE

2017

DEDICATORIA

Aquellos que han caminado conmigo mis años de vida, han sido participes de mis victorias y mis derrotas, alegrías y mis tristezas... esta tesis es para y gracias a ustedes

Mi familia

AGRADECIMIENTOS

Ha sido un camino arduo, lleno de aprendizajes y superaciones, mucho más que un simple trabajo. Jamás habría hecho nada de esto sin el apoyo incondicional de aquellos que han estado ahí...

En primer lugar darle gracias a mi Diosito, mi Papito que me ha cuidado desde mi primer día, y ha guiado mis pasos hasta acá, quien me ha dado el amor por entender la naturaleza y tantas cosas! Si entré a Bioquímica, solo fue por Él!

Esta tesis va completa dirigida a mi familia, mi mami, mi papi, Ariel, Martin, Francisca, son unos grandes!! Los mejores compañeros, siempre dándome ánimo, siempre con paciencia ante mis rollos con la tesis, ante todo en verdad. Nadie como ustedes!

Como no agradecer en este apartado a mi segunda mami, mi abuelita Nena, mi bebe... jamás podría pasar por alto su infinito cariño, su preocupación por que me fuera bien en la U, que llevara comida calentita, y mil cosas. Mi bebe, fuiste y seguirás siendo un pilar importantísimo para mí, gracias por compartir estos casi 10 años conmigo.

A mis grandes amigos! Que sin ellos tampoco sería nada! Isaac, Lucy, Tania, Cathy, Alexis, mi prima Coni y Vanny, Jorshua, Clau, Carlitos, Maca, Mari, Nelía, Deania, Toñito, Romi, Carito, Vania, mis Superstar! Todos ustedes siempre me han apoyado de alguna u otra forma, siempre presentes con sus palabras de aliento. Los amo!

Finalmente, agradecer a mis profes del colegio, mi gente querida que siempre confió en mi y sentó las bases de mis gustos por el saber. Cómo no destacar en especial a mi querida Luzma, mister Pedro, miss Claudia... gracias por la inspiración y el rigor que instauraron en mí.

INDICE

DEDICATORIA	II
AGRADECIMIENTOS	
ÍNDICE DE TABLAS	IV
ÍNDICE DE FIGURAS	VI
LISTADO DE ABREVIATURA	
RESUMEN	II
ABSTRACT	III
INTRODUCCIÓN	1
Cianobacterias termófilas de la subsección V (Stigonematales)	1
Cianofagos en sistemas acuáticos	2
Fagos en sistemas termales	5
HIPÓTESIS	8
OBJETIVO GENERAL	8
Objetivo específico N°1:	8
Objetivo específico N°2:	8
Objetivo específico N°3:	9
METODOLOGÍA	10
<u>Objetivo específico N°1</u>	
1.1) Obtención de concentrado viral a partir de muestra ambiental.	10
1.2) Preparación de muestras en gradiente de sacarosa.	10
1.3) Determinación de presencia y abundancia de partículas virales mediante microscopía de epifluorescencia	11
1.4) Determinación de diversidad morfológica de partículas virales mediante microscopía electrónica de transmisión (TEM).	12
<u>Objetivo específico N°2</u>	
2.1) Extracción de material genético (DNA) del concentrado viral.	12
2.2) Amplificación de marcadores moleculares con el uso de partidores previamente descritos, mediante técnica de PCR convencional.	15
2.3) Construcción de librerías de clones para cada marcador molecular.	19

2.4)	Análisis de secuencias y reconstrucción filogenética. _____	20
2.5)	Análisis <i>in silico</i> para la obtención de secuencias de marcadores moleculares a partir del metagenoma y metatranscriptoma correspondientes a la terma Porcelana, y posterior diseño de partidores. _____	21
2.6)	Identificación de secuencias virales en el metaviroma de la terma Porcelana. _____	21

Objetivo específico N°3

3.1)	Curva de crecimiento de los aislados CHP1 y CHP2 tanto en cultivo líquido como en cultivo en placa. _____	22
3.2)	Inducción de profagos con agentes promotores del estrés bacteriano. _____	23
3.3)	Caracterización de la diversidad morfológica de fagos correspondiente a los aislados CHP1 y CHP2. _____	24
3.4)	Caracterización de la diversidad genética de fagos correspondientes a los aislados CHP1 y CHP2 _____	26

RESULTADOS _____ 28

Objetivo específico N°1

1.1)	Estimación de la abundancia de partículas virales _____	28
1.2)	Determinación de morfologías virales _____	30

Objetivo específico N°2

2.1)	Extracción de material genético viral _____	36
2.2)	Amplificación de marcadores moleculares _____	38
2.3)	Construcción de librerías de clones. _____	40
2.4)	Análisis de secuencias y reconstrucción filogenéticas _____	41
2.5)	Análisis <i>in silico</i> para la obtención de secuencias de marcadores moleculares de cianofagos a partir del metagenoma y metatranscriptoma correspondientes a la terma Porcelana, y posterior diseño de partidores para genes específicos de interés. _____	43
2.6)	Identificación de secuencias virales en el metaviroma de la terma Porcelana _____	47

Objetivo específico N°3

3.1)	Crecimiento cultivo líquido y cultivo sólido de aislados de cianobacterias obtenidos de la terma Porcelana. _____	53
3.2)	Inducción de profagos con agentes promotores del estrés bacteriano. _____	56
3.3)	Caracterización de la diversidad morfológica de fagos correspondiente a los aislados CHP1 y CHP2, mediante análisis de microscopía electrónica de transmisión y epifluorescencia. _____	65
3.4)	Caracterización de la diversidad genética de fagos correspondientes a los aislados CHP1 y CHP2, mediante uso de marcadores filogenéticos y la herramienta informática PHAST. _____	70

DISCUSIÓN	81
Estimación de la abundancia de partículas virales en Porcelana	81
Determinación de diversidad morfológica viral por microscopía en Porcelana	82
Diversidad genética de cianofagos en el sistema hidrotermal de Porcelana	84
Inducción de profagos en las cepas de cianobacterias termofilas CHP1 y CHP2 con agentes promotores del estrés bacteriano y su caracterización morfológica	88
Caracterización de la diversidad genética de fagos correspondientes a los aislados CHP1 y CHP2	91
CONCLUSIONES	93
BIBLIOGRAFÍA	95
ANEXOS	101

INDICE DE TABLAS

Tabla 1: Set de partidores utilizados en este estudio.....	16
Tabla 2: Condiciones químicas para la amplificación de los marcadores moleculares presentes en las muestras.....	17
Tabla 3: Condiciones de temperatura y tiempo para las amplificaciones de los marcadores moleculares seleccionados.....	18
Tabla 4: Familias de fagos identificadas en la muestra de líquido intersticial de tapete microbiano en la terma Porcelana.....	34
Tabla 5: Extracción de DNA de concentrados virales.....	37
Tabla 6: Marcadores moleculares y set de partidores utilizados correspondientemente así como sus respectivos resultados de amplificación por PCR.....	38
Tabla 7: Número de colonias obtenidas para cada marcador molecular, y set de partidores utilizados correspondientemente.....	40
Tabla 8: Análisis de secuencias de clones con coincidencia para el gen <i>psbA</i> mediante Blastn contra la base de datos no redundante y la de Caudovirales.....	41
Tabla 9: Análisis de blastn de los marcadores <i>dnapol</i> y <i>g20</i> mediante Blastn contra la base de datos no redundante y la de caudovirales.....	43
Tabla 10: Set de partidores generados por Primer Blast y Primer 3.....	46
Tabla 11: Análisis de blastp de las secuencias (reads) rescatadas del metaviroma.....	48
Tabla 12: Curva de crecimiento e inducción para el aislado CHP1.....	54
Tabla 13: Curva de crecimiento e inducción para el aislado CHP2.....	55
Tabla 14: Diversidad de estructuras virales identificadas mediante TEM a partir del halo de lisis correspondiente a CHP1.....	66
Tabla 15: Marcadores moleculares y set de partidores utilizados correspondientemente así como sus respectivos resultados de amplificación por PCR.....	70
Tabla 16: Numero de colonias obtenidas para cada marcador molecular, y set de partidores utilizados correspondientemente.....	72
Tabla 17: Análisis de secuencias de clones representativos con coincidencia para el gen <i>psbA</i> y <i>g23</i> mediante Blastn contra la base de datos no redundante y la de Caudovirales...73	73

<u>Tabla 18:</u> Caracterización de la región de profago putativa encontrada en el genoma del aislado CHP1.....	75
<u>Tabla 19:</u> Asignación de secuencias identificadas en la región de profago putativa encontrada en CHP1 a la base de datos de PHAST.....	76
<u>Tabla 20:</u> Caracterización de la región de profago putativa encontrada en el genoma del aislado CHP2.....	78
<u>Tabla 21:</u> Asignación de secuencias identificadas en la región de profago putativa encontrada en CHP2 a la base de datos de PHAST.....	79

INDICE DE FIGURAS

Figura 1: Montaje de laminas de agarosa.....	25
Figura 2: Concentrados virales obtenidos por ultrafiltración por 30kDa y previa filtración.....	28
Figura 3: Tinción con SYBRgold de VLPs en muestra concentrado viral de líquido intersticial, interfase 30-60% gradiente sacarosa.....	29
Figura 4: Tinción con SYBRgold de VLPs en muestra concentrado viral de líquido intersticial, Fracción 60% gradiente sacarosa.....	30
Figura 5: Morfologías identificadas en muestras de líquido intersticial de la terma Porcelana, concentrado por ultracentrifugación.....	31
Figura 6: Morfologías identificadas en muestras de líquido intersticial de la terma Porcelana, concentrando mediante un gradiente discontinuo de sacarosa.....	32
Figura 7: Morfologías sin clasificación actual obtenidas en la terma Porcelana.....	33
Figura 8: Gel de integridad de los extractos de DNA obtenidos mediante los distintos protocolos y modificaciones a los mismos para la extracción de DNA.....	36
Figura 9: Imágenes en gel de agarosa correspondientes a las amplificaciones de los marcadores utilizados en este estudio.....	39
Figura 10: Reconstrucción filogenética de secuencias del gen <i>psbA</i> correspondiente a la proteína D1 de fotosistema.....	42
Figura 11: Análisis de blastn de la secuencia de consenso diseñada contra la base de datos no redundante.....	45
Figura 12: Análisis de blastn de la secuencia de consenso diseñada contra la base de datos de los Caudovirales.....	45
Figura 13: Reconstrucción filogenética de secuencias de Integrasa, utilizando el algoritmo Maximum likelihood con un bootstrap de 1000.....	52
Figura 14: Curva de crecimiento del aislado CHP1.	53
Figura 15: Curva de crecimiento del aislado CHP2.	54
Figura 16: Sistema de doble capa BG11 agar 0.5% superior- 1% inferior, de un cultivo del aislado CHP1.....	55

<u>Figura 17:</u> Aislado CHP1 sometido a shift de temperatura 30°C-50°C tras 5 días de inducción.....	56
<u>Figura 18:</u> Aislado CHP2 sometido a shift de temperatura 30°C-50°C tras 5 días de inducción.....	57
<u>Figura 19:</u> Cultivos inducidos con distintas concentraciones crecientes de CuSO ₄	57
<u>Figura 20:</u> Filamento de CHP1 inducido con 1.24e-5 M de CuSO ₄	58
<u>Figura 21:</u> Filamento de CHP1 desintegrado proveniente de cultivo inducido.....	59
<u>Figura 22:</u> Filamento de CHP1 desintegrado proveniente de cultivo control.....	60
<u>Figura 23:</u> Montaje de sistemas de desecación para el aislado CHP1 mediante uso de silica gel.....	61
<u>Figura 24:</u> Montaje de sistemas de desecación para el aislado CHP2 mediante uso de silica gel.....	62
<u>Figura 25:</u> Cultivos sólidos de doble capa BG11 agar con halos de lisis inducido.....	63
<u>Figura 26:</u> Halos de lisis en cultivos de los aislados CHP1 y CHP2.....	64
<u>Figura 27:</u> Micrografía de epifluorescencia de halo de lisis perteneciente al aislado CHP1.....	65
<u>Figura 28:</u> Micrografía de epifluorescencia de halo de lisis perteneciente al aislado CHP2.....	66
<u>Figura 29:</u> Morfologías representativas de fagos identificados en halos de lisis provenientes de cultivo inducido del aislado CHP1.....	67
<u>Figura 30:</u> Micrográficas electrónicas correspondientes al aislado CHP1.....	69
<u>Figura 31:</u> Imágenes en gel de agarosa correspondientes a las amplificaciones de los marcadores utilizados en este estudio.....	71
<u>Figura 32:</u> Región genómica correspondiente a un profago putativo incompleto (score: 50) en el genoma del aislado CHP1.....	74
<u>Figura 33:</u> Región genómica correspondiente a un profago putativo incompleto (30) en el genoma del aislado CHP2.....	77

LISTADO DE ABREVIATURAS

DNA	Acido desoxirribonucleico
Ds-DNA	Acido desoxirribonucleico de doble cadena
EDTA	Ácido etilendiaminotetraacético
RNA	Acido ribonucleico
Nr	Base de datos no redundante
Refseq	Base de datos secuencias de referencias
CTAB	Bromuro de hexadeciltrimetilamonio
dNTPs	desoxirribonucleótidos
SDS	Dodecilsulfato sódico
DGGE	Electroforesis en gel con gradiente de desnaturalización
IPTG	Isopropil- β -D-1-tiogalactopiranosido
Kb	Kilo bases
kDa	Kilo dalton
ORF	Marco de lectura abierto
LB	Medio Luria-Bertani
TEM	Microscopía electrónica de transmisión
NCBI	National Center for Biotechnology Information (Centro Nacional para Información Biotecnológica)
PHAST	Phage Search Tool
PEG	Polietilenglicol
%id	Porcentaje de identidad

MCP	Proteína principal de la cápside
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
TAE	Tris, ácido acético y EDTA
VLPs	Viral-like particles
X-GAL	5-bromo-4-cloro-3-indolil- β -D-galactopiranosido

RESUMEN

Chile en particular es uno de los países del mundo que alberga una mayor variedad de ecosistemas considerados extremos, por tener condiciones hostiles para la vida. Estas condiciones suponen un obstáculo al cual los organismos que los habitan deben sobreponerse adoptando distintas estrategias de supervivencia. Uno de estos ambientes extremos son los sistemas hidrotermales que se encuentran repartidos a lo largo de toda nuestra geografía. En muchos de los sistemas termales de todo el mundo con la característica de poseer un pH neutro o alcalino, se ha descrito a las cianobacterias de la subsección V (Stigonematales) como uno de los principales organismos que impactan los ciclos biogeoquímicos sobre todo del carbono y nitrógeno. La adaptación a las altas temperaturas de este grupo tan relevante de microorganismos en estos sistemas no ha sido todavía muy estudiada. Una de las posibles causas que hasta la fecha no ha sido explorada, y que podría explicar esta adaptación, es el efecto positivo de su asociación con cianofagos, virus de DNA de doble hebra que las infectan. En otros ecosistemas acuáticos como el marino, se ha sugerido que la interacción cianofago-cianobacteria implica una marcada co-evolución por parte de ambos, lo que tiene un impacto ecológico preponderante. En ambientes marinos los cianofagos han sido estudiados tanto morfológica como filogenéticamente utilizando diversos marcadores moleculares y métodos de observación, mientras que estas metodologías no se han aplicado en relación a la caracterización de cianofagos en sistemas hidrotermales.

Debido a este vacío en la literatura en relación a los cianofagos de sistemas termales, es que en el presente proyecto se plantea caracterizar la diversidad tanto morfológica como filogenética de cianofagos presentes tanto en muestras naturales como en aislados en cultivo de cianobacterias del sistema hidrotermal de Porcelana, localizado ($42^{\circ} 27' 29.1''\text{S} - 72^{\circ} 27' 39.3''\text{O}$) en la Patagonia norte de Chile (X Región de los Lagos). En este sistema termal prístino, se ha identificado la presencia (Mackenzie et al. 2013) y aislado en cultivo (Alcamán et al. 2017) de cianobacterias de la subsección V. Los miembros de este grupo son dominantes en los tapetes microbianos a temperaturas entre 40°C y 60°C en este sistema. Se llevarán a cabo análisis morfológicos y estructurales

mediante microscopía electrónica (TEM), así como análisis basados en marcadores genéticos como el gen *g20* (correspondiente a una proteína de ensamblaje de la cápside viral), *psbA* (gen de proteína de fotosistema), *g23* (codifica para MCP, proteína mayor de la cápside), *dnapol* (DNA polimerasa), entre otros; análisis de secuencias encontradas en los metagenomas, metatranscriptoma y metaviroma, y en el genoma de los aislados para la detección de profagos. Los resultados que se obtengan en este estudio particular en la terma Porcelana se espera proporcionen la primera información que ayude a identificar los principales cianofagos asociados a cianobacterias termófilas de la subsección V, ayudando así a dilucidar su rol ecológico en este sistema y quizás en muchos otros sistemas termales similares a este repartidos por todo el mundo.

ABSTRACT

Chile in particular is one of the countries in the world that shelters a greater variety of ecosystems considered extreme, because of their hostile conditions to life. These conditions constitute an obstacle to which the organisms that inhabit them must overcome by adopting different strategies of survival. One of these extreme environments are hydrothermal systems that are distributed throughout our geography. In many of the thermal systems of the world with the characteristic of having a neutral or alkaline pH, subsection V cyanobacteria (Stigonematales) have been described as one of the main organisms impacting the biogeochemical cycles, especially carbon and nitrogen. The adaptation to the high temperatures of this group of relevant microorganisms in these systems has not yet been studied. One of the possible causes that until now has not been explored, and which could explain this adaptation is the positive effect of its association with cyanophages, double-stranded DNA viruses that infect them. In other aquatic ecosystems such as the marine, it has been suggested that the cyanophage-cyanobacteria interaction implies a marked co-evolution, which has a preponderant ecological impact. In marine environments, cyanophages have been studied both morphologically and phylogenetically using different molecular markers and observation methods, whereas these methodologies have not been applied in relation to the characterization of cyanophages in hydrothermal systems.

The lack of information in the literature regarding on cyanophages of thermal systems, the present project aims to characterize the morphological and genetic diversity of cyanophages present in both natural and cyanobacterial culture isolates of the Porcelana hydrothermal system, located (42° 27 '29.1"S - 72° 27 '39.3"O) in the northern Patagonia of Chile (X Region de los Lagos). In this pristine thermal system, the presence (Mackenzie et al. 2013) and isolated in culture (Alcamán et al. 2017) of subsection V was identified. The members of this group are dominant in the microbial mats at temperatures between 40°C And 60°C in this system. Morphological and structural analyzes will be performed using electron microscopy (TEM), as well as analyzes based on genetic markers such as the *g20* gene (corresponding to a viral capsid assembly protein), *psbA* (photosystem protein gene), *g23* (Major capsid protein), *dnapol* (DNA polymerase), among others; analysis of sequences found in metagenomes, metatranscriptome and metavirome, and in the genome of the isolates for the detection of prophages. The results obtained in this particular study in the Porcelana termal system are expected to provide the first information that will help to identify the main cyanophages associated to thermophilic cyanobacteria of subsection V, helping to elucidate their ecological role in this system and perhaps in many other thermal systems similar to this one, spread all over the world.

INTRODUCCIÓN

Los diversos ecosistemas del planeta se encuentran habitados por una enorme variedad de microorganismos, que por lo general son dependientes de las condiciones ambientales de cada uno de estos ecosistemas, tales como temperatura, humedad, salinidad, pH, entre otros factores. Dichas condiciones pueden fluctuar en el tiempo, generando cambios a los cuales los respectivos organismos se deben sobreponer, utilizando diferentes estrategias de adaptación. En particular, los ecosistemas denominados “extremos”, caracterizados por tener condiciones que se definen como difíciles para la vida, promueven la presencia de microorganismos llamados “extremófilos”, los cuales han adaptado su fenotipo y genotipo para vivir y ser competitivos en estos ambientes.

Las cianobacterias son organismos procariotas que han tenido una implicancia muy significativa en la evolución de los ecosistemas tanto acuáticos como terrestres. Estos microorganismos son considerados como los principales productores primarios con capacidad fotosintética que repletaron de oxígeno la atmósfera terrestre hace 2500 millones de años, impactando desde entonces en los ciclos biogeoquímicos de los ambientes en los que habitan.

En particular, algunas cianobacterias habitan exitosamente en ambientes extremos, tales como los sistemas hidrotermales, por lo que algunos de sus miembros pueden considerarse extremófilos.

Cianobacterias termófilas de la subsección V (Stigonematales)

En los tapetes microbianos de sistemas hidrotermales no ácidos de todo el mundo, se ha encontrado que miembros de las cianobacterias pertenecientes a la subsección V (orden Stigonematales), las cuales tienen capacidad de fijar nitrógeno atmosférico y realizar división multiplanar (Rippka et al. 1978), son un componente dominante junto con otras bacterias y arqueas termófilas (Vieille et al. 2001). Dentro de la estratificación de estos tapetes, las cianobacterias forman parte de la fracción oxigénica, cuya versatilidad

metabólica les permite llevar a cabo procesos de fotosíntesis, respiración aeróbica y fijación de nitrógeno principalmente (Stal, L.J. et al. 2007). Las cianobacterias correspondientes a esta subsección se caracterizan por presentar ramificaciones a lo largo de todo el filamento, cuyas células vegetativas tienen la potencialidad adaptativa de diferenciarse a tres estados celulares diferentes según las condiciones ambientales, uno de los cuales consiste en la formación de células especializadas para la fijación de nitrógeno llamadas heterocistos (Nierzwicki-bauer, S et al. 1984). En particular, los géneros *Mastigocladus* y *Fischerella* han sido los más reportados en estos sistemas, aunque todavía nuestro conocimiento sobre ellos es limitado (Khumanthem, N. et al. 2007, Gugger, M.F. et al. 2004). Estas cianobacterias son consideradas termófilas, ya que se las encuentra entre los 40°C y los 60°C (Ward, D.M. et al. 2000, Lau et al. 2005).

Asimismo, estudios realizados por Alcamán y colaboradores (Alcamán et al. 2015), han corroborado el potencial rol biológico de las cianobacterias de la subsección V, en particular el género *Mastigocladus*, en cuanto a la activa fijación de nitrógeno, en un sistema termal no ácido representativo de nuestro país, reafirmando la predominancia de este género en dicho sistema. Así como la presencia de estos microorganismos es fundamental para el ecosistema termal, la regulación de su ciclo de vida y biomasa son aspectos igualmente importantes en todos los sistemas reportados. A la fecha aún no se sabe cómo es que se regulan, aspecto fundamental para el conocimiento íntegro de estos ecosistemas termales.

Cianofagos en sistemas acuáticos

Los cianofagos son virus de DNA de doble hebra (ds-DNA) de tamaño promedio entre 20-200 nm de largo, con capacidad de infectar cianobacterias. Como todos los tipos de virus, no poseen una maquinaria metabólica intrínseca, por lo que utilizan la correspondiente al hospedero que han infectado. Los cianofagos infectan y establecen una asociación con las cianobacterias mediante distintos tipos de mecanismos reproductivos: (1) el ciclo lítico a través de la unión del fago a la célula hospedera, previo a la inyección del material genético al citoplasma celular donde la maquinaria metabólica promueve la

formación de nuevas partículas virales; (2) el ciclo lisogénico, donde el genoma viral se integra al genoma cianobacteriano, denominándose profago, y se replica con él; y (3) la pseudolisogenia, donde el material genético viral puede permanecer latente e inactivo transcripcionalmente en el citoplasma sin integrarse, antes de que la lisis celular ocurra. Según el tipo de ciclo vital correspondiente, dichos fagos serán inducidos a proliferar y lisarán finalmente la célula, liberando su contenido citoplasmático al medio.

Específicamente con respecto a la lisogenia, se ha reportado previamente que este tipo de asociación se caracteriza por potenciar el fitness biológico de los hospederos que alguna vez infectaron (Edlin et al. 1975), y asegurar de esta manera la supervivencia del profago frente a alguna posible amenaza ambiental o factor inactivante (Wommack et al. 2000). Así, la detección de estas partículas profágicas se ha logrado con el uso de distintos agentes inductores del estrés celular. Su uso induce la liberación del profago desde el genoma celular. Investigaciones previas han demostrado que agentes tales como la radiación ultravioleta, sulfato de cobre, estrés por temperatura, algunos antibióticos como mitomicina c, entre otros, inducen la liberación de profagos de sus hospederos, generando lisis en ellos (Barnhart et al. 1976, Ortmann et al. 2002, Marei et al. 2013, Tin-Chun Chu et al. 2009). Esto tiene una relevancia sustancial dado que se ha reportado que la lisogenia se presenta bajo condiciones desfavorables para el rápido crecimiento vegetativo del hospedero. Dichas condiciones determinan generalmente una baja abundancia de hospederos y de tasas de crecimiento por lo que la probabilidad de encontrar un hospedero y generar una infección lítica es muy baja.

Así los fagos, mediante sus mecanismos de infección, pueden ejercer un control significativo en el microbioma del hábitat donde infectan, incidiendo en la producción de materia orgánica, transferencia de energía, y en la composición de las especies del ecosistema (Mann and Clokie, 2012).

Dada la relevancia de las cianobacterias en los ambientes acuáticos, cabe destacar asimismo que su ciclo de vida se ve fuertemente influenciado por la presencia de cianofagos, cuya implicancia en su dinámica ecológica solo ha comenzado a ser estudiada

en las últimas décadas (Clokje, M. et al. 2006). Los primeros reportes que hablan acerca de la abundancia de cianofagos en sistemas acuáticos, estiman aproximadamente la presencia de 10^{10} virus por litro de agua superficial, si bien existen variaciones entre lugares como el mar abierto, lagos eutroficados y aguas costeras. Hoy se sabe que los cianofagos tienen influencia directa en la disposición de nutrientes, tasa de oxígeno, distribución de tamaños de partículas, biodiversidad algal y bacteriana, distribución de especies, control de floración de biomasa, formación de dimetil sulfuro, y transferencia horizontal de genes (Fuhrman 1999; Singh et al. 2012). En particular, los cianofagos del ecosistema marino han sido los más estudiados, demostrando no solo su abundancia en el plancton marino sino también su significancia en la regulación de los procesos vitales de cianobacterias marinas predominantes en los océanos tales como *Prochlorococcus* y *Synechococcus* (Chen et al. 2009, Lu et al. 2001, Wang et al. 2011). Tras demostrada la importancia de estos cianofagos en el equilibrio del ecosistema, muchos estudios han surgido para dilucidar su morfología, taxonomía y biodiversidad. De esta forma se ha descrito que morfológicamente poseen cabeza y cola, estructura característica de los bacteriófagos. Así, estos cianofagos han sido clasificados taxonómicamente según el criterio estructural, en tres diferentes familias: i) *Myoviridae*, la cual incluye fagos compuestos de un cuello angosto central y cola contráctil, similares a los bacteriófagos T4; ii) *Podoviridae*, que contempla fagos con colas cortas, similares a bacteriófagos T7; y iii) *Syphoviridae*, la cual posee fagos de colas largas no contráctiles, similares al fago Lambda (Safferman et al. 1983, Suttle 2000). Los cianofagos pertenecientes a la familia de los *Myoviridae* parece ser la más abundante en los océanos (Angly et al. 2006) y tiene un amplio rango de hospederos a diferencia de aquellos relativos a la familia *Podoviridae* que tiene hospederos específicos (Suttle, C.A. et al. 1993; Lu et al. 2001). Estos análisis taxonómicos han sido suplementados con estudios metagenómicos, donde por ejemplo, se han identificado patrones biogeográficos de cianofagos marinos que infectan algunas especies del género *Synechococcus* (Marston et al. 2013). En este trabajo se compararon diversas comunidades en base a aislados de cianofagos utilizando genes conservados, permitiendo el diseño de partidores que pueden ser usados para evaluar la diversidad genética de un grupo específico de fagos en su ambiente natural, como por ejemplo el gen de la DNA polimerasa (Chen, F. et al. 2002, Breitbart, M. et al. 2004), genes de proteínas estructurales de la cápside vírica tales como

g20 (proteína de ensamblaje) y *g23* (proteína principal de la cápside) (Fuller et al. 1998), y genes característicos de los fotosistemas, como *psbA* y *psbD* (Sullivan et al. 2006; Chenard, C. et al. 2008).

Hoy en día los análisis metagenómicos son de gran utilidad para el estudio de la enorme gama de entidades biológicas existentes en el planeta, tanto fagos como microorganismos no cultivables. Estos estudios han mostrado que sólo entre un 1% y 15% de los microorganismos conocidos son cultivables bajo condiciones de laboratorio, por lo que más del 85% aún no han sido estudiados (Singh et al. 2009). Dichos análisis han posibilitado el acceso a la información del material genético ambiental, que involucra al microbioma completo del ecosistema. A partir de esto ha sido posible reconocer secuencias virales que pueden estar en asociación con microorganismos de un determinado ecosistema, pudiéndose así estimar una caracterización genética más adecuada de los fagos presentes en el sistema.

Fagos en sistemas termales

Varios estudios han caracterizado la diversidad y morfología de fagos en ambientes termales de todo el mundo, predominantemente aquellos que infectan arqueas o bacterias hipertermófilas (Yu, M. et al. 2006, Rice et al. 2001; Rachel et al. 2002, Redder et al. 2009). A modo de ejemplo, análisis de microscopía electrónica en muestras obtenidas del Parque Nacional Yellowstone (USA), han logrado caracterizar morfológicamente los fagos más abundantes en algunos de estos ecosistemas. Estos se clasificaron en 3 familias diferentes: i) *Fuselloviridae*, con estructura en forma de huso oval que infecta arqueas hipertermoacidófilas del género *Sulfolobus*; ii) *Lipothrixviridae*, de estructura filamentosa, como el fago TTV2, que infecta a arqueas del género *Thermoproteus*; y finalmente iii) *Rodoviridae*, fagos tubulares como por ejemplo SIRV1 y SIRV2 que infectan arqueas de los géneros *Acidianus* y *Sulfolobus* (Rachel, R. et al. 2002). Asimismo, algunos estudios han caracterizado la diversidad genética de virus de bacterias y arqueas previamente descritos en sistemas termales, gracias a la aproximación metagenómica (Inskeep et al. 2010; Bolduc et al. 2012), construcción de librerías de clones (Wiedenheft et al. 2004;

Zhong et al. 2002; Redder et al. 2009) o bien fingerprinting mediante electroforesis en geles de gradiente denaturante (DGGE) (Wilson et al. 1999). Por otro lado, también ha sido descrito el rango de hospederos y capacidad infectiva de alguno de estos fagos termófilos (Lu et al. 2001).

Si bien actualmente se sabe bastante acerca de fagos termales que infectan arqueas y bacterias termófilas, no existen a la fecha estudios en relación a cianofagos termófilos presentes en sistemas hidrotermales. Este vacío de información en la literatura respecto a la identidad e importancia ecológica de cianofagos en estos sistemas donde cianobacterias son predominantes, nos ha motivado para llevar a cabo este estudio. En particular, Chile presenta gran actividad volcánica a lo largo de su territorio, ofreciendo una gran oportunidad para acceder e investigar sistemas hidrotermales. Como sistema modelo, en nuestro estudio hemos elegido el sistema hidrotermal de Porcelana, localizado ($42^{\circ} 27' 29.1''\text{S} - 72^{\circ} 27' 39.3''\text{O}$) en la Patagonia norte de Chile (X Región de los Lagos). De acuerdo a muestreos realizados previamente por el laboratorio de la Dra. Beatriz Díez en este sistema termal prístino, se identificó la presencia de representantes de cianobacterias diazótroficas de la subsección V (Mackenzie et al. 2013). Los miembros de este grupo son dominantes en los tapetes microbianos a temperaturas entre 40 y 60°C en este sistema, donde contribuyen de manera muy significativa al ciclo del carbono y del nitrógeno (Alcamán et al. 2015). En el laboratorio de la Dra. Díez se cuenta actualmente con los aislados CHP1 y CHP2 perteneciente a la subsección V tentativamente identificados como del género *Mastigocladus* que es dominante en la terma Porcelana de donde se aislaron, y sus genomas secuenciados y ensamblados a nivel de contigs. Además, se cuenta actualmente con el metagenoma, el metatranscriptoma y el metaviroma de la terma, los cuales están disponibles para su análisis.

En este proyecto se estudiarán tanto los cianofagos presentes en muestras naturales como en aislados como el CHP1. Se llevarán a cabo análisis morfológicos y estructurales mediante microscopía electrónica (TEM), así como análisis basados en marcadores genéticos como el gen *g20* (correspondiente a una proteína de ensamblaje de la cápside viral), *psbA* (gen de proteína de fotosistema), *g23* (gen de proteína mayor de la cápside,

MCP), *dnapol* (DNA polimerasa), entre otros; análisis de secuencias encontradas en los metagenomas, metatranscriptoma y metaviroma, y en el genoma de los aislados para la detección de profagos. Los resultados obtenidos en este estudio se espera proporcionen la información para identificar los principales cianofagos presentes en estas termas y en particular aquellos asociados a cianobacterias de la subsección V, ayudando así a dilucidar su rol ecológico en este sistema.

HIPÓTESIS

«Existen cianofagos asociados a cianobacterias termófilas de la subsección V en el sistema hidrotermal de Porcelana».

OBJETIVO GENERAL

Identificar y caracterizar cianofagos asociados a cianobacterias termófilas de la subsección V del sistema hidrotermal Porcelana.

Objetivo específico N°1:

Estimar la abundancia y diversidad morfológica de cianofagos en el sistema hidrotermal de Porcelana.

- i. Obtención de concentrado viral mediante sistema de filtración de flujo tangencial.
- ii. Preparación de muestras en gradiente de sacarosa.
- iii. Determinación de presencia y abundancia de partículas virales mediante microscopía de epifluorescencia.
- iv. Determinación de diversidad morfológica de partículas virales mediante microscopía electrónica de transmisión (TEM).

Objetivo específico N°2:

Estimar la diversidad genética de cianofagos en el sistema hidrotermal de Porcelana.

- i. Extracción de material genético (DNA) del concentrado viral.
- ii. Amplificación de marcadores moleculares, con el uso de partidores previamente descritos, mediante técnica de PCR convencional.
- iii. Construcción de librerías de clones para cada marcador molecular.
- iv. Análisis de secuencias y reconstrucción filogenética.

- v. Análisis *in silico* para la obtención de secuencias de marcadores moleculares a partir del metagenoma y metatranscriptoma correspondientes a la terma Porcelana, y posterior diseño de partidores.
- vi. Identificación de secuencias virales en el metaviroma de la terma Porcelana.

Objetivo específico N°3:

Caracterizar cianofagos asociados a cianobacterias termófilas de la subsección V aisladas de la terma Porcelana.

- i. Crecimiento de aislados CHP1 y CHP2 tanto en cultivo líquido como en cultivo en placa.
- ii. Inducción de profagos con agentes promotores del estrés bacteriano.
- iii. Caracterización de la diversidad morfológica de fagos correspondientes a los aislados CHP1 y CHP2, mediante análisis de microscopía electrónica de transmisión y epifluorescencia.
- iv. Caracterización de la diversidad genética de fagos correspondientes a los aislados CHP1 y CHP2, mediante uso de marcadores filogenéticos y la herramienta informática PHAST.

METODOLOGIA

Objetivo 1

1.1) Obtención de concentrado viral a partir de muestra ambiental.

Las muestras utilizadas en este estudio fueron obtenidas del sistema hidrotermal Porcelana, recolectándose 2 litros de líquido intersticial de tapete microbiano en un gradiente de temperatura de 42°C a 62°C, los que fueron almacenados en bidones de plástico y llevados a laboratorio para posteriores análisis. Posteriormente, las muestras fueron inicialmente prefiltradas por filtros de 1,2 µm, 0,8 µm y de 0,4 µm, con el fin de descartar la mayor cantidad de microorganismos mayores a esos tamaños y así obtener la mayor cantidad de virus posible en la fracción final. Luego fueron concentradas mediante un sistema de filtración de flujo tangencial Vivaflow 200 de 30kD, hasta un volumen final de 75 mL. Este concentrado, enriquecido en la fracción viral, fue tratado con DNAsa para eliminar el DNA ambiental. Para esto se incubaron las muestras con DNAsa 3U/mL durante 45 min. a 37°C, con agitación suavemente de vez en cuando. Posteriormente se inactivó la DNAsa incubando las muestras a 65°C durante 45 min. más.

1.2) Preparación de muestras en gradiente de sacarosa.

Como método alternativo para la obtención de concentrados virales, las muestras fueron sometidas a un gradiente discontinuo de sacarosa. Para esto se prepararon gradientes discontinuos de sacarosa a concentraciones de 10%-30%-60% en buffer SM prefiltrado por un filtro de 0,22 µm (50 mM Tris-HCl pH 7,5, 100 mM NaCl, 8 mM MgSO₄) en tubos de policarbonato Beckman Coulter para ultracentrífuga con rotor vertical SWTi. Luego de contrarrestar los pesos de cada tubo con las mismas muestras a la centésima, se llevó a Ultracentrifugación por 120000 g (34.000 rpm según radio del rotor) durante 3,5 h. a 4°C. Finalmente se recuperó cada fracción obtenida y se almacenaron a 4°C en oscuridad para posteriores análisis.

A partir de las muestras tratadas se realizaron microscopías de epifluorescencia y de transmisión electrónica (TEM) para identificar presencia, abundancia y diversidad morfológica.

1.3) Determinación de presencia y abundancia de partículas virales mediante microscopía de epifluorescencia

Para la microscopía de epifluorescencia se procedió según el protocolo descrito por Noble y Fuhrman (1998) con algunas modificaciones. Inicialmente se procedió a fijar las respectivas muestras a visualizar con para-formaldehído a una concentración final de 4%, y luego se dejó incubar durante 30 minutos a 4°C en oscuridad. A continuación se procedió a montar la muestra fijada sobre un sistema de filtración en el cual se dispuso un filtro Anodisc de 25 mm de 0,02 μm de poro. Tras haber filtrado la muestra, el filtro se dispuso en un placa de Petri y se tiñó durante 15 min en oscuridad a temperatura ambiente con 2,5 uL de Sybr-gold al 10% (a partir de un stock comercial de 10000x) y 97,5 uL de agua mQ filtrada. Posteriormente se secó cuidadosamente el filtro por debajo de este suavemente con papel adsorbente y se colocó sobre un portaobjeto. Luego se añadió sobre el filtro una pequeña gota de Citifluor AF-1, y se colocó encima un cubreobjetos bien presionado con el fin de que no se formaran burbujas que impidieran la visualización homogénea de la muestra.

El conteo de VLPs mediante microscopía de epifluorescencia se realizó con la colaboración del laboratorio del Dr. Fernando Santos en la Universidad de Alicante, España. Para el conteo de VLPs, primeramente se acopló al microscopio de epifluorescencia un portaobjeto calibrado con una regla micrométrica. Posteriormente se tomó una fotografía de dicha regla con la cámara acoplada al microscopio. Se procedió a insertar la imagen de ésta a un archivo PowerPoint como fondo de diapositiva y a partir de ésta se generó una cuadrícula micrométrica. Se procedió a tomar fotos de las muestras teñidas con los mismos parámetros de escala y amplificación usadas al tomar la foto del portaobjetos graduado. Posteriormente las imágenes fueron insertadas en Powerpoint como fondo de diapositiva y luego se incorporó la cuadrícula generada. Tras esto, se realizó el recuento de VLPs dentro de esa cuadrícula, y se extrapolaron la cantidad de VLPs en esa área, al área del filtro. Posteriormente, conociendo el volumen filtrado de muestra (500 μL), se hizo el cálculo de VLPs/mL.

1.4) Determinación de diversidad morfológica de partículas virales mediante microscopía electrónica de transmisión (TEM).

Para microscopía de transmisión electrónica (TEM), se tomaron 3 mL de muestra, las cuales fueron inicialmente centrifugadas a 15000 g durante 40 min. para eliminar restos celulares, entre otros contaminantes. Posteriormente, se recolectó el sobrenadante respectivo y se trasvasijaron a tubos de policarbonato Beckman Courter para ultracentrífuga de rotor SWYTi. Luego se equipararon los pesos de cada tubo con las mismas muestras a la centésima y se llevó a ultracentrifugación por 160000 g durante 3 h. a 4°C. A continuación, se descartó gran parte del sobrenadante, rescatando el pellet enriquecido en VLPs. La resuspensión del pellet se recolectó en tubos eppendorf de 0,2 mL correspondientemente.

Para el caso de las fracciones de gradiente de sacarosa obtenidas, se extrajo el volumen necesario para cargar directamente a la grilla utilizada para microscopía.

Para el montaje de la muestra líquida, 15 µL de cada suspensión se dispuso sobre una grilla de cobre cubierta con film de formvar y carbón. Se dejó por 60 seg. y se escurrió el exceso con papel filtro Whatman #1. Se agregó 15 µL de acetato de uranilo 1% acuoso, se dejó por 1 min. y se escurrió con papel filtro. Se dejó secar al aire durante 30 min. y se observó en un microscopio electrónico de transmisión Philips Tecnai 12 a 80 kV. Las imágenes fueron obtenidas con una cámara ccd Megaview G2 (Olympus-Sis).

Objetivo 2

2.1) Extracción de material genético (DNA) del concentrado viral.

Para la extracción de material genético proveniente del concentrado viral, se llevó a cabo varios métodos con el fin de evaluar cuál era óptimo para dicho fin.

2.1.1) Extracción de DNA viral según el método descrito por Chen et al. (2009)

A partir del concentrado viral obtenido, se tomaron 100 μ L de cada una para la extracción de DNA. Las muestras fueron centrifugadas a 15000 g durante 30 min, se rescató el sobrenadante (aproximadamente 95 μ L) y se le agregó 1 volumen de polietilenglicol (PEG) 8000 al 20% m/v a cada muestra. Luego, la mezcla se centrifugó a 15000 g durante 1 h. El precipitado viral obtenido finalmente fue resuspendido en 100 μ L de buffer SM (10 mM NaCl, 50 mM Tris, 10 mM MgSO₄) y almacenado a 4°C. Para la extracción de DNA del precipitado viral, se llevó 20 μ L a ebullición durante 5 min. y esto fue usado como templado para posteriores amplificaciones.

2.1.2) Extracción de DNA mediante el uso de Purelink viral DNA/RNA minikit.

Para la extracción de material genético de las partículas virales se utilizó como posible estrategia el uso del kit comercial Purelink viral DNA/RNA minikit (Invitrogen) el cual utiliza columnas de sílica para la retención de DNA.

2.1.3) Extracción de DNA mediante protocolo modificado en laboratorio.

Se recuperó 1 mL de concentrado viral o muestra a tratar, y tras llevar luego a un tubo de 2 mL, se agregó 500 μ L de buffer de lisis (0,5% SDS, 200 μ g/mL de proteinasa k). Tras un periodo de incubación de 1 h. a 55° C se procedió a añadir 80 μ L de NaCl 5M y 150 μ L de buffer CTAB (2% p/v CTAB, 1,4M NaCl, 20mM EDTA, 100mM Tris-HCl) precalentado a 60°C. La mezcla se incubó durante 15 min a 60°C y luego se dividió en 2 tubos de 2 mL (865 μ L) y se agregó 1 volumen de cloroformo. Se agitó con vortex suave y se centrifugó por 5 min. a 12000 g. Posteriormente el sobrenadante se transfirió a un tubo nuevo, tras lo cual el DNA se encontrará en el sobrenadante. Desde este punto se procedió a tratar las muestras mediante la utilización de trizol, y por otro lado usando fenol-cloroformo:

2.1.3.1) Método con trizol.

Al sobrenadante, se agregó 1 mL de TRIZOL, y se agitó vigorosamente durante 15 seg. Posteriormente, se incubó a temperatura ambiente por 2 a 3 min. y se centrifugó a 4°C durante 15 min. a 12000 g. El sobrenadante obtenido se descartó, pero se recuperó la interfase y la fase orgánica, en la cual se encuentra el material genético. Sobre ésta última, se agregó 400 µL de etanol al 100% por cada mililitro de TRIZOL y se mezcló por inversión varias veces. Luego, las muestras fueron incubadas por 5 min. a temperatura ambiente y se centrifugaron a 12000 g durante 15 min. más a 4°C. La fase superior obtenida en este fraccionamiento se eliminó y luego se lavó la fase inferior con 1 mL de solución de citrato de sodio/etanol (0,1 M citrato de sodio en 10% etanol, pH 8,5) por cada mililitro de TRIZOL, mezcla que se dejó incubar 30 min. a temperatura ambiente mezclando ocasionalmente por inversión. Posteriormente, se centrifugó a 12000 g por 5 min. a 4°C y se repitió el lavado del pellet. Luego, se agregó 1,5 mL de etanol 75% por cada mL de TRIZOL y nuevamente se incubó por 20 min. a temperatura ambiente mezclando ocasionalmente por inversión. Enseguida se centrifugó nuevamente a 12000 g por 5 min. a 4°C y después el pellet se dejó secar al aire durante 5 min. A continuación el pellet se resuspendió en 30 µL de NaOH 8 mM, removiendo cualquier partícula insoluble por centrifugación a 12000 g por 10 min. a 4°C. Finalmente se procedió a cuantificar mediante Nanodrop, revisar su integridad en gel, y almacenar a -20°C.

2.1.3.2) Método con Fenol/cloroformo.

Al material genético obtenido en el sobrenadante de los pasos previos, se añadió un volumen de fenol-cloroformo y se procedió a mezclar por inversión y centrifugar por 5 min. a 12.000 g. Luego el sobrenadante se transfirió a un tubo nuevo donde se añadió 1 volumen de cloroformo y, tras mezclarse por inversión, se centrifugó bajo las mismas condiciones anteriores. Luego, se transfirió el sobrenadante a un tubo nuevo de 1,5 mL. Y ahí, se añadió 0,7 volúmenes (420 µL) de isopropanol e incubó a -20°C por 2 h. u overnight. Tras este tiempo, se centrifugó la mezcla por 15 min. a 12.000 g por 4°C para obtener el pellet de DNA. En este punto se procedió a la purificación del material genético mediante tres métodos diferentes con el fin de evaluar el mejor procedimiento usando i) una columna de concentración y limpieza de DNA ZymoResearch; ii) una columna de extracción de ácidos nucleicos virales Invitrogen; y por último, iii) sin la ayuda de una columna. En este último caso, se descartó el sobrenadante y se lavó el pellet dos veces con 200 µL de etanol frío al 70% para eliminar restos de sales, para luego secar el pellet de DNA y finalmente resuspenderlo con 30 µL de agua sin nucleasas o buffer TE (10 mM Tris-Cl; 1 mM EDTA) durante al menos 5 min. Por último, se procedió a cuantificar mediante Nanodrop, revisar su integridad en gel de agarosa, y almacenar a -20°C.

2.2) Amplificación de marcadores moleculares con el uso de partidores previamente descritos, mediante técnica de PCR convencional.

La caracterización genética se procedió a realizar en base a los marcadores moleculares *psbA*, *dnapol*, *g23* y *g20*. En la tabla 1 aparecen los genes marcadores elegidos y el set de partidores utilizados para cada amplificación.

Tabla 1: Set de partidores utilizados en este estudio

Gen	Primer	Secuencia	Amplicón	Familia	Referencia
<i>g20</i>	CPS 1 F	(5"-GTAGWATTTTCTACATTGAYGTTGG-3")	592 pb	Myoviridae	Zhong et al. 2002
	CPS 8 R	(5"-AAATAYTTDCCAACAWATGGA-3")			
	CPS 2 R	(5'-GGTA[G/A]CCAGAAATC[C/T]TC[C/A]A GCAT-3')			Sullivan et al. 2008
	CPS 1.1	5'-GTAGWATWTTYTAYATTGAYG TWGG-3'			
	CPS 8.1	5'-ARTAYTTDCCDAYRWAWGGW TC-3'			
<i>psbA</i>	psbA-F	(5'-GTN GAY ATH GAY GGN ATH MGN GAR CC-3')	795 pb	Myoviridae/Podoviridae	Zeidner et al. 2003
	psbA-R	(5'-GGR AAR TTR TGN GCR TTN CKY TCR TGC-3')			
<i>mcp</i>	MCPF5	(5 -GTT CCT GGC ACA CCT GAA GCG T-3)	350 pb	Myoviridae	Baker et al. 2006
	MCP5	(5 -CTT ACC ATC GCT TGT GTC GGC ATC-3)			
	CAP1	5'-ATTTGYGGYGTTCAGCCKATGA-3'	450 pb	Myoviridae/Siphoviridae	Jenkins and Hayes 2006
	CAP2	5'- AACRAYTTCRCGGTTGATTCCA-3'			
<i>DNA pol</i>	CP-DNAP-349F	(5'- CCA AAY CTY GCM CAR GT-3')	550-600 pb	Podoviridae	Chen et al. 2009
	CP-DNAP-533Ra	(5'- CTC GTC RTG SAC RAA SGC-3')			
	CP-DNAP-533Rb	(5'- CTC GTC RTG DAT RAA SGC-3')			
	pol2 F	5'- ACTGCAACGCCTGGGATGGTG- 3'	389 pb		Jacquet et al. 2013
	pol2 R	5'- AGCAATGCGGCGACCGTCAA- 3'			

En las tablas 2 y 3 se muestran las condiciones de amplificación predeterminadas para todos los partidores, modificándose algunas de éstas con respecto a sus fuentes de referencias, o realizando amplificaciones en gradiente, con el fin de mejorar la amplificación del fragmento específico del marcador molecular a evaluar. De cada producto de PCR obtenido, se tomaron de 5 µL a 7 µL, a los cuales se les agregó 2 µL de un buffer de carga 6X con glicerol y gel red, y posteriormente cada uno fue cargado en un gel de agarosa 1% en TAE 1X (Tris, acetato y EDTA), y se procedió a resolver mediante electroforesis bajo parámetros de avance electroforéticos determinados. Las bandas del gel de agarosa obtenidas de los productos de PCR, fueron llevadas a un transiluminador y cortadas, para luego ser purificadas según el protocolo de purificación del kit comercial GFX GE Healthcare Life Sciences.

Tabla 2: Condiciones químicas para la amplificación de los marcadores moleculares presentes en las muestras. Los partidores señalados con un * señala aquellos que fueron diseñados

Marcador molecular	Partidores	Buffer PCR	MgCl2 (mM)	dNTPs (mM)	Partidor F/R (uM)	Taq Polimerasa (U/ul)
g20	CPS 1 F/CPS 8R	1x	1.5	0.25	0.8	0.75
	CPS 1 F/CPS 2R	1x	1.5	0.2	0.08	1.25
	CPS 1.1/CPS8.1	1x	2	0.2	0.4	0.5
g23	CP_MCP_A4L_F1/R1 *	1x	1.5	0.2	0.4	0.5
	MCP F5/R5	1x	1.5	0.2	0.4	0.5
	CP_MCP_F1/R1 *	1x	1.5	0.2	0.4	0.5
	CAP 1/2	1x	1.5	0.1	0.1	0.2
psbA	psbA F/R	1x	1.5	0.2	0.2	0.5
DNA polimerasa	CP-DNAP 349F/533Ra-Rb	1x	1.5	0.1	0.5	0.8
	pol 2 F/R	1x	2	0.2	0.4	0.5

Tabla 3: Condiciones de temperatura y tiempo para las amplificaciones de los marcadores moleculares seleccionados. Los partidores señalados con un * señala aquellos que fueron diseñados. La fase de denaturación, alineamiento y extensión para todos los set de partidores fue de 35 ciclos.

Marcador molecular	Partidores	Tamaño amplicón (pb)	Denaturación inicial (°C)- tiempo	Denaturación (°C)- tiempo	Alineamiento (°C)- tiempo	Extensión (°C)- tiempo	Extensión final (°C)- tiempo
g20	CPS 1 F/CPS 8R	592	95-5 min	95-15 seg	36-15 seg	72-1 min	72-5 min
	CPS 1 F/CPS 2R	592	94-5 min	94-1 min	55-1 min	72-1 min	72-5 min
	CPS 1.1/CPS8.1	592	95-5 min	95-30 seg	46- 30seg	72-1 min	72-5 min
g23	CP_MCP_A4 L_F1/R1 *	167	95-5 min	95-30 seg	44.7-30 seg	72-30 seg	72-5 min
	MCP F5/R5	350	95-5 min	95- 30 seg	56- 30 seg	72-30 seg	72-5 min
	CP_MCP_F1/R1 *	167	95-5 min	95-30 seg	45.3-30 seg	72-30 seg	72-5 min
	CAP 1/2	450	94-3 min	94-1 min	42- 1 min	72-1 min	72-5 min
psbA	psbA F/R	795	95- 5 min	95-30 seg	56.4-30 seg	72-30 seg	72-5 min
DNA polimerasa	CP-DNAP 349F/ 533Ra-Rb	550-600	94-3 min	94- 30 seg	53- 30 seg	72-30 seg	72-5 min
	pol 2 F/R	389	95-5 min	95-30 seg	50-30 seg	72-30 seg	72-5 min

2.3) Construcción de librerías de clones para cada marcador molecular.

A partir de cada producto de PCR purificado se procedió a realizar la ligación tras haber estimado la concentración de la banda en su respectivo gel de integridad. Los productos fueron ligados al vector pGEM-T Easy (Promega), vector que posee un gen de resistencia a ampicilina), los cuales fueron incubados en un buffer de ligación en presencia de T4 Ligasa, durante 12 h. a 4°C en oscuridad. Posterior a esto, se procedió con la transformación de dicho vector, para lo cual se utilizó una suspensión de *E. coli* DH5 α quimiocompetentes. Por cada producto de PCR a clonar, se dispone de un control de ligación, de transformación, control negativo y la muestra a clonar, cada cual se inoculó en una placa Petri. Para esto se tomó 40 μ L de suspensión de *E. coli* DH5 α y se añadió 360 μ L de CaCl₂ estéril y frío. Dicha mezcla fue distribuida en 4 tubos con 100 μ L para cada control a considerar. Para el caso del producto a ligar, se transfirió toda la mezcla de ligación a las bacterias quimiocompetentes; para el control de transformación se utilizó 1 μ L de un vector ya ligado; y para el control de ligación se utilizó 5 μ L de éste para transformar.

Cada suspensión a transformar fue incubada en hielo durante 30 min. y luego se sometió a estrés térmico a 42°C en un baño termorregulado durante 45 seg. Posteriormente se pusieron en hielo durante 5 min. y se agregó a cada tubo 1 mL de caldo LB. Enseguida se incubo bajo agitación constante a 37°C durante 1,5 h. para así promover la transformación.

Paralelamente, se prepararon las placas para el crecimiento de los clones. Para cada placa se utilizó 20 mL de LB agar 1%, 200 μ L de ampicilina 10 mg/mL, 3 μ L de IPTG 200 mg/mL y 30 μ L de X-GAL 50 mg/mL, y tras preparadas, se dejaron enfriando a temperatura ambiente. Los tubos con las muestras fueron centrifugados a 3000 rpm durante 3 min, se descartó el sobrenadante, y se procedió a sembrar el pellet resuspendido (aproximadamente 100 μ L). Cada placa fue llevada a una estufa a 37°C durante 16 h. para permitir el crecimiento de los clones. Tras este tiempo y luego de evaluar el crecimiento de colonias blancas y azules, se dispuso de una multiplaca de 96 pocillos en los cuales se

añadió 150 μ L de LB caldo con ampicilina y se procedió a picar las colonias blancas de la placa con la ayuda de una punta de micropipeta, y se sumergió respectivamente en cada pocillo. La multiplaca fue luego llevada a un agitador a 37°C durante 12 h. para promover el crecimiento de cada clon, lo cual se evidenció con la turbidez presente en cada pocillo.

Para realizar el PCR de colonia para cada marcador respectivamente, se obtuvo una alícuota de 50 μ L de cada pocillo de la multiplaca como stock accesible, mientras que el resto fue completado con glicerol al 80% y almacenados a -80°C. Cada alícuota obtenida según el número de colonias blancas picadas fue denaturada en el termociclador a 99°C durante 10 min. y luego se dejó incubar 3 min. en hielo. A continuación se tomó la mezcla y se centrifugó a temperatura ambiente durante 5 min. a 10000 rpm. El sobrenadante se rescató y se utilizó 1 μ L de éste como templado para llevar a la reacción de PCR, en la cual se pretendió amplificar el inserto correspondiente con el uso de los partidores M13. Posteriormente, se verificó la presencia de la banda correspondiente al inserto respectivo mediante un gel de agarosa, y se seleccionaron algunos de los productos de PCR de colonias obtenidos para ser secuenciados.

2.4) Análisis de secuencias y reconstrucción filogenética.

Las secuencias obtenidas correspondientes a cada librería de genes, fueron editadas utilizando los softwares Bioedit 7.2.0 y VectorNTi Advance 11. Cada una de las secuencias editadas fue comparada con la base de datos pública (nr/nt), y contra la base de datos de Caudovirales mediante BLASTN. Para la reconstrucción filogenética, inicialmente se realizó un alineamiento usando la aplicación CLUSTALW de las secuencias obtenidas para cada gen marcador investigado, junto a secuencias de referencias específicas. Posteriormente, se realizó una reconstrucción filogenética para cada gen marcador, utilizando el software MEGA V 5.01. Dichas reconstrucciones filogenéticas fueron realizadas utilizando el algoritmo Maximum likelihood con un bootstrap de 1000.

2.5) Análisis *in silico* para la obtención de secuencias de marcadores moleculares a partir del metagenoma y metatranscriptoma correspondientes a la terma Porcelana, y posterior diseño de partidores.

Para la identificación de posibles marcadores moleculares encontrados en el metatranscriptoma y/o metagenoma secuenciado (a nivel de ensamblado de contigs) del sistema hidrotermal de Porcelana, éstos fueron analizados con el software MG-RAST, una plataforma de análisis metagenómico funcional automatizado, utilizado con el objetivo de realizar asignaciones de las bases de datos mencionadas a secuencias virales. La asignación se realizó con un e-value cut off de 1×10^{-5} . Las secuencias asignadas identificadas en los contigs correspondientes fueron recuperadas y alineadas contra secuencias de referencia del marcador respectivo. Posteriormente se procedió a diseñar secuencias de consenso, las cuales fueron comparadas con la base de datos pública (nr/nt), y contra la base de datos de bacteriófagos mediante BLASTN.

El diseño de partidores para los marcadores moleculares identificados se realizó con la ayuda de los softwares Primer3 y Primer BLAST, tras lo cual se escogió el set de partidores que generaran un amplicón de tamaño constante a lo largo de las secuencias consideradas, lo cual se evaluó con el uso del software VectorNTi. Asimismo, se utilizó el programa Oligoanalyzer3.1 para conocer algunos de los parámetros fisicoquímicos de los partidores y comprobar que no se generaran horquillas ni dímeros de estos que impidieran la amplificación. Posteriormente, mediante el uso de ClustalW, se procedió a alinear las secuencias de referencia del marcador respectivo con las secuencias y los partidores, para así identificar la región a amplificar.

2.6) Identificación de secuencias virales en el metaviroma de la terma Porcelana.

Para evaluar la presencia de señales virales de cianofagos en el metaviroma, se procedió a identificar las secuencias de éste asociadas a los marcadores moleculares ya estudiados *g23*, *g20*, *psbA*, *dnapol*, y asimismo a otros marcadores moleculares reportados tales como *terL* e integrasa. Para esto se hizo uso del metaviroma disponible en el laboratorio de la Dra. Beatriz Diez, del cual se recuperaron las secuencias que estén

asignadas a dichos marcadores moleculares mediante análisis de blastp con bases de datos del refseq del NCBI correspondiente a cada marcador. Cada una de las secuencias asignadas a los marcadores, recuperadas del metaviroma, fue comparada con la base de datos pública (nr/nt), y contra la base de datos de Caudovirales mediante BLASTp. Para la reconstrucción filogenética, inicialmente se realizó un alineamiento usando la aplicación CLUSTALW de las secuencias obtenidas para cada gen marcador investigado, junto a secuencias de referencias específicas. Posteriormente se realizó una reconstrucción filogenética para cada gen marcador, utilizando el software MEGA V 5.01. Dichas reconstrucciones filogenéticas fueron realizadas utilizando el algoritmo Maximum likelihood con un bootstrap de 1000.

Objetivo 3

3.1) Curva de crecimiento de los aislados CHP1 y CHP2 tanto en cultivo líquido como en cultivo en placa.

Se realizó una curva de crecimiento para los aislados CHP1 y CHP2 con el fin de evaluar la fase de desarrollo predominante para la posterior inducción de profagos. Para esto, se dispuso inicialmente un cultivo de 200 mL de cada aislado, el cual se dejó crecer durante 2 semanas para aumentar su biomasa en medio BG11 1X (ver composición stock en sección Anexo) en un incubador a 50°C con ciclo día/noche, para simular condiciones naturales. Posteriormente, los cultivos fueron sometidos a lavados continuos bajo sistemas de filtración para tener un inóculo limpio. A partir de estos cultivos limpios se procedió a hacer inóculos de 2 mg de biomasa inicial de CHP1 y CHP2 en 10 nuevos matraces con 200 mL de BG11 1X para cada aislado, los cuales fueron inducidos durante 48 h. con luz roja, para estimular la producción de hormogonio. Posteriormente, cada 7 días los cultivos fueron evaluados, donde de estos 10 matraces por cultivo, 5 de ellos fueron utilizados para inducción de profago con 5 ug/mL de mitomicina C (Winkler) en cada día evaluado, para apreciar el efecto del antibiótico según su estado de crecimiento, identificando posible clarificación del cultivo; y otros 5 cultivos para estimación de biomasa, para lo cual se realizó mediciones de peso seco en los cuales el cultivo fue suspendido en una cubeta de aluminio y deshidratado en un horno de hibridación a 60°C durante 12 h.

Asimismo, para los experimentos con distintos tipos de inductores de profago, señalados en la sección 3.2 se procedió a crecer, tanto cultivos líquidos en sistema de multiplacas, como cultivos inoculados sobre sistemas de doble capa de agar. Para esto último, se dispuso de placas de Petri estériles en las cuales se agregó medio BG11 agar 1% caliente. Tras haberse enfriado, se añadió sobre éste una delgada capa de BG11 agar 0.5% con cultivo inmerso previamente sonicado, correspondiente al aislado respectivo, con el fin de poder evaluar la formación de halos de lisis.

3.2) Inducción de profagos con agentes promotores del estrés bacteriano.

A partir de cultivos crecidos en sistemas de doble capa BG11 agar 0.5-1% se inoculó 500 µL de cultivo inmerso en la capa superior de agar blando hasta que creciera formando colonias. Posteriormente, se procedió a inducir el cultivo con agentes inductores de profago tales como mitomicina C, estrés térmico, radiación ultravioleta, CuSO₄ y estrés hídrico.

Para el caso de los cultivos inducidos con radiación UV, se expuso los sistemas de doble capa durante 5, 15 y 30 min. frente a radiación UV-C en una campana de flujo laminar Nuair de clase II.

Para promover la formación de halos de lisis mediante estrés térmico, cultivos crecidos en sistemas de doble capa a 30°C fueron colocados en un incubador a 50°C para posteriormente devolverlo a su temperatura inicial y esperar hasta la aparición de halos de lisis.

Para evaluar la lisis de los cultivos mediante CuSO₄ se dispusieron cultivos en una multiplaca de 8 pocillos, considerando un blanco, cultivo control y 6 cultivos con concentraciones crecientes de CuSO₄.

Para la inducción de profagos en cultivos, se utilizó el antibiótico mitomicina C (Winkler), con el cual se hizo una curva de inducción en un rango total de 12 h, evaluando

presencia de VLPs cada 1 h, con el fin de estimar el tiempo al cual pudiese generarse la liberación de VLPs. Se dispuso 12 alícuotas de cultivos homogenizadas en multiplacas donde una fue utilizada como control y las otras 11 se indujeron con 5 µg/mL de mitomicina C, y posteriormente se procedió a dejar incubando con el antibiótico. Tras la inducción inicial, cada 1 h. aproximadamente, cada cultivo fue fijado con formaldehído 37% y luego teñido con 2,5 µL de SYBRgold 10% en oscuridad durante 30 min. La muestra fue montada en portaobjetos utilizando la metodología de láminas o pads de agarosa señalada en la figura 1, para observación directa al microscopio de epifluorescencia.

Para la inducción de profagos mediante estrés hídrico se armó un sistema de desecación para los aislados CHP1 y CHP2, montado en una placa de Petri de vidrio. Para el montaje se dispuso de una plataforma de vidrio, apoyada en dos set de mondadientes, sobre la cual se situó los cultivos crecidos en sistemas de doble capa 0.5-1%, dentro de la placa de Petri. Bajo dicha plataforma se colocaron 15 gramos de sílica gel para disminuir la humedad circundante en la placa. Se dispuso 4 cultivos de doble capa por cada montaje en una misma placa, donde uno de ellos había sido previamente inducido con 5 µg/mL de mitomicina C. Se utilizó 2 placas de vidrio para cada aislado, una incubada a 50°C y otra incubada a 30°C.

Los halos de lisis recuperados en cada una de las inducciones fueron resuspendidos en buffer SM para promover la estabilidad de los cianofagos.

3.3) Caracterización de la diversidad morfológica de fagos correspondiente a los aislados CHP1 y CHP2, mediante análisis de microscopía electrónica de transmisión y epifluorescencia.

La visualización de VLPs mediante microscopía de epifluorescencia en cultivos inducidos se realizó mediante el uso de láminas o pads de agarosa según se detalla. Estos pads fueron preparados sobre un soporte de 6 portaobjetos estériles apilados de forma específica. Se disolvió 0,3 gramos de agarosa low melting Promega en 20 mL de PBS 1X y

se procedió a calentar hasta su total disolución. Dicha solución se vertió sobre los portaobjetos como se muestra en la Figura N°1 y se dejó enfriar. Paralelamente una muestra de 100 μ L de cultivo inducido fijado con formaldehído 37% se tiñó con 2,5 μ L de sybr-gold al 10% (a partir de un stock comercial de 10000x) y 97,5 μ L de agua mQ filtrada durante 15 min en oscuridad a temperatura ambiente. Finalmente, se dispuso 25 μ L de la muestra teñida sobre un portaobjeto estéril sobre el cual se colocó un segmento de la lámina de agarosa formada, bien presionada con el objetivo de evitar la presencia de burbujas en el microscopio, para poder ver la muestra en un solo plano e identificar óptimamente las VLPs.

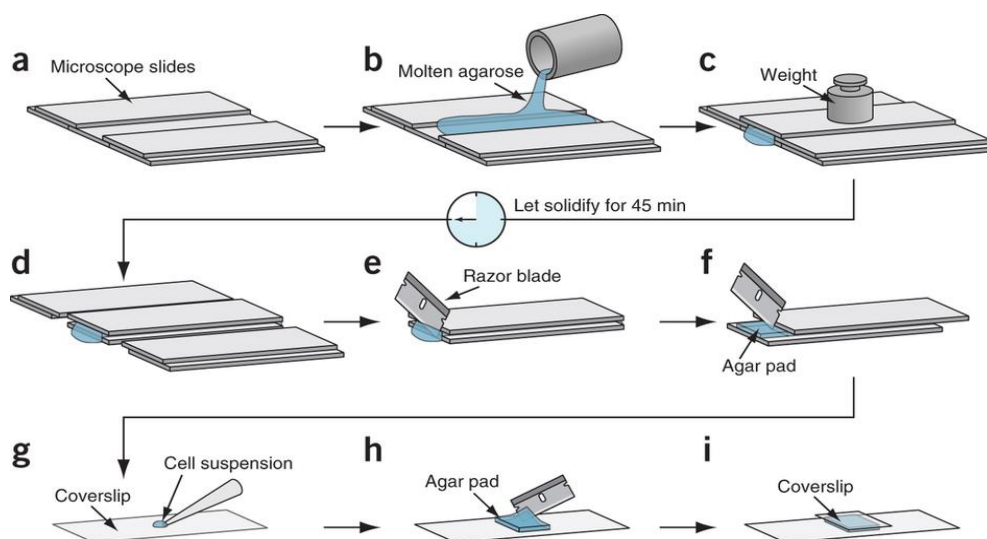


Figura 1: Montaje de pads de agarosa según Skinner et al. 2013.

Para poder determinar la presencia y morfología de VLPs proveniente de profagos inducidos mediante microscopía electrónica de transmisión, se tomó una alícuota de 500 μ L de cultivo inducido y se procedió a centrifugar a 10000 g durante 15 min. El pellet obtenido se procedió a fijar durante 18 h con glutaraldehído al 2.5% en buffer cacodilato de sodio 0,1M pH7. Posteriormente, se realizó un lavado con el mismo buffer por 2 h y se postfijó con OsO₄ 1% acuoso por 1 h. Luego se lavó con agua durante 1 h y se procedió a teñir en resina con Acetato de Uranilo 1% por 30 min. Tras la tinción, se deshidrató en acetona consecutivamente a diferentes concentraciones (50%, 70%, 95% y 100%) por 15 min cada uno. La muestra tratada se preincluyó con resina Epon-acetona 1:1 durante 4 h y luego se procedió a dejar en resina por otras 4 h. Finalmente, se procedió a polimerizar la resina en

estufa a 60°C. Una vez polimerizado se realizaron cortes (ultramicrotomía) con cuchilla de diamante y posteriormente se tiñeron en Acetato de Uranilo 4% en metanol y citrato de plomo. Finalmente, las muestras se observaron en el microscopio electrónico Philips Tecnai 12 a 80 kV.

3.4) Caracterización de la diversidad genética de fagos correspondientes a los aislados CHP1 y CHP2, mediante uso de marcadores filogenéticos y la herramienta informática PHAST.

Se extrajo material genético de los aislados CHP1 y CHP2 con el objetivo de identificar presencia de profagos con el uso de los marcadores moleculares. Para dicha extracción se dispuso de 200 µL de cultivo crecido en tubos de policarbonato con tapa rosca y se añadió 500 µL de buffer X (preparación en Anexo) junto a microesferas autoclavadas, para posteriormente llevar los tubos a un homogeneizador Beadbeater. Cada tubo a lisar fue homogeneizado 3 veces durante 30 segundos. Posteriormente, se agregó 50 µL de SDS 10% y proteinasa K 200 ug/mL, y se incubó durante 2 h. a 65°C. Luego se dejó en hielo durante 30 min. para luego centrifugar a 13000 rpm a 4°C durante 10 min. Tras esto, se rescató el sobrenadante obtenido y se le añadió 750 µL de una mezcla fenol: cloroformo: alcohol isoamílico (25:24:1), tras lo cual se llevó a vortex para agitación y posterior centrifugación a 13000 rpm a 4°C. Posteriormente, se transfirió la fase superior a un nuevo tubo eppendorf sobre el cual se añadió 500 µL de cloroformo: alcohol isoamílico 24:1. Nuevamente se procedió a centrifugar a 13000 rpm durante 10 min. a 4°C. Luego al sobrenadante se le añadió un volumen de Isopropanol absoluto y 0,1 volumen de acetato de amonio 4M, y se dejó reposar a -20°C durante la noche. Posteriormente, la mezcla se centrifugó bajo las mismas condiciones antes mencionadas y el pellet resultante tras descargar el sobrenadante, se lavó con etanol al 70%, para luego secar el pellet durante 1 hora y ser resuspendido en 50 µL de agua ultrapura. Se utilizaron los extractos de DNA de CHP1 y CHP2 para realizar las amplificaciones de los marcadores moleculares y set de partidores descritos en la sección 2.2, según protocolo de aplicación correspondiente.

Con el fin de evaluar la presencia de profagos en el genoma de CHP1 y CHP2, se utilizó la herramienta informática PHAST (PHAge Search Tool), un software diseñado para anotar, identificar de manera precisa y rápida, secuencias de profago en genomas bacterianos o plásmidos. Se dispuso de los draft del genoma de CHP1 y CHP2 para lo cual fueron ingresados en el software indicando concatenación de los contigs. Con esta información el programa generó un archivo informativo acerca de lo identificado en dichos genomas.

RESULTADOS

Objetivo 1

1.1) Estimación de la abundancia de partículas virales

A partir del concentrado viral obtenido de muestras de agua termal y líquido intersticial de tapete microbiano (Figura 2), representativas del sistema hidrotermal Porcelana, se realizó la estimación de la presencia y abundancia de partículas virales (VLPs). El concentrado de exudado de tapete obtenido poseía una consistencia viscosa, y presentó un suave tono amarillo. Para el caso del concentrado de agua termal, este tenía una consistencia menos densa y se mostró transparente. La abundancia de partículas virales determinada en estas muestras, fue realizada mediante conteo en microscopía de epifluorescencia.

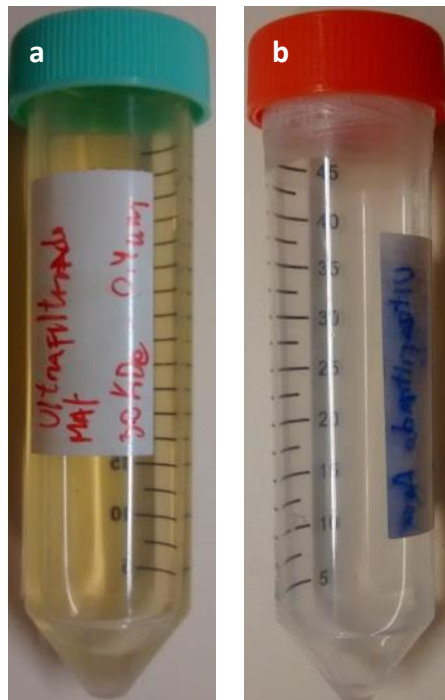


Figura 2: Concentrados virales obtenidos por ultrafiltración por 30kDa y previa filtración por 0.4 um de a) exudado de tapete microbiano, b) agua termal.

Los resultados de la microscopía se muestran en las figuras 3 y 4, donde para muestras de líquido intersticial ha sido estimada una concentración de 3×10^6 VLPs/mL, y para la muestra de agua termal se estimó en 3.5×10^5 VLPs/mL. Dado que la cantidad identificada en las muestras de agua termal fue de un orden de magnitud (8.57 veces) más pequeña con respecto a lo detectado en el líquido intersticial, y asimismo bastante menor a las halladas en otros sistemas de referencia tales como aguas superficiales o ecosistemas marinos, no fue considerada para los posteriores análisis. Asimismo, las figuras 3 y 4 representan muestras de líquido intersticial que posteriormente fueron sometidas a un gradiente de sacarosa (10%-30%-60%), donde se señala la presencia de VLPs, las cuales se encuentran dentro del rango de tamaño alrededor a 200 nm.

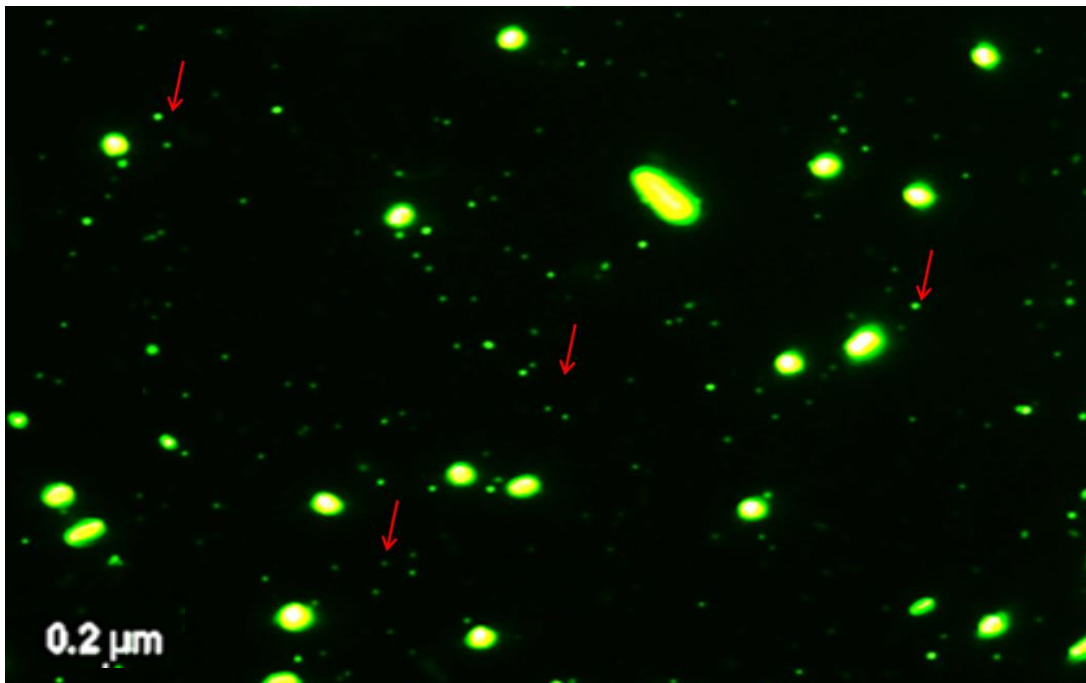


Figura 3: Tinción con SYBRgold de VLPs en muestra concentrado viral de líquido intersticial, interfase 30-60% gradiente sacarosa. Las flechas rojas indican la presencia de VLPs.

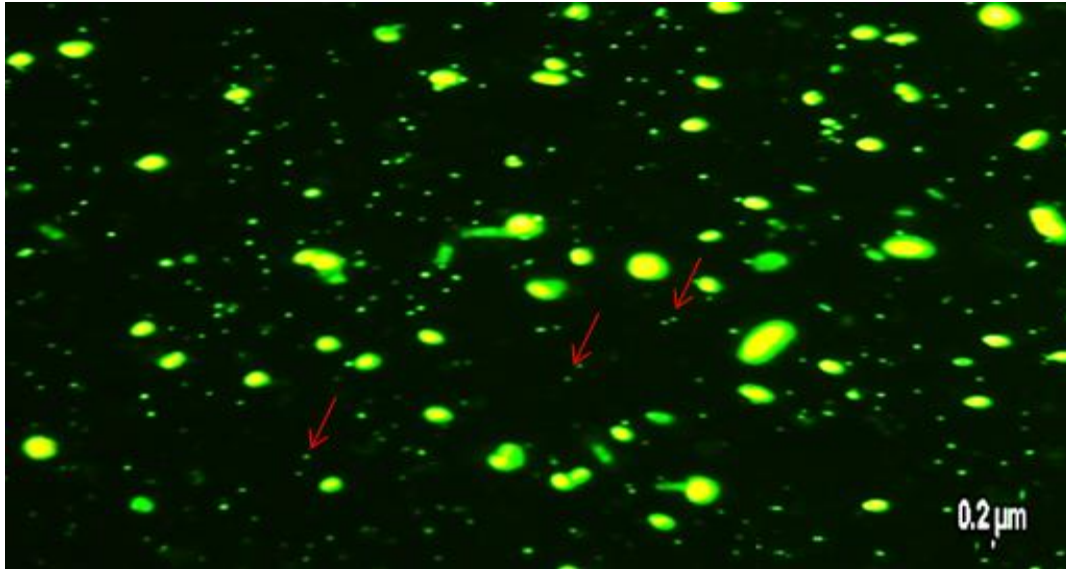


Figura 4: Tinción con SYBRgold de VLPs en muestra concentrado viral de líquido intersticial, Fracción 60% gradiente sacarosa. Las flechas rojas indican la presencia de VLPs.

Es posible identificar junto a las VLPs señaladas, una gran cantidad de bacterias acompañantes del orden de micrómetros, presentes en la muestra a pesar de los prefiltrados realizados al tratar la muestra.

1.2) Determinación de morfologías virales

Las micrografías para realizar determinación de morfologías virales, fueron obtenidas mediante microscopía de transmisión electrónica a partir de las muestras de líquido intersticial recolectadas tanto de la ultracentrifugación del gradiente de sacarosa como de la ultracentrifugación de la muestra, según metodología utilizada (ver sección Materiales y Métodos). En la figura 5 se pueden observar las distintas morfologías encontradas de VLPs en el líquido intersticial tras la ultracentrifugación directa. Asimismo, en la figura 6 las micrografías corresponden a muestras tratadas con gradiente discontinuo de sacarosa. En ambos set de micrografías es posible identificar potenciales representantes de las 3 familias de bacteriofagos, correspondientes al orden de los Caudovirales, tales como *Syphoviridae* (Fig. 5e), *Myoviridae* (Fig 5a) y *Podoviridae* (Fig 5b). Para el caso de la familia *Syphoviridae* se identificaron 3 morfotipos distintos en las micrografías: fagos de cabeza poligonal con colas en promedio de 166 nm de largo (Fig. 6b, Morfotipo 1), fagos

con cabeza ovoide y colas de 321 nm en promedio (Fig. 6c, Morfotipo 2), y fagos de cabeza circular pequeña y colas de 773 nm promedio (Fig 6d, Morfotipo 3). También es posible distinguir algunas estructuras de fagos que podrían estar infectando Arqueas, pertenecientes a familias tales como *Lipothrixviridae* (Fig 5b), *Globuloviridae* (Fig 5f), *Fuselloviridae* (Fig 5g) y *Ampullaviridae* (Fig 5d).

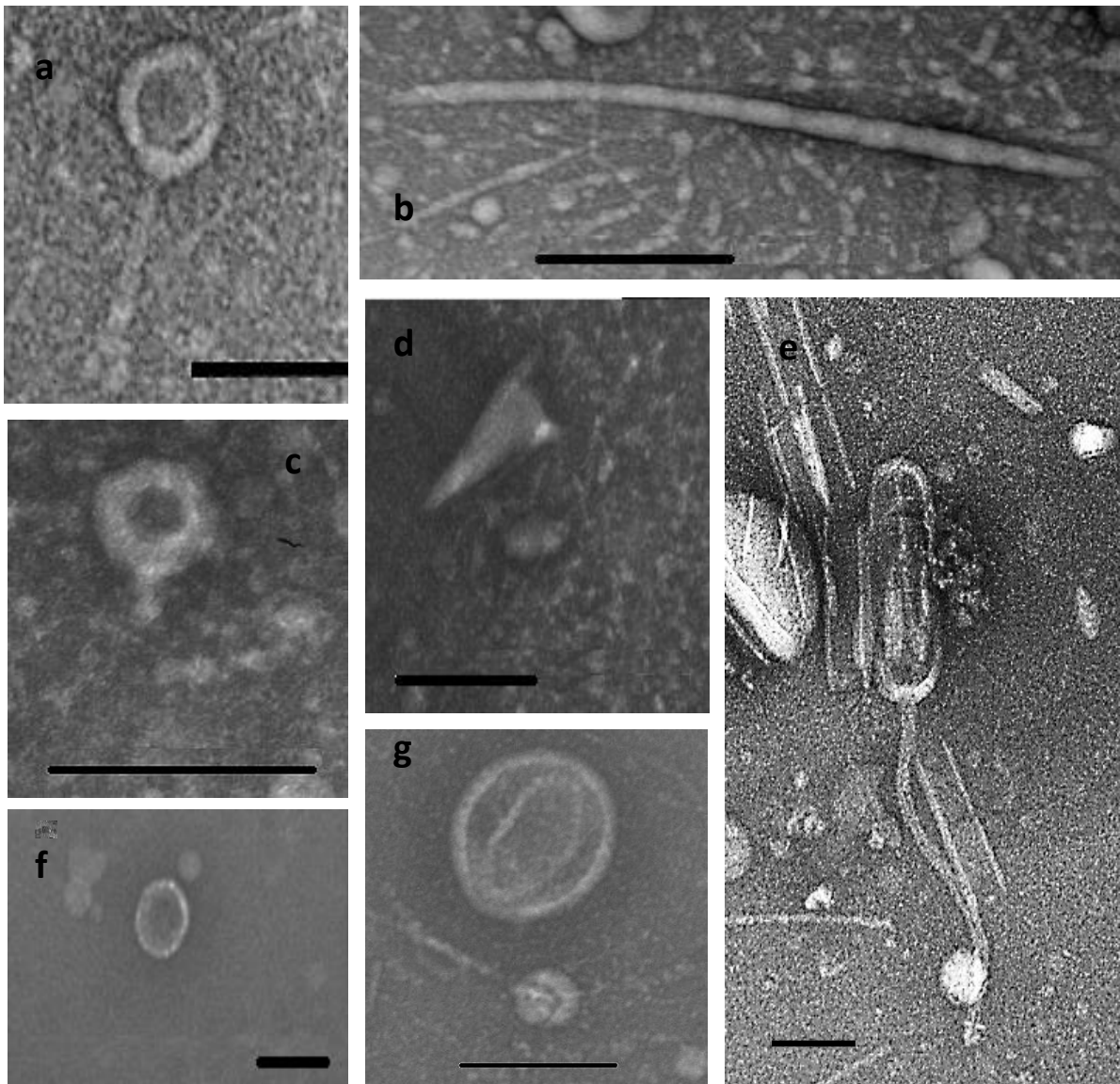


Figura 5: Morfologías identificadas en muestras de líquido intersticial de la terma Porcelana, concentrado por ultracentrifugación (sin el uso de gradiente de sacarosa). Los morfotipos corresponden a las familias: a) Myoviridae; b) Lipothrixviridae; c) Podoviridae; d) Ampullaviridae; e) Syphoviridae; f) Globuloviridae y g) Fuselloviridae. Escala 100nm

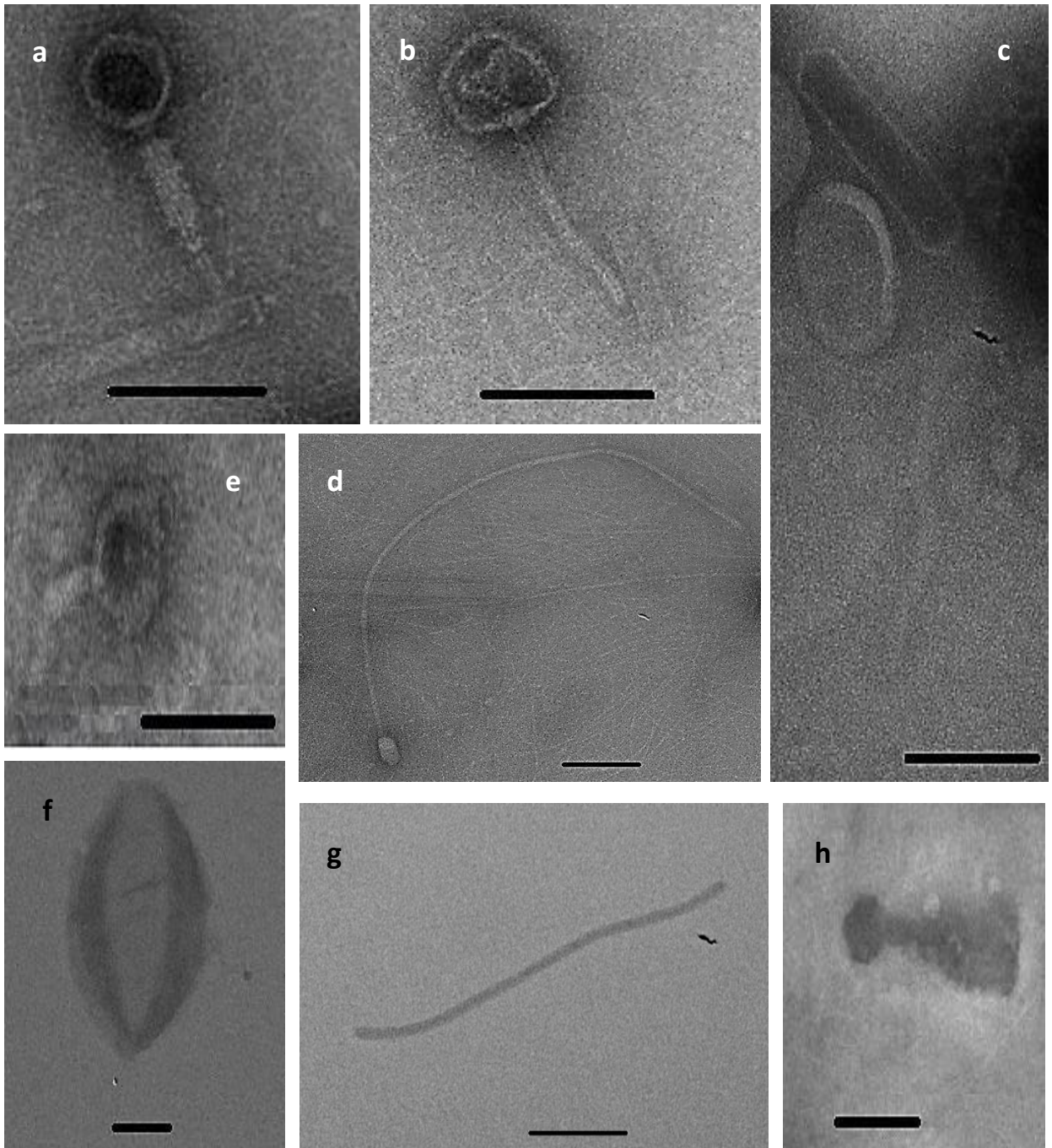


Figura 6: Morfologías identificadas en muestras de líquido intersticial de la terma Porcelana, concentrando mediante un gradiente discontinuo de sacarosa. Los morfotipos corresponden a las familias: a) Myoviridae; b, c y d) Syphoviridae; e) Podoviridae; f) Fuselloviridae; g) Rudiviridae; h) Ampullaviridae. Escala 100 nm.

Por otra parte, si bien con una baja abundancia, se identificaron estructuras no categorizadas previamente para fagos de sistemas termales, como las micrografías de la Figura 7, donde es posible distinguir un morfotipo filamentoso con extremos redondos (Figura 7a), un morfotipo identificado previamente en sistemas termales ácidos de Yellowstone no categorizado, de cabeza alargada con cola ancha (Figura 7b); y una estructura ovoide doble de pequeñas dimensiones (Figura 7c).

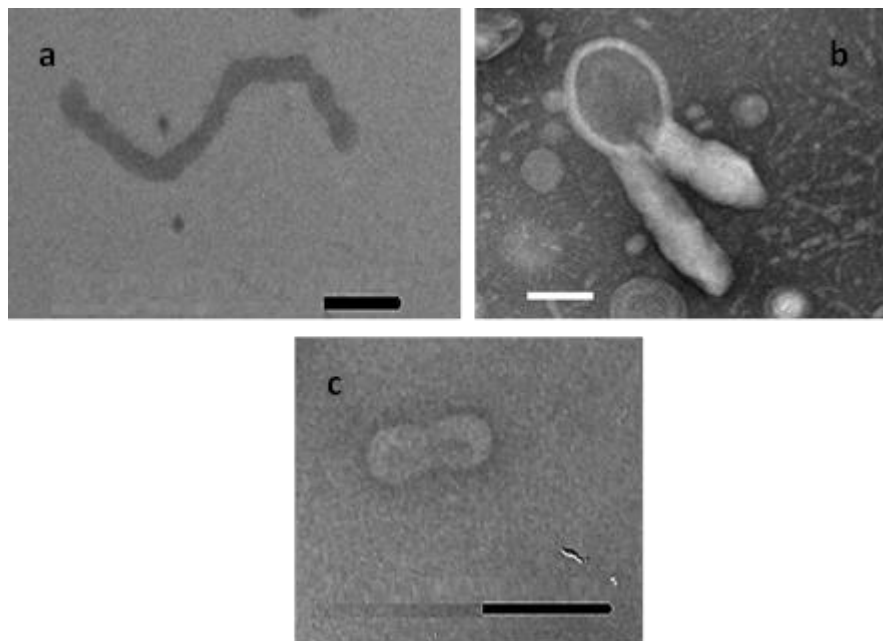
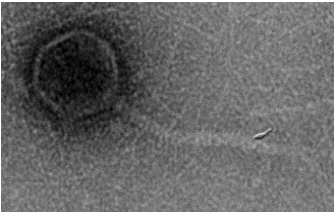
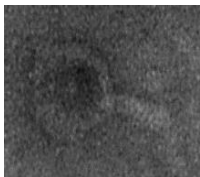
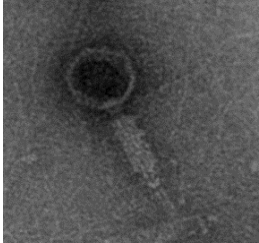
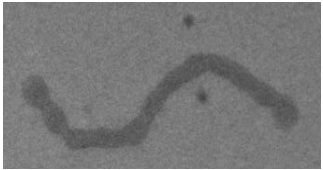
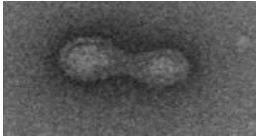
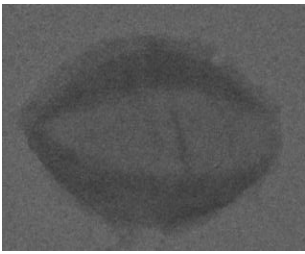
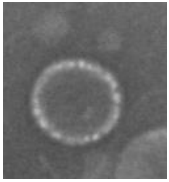
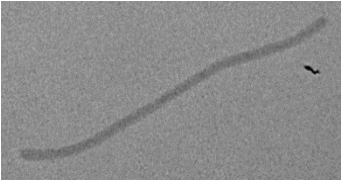
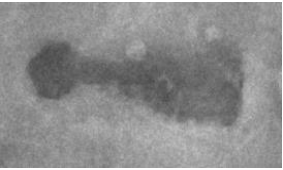

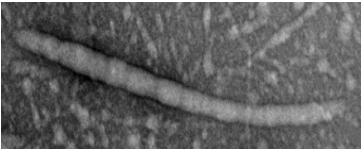


Figura 7: Morfologías sin clasificación actual obtenidas en la terma Porcelana. a) Estructura filamentosa con extremos redondos; b) Estructura previamente descrita en sistemas termales ácidos de Yellowstone no categorizada, cabeza alargada con cola ancha; c) Estructura ovoide doble. Escala 100 nm

De un total de 97 estructuras virales encontradas bien definidas mediante microscopía electrónica de transmisión, se estimó la abundancia de cada familia identificada dentro de la muestra analizada así como las dimensiones promedio de cada morfotipo, datos presentados en la Tabla 4. La familia de fagos más abundante corresponde a bacteriófagos de la familia *Syphoviridae* (33%) seguidas de *Podoviridae* y *Myoviridae* con una representación de un 19.60% y un 18.60% respectivamente.

Tabla 4: Familias de fagos identificadas en la muestra de líquido intersticial de tapete microbiano en la terma Porcelana. Se señalan los rangos de tamaño promedio (largo, ancho y alto) y sus porcentajes de abundancia con respecto al total de conteos realizados a partir de micrografías correspondientes a cada morfotipo.

Morfologías presentes	Familia	Tamaño (nm) Cabeza x (Largo x Ancho) cola	% Abundancia
	<i>Syphoviridae</i>	Morfotipo 1 69.6 x (166 x 8.5) Morfotipo 2 (180 x 71)x (321 x 12) Morfotipo 3 57 x 773 x 9	33%
	<i>Podoviridae</i>	119 x 42 x 28	19.60%
	<i>Myoviridae</i>	87 x 150 x 35	18.60%
	ND	747 x 35	8.20%
	ND	207 x 61	5.20%

	<i>Fuselloviridae</i>	140 x 100	4.10%
	<i>Globuloviridae</i>	65 x 65	4.10%
	<i>Rudiviridae</i>	877 x 30	3.10%
	<i>Ampullaviridae</i>	162 x 48	2.10%
	ND	402 x 98	1%
	<i>Lipothrixviridae</i>	976 x 37	1%

Objetivo 2

2.1) Extracción de material genético viral

Los concentrados virales obtenidos a partir de la ultrafiltración de líquido intersticial previamente tratados con DNAasa (según se indica en la sección Materiales y Métodos), fueron sometidos a extracción de material genético viral con distintos protocolos y modificaciones a los mismos tal y como se indica en la Tabla 5.

En la Tabla 5, así como a través del gel de integridad (Figura 8), se puede observar que las extracciones más adecuadas para realizar posteriores amplificaciones de material genético requerido fueron la número 4 y la 8. A partir de estas extracciones se observa una banda de DNA genómico para el que se obtuvieron razones de absorbancia entre 1,5 y 1,9 que está dentro del rango de calidad considerado como adecuado para seguir trabajando con este tipo de muestras. Asimismo, no se observa tan evidentemente material genético degradado y la banda superior, esperada entre 50 kb y 200 kb, es prominente. A partir de estas muestras se llevó a cabo la amplificación de los marcadores moleculares correspondientes.

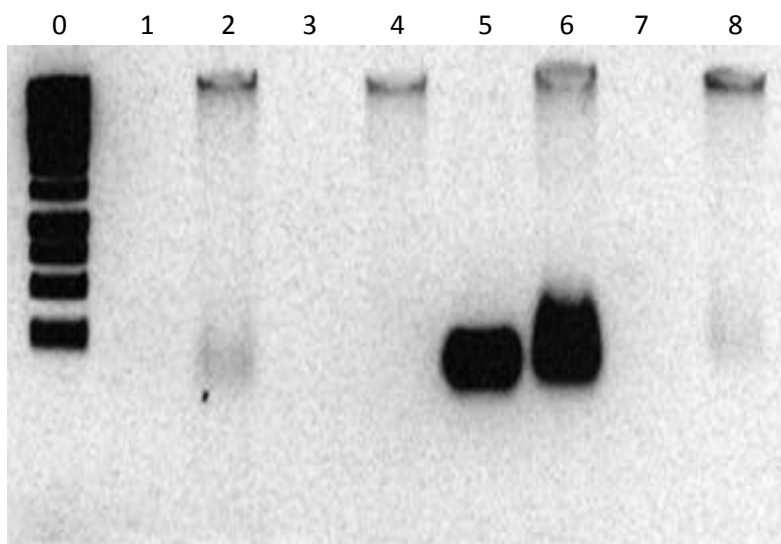


Figura 8: Gel de integridad de los extractos de DNA obtenidos mediante los distintos protocolos y modificaciones a los mismos para la extracción de DNA. Se utilizó ladder 1 kb como patrón de corrida..

Tabla 5: Extracción de DNA de concentrados virales. Las muestras señaladas en rojo son aquellas que fueron las óptimas en relación a los parámetros de purificación y el gel de integridad.

Carril	Procedimiento y muestra	Concentración (ng/ul)	Abs. 260/280	Abs. 260/230
1	Extracción DNA método PEG	11,9	1,57	0,26
2	CTAB- Fenol cloroformo completo	48,2	1,52	1,94
3	CTAB- Trizol completo	1,42	0,62	0,08
4	CTAB- Fenol cloroformo completo, eluido va a kit Purelink	70,4	1,93	1,53
5	CTAB-Trizol completo, eluido va a kit ZYMO	5,5	1,59	0,37
6	CTAB-Purelink kit extracción	366,5	1,91	1,56
7	CTAB-kit extracción ZYMO DNA	2,7	4,4	0,41
8	CTAB-Fenol cloroformo completo x2 lavados	47,4	1,51	1,71

2.2) Amplificación de marcadores moleculares

Los marcadores utilizados inicialmente para la caracterización genética fueron los genes *dnapol*, *psbA*, *g23* y *g20*, los cuales fueron amplificados por PCR con el uso de distintos set de partidores obtenidos de la literatura para la caracterización de cianofagos de sistemas naturales tales como sistemas marinos y aguas dulces superficiales. Las condiciones finalmente utilizadas para cada uno de los marcadores en el PCR convencional se muestran en la tabla 2 y 3 de la sección 2.2 de Materiales y Métodos.

En la tabla 6 se muestra el resultado de las amplificaciones, señalándose con un signo (+) si ésta resultó en un amplicón del tamaño esperado, o bien con el símbolo (-) en caso que no se consiguió amplificación. Muy pocas muestras de las analizadas amplificaron correctamente.

Tabla 6: Marcadores moleculares y set de partidores utilizados correspondientemente así como sus respectivos resultados de amplificación por PCR.

Muestra	Marcadores moleculares									
	psba	g23				DNA pol		g20		
	psba F/R	CAP 1/2	MCP F5/R5	CP_MCP_F1/R1 *	CP_MCP_A4L_F1/R1 *	CP DNAPol F/ R1-R2	pol 2 F/R	CPS 1/2	CPS 1/8	CPS 1.1/8.1
Tapete microbiano	+	-	-	-	-	+	+	-	-	-
Concentrado viral de liquido intersticial	-	-	-	-	-	+	-	-	-	+

De todas estas muestras sólo se obtuvo amplificación en 4 set de partidores correspondientes a los marcadores *psbA*, *dnapol* y *g20*.

En la Figura 9 se muestran los geles de agarosa en los cuales se obtuvo el producto de PCR correspondiente a las amplificaciones esperadas para los diferentes marcadores

moleculares. El tamaño esperado del amplicón se señala con una flecha para cada set de partidores usados.

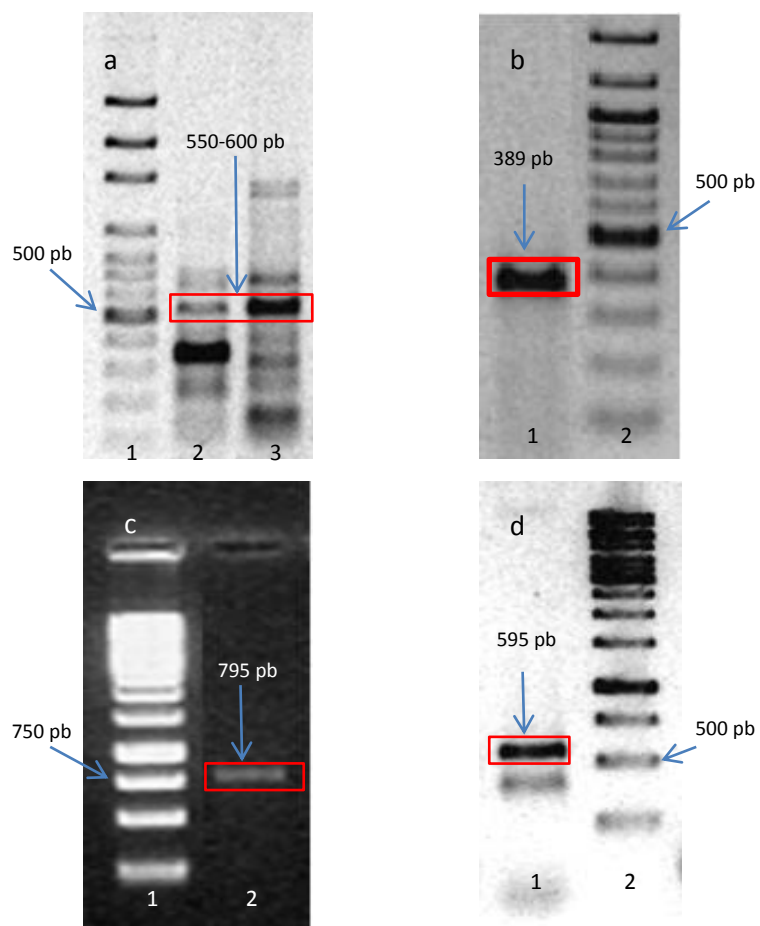


Figura 9: Imágenes en gel de agarosa correspondientes a las amplificaciones de los marcadores utilizados en este estudio, con el uso de los partidores: a) CP-DNApol F/R1-R2 que amplificó DNA polimerasa de muestras de tapete microbiano (carril 1) y concentrado viral de líquido intersticial (carril 2); b) pol2F/R, que amplificó DNA polimerasa de muestras de tapete microbiano; c) psbA F/R, que amplificó psbA de muestras de tapete microbiano; y d) CPS 1.1/8.1, que amplificaron parte de *g20* en muestras de concentrado viral de líquido intersticial

El uso de PCRs en gradiente no fue suficiente para eliminar aquellas amplificaciones inespecíficas evidenciadas en la imagen a y d, correspondientes al gen *dnapol* y *g20*, respectivamente. Para estos dos casos, sólo las bandas enmarcadas en rojo en la figura 9 fueron utilizadas para la construcción de librerías de clones.

2.3) Construcción de librerías de clones.

Según el protocolo descrito en la sección de Materiales y Métodos, se realizaron librerías de clones para cada uno de los marcadores cuyos partidores generaron un amplicón del tamaño esperado. En la Tabla 7 se muestra la cantidad de colonias blancas transformantes obtenidas. Para la mayoría de los marcadores moleculares, se logró un alto número de transformantes, dentro de los cuales 5 clones de cada uno fueron secuenciados.

Tabla 7: Numero de colonias obtenidas para cada marcador molecular, y set de partidores utilizados correspondientemente. Las colonias transformadas resultaron ser blancas y aquellas que no poseen el inserto, azules.

Marcador	Partidor	Muestra	Colonias Transformadas	Colonias azules	Colonias totales
DNApolimerasa	CP-DNApol F/R1-R2	Concentrado viral líquido intersticial	195	6	201
		Tapete microbiano	110	12	122
	pol2 F/R	Tapete microbiano	94	18	112
psbA	psbA F/R	Tapete microbiano	101	8	109
g20	CPS 1.1/8.1	Concentrado viral líquido intersticial	116	12	128
		Control de ligación	94	3	97
		Control Transformación	412	0	412
		Control Negativo	0	0	0

2.4) Análisis de secuencias y reconstrucción filogenéticas

Se realizaron análisis de Blastn de las secuencias editadas resultantes de la secuenciación de los clones de cada marcador respectivo contra la base de datos nr y la de Caudovirales. Los resultados muestran que sólo hubo coincidencia con secuencias de la base de datos de Caudovirales, para el gen *psbA* (proteína D2 del fotosistema II), lo cual se ilustra en la Tabla 8.

Tabla 8: Análisis de secuencias de clones con coincidencia para el gen *psbA* mediante Blastn contra la base de datos no redundante y la de Caudovirales

Marcador molecular	Procedencia de secuencia representativa	Organismo asociado	Gen asociado	Q. Cover	E-value	%Identidad
psbA	Tapete microbiano	Cianobacteria subsección IV	proteina D1 de fotosistema II	99%	0	88%
		Cianofagos de <i>Synechococcus</i>		99%	0	82%

En particular la muestra que resultó positiva fue la correspondiente al extracto de tapete microbiano, donde las secuencias obtenidas para el gen *psbA* fueron cercanas a secuencias de cianofagos y cianobacterias. Se procedió a realizar un árbol filogenético (Figura 10) a partir de estas secuencias obtenidas del gen *psbA* junto con algunas de referencias provenientes tanto de sistemas marinos como de aguas dulces superficiales.

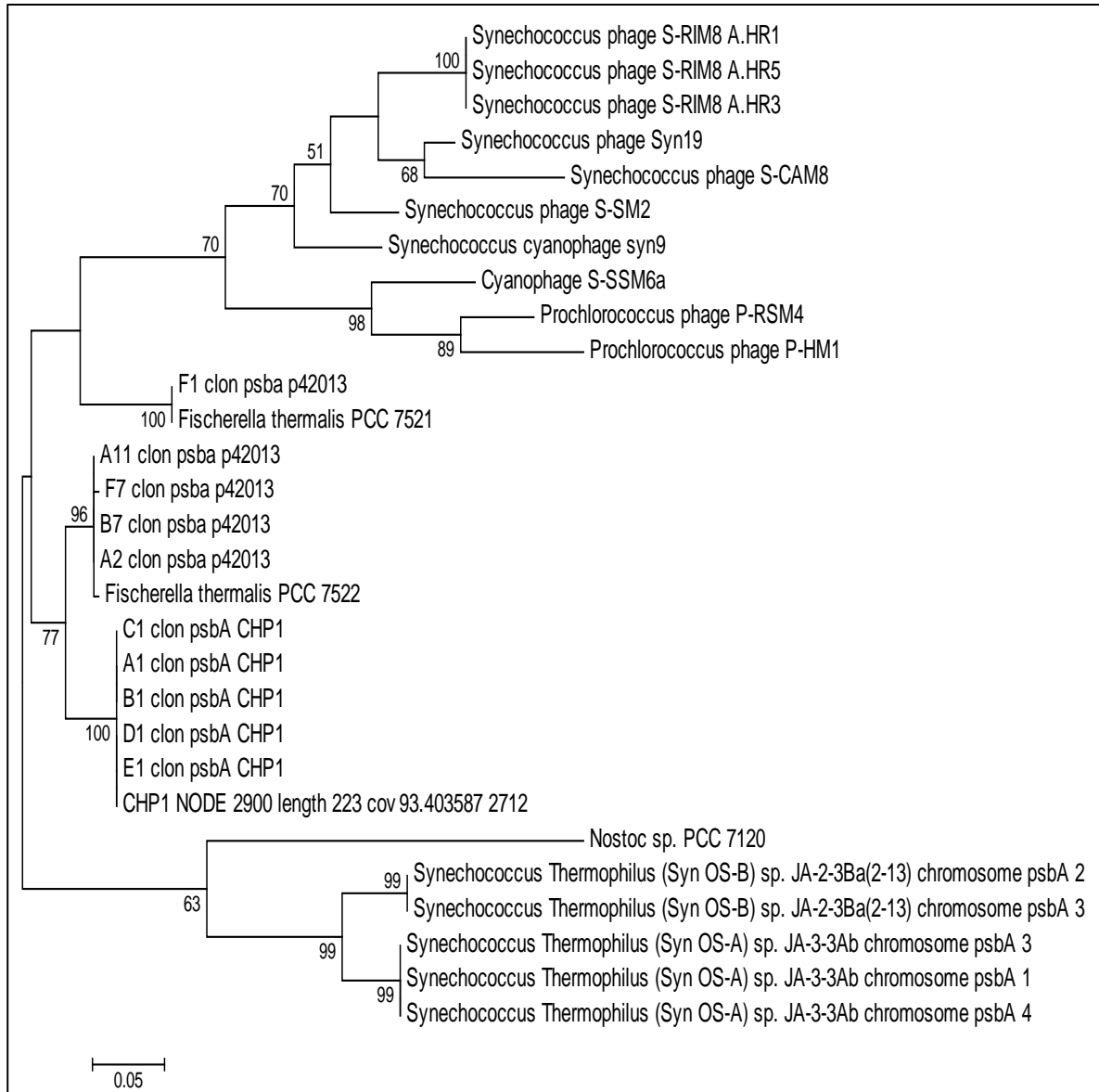


Figura 10: Reconstrucción filogenética de secuencias del gen *psbA* correspondiente a la proteína D1 de fotosistema

En la reconstrucción filogenética fueron incorporadas las secuencias editadas de *psbA* provenientes tanto de la muestra de tapete microbiano, como del aislado CHP1, cuya amplificación se indicará posteriormente en los resultados correspondientes al objetivo 3. En dicha filogenia, se obtuvo cercanía de las secuencias obtenidas para la terma Porcelana con otras secuencias para el gen *psbA* de cianofagos, cianobacterias marinas y cianobacterias termófilas de la subsección I y V, estas últimas obtenidas de la base de datos del NCBI. En los resultados, se puede distinguir un clado formado por secuencias del gen

de *psbA* de cianofagos, mientras que nuestros clones se ubican fuera de ese clado, y junto a secuencias de *psbA* putativas del aislado en cultivo CHP1 de la terma Porcelana, así como a otras cianobacterias de la subsección V como *Fischerella thermalis*.

El análisis de Blastn de las secuencias correspondientes a los otros marcadores moleculares testados y distintos al gen *psbA*, indicó una mayor asignación de éstas a proteínas bacterianas, por lo que no fue posible establecer relación alguna con proteínas virales (Tabla 9). El hecho de que gran parte de estos partidores no funcionaran para amplificar los genes escogidos en las muestras de este estudio, puede explicarse debido a lo distintas que pueden ser las secuencias de estos genes de fagos en ambientes tan radicalmente distintos.

Tabla 9: Análisis de blastn de los marcadores *dnapol* y *g20* mediante Blastn contra la base de datos no redundante y la de caudovirales.

Marcador	Partidores	Tipo de muestra	Asignación taxonómica	Gen asignado	Q. Cover	E-value	%Id.
DNA polimerasa	pol 2 F/R	Tapete microbiano	<i>Sphaerobacter Thermophilus DSM 20745</i>	factor de enlongacion Ef-Tu	92%	2.00E-46	84%
	CP_DNApol_F/R	Tapete microbiano	<i>Colwellia psychrethraea 34H</i>	Succinato aldehido deshidrogenasa	22%	5.00E-09	71%
		Concentrado viral liquido intersticial	<i>Chloroflexus sp. Y.400.fl</i>	proteina biosintesis polisacarido	100%	0	98%
<i>g20</i>	CPS 1.1/8.1	Concentrado viral liquido intersticial	No esta representado en base de datos				

2.5) Análisis *in silico* para la obtención de secuencias de marcadores moleculares de cianofagos a partir del metagenoma y metatranscriptoma correspondientes a la terma Porcelana, y posterior diseño de partidores para genes específicos de interés.

Se utilizó el software MG-RAST, descrito en la sección materiales y métodos, con el fin de rescatar las secuencias presentes en el metagenoma y en el metatranscriptoma que tuvieran una asignación correspondiente a algunos de los marcadores moleculares descritos para cianofagos. El único marcador representado en estas bases de datos fue el gen *g23* que codifica para la proteína MCP.

Inicialmente se recuperaron 34 secuencias relacionadas al gen *g23*, representadas en los contigs del metatranscriptoma, y una secuencia representada en el metagenoma, las cuales se encuentran asignadas específicamente al gen *g23* del fago que infecta a la cepa de cianobacteria *Phormidium* PFWMP3. Se realizaron alineamientos individuales entre cada secuencia identificada o read, y el gen *g23* completo con el fin de diseñar una secuencia consenso donde estuvieran representados estos reads presentes tanto en el metagenoma como en el metatranscriptoma. Para esto, tras disponer de cada alineamiento individual, los reads fueron llevados todos a un mismo alineamiento contrastándose con la secuencia completa del gen *g23*, y de esta forma se diseñó una secuencia de consenso que cubría la región del gen desde el nucleótido 211 al 431. Para esto finalmente solo fueron consideradas 18 de los 35 reads rescatados, dado que las otras secuencias alineaban en otras regiones variables del gen. La secuencia de consenso creada, con un largo de 221 pb, es la siguiente:

Secuencia consenso a partir de reads homólogos a cápside fago PFWMP3 (211-431)

```
GACAAAATACCTGAAACACCAGTACAGCTACAATCTCGTACAGAGACTGAATA  
CACAATCATCATCGATAAGTACAAAGAGACTTCGATAATGATTGAAGACATTC  
TGACAATTCAAGCTGATTATGAGCTGATGTCAGAGTACACACGGGAGATTGGC  
TATGCTCTGGCCCGAGACATAGACAACTGTATTTTAGGTCAGCGTGCAGTGATA  
AACAGTTT
```

Dicha secuencia de consenso fue alineada contra la base de datos nr y la de Caudovirales. Las asignaciones resultantes se encuentran en las imágenes a continuación:

Description	Max score	Total score	Query cover	E value	Ident
Uncultured T7-like podovirus clone LP3 genomic sequence	55.4	55.4	66%	4e-04	69%
Uncultured T7-like podovirus clone LP2 genomic sequence	55.4	55.4	66%	4e-04	69%
Phormidium phage Pf-WMP3, complete genome	55.4	55.4	66%	4e-04	69%
Anabaena phage A-4L, complete genome	51.8	51.8	44%	0.004	71%
Uncultured T7-like podovirus clone LP17 genomic sequence	51.8	51.8	97%	0.004	66%

Figura 11: Análisis de blastn de la secuencia de consenso diseñada contra la base de datos no redundante. Se muestran los parámetros de alineamiento respectivo.

Description	Max score	Total score	Query cover	E value	Ident
Uncultured T7-like podovirus clone LP3 genomic sequence	55.4	55.4	66%	9e-07	69%
Uncultured T7-like podovirus clone LP2 genomic sequence	55.4	55.4	66%	9e-07	69%
Phormidium phage Pf-WMP3, complete genome	55.4	55.4	66%	9e-07	69%
Anabaena phage A-4L, complete genome	51.8	51.8	44%	1e-05	71%
Uncultured T7-like podovirus clone LP17 genomic sequence	51.8	51.8	97%	1e-05	66%
Cyanophage PP, complete genome	50.0	50.0	66%	4e-05	68%

Figura 12: Análisis de blastn de la secuencia de consenso diseñada contra la base de datos de los Caudovirales. Se muestran los parámetros de alineamiento respectivo.

Efectivamente es posible comprobar que las asociaciones más cercanas al alinear la secuencia de consenso están relacionadas a secuencias virales, específicamente del orden Caudovirales, encontrándose representadas secuencias de *g23* correspondientes a los fagos PFWMP3, el fago A4-L que infecta cianobacterias del género *Anabaena*, al cianopodovirus PP que infecta a los géneros *Phormidium*, *Plectonema* y *Leptolyngbya*; entre otros podovirus no cultivados.

Para el diseño de los partidores fueron consideradas las secuencias previamente mencionadas, asignadas a *g23*, así como la secuencia de consenso. A partir de esta última, mediante los softwares Primer3 y Primer BLAST, fue posible elegir el par de partidores que pudieran generar un amplicón de tamaño constante a lo largo de las secuencias consideradas. Los partidores elegidos finalmente amplifican una región de 167 pb dentro de la secuencia de consenso, y al probar los partidores en todas las secuencias de referencias con el software VectorNTi amplifican en todas ellas una región constante de 166 pb. Se alinearon todas las las secuencias consideradas, incluyéndose los partidores, y se procedió a degenerar según fuera necesario. Ambos set de partidores propuestos se diferencian en su degeneración. Las secuencias de éstos y algunas de sus características se muestran en la tabla 10.

Tabla 10: Set de partidores generados para *g23*, mediante Primer Blast y Primer 3. Aquellos rotulados como F1 corresponden al partidior forward y R1 a reverse.

Nombre Partidor	Secuencia	Largo (nts)	Tamaño amplicón	%G-C	Temperatura melting
CP_MCP_F1	ACCKSARACMCCDGTWMAVY	20	167	52.5	49.5-65.1
CP_MCP_R1	RWGCYCKRTYKCGTATYG	18	167	52.8	43.8-61.6
CP_MCP_A4L_F1	ACCTGAAACMCCWGTACARC	20	167	50	52.5-57.1
CP_MCP_A4L_R1	RWGCYCKGTYTCGTATYG	18	167	52.8	47.1-58

Se utilizaron condiciones predeterminadas para la amplificación del fragmento de 167 pb, asignado a *g23*, las cuales aparecen señaladas en las tablas 2 y 3 de la sección 2.2 de Materiales y Metodos, junto con las condiciones de amplificación de los otros partidores utilizados en este estudio. Tras realizar PCRs en gradiente entre las temperaturas 40°C y 55°C no hubo amplificación, lo cual se señala con signo negativo en la columna correspondiente a *g23* en la tabla 6 de la sección 2.2 de Resultados.

2.6) Identificación de secuencias virales en el metaviroma de la terma Porcelana

Previamente a la identificación de marcadores virales en el metaviroma de la terma Porcelana, se dispuso de este metaviroma, accesible en el laboratorio de la Dra. Beatriz Díez, el cual inicialmente se ensambló a nivel de contigs usando gráficos de De Bruijn implementados en Spades 3.6 opción metaspades. Posteriormente, se utilizó el software PROKKA para la predicción de secuencias proteicas.

Asimismo, paralelamente se descargaron las secuencias aminoacídicas de la base de datos del Refseq accesibles desde NCBI, correspondiente a los marcadores moleculares ya utilizados: *g20*, *dnapol*, *g23*, *psbA*; y otros que fueron identificados en la literatura como constitutivos en fagos tales como genes de la proteína integrasa y *terL* (la subunidad mayor de la terminasa).

Posteriormente, se hizo un blastp con un cut off de $1e-3$ y *query coverage* de 65% entre la base de datos de los marcadores y el metaviroma ensamblado, encontrándose finalmente solo 34 secuencias del metaviroma asociadas a alguno de los marcadores en Caudovirales (*Podoviridae*, *Myoviridae* y *Siphoviridae*) que infectasen cianobacterias, de entre un universo de 11.145 secuencias asociadas. Las secuencias del metaviroma son las siguientes:

Tabla 11: Análisis de blastp de las secuencias (reads) rescatadas del metaviroma preasignadas a secuencias virales contra la base de datos no redundante. Se colocaron solo aquellas secuencias sobre un %identidad de 40%. La información en rojo señala aquellas secuencias asignadas a alguno de los marcadores moleculares a identificar.

Read metaviroma	Asignación taxonómica	Gen asignado	Q. Cover	E-value	%Id.
>NODE_1_length_767108_cov_33.5092_101	Acidimicrobium ferrooxidans	DNA-directed RNA polymerase sigma-70 factor	64%	1.00E-59	42%
>NODE_1_length_767108_cov_33.5092_106	Candidatus Saccharibacteria bacterium	RNA polymerase sigma factor RpoD	96%	0	81%
>NODE_100_length_1985_2_cov_72.8161_10	Cyanothece sp. PCC 7822	integrasa	96%	6.00E-123	46%
>NODE_100_length_1985_2_cov_72.8161_10	Planktothrix phage PaV-LD	integrasa	97%	7.00E-102	42%
>NODE_120_length_1678_3_cov_9.09099_13	Candidatus Saccharibacteria bacterium	RNA polymerase sigma factor RpoD	92%	0	85%
>NODE_119_length_1688_3_cov_7.63174_3	marine actinobacterium MedAcidi-G1	RNA polymerase sigma 70	75%	2.00E-96	51%
>NODE_3369_length_143_7_cov_2.48915_1	candidate division WS6 bacterium OLB20	RNA polymerase sigma factor SigA	99%	7.00E-177	64%
>NODE_4080_length_130_8_cov_3.06784_2	Pseudomonas sp. PAMC 26793	RNA polymerase sigma factor RpoS	100%	0	99%
>NODE_4794_length_121_7_cov_4.32014_1	Inquilingus limosus	RNA polymerase factor sigma-32	93%	3.00E-160	77%
>NODE_6475_length_105_7_cov_1.40918_1	Planctomycetaceae bacterium SCGC AG-212-F19	RNA polymerase subunit sigma-70	95%	1.00E-177	76%
>NODE_12550_length_79_2_cov_1.5848_2	Geminicoccus roseus	RNA polymerase factor sigma-32	100%	8.00E-92	76%

>NODE_14798_length_73 5_cov_2.00441_2	Janthinobacterium sp. HH01	RNA polymerase sigma factor RpoD	100%	1.00E-138	100%
>NODE_16487_length_70 0_cov_2.32558_1	Brevundimonas sp. 374	RNA polymerase, sigma 32 subunit, RpoH	97%	1.00E-129	85%
>NODE_17197_length_68 6_cov_2.52773_1	Candidatus Saccharibacteria bacterium	RNA polymerase sigma factor RpoD	79%	2.00E-40	47%
>NODE_21852_length_61 9_cov_4.86702_1	Janthinobacterium	MULTISPECIES: RNA polymerase sigma factor RpoD	100%	8.00E-148	100%
>NODE_32722_length_51 5_cov_1.5587_1	Pseudomonas deceptionensis	RNA polymerase sigma factor RpoS	100%	1.00E-97	98%
>NODE_33109_length_51 2_cov_2.31072_1	Paraburkholderia graminis C4D1M	sigma-70 region 3 domain protein	100%	2.00E-117	97%
>NODE_38512_length_47 2_cov_1.56835_1	Vibrio cholerae	RNA polymerase sigma factor RpoS	93%	4.00E-62	78%
>NODE_40414_length_45 9_cov_1.7005_1	Pseudomonas syringae pv. lapsa	RNA polymerase sigma factor RpoS	100%	9.00E-106	100%
>NODE_43236_length_44 4_cov_0.92545_1	Candidatus Saccharimonas aalborgensis	RNA polymerase major sigma-43 factor (sigma-A)	100%	1.00E-93	93%
>NODE_44476_length_44 0_cov_0.935065_1	Calditerrivibrio nitroreducens	RNA polymerase sigma factor RpoD	100%	5.00E-98	99%
>NODE_45278_length_43 8_cov_1.40209_1	Rhodospirillum centenum	RNA polymerase sigma 70	99%	1.00E-79	86%

>NODE_48806_length_428_cov_0.959786_1	Chloroflexus	MULTISPECIES: DNA-directed RNA polymerase sigma-70 factor	100%	2.00E-95	99%
>NODE_65691_length_392_cov_1.06528_1	Candidatus Woesebacteria bacterium RBG_16_39_8b	RNA polymerase sigma factor RpoD	100%	7.00E-71	90%
>NODE_70189_length_384_cov_1.64134_1	Polaromonas sp. JS666	RNA polymerase, sigma 32 subunit, RpoH	99%	5.00E-75	88%
>NODE_70912_length_383_cov_1.08232_1	Chloroflexus aurantiacus J-10-fl	SigC	99%	8.00E-12	47%
>NODE_72407_length_380_cov_1.10769_1	Elioraea tepidiphila	RNA polymerase factor sigma-32	100%	6.00E-84	95%
>NODE_74428_length_377_cov_1.04348_1	uncultured Mediterranean phage uvMED	terminase large subunit	80%	1.00E-17	43%
>NODE_81801_length_365_cov_1.15806_1	Candidatus Woesebacteria bacterium GW2011_GWB1_45_5	RNA polymerase sigma factor	100%	6.00E-78	99%
>NODE_87876_length_356_cov_1.19269_1	Candidatus Fraserbacteria bacterium RBG_16_55_9	RNA polymerase sigma factor RpoD	88%	9.00E-32	56%
>NODE_93913_length_347_cov_2.43151_1	Candidatus Saccharibacteria bacterium RIFCSPHIGHO2_01_FULL_49_21	RNA polymerase sigma factor RpoD	100%	2.00E-68	91%

>NODE_101581_length_3 37_cov_2.07801_1	Pseudomonadale s bacterium RIFCSPHIGHO2 _02_FULL_60_4 3	RNA polymerase sigma factor RpoS	100%	6.00E- 75	100%
>NODE_106992_length_3 29_cov_1.30292_1	Spirochaetes bacterium RBG_16_49_21	RNA polymerase sigma factor RpoD	100%	1.00E- 64	93%
>NODE_109538_length_3 26_cov_2.65314_1	Candidatus Paracaedibacter symbiosus	RNA polymerase sigma factor RpoD	100%	1.00E- 54	85%
>NODE_138513_length_2 91_cov_1.51271_1	Chelativorans sp. BNC1	phage terL protein	100%	6.00E- 34	65%

Fue posible identificar en el metaviroma secuencias asociadas a los genes de integrasa y de la subunidad mayor de la terminasa (*terL*). El análisis de blastp mostró que gran parte de los reads recuperados del metaviroma preasignados a secuencias de Caudovirales, están asociado a secuencias correspondiente tanto a factores sigma o sigma alternativos de RNA polimerasa.

Se procedió a realizar árboles filogenéticos a partir de aquellas secuencias del metaviroma asignados a los marcadores moleculares *terL* e integrasa junto con secuencias de referencia de la base de datos para cada marcador obtenidas del refseq del NCBI. Sin embargo, para el caso de *terL* no fue posible establecer una asociación filogenética confiable dados los bajos valores de bootstrap (1000) asignados a gran parte de los clados. Por esta razón, no fue posible concluir la relación de cercanía entre las secuencias del metaviroma y las otras secuencias de genes de terminasa presentes en las bases de datos públicas.

Con respecto al árbol filogenético correspondiente al gen de la integrasa (Figura 13), es posible observar que la única secuencia obtenida en el metaviroma asociada a ésta, tiene características termales, agrupándose con buen soporte bootstrap (1000) junto a secuencias de integrasas presentes en las cianobacterias *Mastigocladus laminosus* y *Chroococcidiopsis thermalis* descritos en dichos ambientes, y asimismo está asociado a un cianofago que infecta cianobacterias filamentosas de agua dulce como *Planktothrix* PAV_LD.

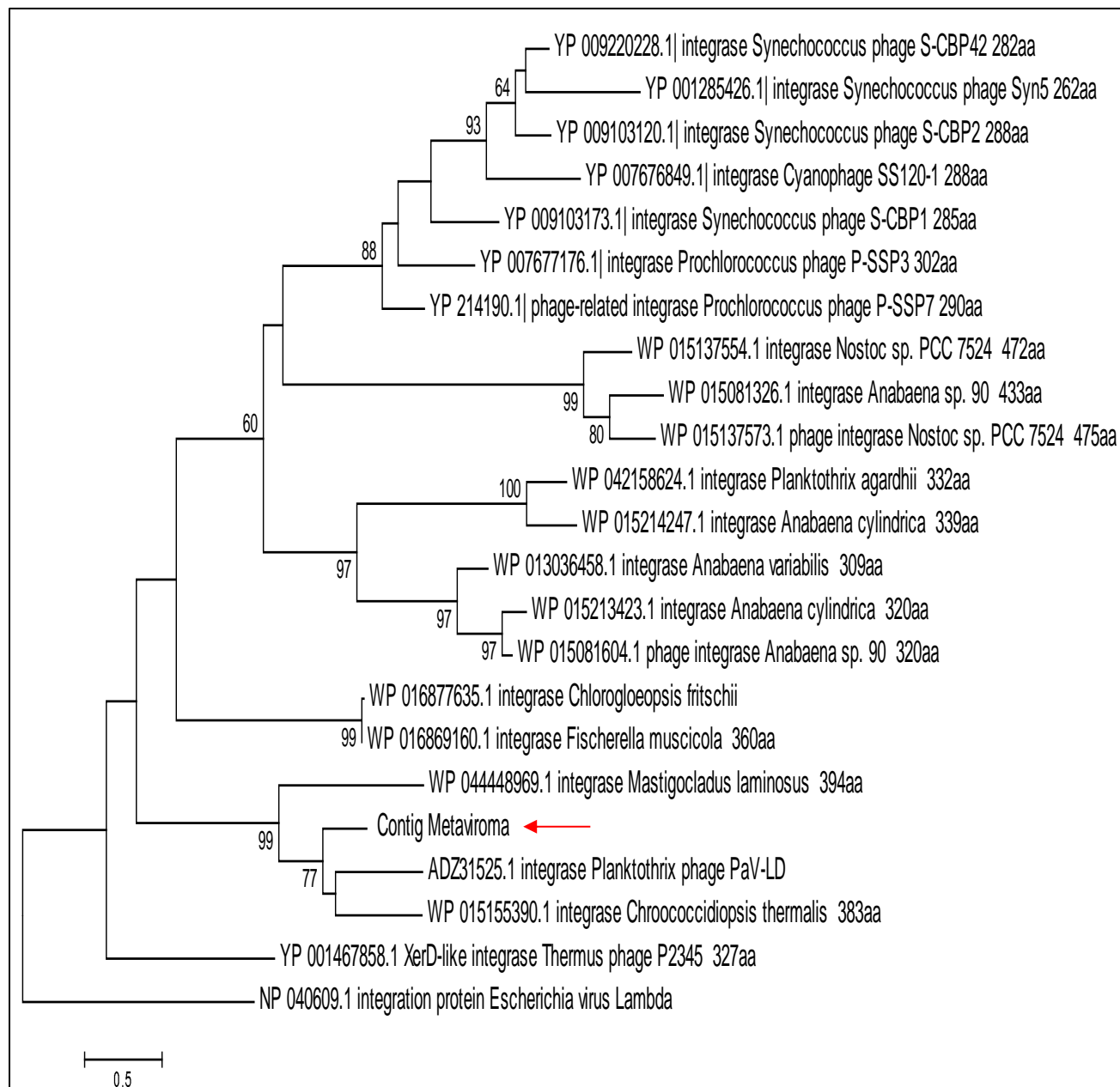


Figura 13: Reconstrucción filogenética de secuencias de Integrasa, utilizando el algoritmo Maximum likelihood con un bootstrap de 1000. En rojo se señala la secuencia asociada a la integrasa, presente en el metaviroma.

Objetivo 3

3.1) Crecimiento cultivo líquido y cultivo sólido de aislados de cianobacterias obtenidos de la terma Porcelana.

Se realizó una curva de crecimiento para dos aislados termófilos de la subsección V CHP1 y CHP2 obtenidos de la terma Porcelana. Estos fueron crecidos en medio de cultivo líquido BG11 con un inóculo inicial con 2 mg de biomasa. La curva se realizó a partir de los cálculos de peso seco (mg) mostrados en la tabla 12 y 13, y representados en las Figuras 14 y 15.

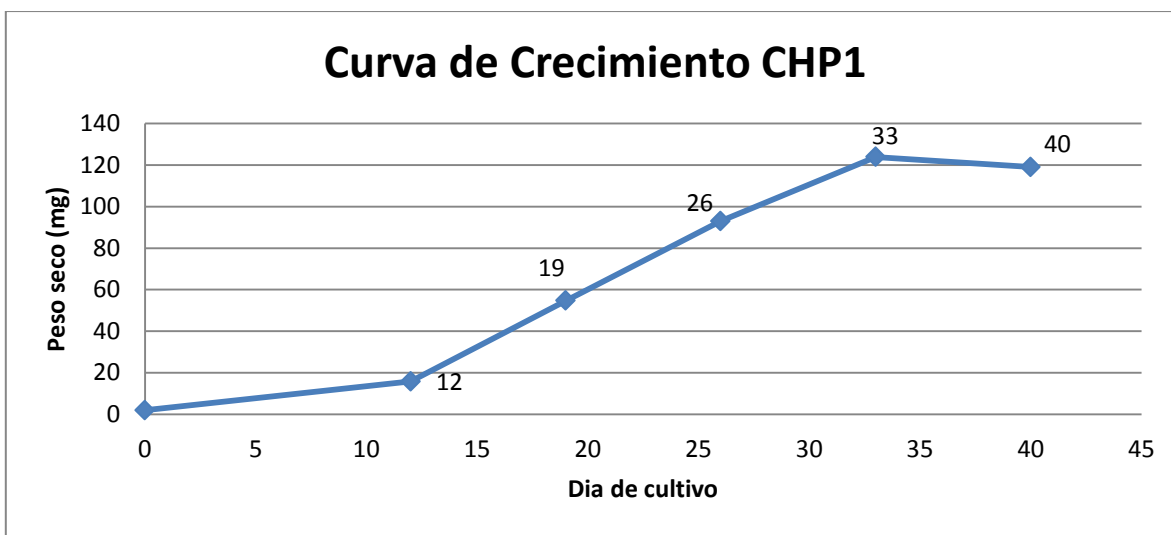


Figura 14: Curva de crecimiento del aislado CHP1. Se evalúa periódicamente el aumento de biomasa mediante estimación de peso seco.

En la tabla 12 se muestra el peso seco asociado a la curva de crecimiento del aislado CHP1. Se utilizó cultivos en paralelo a los cuales se les realizó inducción de profago como se señaló en la sección 3.1 de Materiales y Metodos. Asimismo, se señala en la tabla 12 que luego de 19 días de haber sido incubado en medio BG11 es posible ver clarificación en el cultivo postinducción, lo cual podría indicar posible lisis por fagos.

Tabla 12: Curva de crecimiento e inducción con mitomicina C 5 ug/mL para el aislado CHP1.

Aislado	Día curva	Peso seco (mg)	Comentarios
	12	12.1	Cultivo con señal de clorosis y clarificación
	19	33.7	Cultivo con señal de clorosis y clarificación
CHP1	26	83.6	Cultivo integro sin señal de lisis postinducción
	33	102.9	Cultivo integro sin señal de lisis postinducción
	40	104.8	Cultivo integro sin señal de lisis postinducción

La figura 15 muestra la curva de crecimiento del aislado CHP2 crecido bajo las mismas condiciones que para el aislado CHP1.

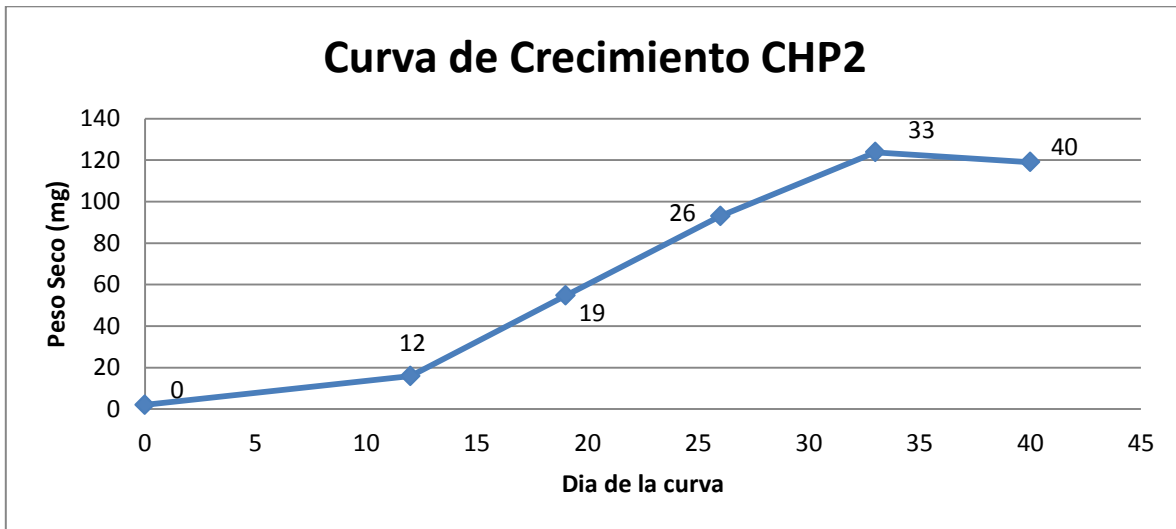


Figura 15: Curva de crecimiento del aislado CHP2. Se evalúa periódicamente el aumento de biomasa mediante estimación de peso seco.

En la tabla 13 se muestra el peso seco asociado a la curva de crecimiento del aislado CHP2. Al igual que para el aislado CHP1, cultivos paralelos fueron inducidos con el antibiótico en los distintos puntos de la curva y se evaluó presencia de clarificación. Al igual que para CHP1, luego de 19 días de haber sido incubado en medio BG11 es posible ver clarificación en el cultivo postinducción, lo cual podría indicar posible lisis por fagos.

Tabla 13: Curva de crecimiento e inducción con mitomicina C 5 ug/mL para el aislado CHP2.

Aislado	Día curva	Peso seco (mg)	Comentarios
	12	15.9	Cultivo con señal de blanqueamiento
	19	54.7	Cultivo con señal de blanqueamiento
CHP2	26	93	Cultivo clorótico luego de 7 días
	33	123.8	Cultivo integro sin señal de lisis postinducción
	40	119	Cultivo integro sin señal de lisis postinducción

Para experimentos de inducción de profago se prepararon sistemas de doble capa como se indica en la sección Materiales y Métodos. La figura 16 muestra un sistema de doble capa representativo proveniente de un cultivo inicial del aislado CHP1.

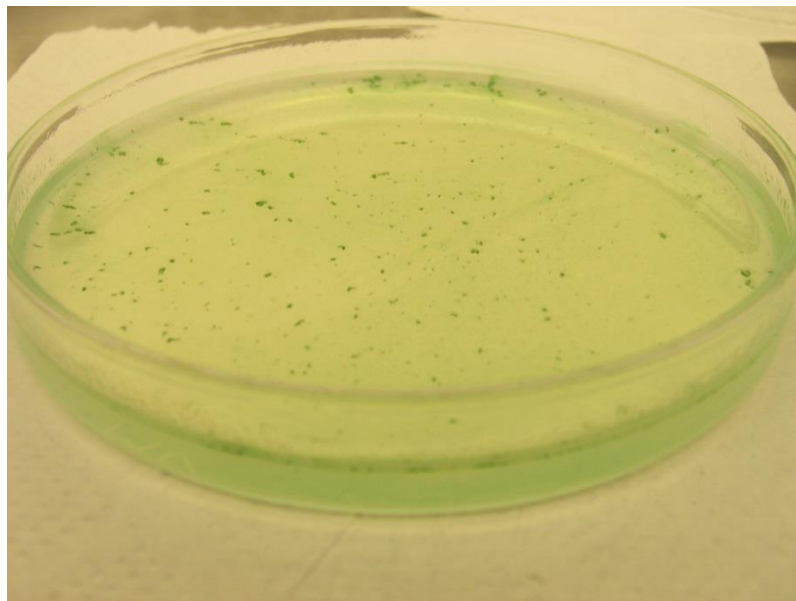


Figura 16: Sistema de doble capa BG11 agar 0.5% superior- 1% inferior, de un cultivo del aislado CHP1.

Para el caso del crecimiento de los aislados en medio sólido doble capa se observó como resultado con el pasar de los días, la formación de un césped microbiano homogéneo en la delgada capa superior de BG11 0.5%, en lugar de colonias.

3.2) Inducción de profagos con agentes promotores del estrés bacteriano.

Se utilizó distintos agentes estresores para la inducción de profago. Para la inducción de los cultivos con luz UV-C no se observó formación de halos de lisis en cultivos sólidos de doble capa en ninguno de los tiempos testados (5'-15'-30' minutos).

Para el caso de la inducción mediada por un cambio de temperatura de 30°C a 50°C, se observó que tanto el aislado CHP1 como el CHP2 (Figuras 17 y 18 respectivamente) se mantuvieron intactos sin formación de halos de lisis. Sólo se observó clorosis luego de 2 semanas de incubación a 50°C debido a la deshidratación del sistema de doble capa. Los cultivos c y d señalados en las figuras 17 y 18 para ambos aislados, fueron pre-inducidos con mitomicina C, sin embargo tampoco presentaron halos de lisis.

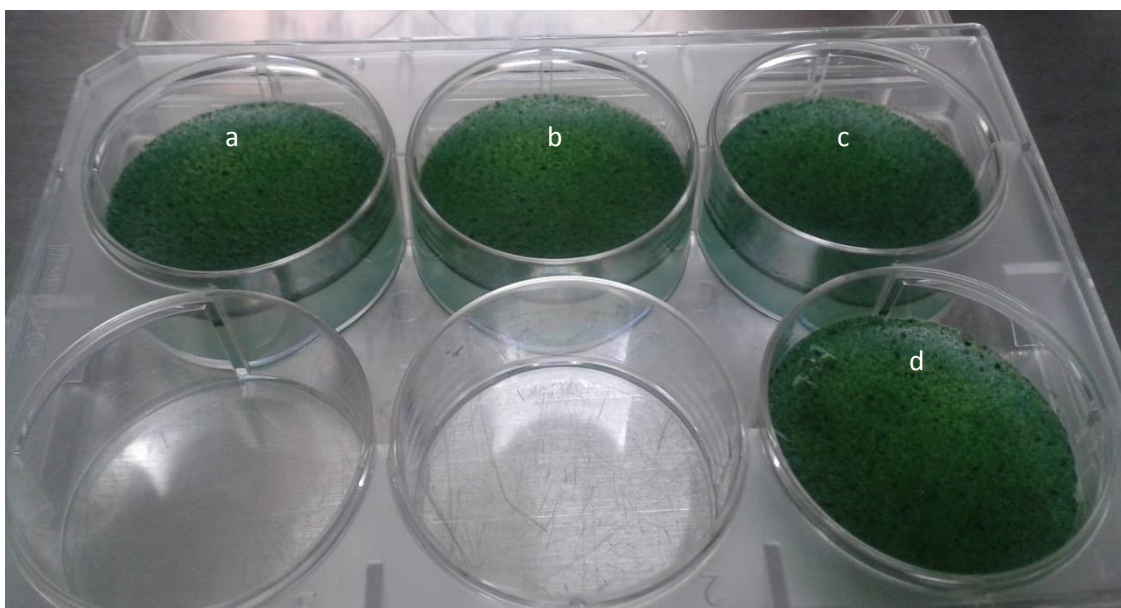


Figura 17: Aislado CHP1 sometido a shift de temperatura 30°C-50°C tras 5 días de inducción. Los cultivos a y b corresponden a cultivos inducidos solo con el shift de temperatura, mientras que c y d fueron pre-incubados con mitomicina C 5ug/mL.

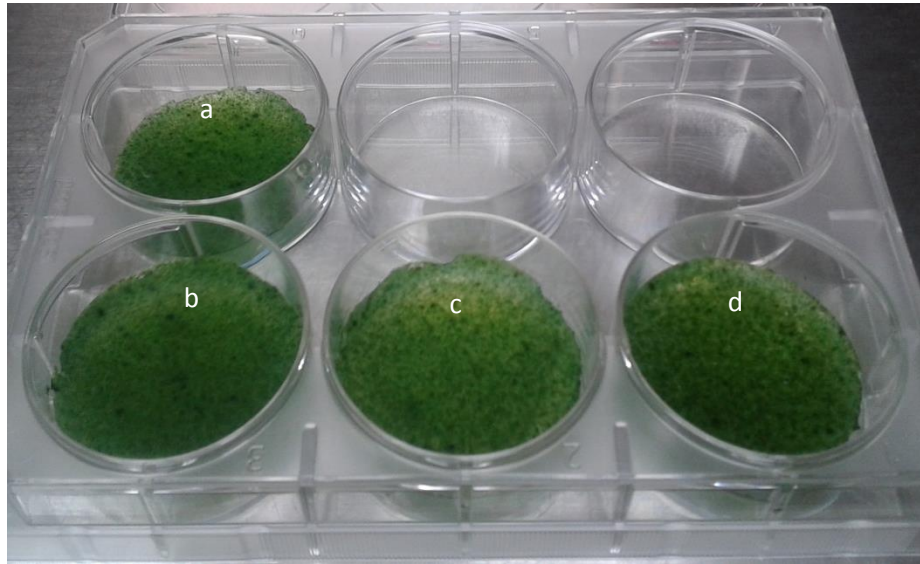


Figura 18: Aislado CHP2 sometido a shift de temperatura 30°C-50°C tras 5 días de inducción. Los cultivos a y b corresponden a cultivos inducidos solo con el shift de temperatura, mientras que c y d fueron pre-incubados con mitomicina C 5ug/mL.

La inducción mediada por CuSO₄ fue testada en cultivos líquidos del aislado CHP1. Fue posible observar clorosis del cultivo cuando éste se indujo bajo concentraciones desde los 1.24e-5M de CuSO₄ dada la transparencia del cultivo como se observa en la figura 19.

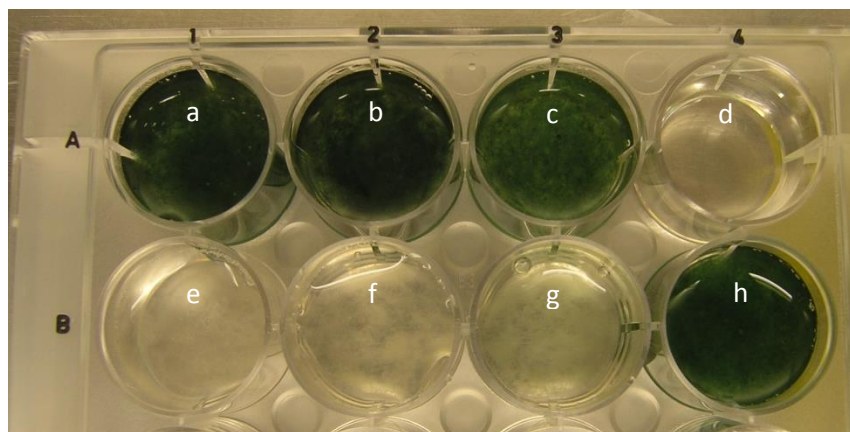


Figura 19: Cultivos inducidos con distintas concentraciones crecientes de CuSO₄; estas son: a) 3.1e-6 M, b) 6.2e-6 M, c) 9.3e-6 M, d) BG11 sin CuSO₄, e) 1.24e-5 M, f) 3.1e-5 M, g) 3.1e-4 M, h) cultivo control sin inductor.

Se evaluó la eficiencia de la inducción mediante microscopía de epifluorescencia para identificar la presencia de VLPs en el cultivo e, señalado en la figura 20.

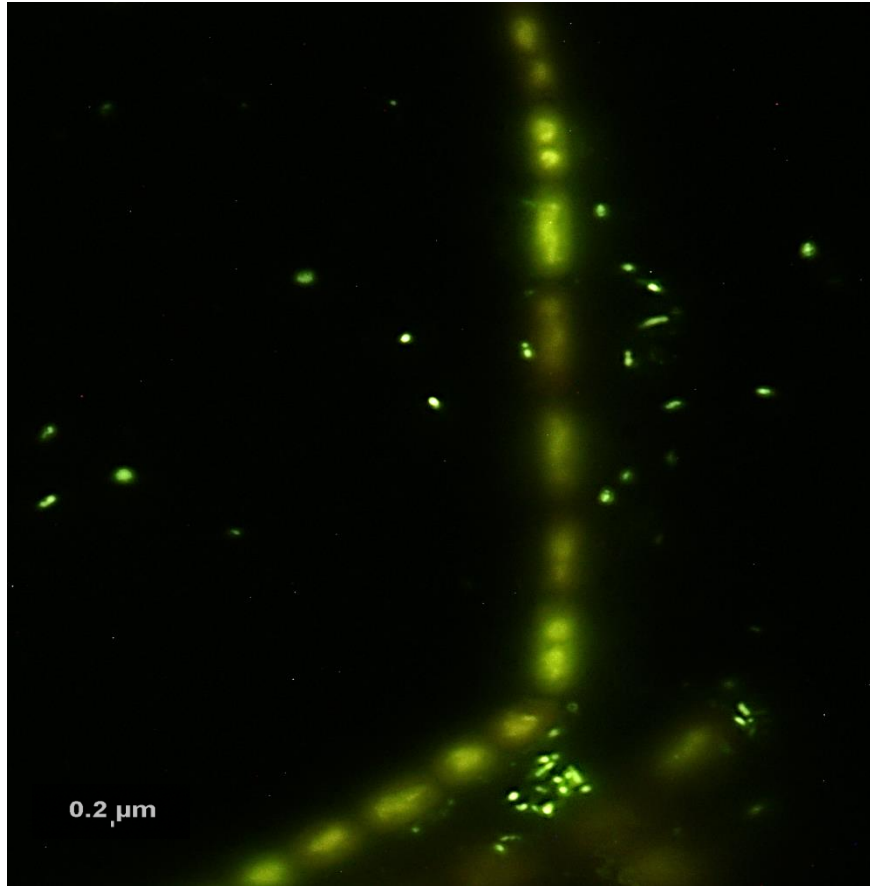


Figura 20: Filamento de CHP1 inducido con 1.24×10^{-5} M de CuSO_4 .

La muestra evaluada poseía una amplia cantidad de filamentos desintegrados, sin embargo no fue posible encontrar VLPs en la observación. En la figura 20 además se distinguen bacterias heterotróficas acompañantes junto a un filamento de CHP1 encontrado integro.

Para el caso de la inducción mediada por mitomicina C, se realizó una curva de inducción en la cual el cultivo líquido del aislado CHP1 fue sometido a 5 $\mu\text{g/mL}$ de mitomicina C durante distintos tiempos para evaluar la posible liberación de los fagos inducidos, según como se señala en la sección Materiales y Métodos. Tras examinar las microscopías obtenidas para la identificación de VLPs, fue posible encontrar muchos filamentos desintegrados del aislado, con VLPs solo adheridas a éstos, como se muestra representativamente en la figura 21, solo tras 10 h. de haber sido inducido el cultivo.

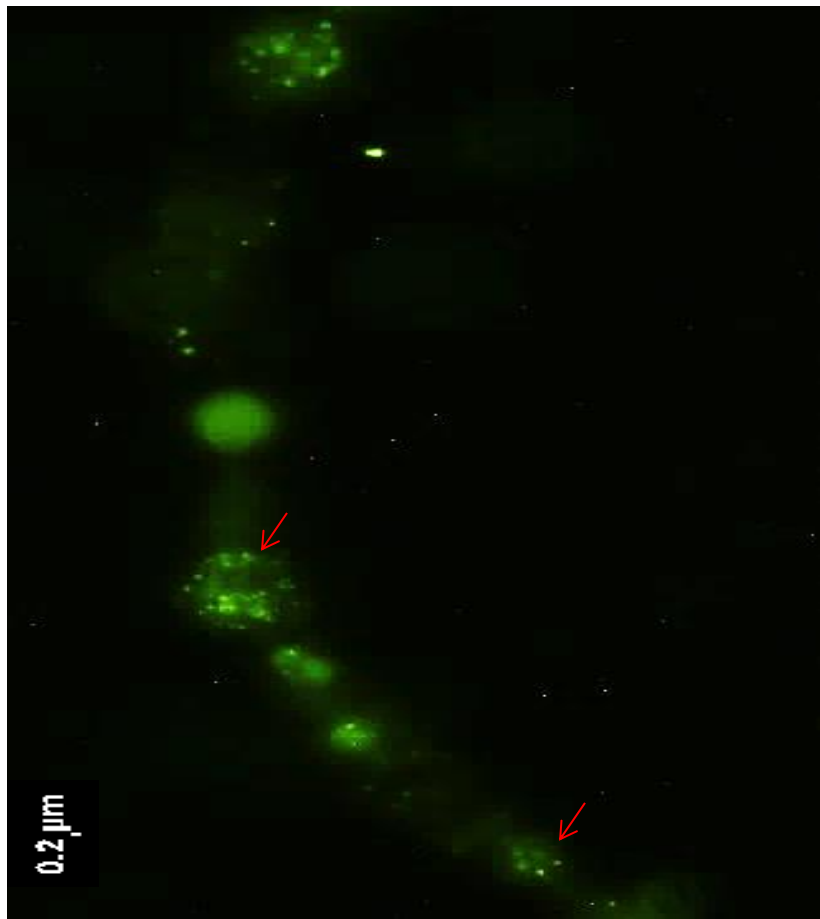


Figura 21: Filamento de CHP1 desintegrado proveniente de cultivo inducido con mitomicina C 5ug/mL tras 10 horas de inducción, con posibles VLPs señaladas por las flechas rojas.

Sin embargo, cuando se evaluó el cultivo control sin inducción, si bien los filamentos estaban íntegros y había solo bacterias heterotróficas, se identificó un filamento desintegrado en el cual se observan VLPs del tamaño esperado, como se muestra en la figura 22.

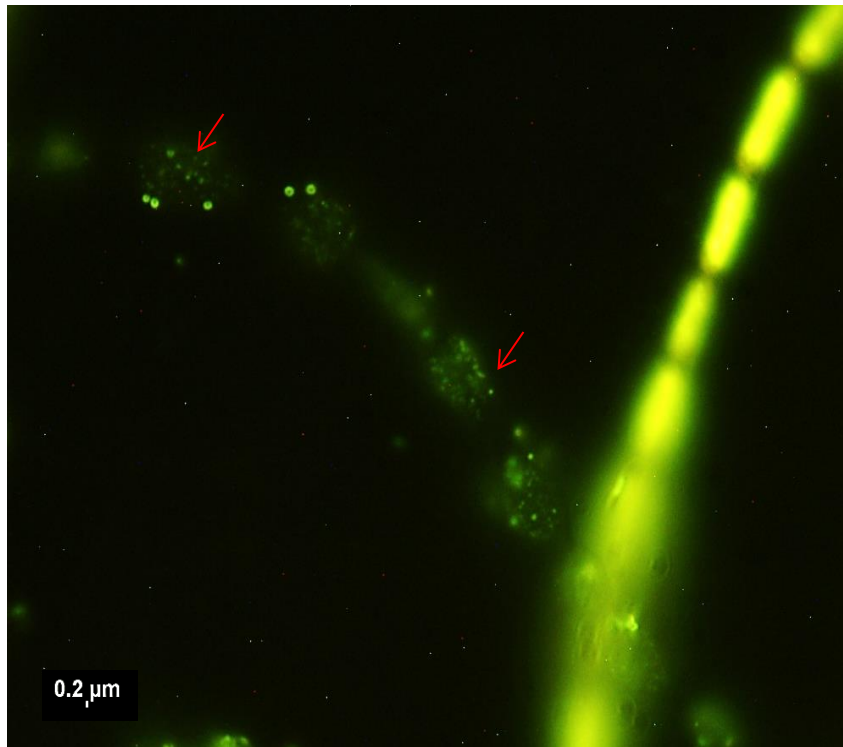


Figura 22: Filamento de CHP1 desintegrado proveniente de cultivo control, con posibles VLPs señaladas por las flechas rojas.

Para el caso de la inducción mediante estrés hídrico, se evaluó la presencia de halos de lisis en los cultivos sólidos de doble capa montados en los sistemas de desecación según las condiciones descritas en la sección 3.2 de Materiales y Métodos. En cada sistema se presentan 3 cultivos sólidos de doble capa sometidos a estrés hídrico y un cuarto cultivo con pre incubación con mitomicina C 5ug/mL. Los sistemas correspondientes a cada cultivo se presentan en la figura 23 y 24.

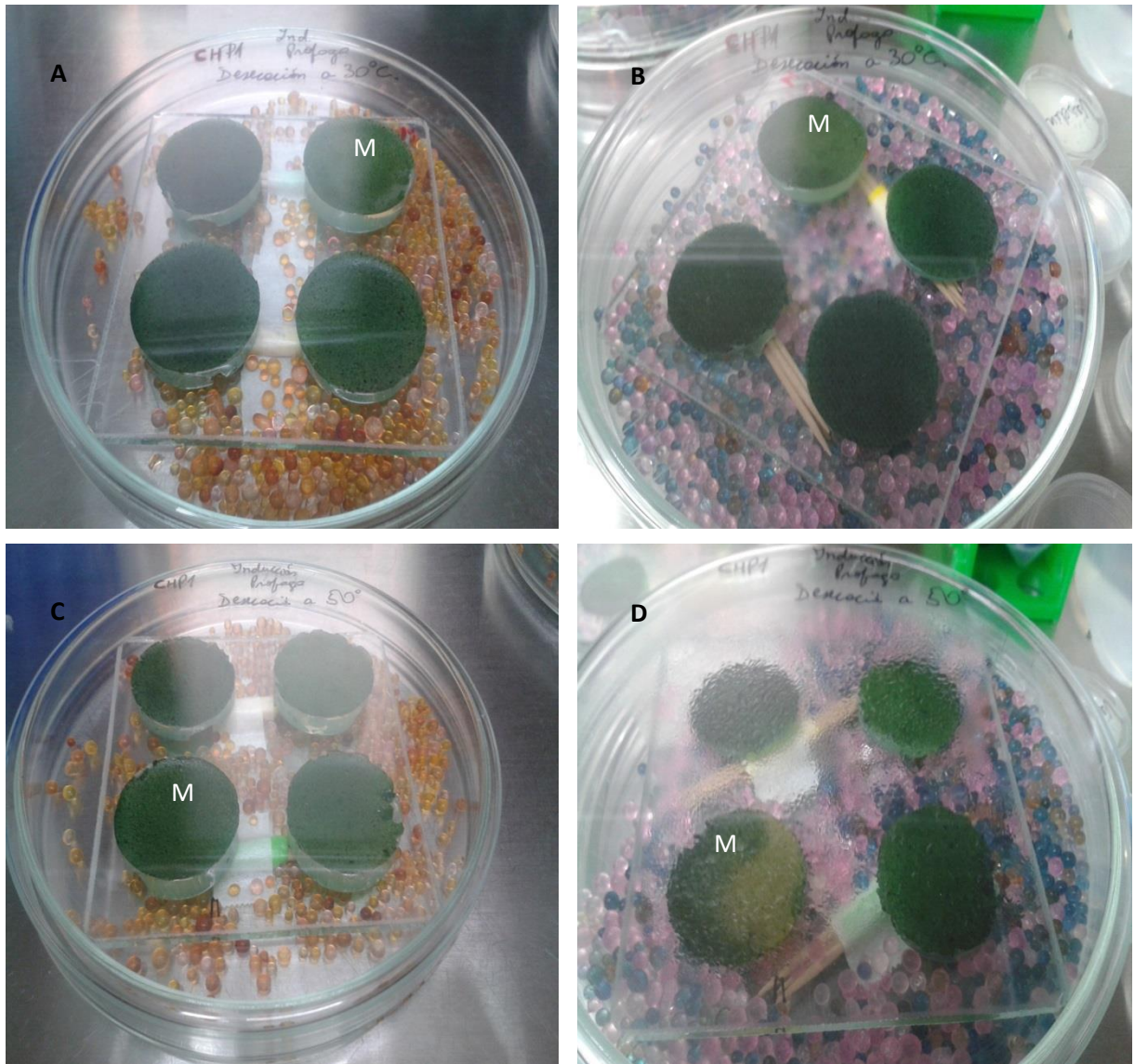


Figura 23: Montaje de sistemas de desecación para el aislado CHP1 mediante uso de silica gel. Las imágenes corresponden a cultivos de CHP1 que fueron sometidos a: A) Previo estrés hídrico a 30°C, B) Post inducción por estrés hídrico a 30°C, C) Previo estrés hídrico a 50°C, D) Post inducción por estrés hídrico a 50°C. Las imágenes B y D fueron obtenidas 7 días después del inicio de la inducción. Los cultivos señalados con la letra M fueron aquellos inducidos además con 5ug/mL de mitomicina C.

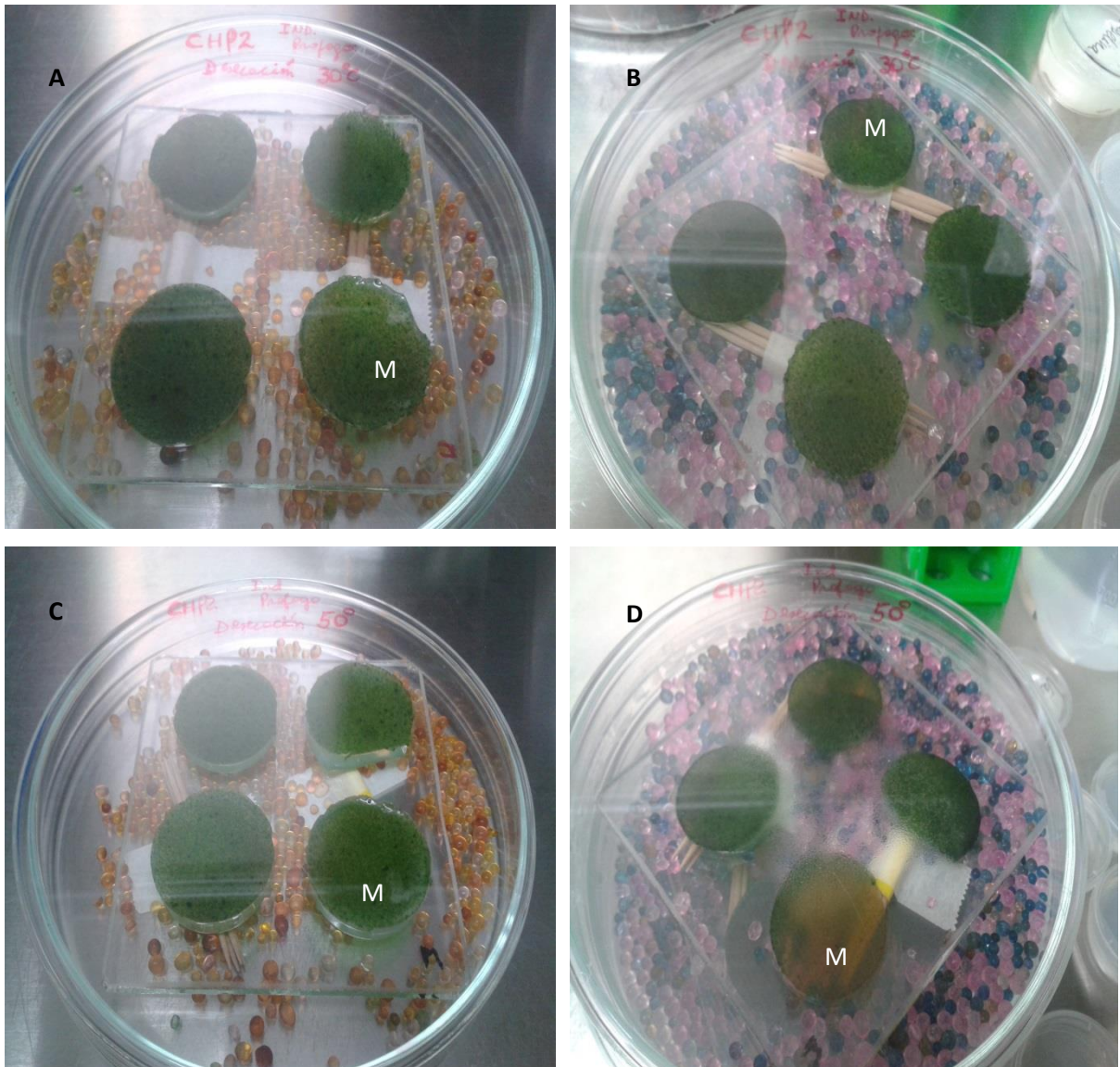


Figura 24: Montaje de sistemas de desecación para el aislado CHP2 mediante uso de silica gel. Las imágenes corresponden a cultivos de CHP2 que fueron sometidos a: A) Previo estrés hídrico a 30°C, B) Post inducción por estrés hídrico a 30°C, C) Previo estrés hídrico a 50°C, D) Post inducción por estrés hídrico a 50°C. Las imágenes B y D fueron obtenidas 7 días después del inicio de la inducción. Los cultivos señalados con la letra M fueron aquellos inducidos además con 5ug/mL de mitomicina C.

No fue posible obtener halos de lisis en ninguno de los cultivos sometidos a los sistemas de desecación. Solo para el caso del cultivo del aislado CHP2 pre incubado con mitomicina C y sometido a 50°C, presentó clorosis 7 días después de la inducción por estrés hídrico (Figura 24 D), sin embargo, tampoco fue posible rescatar algún posible halo de lisis.

Como se expuso anteriormente, mediante los métodos anteriores de inducción de profago no fue posible obtener halos de lisis, sin embargo fue posible obtener cultivos sólidos lisados como se muestran en la figura 25, mediante una mezcla de condiciones a continuación descritas.

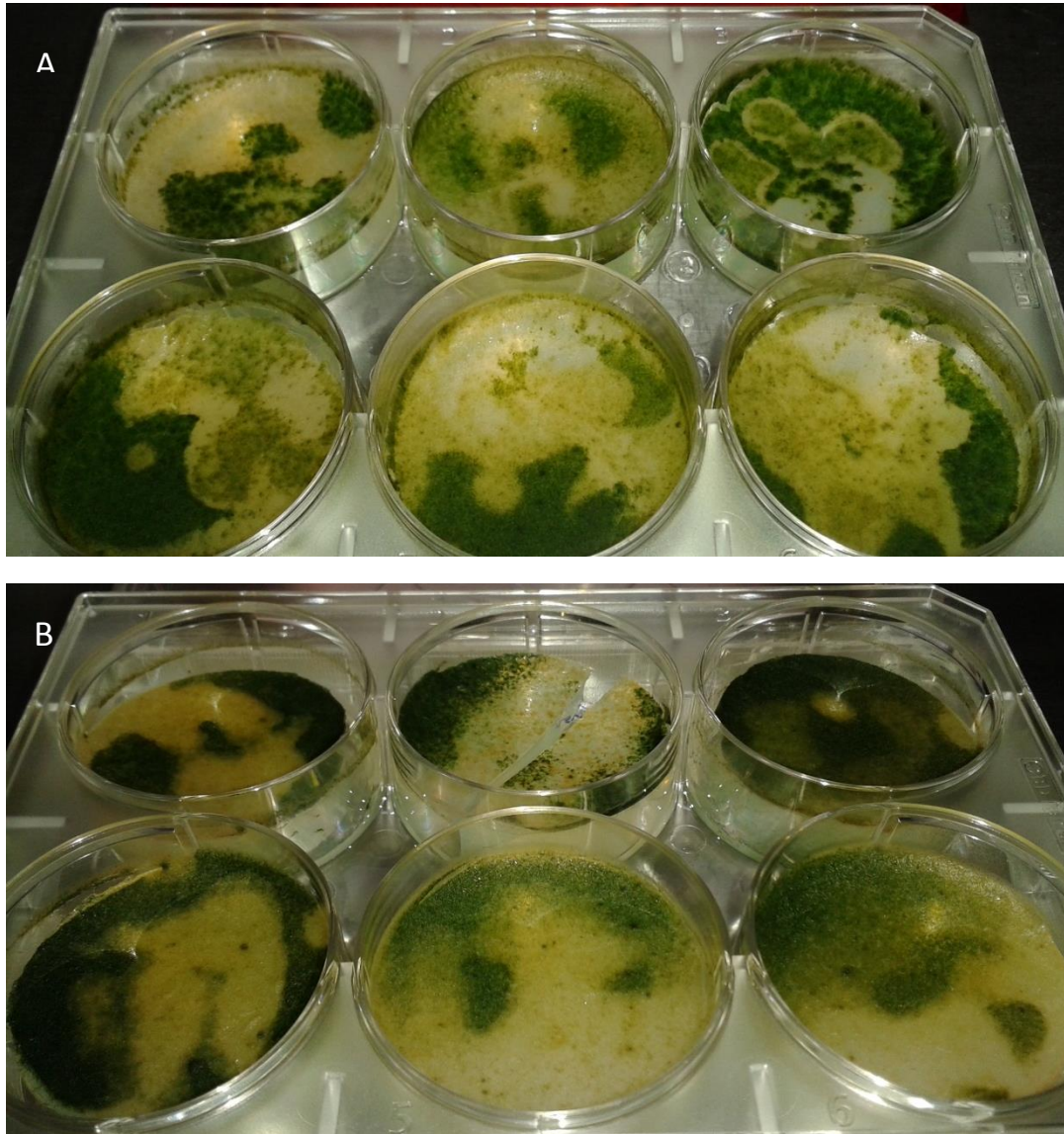


Figura 25: Cultivos solidos de doble capa BG11 agar con halos de lisis: A) Aislado CHP1, B) Aislado CHP2.

Se dejó crecer cultivos en sistemas de doble capa inoculados inicialmente con 500 μL de los aislados CHP1 y CHP2 en fase temprana a 30°C durante 20 días hasta formar un césped homogéneo. Posteriormente, cada uno de los aislados fue inducido con mitomicina C 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ sin observar cambios durante 7 días. Al cabo de dicho tiempo los cultivos se sometieron a un cambio de temperatura a 50°C durante 16 horas, y luego se volvieron a colocar a 30°C . Al cabo de 14 días se pudo ver los halos de lisis señalados con flechas negras en la figura 26.

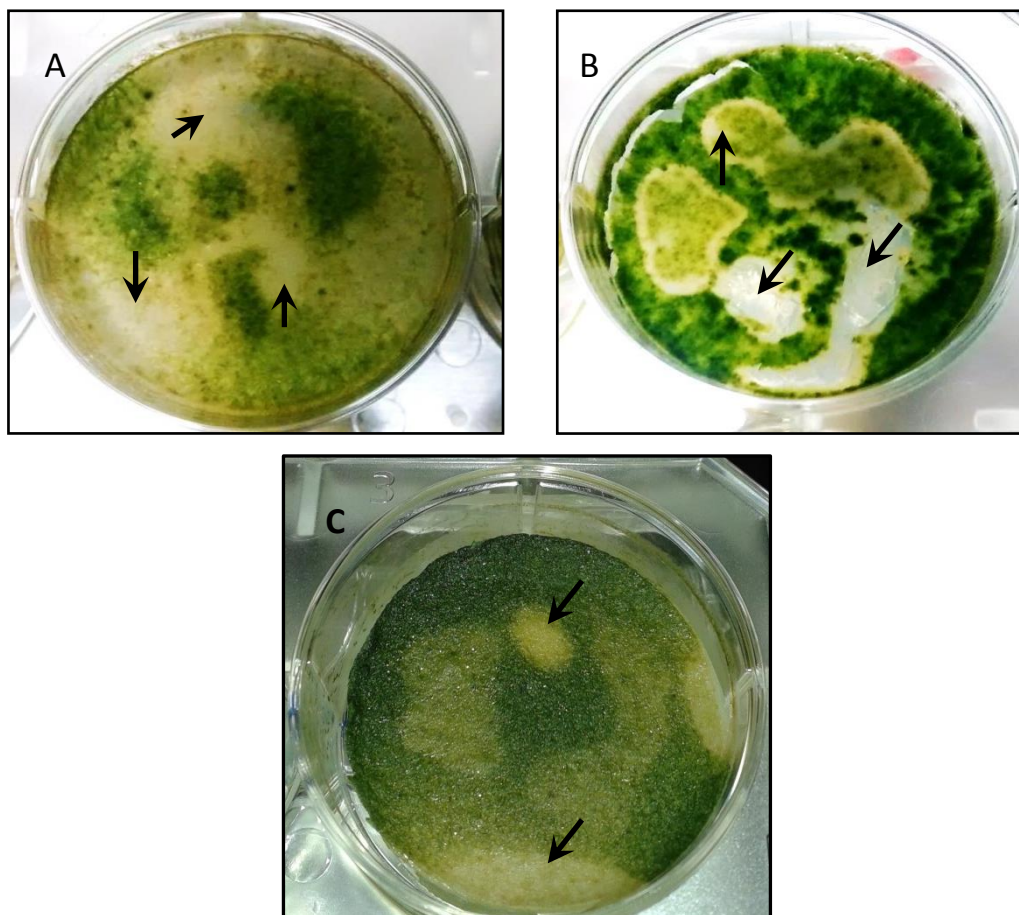


Figura 26: Halos de lisis en cultivos del aislado: A y B) Aislado CHP1, C) Aislado CHP2. Las flechas negras señalan presencia de halos de lisis.

3.3) Caracterización de la diversidad morfológica de fagos correspondiente a los aislados CHP1 y CHP2, mediante análisis de microscopía electrónica de transmisión y epifluorescencia.

A partir de los halos de lisis recuperados del sistema de inoculación de los aislados en doble capa BG11 agar 0.5-1% se obtuvieron las siguientes micrografías de epifluorescencia (Figura 27 y 28), indicando la presencia de VLPs mediante flechas en color rojo.

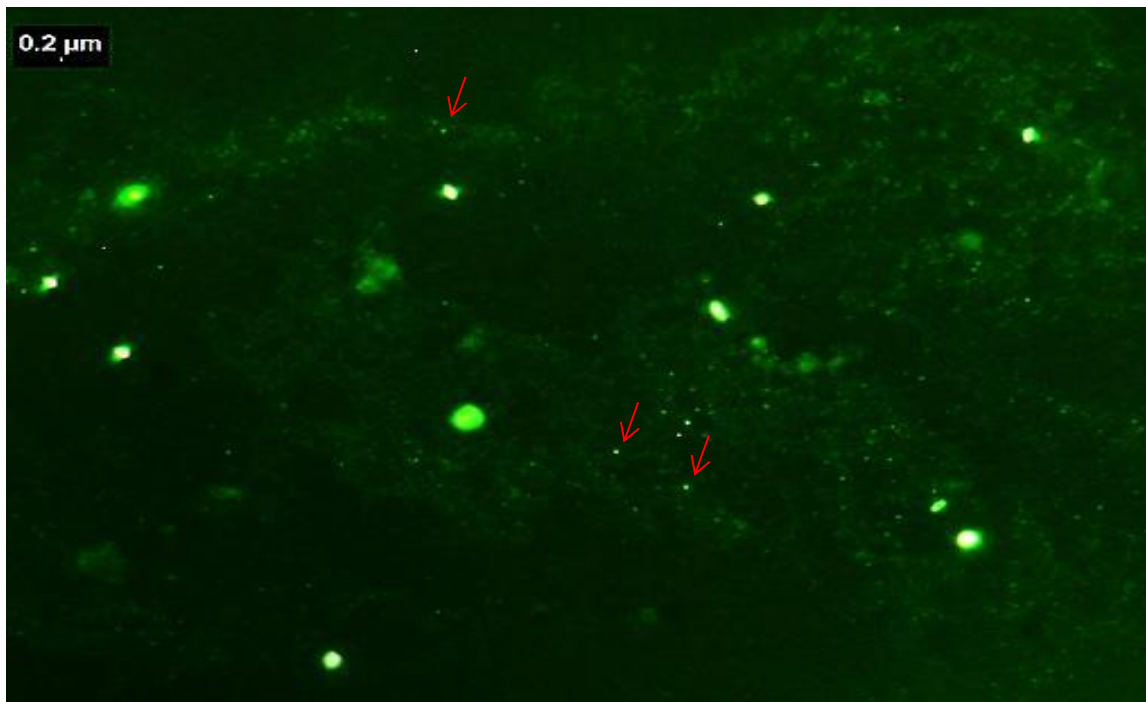


Figura 27: Halo de lisis perteneciente al aislado CHP1. Las VLPs están señaladas con flechas

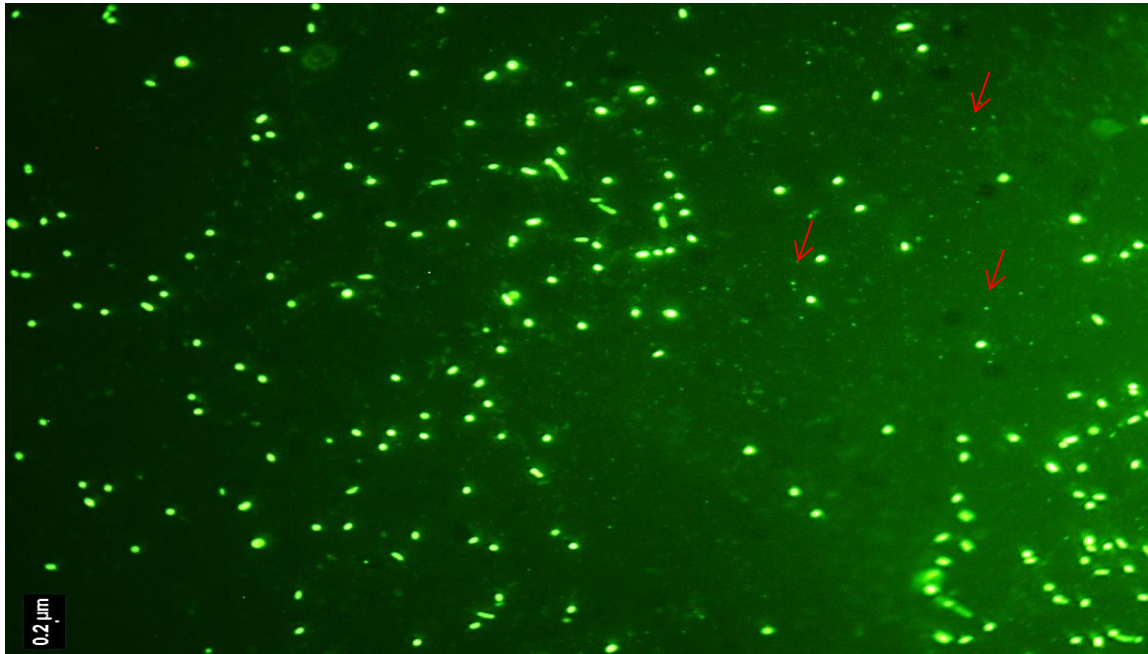


Figura 28: Halo de lisis perteneciente al aislado CHP2. Las VLPs están señaladas con flechas

Asimismo, la caracterización morfológica de los cianofagos que infectan a los aislados CHP1 y CHP2, se realizó a partir de muestras de los halos de lisis correspondientes. En la tabla 14 se muestra la diversidad de estructuras virales encontradas en halos provenientes del cultivo de CHP1 en un total de 44 micrografías electrónicas obtenidas. Para este aislado, se puede apreciar un marcado predominio de miembros de la familia *Syphoviridae* (52.17%). En la figura 29 se muestran algunas estructuras fágicas representativas presentes en dicha muestra.

Tabla 14: Diversidad de estructuras virales identificadas mediante TEM a partir del halo de lisis correspondiente a CHP1. El total de fagos encontrados en las micrografías electrónicas fue de 46.

Familia	Estructuras identificadas	Porcentaje
<i>Podoviridae</i>	7	15.22%
<i>Syphoviridae</i>	24	52.17%
<i>Globuloviridae</i>	6	13%
<i>Myoviridae</i>	2	4.35%
<i>Lipothrixviridae</i>	3	6.52%
Otros	4	8.70%

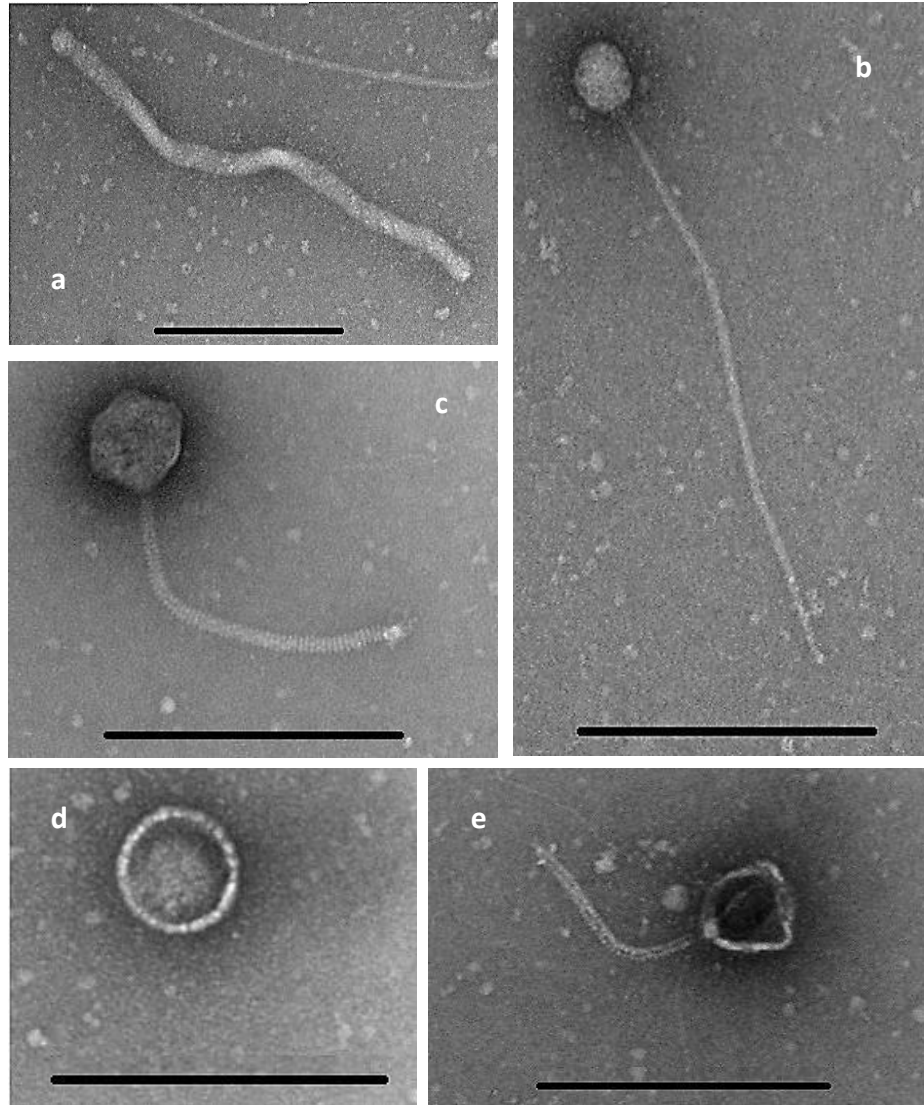
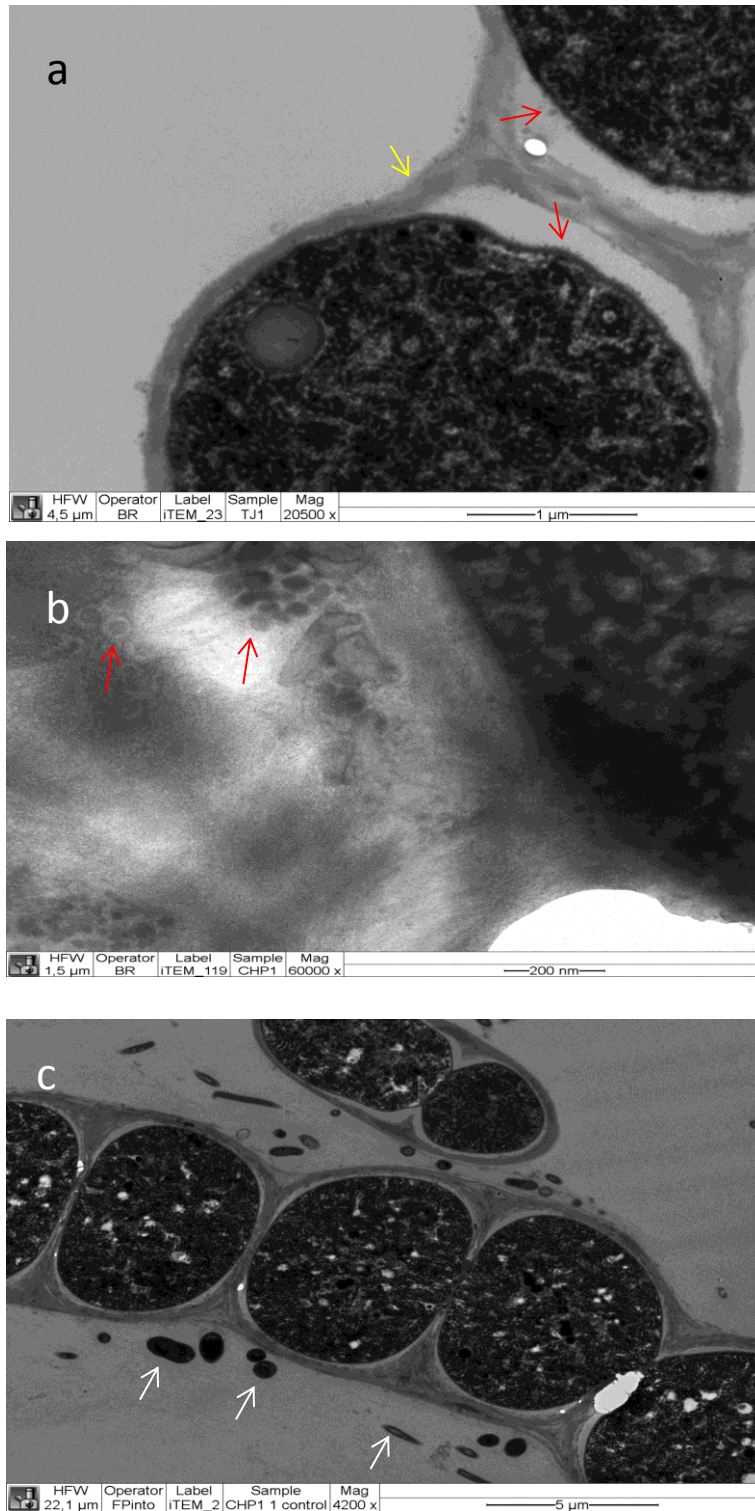


Figura 29: Morfologías representativas de fagos identificados en halos de lisis provenientes de cultivo inducido del aislado CHP1. A) estructura alargada de extremos redondeados; B) morfotipo de cola alargada correspondiente a la familia Syphoviridae; C) morfotipo de cabeza poligonal regular correspondiente a la familia Syphoviridae; D) morfotipo de cabeza irregular correspondiente a la familia Globuloviridae; E) morfotipo alusivo a la familia Syphoviridae. *Escala: 200 nm*

Para el caso del aislado CHP2 no fue posible identificar morfologías virales en las micrografías electrónicas.

En las micrografías señaladas en la figura 30 se muestran filamentos del aislado CHP1 inducido con mitomicina C, y CHP1 sin inducir, con el fin de identificar estructuras virales asociadas a las células del aislado.



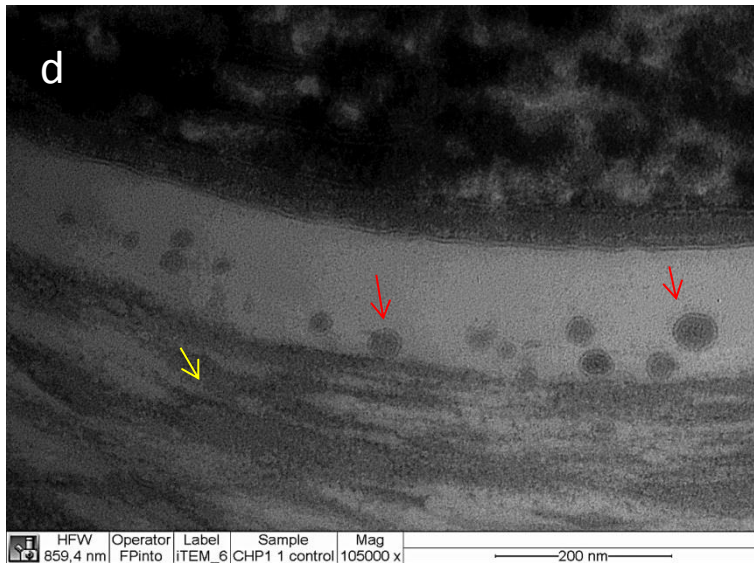


Figura 30: Micrografías electrónicas correspondientes al aislado CHP1. Las imágenes a y b corresponden a micrografías de CHP1 control sin inducir con mitomicina C. Las imágenes c y d corresponden a CHP1 inducido con 5 ug/mL de mitomicina C. Las flechas rojas indican la presencia de estructuras capsoides, las flechas amarillas representan el exopolisacarido liberado y las flechas blancas indican la presencia de bacterias heterótrofas acompañantes.

En las micrografías obtenidas tanto del aislado CHP1 control (Figura 30 a y b) como el inducido con mitomicina C (Figura 30 c y d), fue posible observar estructuras similares a cápsides de fagos siendo secretadas de los filamentos del aislado, tanto en el espacio periplasmático como dentro del exopolisacárido secretado por estas cianobacterias, así como algunas bacterias acompañantes igualmente identificadas mediante microscopía de epifluorescencia. No fue posible encontrar ninguna morfología intacta propia de cianofagos.

Para el caso de aislado CHP2, no fue posible obtener micrografías de calidad para el análisis de los filamentos de este aislado.

3.4) Caracterización de la diversidad genética de fagos correspondientes a los aislados CHP1 y CHP2, mediante uso de marcadores filogenéticos y la herramienta informática PHAST.

Se utilizaron los mismos marcadores moleculares empleados en la caracterización genética de la muestra de concentrados virales, los cuales fueron amplificados por PCR con el uso de distintos set de partidores, señalados en la sección 2.2 de Resultados. En la tabla 15 se muestra el resultado de las amplificaciones, señalándose con un signo (+) si de ésta se obtuvo como resultado un amplicón del tamaño esperado, o bien con el símbolo (-) en caso que no se consiguió amplificación. Muy pocas muestras de las analizadas amplificaron correctamente.

Tabla 15: Marcadores moleculares y set de partidores utilizados correspondientemente así como sus respectivos resultados de amplificación por PCR

Muestra	Marcadores moleculares									
	psba	g23				DNA pol		g20		
	psba F/R	CAP 1/2	MCP F5/R5	CP_MCP_F1/R1 *	CP_MCP_A4L_F1/R1 *	CP DNApol F/R1-R2	pol 2 F/R	CPS 1/2	CPS 1/8	CPS 1.1/8.1
Aislado CHP1	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-
Aislado CHP2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Halo de lisis CHP1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Halo de lisis CHP2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

En la figura 31 se muestran los gels de agarosa en los cuales se obtuvo el producto de PCR correspondiente a las amplificaciones esperadas para los diferentes marcadores moleculares estudiados. El tamaño del amplicón se señala con una flecha para cada set de partidores usados.

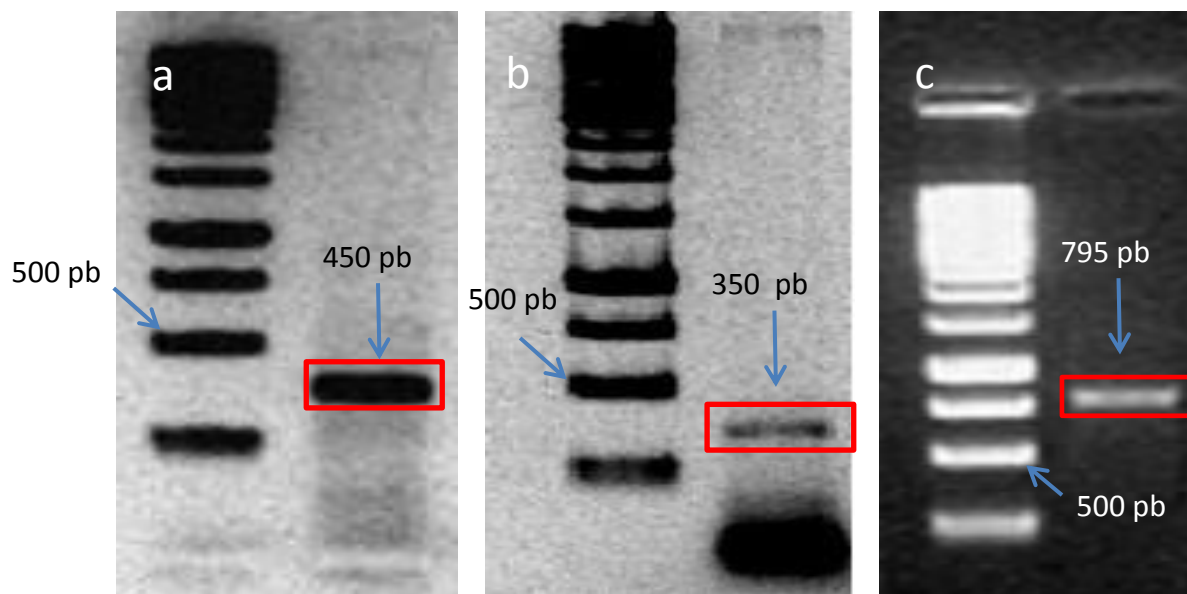


Figura 31: Imágenes en gel de agarosa correspondientes a las amplificaciones de los marcadores utilizados en este estudio, con el uso de los partidores: a) CAP 1/2 y b) MCP F5/R5 que amplifican fragmentos de 450 pb y 350 pb aprox, correspondientes al gen de la proteína de la capsida, pertenecientes a muestras de DNA del aislado CHP1; y c) psbA F/R, que amplifica para un fragmento de 795 pb del gen psbA, pertenecientes a muestras de DNA del aislado CHP1.

Asimismo, se realizaron librerías de clones, según se señala en la sección Materiales y Métodos correspondiente, para cada uno de los marcadores cuyos partidores generaron un amplicón del tamaño esperado. En la tabla 16 se muestra la cantidad de colonias transformantes obtenidas. Para la mayoría de los marcadores moleculares, se logró un alto número de transformantes, dentro de los cuales 5 clones de cada uno fueron secuenciados.

Tabla 16: Numero de colonias obtenidas para cada marcador molecular, y set de partidores utilizados correspondientemente. Las colonias transformadas presentaron tonalidad blanca, mientras aquellas que no poseían el inserto presentaron color azul

Marcador Molecular	Partidor	Muestra	Colonias Transformadas	Colonias azules	Colonias totales
g23	CAP 1/2	Aislado CHP1	95	17	112
	MCPF5/ MCPR5		58	63	121
psba	psbA F/R	Aislado CHP1	101	8	109
		Control de ligación	94	3	97
		Control Transformación	412	0	412
		Control Negativo	0	0	0

Se realizaron análisis de Blastn de las secuencias editadas resultantes de la secuenciación de los clones de cada marcador respectivo contra la base de datos nr y la de Caudovirales. Los resultados ilustrados en la tabla 17 muestran que sólo hubo coincidencia con secuencias de la base de datos de Caudovirales para el gen *psbA*, pero no para el gen *g23*, por lo que los clones secuenciados relativos a *psbA* fueron incorporados en la reconstrucción filogenética mostrada en la figura 10, en la sección 2.4 de Resultados. El análisis de Blastn de las secuencias correspondientes al gen *g23*, indica una mayor asignación de éstas a proteínas bacterianas, por lo que no fue posible establecer relación alguna con proteínas virales (Tabla 17)

Tabla 17: Análisis de secuencias de clones representativos con coincidencia para el gen psbA y g23 mediante Blastn contra la base de datos no redundante y la de Caudovirales.

Marcador molecular	Procedencia de secuencia representativa	Partidores	Asignación taxonómica	Gen asignado	Q. Cover	E-value	%Id.
g23	Aislado CHP1	CAP F/R	<i>Calothrix sp. PCC 7507</i>	dominio protein-kinasa	100%	2.00E-58	77%
		MCP F5/R5	<i>Rhodspirillum centenum SW</i>	subunidad II, citocromo C oxidasa	80%	7.00E-30	100%
			<i>Prunus necrotic ringspot virus mRNA</i>	proteína de capsida viral	60%	3.00E-52	100%
psbA		psbA F/R	<i>Nostoc sp. PCC 7524</i>	proteína D1 de fotosistema II	99%	0	88%
			<i>Synechococcus phage S-SM1</i>		99%	0	82%

Por otro lado, a partir de los genomas bacterianos de los aislados CHP1 y CHP2 disponibles en el laboratorio, se procedió a realizar la identificación de posibles profagos presentes en dichos genomas mediante la herramienta PHAST. Dentro de los parámetros que utiliza este software, propone un método de evaluación de la completitud del profago, por lo cual se asocia un score o puntaje según dicho parámetro, el cual se basa en el número de genes virales presentes, su cercanía, secuencias de integrasas, sitios de unión att, entre otros. Si el score es de 0-60 se considera al profago como incompleto, si esta entre 60-90 se considera cuestionable, y si es sobre 90 de score, entonces se propone como una estructura intacta. La figura 32 representa la estructura genética putativa de profago identificada en el genoma del aislado CHP1.

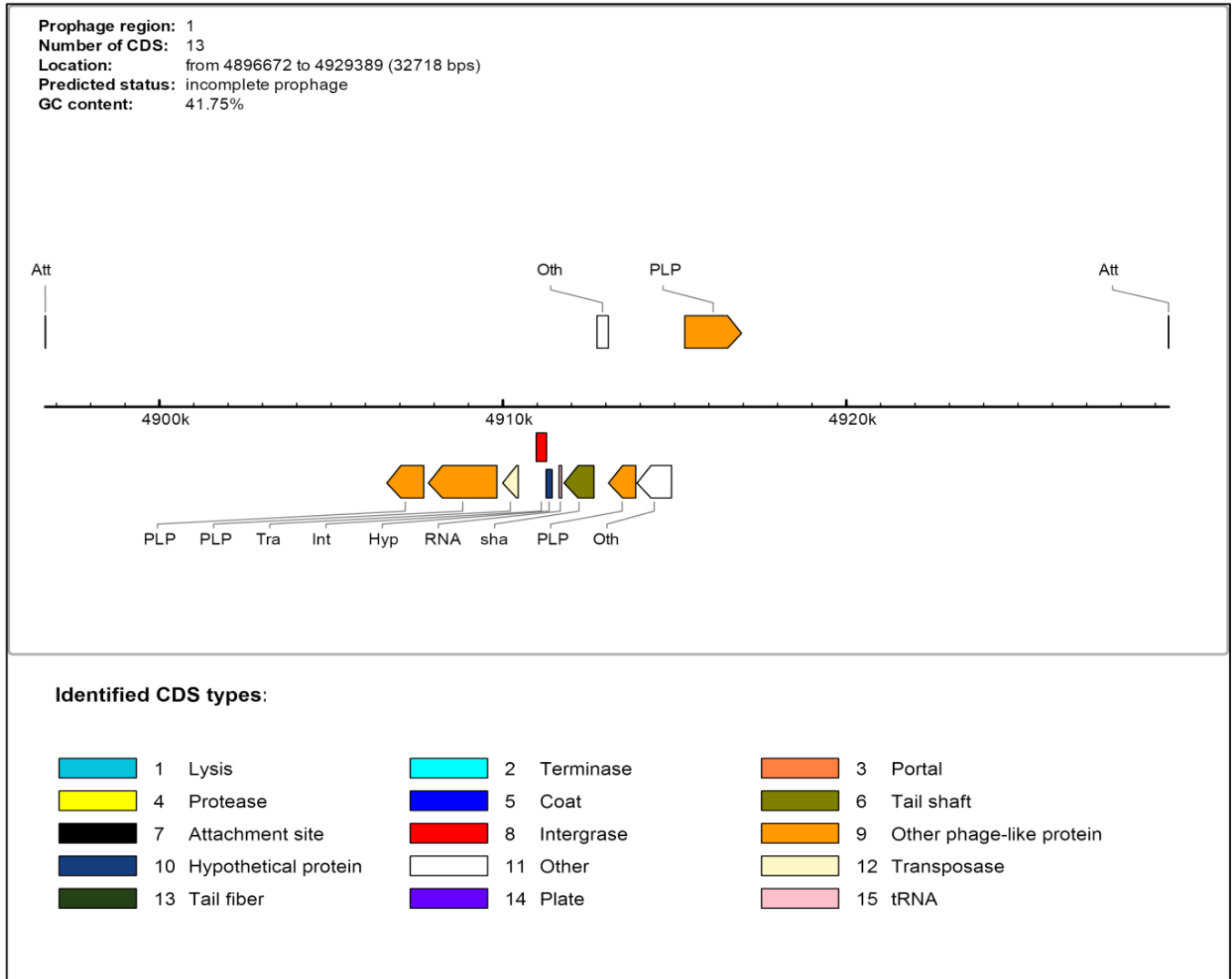


Figura 32: Región genómica correspondiente a un profago putativo incompleto (score: 50) en el genoma del aislado CHP1. El largo de la región profagica putativa es de 32718 pb y tiene un contenido GC de 41,75%. La simbología indica la función asociada a cada uno de los marcos de lectura encontrados.

Dentro de lo identificado por PHAST, no fue posible encontrar *psbA* ni *g23*, sin embargo se encontraron secuencias relacionadas a fagos, tales como secuencias de integrasa, proteína de la cola, transposasa, tRNA, y otras proteínas de fago. En la tabla 18 se presentan algunas características propias de la región de profago putativa.

Tabla 18: Caracterización de la región de profago putativa encontrada en el genoma del aislado CHP1.

Profago putativo de CHP1	Característica
Numero de regiones	1
Largo de la region	32.7Kb
Porcentaje GC	41.75%
Nivel de completitud (score)	incompleto (50)
Conceptos clave	transposasa,integrasa,cola
Posición de la región en el genoma	4896672-4929378
Numero de genes de tRNA	1
Numero de ORF totales	10
Numero de ORF bacterianos	2
Numero de ORF fágicos	7
Numero de proteínas hipotéticas	1
Porcentaje de secuencias virales e hipotéticas	80%
Presencia de sitios ATT	SI
Numero de fagos con asignación a secuencias identificadas	5
	PHAGE_Plankt_PaV_LD_NC_016564(2)
	PHAGE_Bacill_G_NC_023719(1)
	PHAGE_Amsact_moorei_entomopoxvirus__L__NC_002520(1)
Nombre de fagos con proteínas asignadas (número de asociaciones)	PHAGE_Plutel_xylostella_granulovirus_NC_002593(1)
	PHAGE_Lactob_phi_jlb1_NC_024206(1)
	PHAGE_Anomal_entomopoxvirus_NC_023426(1)
	PHAGE_Synech_S_PM2_NC_006820(1)

Sólo pudo identificarse una región profágica putativa incompleta ya que el *score* asociado a esta estructura es de 50. Dentro de un total de 13 secuencias halladas en este cluster, 10 corresponden a ORFs y de éstos, solo 7 corresponden a secuencias relacionadas con fagos. Las asignaciones de éstas se dan a conocer en la tabla 19, describiéndose en rojo solo aquellas secuencias asociadas a cianofagos.

Tabla 19: Asignación de secuencias identificadas en la región de profago putativa encontrada en CHP1 a la base de datos de PHAST. Los recuadros de color gris corresponden a asociaciones a secuencias bacterianas, mientras que los de color verde están asociados a secuencias de fagos. Las descripciones en rojo hacen alusión a secuencias asociadas a cianofagos.

#	POSICION	ASIGNACIÓN A BASE DE DATOS	E-VALUE
1	(4896672..4896683)	attL CAAATGTTTGGA	0.0
2	(4906623..4907696)	PHAGE_Plutel_xylostella_granulovirus_NC_002593: PxORF73 peptide; PP_04705; phage(gi11068076)	8e-09
3	(4907832..4909826)	PHAGE_Synech_S_PM2_NC_006820: putative S-layer protein; PP_04706; phage(gi58532980)	1e-07
4	(4909995..4910447)	PROPHAGE_Xantho_33913: IS1480 transposase; PP_04707; phage(gi21231089)	3e-18
5	(4910969..4911274)	PHAGE_Plankt_PaV_LD_NC_016564: integrase; PP_04708; phage(gi371496143)	1e-10
6	(4911259..4911438)	hypothetical protein Riv7116_1714 [Rivularia sp. PCC 7116]. gi 427735262 ref YP_007054806.1 ; PP_04709	3e-15
7	(4911639..4911711)	tRNA	0.0
8	(4911784..4912653)	PHAGE_Lactob_phi_jlb1_NC_024206: putative minor tail protein; PP_04710; phage(gi971848929)	5e-05
9	(4912740..4913069)	transcriptional regulator, ArsR family [Anabaena cylindrica PCC 7122]. gi 440681034 ref YP_007155829.1 ; PP_04711	1e-42
10	(4913079..4913870)	PHAGE_Plankt_PaV_LD_NC_016564: ABC transporter; PP_04712; phage(gi371496158)	1e-12
11	(4913906..4914910)	periplasmic solute binding protein [Nostoc punctiforme PCC 73102]. gi 186684682 ref YP_001867878.1 ; PP_04713	9e-136
12	(4915296..4916951)	PHAGE_Synech_S_PM2_NC_006820: putative S-layer protein; PP_04714; phage(gi58532980)	4e-14
13	(4929378..4929389)	attR CAAATGTTTGGA	0.0

En la tabla 19 se pudo identificar 4 secuencias asociadas a cianofagos. Dos de ellas corresponden a secuencias virales que codifican para la capa S, provenientes de *Synechococcus* phage S-PM2; otra corresponde a una integrasa asociada al fago de *Planktothrix* PAV_LD; y por último, a una proteína transportadora del sistema ABC asociada al fago de *Planktothrix* PAV_LD. Dichas asignaciones presentan e-valores menores a $1e-07$ lo cual provee una asociación confiable.

La figura 33 representa la estructura genética putativa de profago identificada en el genoma del aislado CHP2.

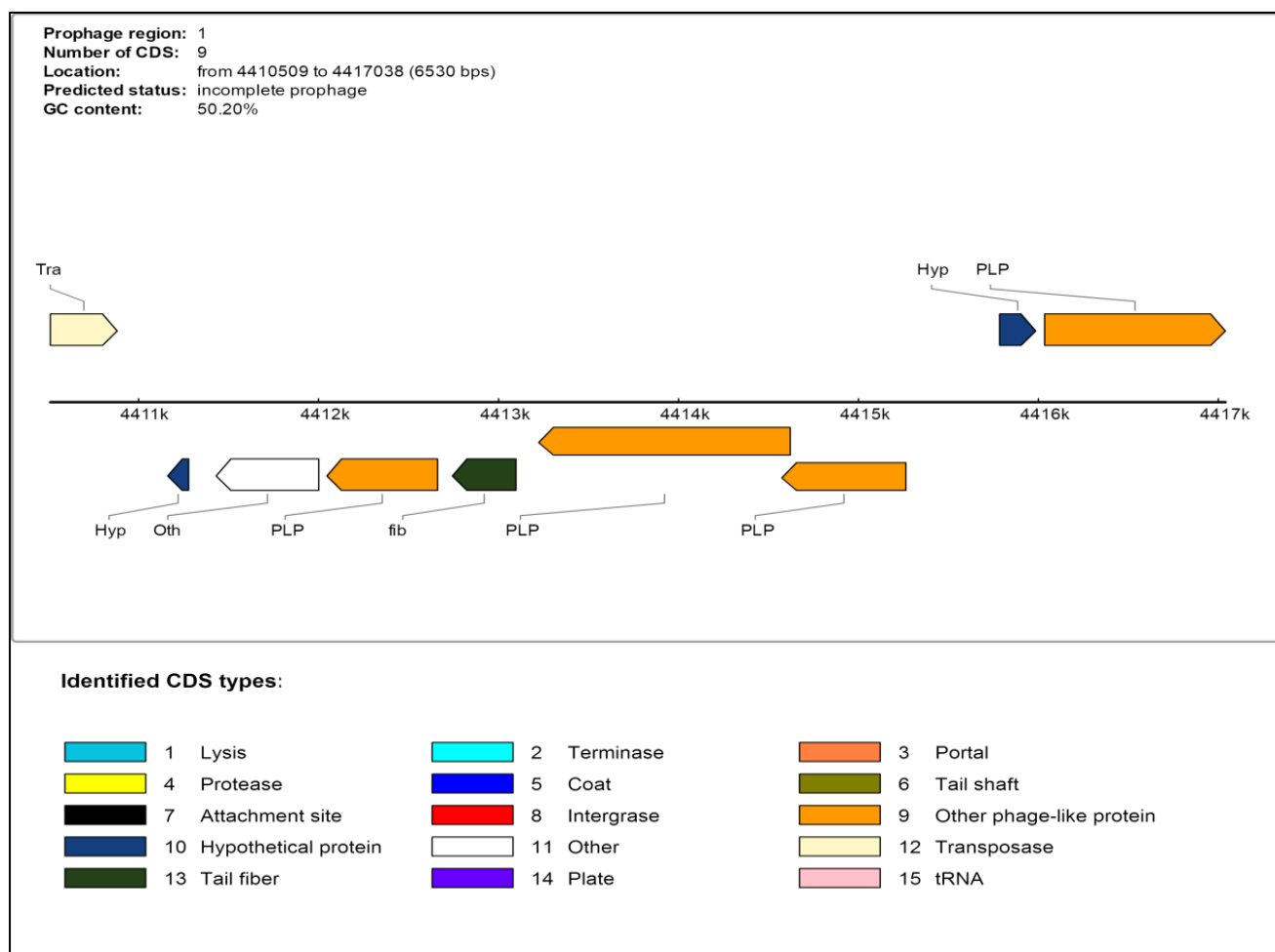


Figura 33: Región genómica correspondiente a un profago putativo incompleto (30) en el genoma del aislado CHP2. El largo de la región profágica putativa es de 6530 pb y tiene un contenido GC de 50,20%. La simbología indica la función asociada a cada uno de los los marcos de lectura encontrados.

Dentro de lo identificado por PHAST, fue posible hallar secuencias relacionadas a fagos, tales como secuencias de transposasa, fibras proteicas de la cola, entre otras proteínas de fago. En la tabla 20 se presentan algunas características propias de la región de profago putativa.

Tabla 20: Caracterización de la región de profago putativa encontrada en el genoma del aislado CHP2.

Profago putativo de CHP2	Característica
Numero de regiones	1
Largo de la región	6.5Kb
Porcentaje GC	50.20%
Nivel de completitud (score)	incompleto (30)
Conceptos clave	transposasa, cola
Posición de la región en el genoma	4410509-4417038
Numero de genes de tRNA	0
Numero de ORF totales	9
Numero de ORF bacterianos	1
Numero de ORF fagicos	6
Numero de proteínas hipotéticas	2
Porcentaje de secuencias virales e hipotéticas	88.80%
Presencia de sitios ATT	NO
Numero de fagos con asignación a secuencias identificadas	6
	PHAGE_Ectoca_siliculosus_virus_1_NC_002687(4)
	PHAGE_Feldma_species_virus_NC_011183(2)
	PHAGE_Mycoba_Kimberlium_NC_028792(1)
	PHAGE_Geobac_E3_NC_029073(1)
	PHAGE_Pandor_inopinatum_NC_026440(1)
	PHAGE_Stx2_converting_I_NC_003525(1)
	PHAGE_Mycoba_Llij_NC_008196(1)
Nombre de fagos con proteínas asignadas (número de asociaciones)	PHAGE_Synech_S_PM2_NC_006820(1)
	PHAGE_Escher_PA2_NC_028449(1)
	PHAGE_Shigel_Ss_VASD_NC_028685(1)

	PHAGE_Synech_S_MbCM7_NC_023587(1)
	PHAGE_Pandor_dulcis_NC_021858(1)
	PHAGE_Prochl_Syn1_NC_015288(1)
	PHAGE_Enterо_VT2phi_272_NC_028656(1)
	PHAGE_Synech_ACG_2014i_NC_027132(1)

Pudo identificarse sólo una región profágica putativa incompleta con un score asociado de 30. Dentro de un total de 9 ORF hallados en este cluster, solo 6 de ellos corresponden a secuencias relacionadas con fagos. No fue posible identificar secuencias *att* ni integrasas. Las asignaciones de estas secuencias se señalan en la tabla 21.

Tabla 21: Asignación de secuencias identificadas en la región de profago putativa encontrada en CHP2 a la base de datos de PHAST. Los recuadros de color gris corresponden a asociaciones a secuencias bacterianas, mientras que los de color verde están asociados a secuencias de fagos. Las descripciones en rojo hacen alusión a secuencias asociadas a cianofagos.

#	POSICION	ASIGNACIÓN A BASE DE DATOS	E-VALUE
1	(4410509..4410880)	PHAGE_Microc_Ma_LMM01_NC_008562: transposase; PP_04387; phage(gi117530202)	4e-18
2	(4411161..4411277)	hypothetical; PP_04388	0.0
3	(4411431..4412000)	PepSY-associated TM helix-containing protein [Oscillatoria acuminata PCC 6304]. gi 428214532 ref YP_007087676.1 ; PP_04389	5e-51
4	(4412046..4412660)	PHAGE_Synech_S_PM2_NC_006820: PiuC; PP_04390; phage (gi58533039)	7e-17
5	(4412743..4413096)	PHAGE_Enterо_VT2phi_272_NC_028656: putative tail fiber protein; PP_04391; phage (gi966197781)	2e-05
6	(4413223..4414620)	PHAGE_Ectoca_siliculosus_virus_1_NC_002687: EsV-1-65; PP_04392; phage(gi13242537)	9e-16
7	(4414574..4415263)	PHAGE_Feldma_species_virus_NC_011183: putative sensor histidine kinase; PP_04393; phage(gi197322366)	7e-08
8	(4415784..4415984)	hypothetical; PP_04394	0.0
9	(4416034..4417038)	PHAGE_Pandor_dulcis_NC_021858: methyltransferase type 11; PP_04395; phage(gi526119766)	6e-11

En la tabla 21 se pudo identificar sólo 1 secuencia asociada a cianofagos, específicamente a *Synechococcus* phage S-PM2, correspondiente a la subunidad alfa de la proteína PiuC, una 4-prolyl hidroxilasa. Dicha asignación presenta un e-value de $7e-17$, lo cual provee una asociación confiable.

DISCUSIÓN

El importante rol de los virus en los sistemas terrestres es cada vez más evidente, donde se les considera agentes reguladores del ciclo de vida de diversos organismos, influyendo por tanto en sus funciones biológicas e impactando así en las tramas tróficas y ciclos biogeoquímicos.

En particular, la importancia de microorganismos como las cianobacterias en la ecología de los sistemas naturales ha sido ampliamente descrita, resultando de gran interés estudiar ahora la asociación con fagos que las infectan (llamados cianofagos), los cuales podrían ser una fuente importante de regulación de estas poblaciones en todos los ecosistemas donde estas habitan. Sin embargo a día de hoy, existe un gran vacío de información respecto a esta asociación entre cianobacterias termófilas y cianofagos que habitan en ambientes termales. No existe en la literatura ningún reporte sobre la diversidad morfológica o genética de estos cianofagos, o de la coexistencia con sus hospederos las cianobacterias, y por tanto el potencial rol ecológico que tienen en estos ecosistemas extremos.

Estimación de la abundancia de partículas virales en Porcelana

Los fagos son reconocidos por ser la entidad biológica más numerosa de la Tierra, estimándose una cantidad aproximada de 4×10^{30} partículas virales en los océanos (Hambly, E. et al. 2005). Asimismo, se ha reportado que la abundancia típica de los organismos procariontes marinos, aproximadamente de 10^9 bacterias por litro (Sieburth, J. M et al. 1988; Proctor, L.M et al. 1990), es excedida en un orden de 5 a 25 veces por la abundancia de fagos presentes en dichos sistemas, reportándose cantidades aproximadas de 10^{10} fagos por litro (o 10^7 fagos por mL) en ecosistemas marinos y aguas superficiales, referido a lagos, ríos, entre otros (Bergh, O. et al. 1989). Sin embargo, en otros sistemas menos estudiados como los sistemas hidrotermales, la abundancia reportada es mucho menor. Breitbart y colegas en el 2004 reportaron una cantidad aproximada entre $0,07 \times 10^6$ y 7×10^6 virus por mL en diversos sistemas hidrotermales de California (USA). Contrastando los resultados presentados en el presente trabajo, la abundancia determinada en el agua del

sistema hidrotermal de Porcelana se estimó en 3.5×10^5 VLPs por mL, valor cerca de 100 veces menor a lo encontrado en un sistema marino, y asimismo también 4.56 veces menos que lo encontrado, en promedio, en los sistemas termales estudiados por Breitbart y colegas en el 2004. No obstante, cuando en el presente estudio se analizó el exudado de tapete microbiano presente en la terma Porcelana se reportó una abundancia de 3×10^6 VLPs, valor que es 8.57 veces más de lo encontrado en el agua de la misma terma y que coincide con lo esperado según lo determinado para otros sistemas termales estudiados (Breitbart et al. 2004). Es posible por tanto estimar que dicha diferencia esté explicada en gran parte por la gran biomasa de microorganismos que forman los tapetes microbianos en el sistema hidrotermal de Porcelana. Los hospederos de estos fagos se encontrarían por tanto estratificados a lo largo de la estructura vertical del tapete, lo cual tendría como consecuencia un líquido intersticial correspondiente enriquecido en fagos. Por otro lado, una explicación para la baja abundancia hallada en sistemas termales con respecto a lo hallado en sistemas marinos puede deberse a que las estructuras proteicas de los fagos que están fuera de sus hospederos son más vulnerables a las condiciones de alta temperatura que existen en el entorno de un sistema termal que en el mar.

Cabe señalar además que uno de los problemas que se observó gracias a las micrografías de las muestras obtenidas por microscopía de epifluorescencia en el presente estudio, es la gran cantidad de bacterias a pesar de los prefiltrados realizados al tratar la muestra. Esto pudo deberse a que si bien las muestras líquidas fueron almacenadas a 4°C , con el paso del tiempo hay un aumento del crecimiento de bacterias. Asimismo, en la micrografía correspondiente a la interfase 30%-60% del gradiente de sacarosa, existe una menor cantidad de bacterias encontradas en comparación a la fracción de 60%, debido probablemente a que esta última es más densa, acumulándose en ella tanto partículas virales de mayor tamaño como posibles bacterias circundantes.

Determinación de diversidad morfológica viral por microscopía en Porcelana

En los ecosistemas acuáticos presentes en la Tierra se han encontrado fagos con diversas morfologías. Estudios previos han clasificado a los cianofagos que habitan

sistemas marinos y aguas superficiales dentro del orden de los Caudovirales, donde se encuentran miembros de la familia *Myoviridae*, *Podoviridae* y *Siphoviridae*. La familia *Myoviridae* ha sido caracterizada como predominante en sistemas marinos pero poco abundante en sistemas de aguas superficiales (Mann, N.H et al. 2005). Por otro lado, el análisis de secuencias de fagos realizado por el Global Ocean Survey (Rusch et al. 2007), determinó que las familias *Podoviridae* y *Siphoviridae* exhibían distribuciones más sitio-específicas comparado con la familia *Myoviridae*, y que había mayor prevalencia de miembros de la familia *Podoviridae* en aguas templadas y mesotróficas (Williamson et al. 2008). Sin embargo, en otros sistemas como los termales, las morfologías caracterizadas y predominantes suelen corresponder a las familias *Fuselloviridae*, *Lipothrixviridae* y *Rodoviridae*, que normalmente han sido asociadas infectando miembros del Dominio Arquea.

En Porcelana, tal y como fue descrito en la sección Materiales y Métodos, las muestras fotografiadas por microscopía electrónica de transmisión, fueron sometidas tanto a un gradiente de sacarosa como a una ultracentrifugación directa de la muestra. Puede observarse que utilizando la ultracentrifugación posterior a un gradiente de sacarosa se obtienen imágenes mucho más limpias (figura 6), con menos elementos particulados como ruido de fondo, a diferencia de la ultracentrifugación directa (figura 5). Esto último, probablemente debido a que gran parte de los elementos particulados quedaron en las fracciones menos densas.

Debido a que las cianobacterias de la subsección V son predominantes en el sistema termal de Porcelana, se sugiere que las morfologías de fagos más representativas, referidas a la familia *Siphoviridae* (33%), *Podoviridae* (19.6%) y *Myoviridae* (18.6%), corresponderían de manera putativa a cianofagos. Estos últimos, se encuentran presentes en mayor porcentaje que otros tipos de fagos, tales como representantes de la familia *Fuselloviridae* (4.1%), *Globuloviridae* (4.1%), *Rudoviridae* (3.1%), *Ampullaviridae* (2.1%), *Lipothrixviridae* (1%), así como aquellos con morfologías no previamente clasificadas, los cuales han sido caracterizados previamente en sistemas hidrotermales en el Parque Nacional de Yellowstone en USA (Rachel, R. et al. 2002). Por otro lado, es posible que

estos fagos termales del orden Caudovirales tengan un amplio rango de hospederos, infectando probablemente no sólo a cianobacterias filamentosas de la subsección V sino también a bacterias heterotróficas presentes y descritas en los tapetes microbianos del sistema hidrotermal de Porcelana, tales como *Chloroflexus* (Mackenzie et al. 2013).

En el presente estudio en la terma Porcelana, fue posible identificar miembros correspondientes a las tres familias del orden de los Caudovirales. Sin embargo, la familia predominante presente en este sistema hidrotermal de Porcelana fue Siphoviridae, representado por un 33% del total y donde se distinguieron 3 morfotipos diferentes. La presencia de estructuras virales correspondientes a esta familia concuerdan con estudios realizados en otros sistemas hidrotermales no ácidos (Lin et al, 2010; Yu et al. 2006), predominando Siphovirus similares al morfotipo tipo 3 encontrado en Porcelana, los cuales se caracterizan por colas de tamaño cercano a los 800 nm. Los miembros de esta familia están relacionados con el género de fagos λ -like, que tienen un estilo de vida lisogénico, lo cual sugiere que este mecanismo de vida les permitiría sobrevivir dentro de sus hospederos y mantenerse activos ante las altas temperaturas en estos ambientes.

Diversidad genética de cianofagos en el sistema hidrotermal de Porcelana

Han sido diversos los métodos utilizados para extraer material genético de concentrados virales procedentes del sistema termal de Porcelana durante este trabajo. Las muestras con mejores parámetros de pureza y concentración obtenidas fueron aquellas tratadas con el procedimiento de extracción mediante el uso de fenol-cloroformo y pre incubación con CTAB, sugiriéndose que éste sería el mejor método a seguir usando en el futuro. El uso de CTAB como surfactante ha sido también previamente usado para la extracción de DNA en plantas (Azmat, M. A et al. 2012), donde ha servido para eliminar las altas concentraciones de polisacáridos, polifenoles, proteínas y metabolitos secundarios. Muchos reportes previos han identificado la presencia de exopolisacáridos recubriendo los filamentos de distintas subsecciones de cianobacterias o bien liberándolos al medio (Pereira, S et al. 2009). Por esta razón, el líquido intersticial de estos tapetes microbianos al poseer abundante concentración de exopolisacáridos, dificulta la extracción de DNA con

alta pureza, por lo que el uso de CTAB disminuye este efecto. Por otro lado, la aplicación de columnas del kit Purelink para extracción de DNA ayudaría en la remoción de impurezas y fragmentos de DNA degradados, revelados en el bandeo difuso que presentaron algunas muestras en el gel de integridad donde no fueron utilizadas.

Los marcadores moleculares para cianofagos considerados en el presente estudio se obtuvieron de referencias de la literatura, para los que se diseñaron multiples set de partidores para permitir amplificar regiones conservadas en dichos marcadores y así conocer la diversidad genética de los cianofagos presentes. Estos set de partidores escogidos para la amplificación de los genes *dnapol*, *g23*, *g20* y *psbA* de cianofagos habían dado resultados positivos en muestras provenientes de sistemas marinos y de aguas superficiales, pero no habían sido previamente probados en extractos de DNA de sistemas termales. El hecho de que gran parte de estos partidores no funcionaran para amplificar los genes escogidos en las muestras de este estudio, puede explicarse debido a lo distintas que pueden ser las secuencias de estos genes de fagos en ambientes tan radicalmente distintos. A modo de ejemplo, estudios filogenéticos en relación al gen de la DNA polimerasa han determinado que los cianopodovirus marinos que infectan cianobacterias del género *Prochlorococcus* y *Synechococcus* están ampliamente distribuidos en el océano pero que la composición de cada comunidad local varia bastante entre sí, encontrándose gran heterogenidad entre sus secuencias (Huang, S. et al. 2010). Es posible que la funcionalidad y/o estructura de dichas proteínas utilizadas como marcadores se vea modificada en ambientes tan distintos, para cumplir los requerimientos del entorno en relación a las necesidades de sus hospederos, por lo que la diferencia en la secuencia de estos genes impide la caracterización de la diversidad genética con los mismos partidores como en el caso de los utilizados en el presente estudio.

En este sentido, la única amplificación que resulto positiva utilizando los partidores reportados previamente y que mediante análisis de blastn indicaron concordancia con el gen diana, fueron las amplificaciones del gen *psbA*, correspondiente tanto a la muestra de tapete microbiano como al aislado CHP1 de la terma Porcelana. El análisis filogenético de este gen situó a las secuencias de estas fuentes en clados distintos de las secuencias de *psbA* de

los cianofagos marinos utilizados como referencia. Esto puede deberse a que en las muestras de este estudio se estaba amplificando *psbA* proveniente de los hospederos, dada la predominancia del aislado CHP1 en el tapete microbiano. Es posible que si bien existan diferencias entre los *psbAs* de cianofagos y de sus hospederos, estas podrían ser menores debido a la interacción ecológica y la transferencia horizontal de genes existente entre ambas entidades biológicas, previamente reportada (Sullivan, M. et al. 2006), donde una co-evolución entre cianofagos y cianobacterias regularía la fotosíntesis, potenciando el fitness biológico.

Cabe destacar que el análisis de blastn indicó además, que una de las secuencias amplificadas inespecíficamente con los partidores CP-DNApol F/R1-R2 para el gen de la proteína DNA polimerasa, fue asignado con óptimos parámetros de alineamiento al gen de una proteína biosintética de polisacárido correspondiente a la bacteria termófila *Chloroflexus* sp. Este último ha sido identificado como uno de los grupos de bacterias dominantes en el tapete microbiano formando parte de la comunidad fotosintética autotrófica en la terma Porcelana (Mackenzie et al. 2013).

Por otro lado, en nuestro estudio tampoco fue posible obtener amplificaciones del gen *g23* con los partidores diseñados a partir de las secuencias representativas de un metagenoma y un metatranscriptoma obtenidos del tapete microbiano en la terma Porcelana. Mediante análisis de blastn, las 35 secuencias recuperadas fueron asociadas taxonómicamente a fagos que infectan cianobacterias filamentosas representantes de la subsección III y IV presentes en las bases de datos, reportados previamente en sistemas marinos y aguas superficiales, no existiendo ninguna proveniente de sistemas hidrotermales. Probablemente el hecho de que los partidores no hayan dado resultado puede explicarse debido a que el diseño de los partidores en este estudio se realizó no solo en base a la secuencia de consenso representativa del metagenoma termal, sino que también en relación a las secuencias del gen *g23* con mayor grado de asociación a la secuencia de consenso según el análisis de blastn mostrado en la figura 12, correspondientes a secuencias relativas a cianobacterias filamentosas de otros sistemas acuáticos no termales. Esto indicaría que las secuencias de los genes *g23* estudiadas, pese a estar asociadas según

análisis de blastn, son muy distintos entre cianobacterias filamentosas termófilas y no termófilas.

Finalmente, y en relación a la búsqueda de secuencias virales en el metaviroma también obtenido de la terma Porcelana, el análisis de blastp mostró que 31 de los 35 reads recuperados y preasignados a secuencias de Caudovirales, están asociados a secuencias correspondiente a factores sigma de RNA polimerasa de bacterias, y con menor grado de asociación a factores sigma virales, tales como RpoS, RpoD, sigma 70, sigma 32, RpoH, sigma 43, y SigC. Huang y colaboradores (2010) realizaron estudios de secuenciación del genoma de 4 cyanosiphovirus completos, pertenecientes a la familia Syphoviridae, caracterizada por presentar estilos de vida lisogénico, en los cuales pudieron identificar que algunos genes encontrados estaban involucrados en el metabolismo y replicación del DNA, tales como genes asociados a la regulación transcripcional (factores sigma de la RNA polimerasa), fotosíntesis y síntesis de cobalamina. Para el caso de los factores sigma identificados en Porcelana, la mayoría de los reads comparten una elevada homología de secuencia con dichos genes presentes en los genomas de las bacterias hospederas. Por el contrario, los cianopodovirus no codifican para factores sigma, y todos los cyanomyovirus tienen un factor sigma para la transcripción tardía de genes como los fagos T4-like, sin guardar homología con los factores sigma de sus hospederos. Es probable que las secuencias de factores sigma hallados en el metaviroma del presente estudio esten implicadas en la modulación de la actividad RNA polimerasa de su hospedero bajo determinadas condiciones en la cual los fagos precisan transcribir sus genes por sobre los de las cianobacterias, siendo así importante la utilización de factores sigma alternativos. Esto coincidiría con el hecho que fagos presentes en la terma Porcelana, podrían llevar un estilo de vida lisogénico que les permitiera tomar el control de la expresión génica de su hospedero en pro de sus necesidades, cambiando los factores sigma y haciendo así la RNA polimerasa más afin a genes virales. Esto último a su vez podría concordar con que el 33% de fagos presentes en la terma poseen morfologías correspondientes a la familia Syphoviridae, siendo estos los predominantes, y cuyo estilo de vida se ha asociado mayormente a la lisogenia, y por lo tanto como profagos podrían regular su expresión génica.

Con respecto a la caracterización filogenética correspondiente a los genes *terL* e integrasa, realizadas para la clasificación de las secuencias metavirómicas encontradas, resultó, específicamente para *terL*, poco concluyente para poder caracterizar dichas secuencias en algunas de las familias del orden de los Caudovirales, debido a valores de bootstrap poco confiables, por lo cual se demostraría que aquellas secuencias utilizadas serían muy divergentes y/o que este gen no es eficiente como marcador molecular. A pesar de esto, es posible notar que para el caso del gen de integrasa, cuya construcción filogenética estaba mejor soportada, sí fue posible encontrar en el metaviroma señales moleculares indicativas de la presencia de cianofagos termales infectando estas cianobacterias filamentosas predominantes.

Inducción de profagos en las cepas de cianobacterias térmofilas CHP1 y CHP2 con agentes promotores del estrés bacteriano y su caracterización morfológica

Para el estudio de cianofagos lisogénicos, el sulfato de cobre (II), un cambio de temperatura, radiación UV y mitomicina C han sido probados previamente como agentes estresores e inductores de profagos (Barnhart et al. 1976, Ortmann et al. 2001, Marei et al. 2013, Tin-Chun Chu et al. 2009), sin embargo en el presente estudio, no se pudo obtener halos de lisis bajo la inducción de ninguno de estos agentes por si solos.

En cuanto al crecimiento de los aislados CHP1 y CHP2 en los sistemas de doble capa sólidos, no fue posible inducir su crecimiento en forma de colonias como había sido visto en estudios previos para otras cianobacterias, sino que crecieron en forma de césped microbiano, dado probablemente a sus características filamentosas. Para el caso de los aislados crecidos en medio líquido BG11 se intentó evaluar en qué etapa de su desarrollo era posible inducir fagos con mitomicina C. Estudios previos han reportado que la inducción de profagos en cultivos puede dar lugar a una clarificación del cultivo, distinto de la clorosis característica dada por la falta de nutrientes o por la ausencia de fuentes de nitrógeno que da lugar a cultivos amarillos envejecidos.

El efecto de bleaching viral o clarificación dada por posible inducción viral en los cultivos de CHP1 y CHP2 se observó a las 3 semanas de crecimiento, es decir, durante la fase de desarrollo exponencial de estas cianobacterias en cultivo. Sin embargo, cuando los cultivos fueron tratados con mitomicina C después del día 19, no fue posible identificar zonas de clarificación ni clorosis. Esto puede sugerir apoyado por literatura previa que en etapa de crecimiento exponencial estas bacterias pueden ser más inducibles frente a la exposición de un agente inductor como la mitomicina C (Paul, J. H et al. 2010; Suttle, C. A. et al. 1996). Al estar los cultivos en fase exponencial, estos presentarían menos exopolisacarido adherido en su superficie por lo que estarían mas expuestos al antibiótico, siendo inducidos mas facilmente. No obstante lo anterior, es probable que, para estas cianobacterias de la subsección V, el estar tan protegidas por sus exopolisacaridos envolventes y tener firmes paredes celulares, les garantice una buena defensa contra estos agentes estresores. Los halos de lisis finalmente obtenidos de los cultivos sólidos aparecieron sólo bajo una mezcla de condiciones fortuitas, a partir de los cuales se realizaron las microscopías posteriores. Sin embargo, es importante destacar que fue posible observar en uno de los cultivos controles en el experimento de la curva de inducción, también posibles VLPs adheridas a un filamento, lo cual sugeriría que probablemente exista un nivel constitutivo de fagos en la muestra que estén causando una infección basal en los filamentos del cultivo. Esto último con el fin de cambiar constantemente de hospederos y aprovechar sus recursos metabólicos. De este modo, cabe la posibilidad que estos fagos observados por microscopía pudiesen estar infectando tanto a las células de la cianobacteria filamentosa o a bacterias heterotróficas acompañantes presentes en el cultivo (que no era axénico). Si esto es posible, de igual manera es probable que la inducción de profagos dada por una mezcla de condiciones estresoras de manera fortuita haya estado involucrada en la inducción de dichas bacterias heterotróficas y que dicho evento esté relacionado con la destrucción de los filamentos de los aislados.

Recientemente, Quistad, et al. (2016) han demostrado que entre las comunidades bacterianas y sus fagos asociados existe una vital interdependencia. Esto ha sido analizado en células epiteliales productoras de mucus ubicuas en metazoos en las cuales se ha podido evaluar los beneficios adaptativos que la interacción microbioma-fagos tiene para la

inmunidad del hospedero, según plantea el modelo BAM. En este modelo, se determinó que los polisacáridos excretados reclutan por afinidad a un tipo de microorganismos y fagos específicos según las características de sus proteínas de adhesión, tras lo cual, luego de establecerse en dicho nicho, dichos fagos toman el control del sistema, evitando el establecimiento de nuevos microorganismos patógenos para el hospedero, promoviendo su destrucción. Se puede entonces sugerir la posibilidad que exista una interacción similar entre las cianobacterias y sus bacterias heterotróficas acompañantes embebidas en el exopolisacárido liberado, por lo que la inducción de estos profagos con el uso de mitomicina C produzca la eventual lisis de dichas bacterias acompañantes y al verse vulnerado el microbioma, la cianobacteria perdería beneficios inmunológicos provistos por la asociación. Esto último tendría como consecuencia, una destrucción progresiva de los cultivos del aislado.

Finalmente, en relación a las imágenes de los halos de lisis obtenidas mediante microscopía de epifluorescencia, fue posible observar VLPs del tamaño esperado de 200nm para el caso de ambos aislados CHP1 y CHP2. Sin embargo, cabe la posibilidad que dichos fagos inducidos no correspondan a cianofagos sino a fagos de bacterias heterotróficas como se mencionó anteriormente. Tras evaluar sus morfologías mediante TEM, se pudo determinar que de los fagos inducidos, el 52.17% correspondía a la familia *Syphoviridae*, lo que coincide con lo esperado en sistemas termales previamente estudiados (Yu, M. et al. 2006; Lin, L. et al. 2010). Por lo demás, las micrografías correspondientes a cortes de CHP1 inducidos con mitomicina C obtenidas mediante TEM muestran muchas extrusiones desde las células de la cianobacteria así como embebidas en el abundante exopolisacárido adherido a los filamentos. Analizando estas extrusiones, se determinó que tenían una estructura de doble capa y no poseían forma poliédrica por lo que es probable que se trate de vesículas secretoras transportando nutrientes, como se ha reportado previamente en *Chlorogleopsis fritshii* (Baulina et al. 2012). Asimismo, en las micrografías obtenidas puede verse que las capas de exopolisacárido son muy abundantes alrededor de los filamentos, lo cual se correlaciona con investigaciones previas, que apuntan que este exopolisacárido liberado por los organismos que coexisten en un tapete microbiano, cumple una función estructural y protectora vital del microecosistema (Rossi, F. et al. 2015).

Caracterización de la diversidad genética de fagos correspondientes a los aislados CHP1 y CHP2

Los resultados correspondientes a las amplificaciones de los marcadores moleculares con los set de partidores probados en este estudio fueron en su mayoría nuevamente negativos, a consecuencia de una probable divergencia entre las secuencias que sirvieron para la síntesis de estos partidores con respecto a las secuencias de los mismos genes presentes en estos sistemas termales.

Las secuencias correspondientes a las amplificaciones resultantes estuvieron asociadas a otros genes de los esperados, uno de ellos un gen presente en la cianobacteria filamentosa *Calothrix* sp. PCC 7507, así como un gen de proteína de la cápside encontrado en el virus patogénico de planta *Prunus necrotic ringspot*, para lo cual dichas secuencias tendrían afinidad a los partidores correspondientes.

En relación al análisis de identificación de profagos presentes en los contigs de los aislados CHP1 y CHP2, fue posible identificar algunas secuencias asignadas a cianofagos. Sin embargo, la integridad de ambos profagos detectados resultó ser muy baja, clasificándose como incompletos. Esto puede ser debido a que la región de profago es muy corta y con pocos genes característicos de fagos para dar lugar a un cluster como en el caso de CHP2, donde además los genes identificados estaban alejados entre sí dando lugar a un cluster poco definido. Según los algoritmos que dan lugar a PHAST como software identificador de profagos usado en este estudio, se necesita un mínimo de 6 genes característicos de fagos para la determinación de un cluster de genes profágicos (Zhou, Y. et al. 2011). Sin embargo, en nuestro estudio no se obtuvo para ninguno de los profagos incompletos identificados en los aislados con el método anterior. Por otro lado, los profagos detectados, a pesar de haber presentado secuencias asignadas a genes de cianofagos, resultaron inconsistentes (dando un puntaje de integridad menor a 60). Esto último podría ser debido a que los contigs correspondientes a los genomas de los aislados poseían genes relativamente cercanos a genes propios de algunos fagos, lo cual implicaría que no necesariamente existiesen profagos en dichas cianobacterias. Otra explicación sería que

efectivamente en algún momento de la historia en la interacción cianofagos-cianobacterias de la subsección V, existió una asociación lisogénica que cesó y dejó rastros de genes y pseudogenes virales en el genoma de estas cianobacterias, que fueron ahora identificadas mediante PHAST. Finalmente, otra explicación en relación al posible mecanismo de vida de estos cianofagos putativos yace en el mecanismo de pseudolisogenia. Este mecanismo en el cual el material viral no se integra en el genoma de la cianobacteria sino que queda inactivo transcripcionalmente e inestable en el citoplasma por un corto periodo de tiempo, se ha reportado en sistemas ambientales poco favorables para los fagos, como en el caso de un sistema termal como el estudiado aquí. Tanto la presencia de profagos incompletos como pseudolisogénicos darían lugar a profagos no inducibles mediante los métodos aplicados en este estudio.

CONCLUSIONES

Las principales conclusiones obtenidas en este trabajo son:

- La estimación de VLPs en el sistema hidrotermal de Porcelana se encuentra en el orden de lo reportado previamente para otros sistemas termales estudiados en el mundo, encontrándose el líquido intersticial de Porcelana enriquecido en VLPs en un orden de magnitud de 8.57 veces con respecto del agua termal.
- Las morfologías correspondientes a fagos del orden de los Caudovirales son predominantes en el sistema hidrotermal de Porcelana, siendo la familia *Syphoviridae* la más abundante, con un 33% de representatividad. Asimismo, 3 morfologías no descritas previamente fueron identificadas, con una representación menor a un 10% cada una.
- Las amplificaciones realizadas con los partidores utilizados en este estudio, no fueron de utilidad para caracterizar la diversidad genética de los fagos encontrados en la terma Porcelana. Pese a esto, fue posible identificar señales virales en el metagenoma y metatranscriptoma relacionadas al marcador molecular de cianofagos previamente descrito como g23, correspondiente al gen que codifica para la proteína principal de la cápside.
- Fue posible encontrar secuencias del metaviroma asociadas a terminasas e integrasas de fagos, identificando a una de las secuencias de éste como una integrasa que estaría asociada a cianofagos que infectan cianobacterias filamentosas termófilas. Sin embargo, con estos marcadores moleculares no fue posible caracterizarlas de manera detallada filogenéticamente.

- Fue posible obtener halos de lisis en las muestras de los aislados CHP1 y CHP2 bajo una mezcla de condiciones estresoras, sin embargo se descarta que correspondan a dichos aislados debido a que éstos presentaron profagos incompletos no inducibles, identificados por PHAST, por lo que se propone que correspondan a profagos inducidos de bacterias acompañantes asociadas a dichos aislados en cultivo. El 52.17% de estos fagos identificados en los halos de lisis corresponden a morfologías relacionadas a la familia *Syphoviridae*, las cuales presentarían un estilo de vida lisogénico, mecanismo de vida viral previamente reportado en este tipo de sistemas termales.

BIBLIOGRAFÍA

- 1) Alcaman, M. et al. (2015) The cyanobacterium *Mastigocladus* fulfills the nitrogen demand of a terrestrial hot spring microbial mat. *The ISME Journal*, 9(10): 2290-2303.
- 2) Alcaman, M. et al. (2017) Physiological and gene expression responses to nitrogen regimes and temperatures in *Mastigocladus* sp. strain CHP1, a predominant thermotolerant cyanobacterium of hot springs. *Systematic and Applied Microbiology*, 40(2), 102-113.
- 3) Angly, F. et al. (2006). The marine viromes of four oceanic regions. *PLoS Biol* 4(11): e368.
- 4) Azmat, M. A. et al. (2012). Extraction of DNA suitable for PCR applications from mature leaves of *Mangifera indica* L. *Journal of Zhejiang University. Science. B*, 13(4), 239–243.
- 5) Baker, A. C. et al. (2006). Identification of a diagnostic marker to detect freshwater cyanophages of filamentous cyanobacteria. *Applied and environmental microbiology*, 72(9), 5713–5719.
- 6) Barnhart, B. J. et al. (1976). Prophage Induction and Inactivation by UV Light. *Journal of Virology*, 18(3), 950–955.
- 7) Baulina, O. I. (2012). *Ultrastructural Plasticity of Cyanobacteria*. Berlin: SpringerVerlag.
- 8) Bergh, O. et al. (1989). High abundance of viruses found in aquatic environments. *Nature* 340, 467-468.
- 9) Breitbart, M. et al. (2004). Phage community dynamics in hot springs. *Applied and environmental microbiology*, 70(3), 1633–1640.
- 10) Bolduc, B. et al. (2012). Identification of novel positive-strand RNA viruses by metagenomic analysis of archaea-dominated Yellowstone hot springs. *Journal of Virology*, 86(10), 5562–5573.
- 11) Chen, F. et al. (2002). Genomic sequence and evolution of marine cyanophage P60: a new insight on lytic and lysogenic phages. *Appl Environ Microbiol.* 68:2589–2594.

- 12) Chen, F. et al. (2009). Diverse and dynamic populations of cyanobacterial podoviruses in the Chesapeake Bay unveiled through DNA polymerase gene sequences. *Environmental Microbiology* 11(11), 2884–2892.
- 13) Chenard, C. et al. (2008). Phylogenetic diversity of sequences of cyanophage photosynthetic gene psbA in marine and freshwaters. *Applied and environmental microbiology*, 74(17), 5317–5324.
- 14) Chu, T. C. et al. (2009). Temperature-induced activation of freshwater Cyanophage AS-1 prophage. *Acta histochemica*, 113(3), 294–299.
- 15) Clokie, M. (2006). Marine cyanophages and light. *Environmental microbiology*, 8(12), 2074–2082.
- 16) Edlin, G. et al. (1975) Lambda lysogens of *E. coli* reproduce more rapidly than non-lysogens. *Nature* 255 (5511): 735-737.
- 17) Fuhrman, J. A. (1999). Marine viruses and their biogeochemical and ecological effects. *Nature*, 399(6736), 541–548.
- 18) Fuller, N. J. et al. (1998). Occurrence of a sequence in marine cyanophages similar to that of T4 g20 and its application to PCR-based detection and quantification techniques. *Applied and environmental microbiology*, 64(6), 2051–2060.
- 19) Gugger, M. F. et al. (2004). Polyphyly of true branching cyanobacteria (Stigonematales). *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 54(2), 349–357.
- 20) Gundersen, K. et al. (1996). Factors influencing the loss of bacteria in preserved seawater samples. *Marine Ecology Progress Series*. 137:305– 310.
- 21) Hambly, E. et al. (2005). The virosphere, diversity, and genetic exchange within phage communities. *Current opinion in microbiology*, 8(4), 444–450.
- 22) Huang, S. et al. (2010). Ubiquitous cyanobacterial podoviruses in the global oceans unveiled through viral DNA polymerase gene sequences. *The ISME journal*, 4(10), 1243–1251
- 23) Inskeep, W. P. et al. (2010). Metagenomes from high-temperature chemotrophic systems reveal geochemical controls on microbial community structure and function. *PloS one*, 5(3), e9773.

- 24) Jacquet, S. et al. (2013). First description of a cyanophage infecting the cyanobacterium *Arthrospira platensis* (Spirulina). *Journal of Applied Phycology*, 25(1), 195–203.
- 25) Jenkins, C. A. et al. (2006). Diversity of cyanophages infecting the heterocystous filamentous cyanobacterium *Nodularia* isolated from the brackish Baltic Sea. *Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom*. Vol 86(3), 529-536.
- 26) Khumanthem N. et al. (2007). Isolation and characterization of a *Mastigocladus* species capable of growth, N₂-fixation and N- assimilation at elevated temperature. *Indian Journal of Microbiology*, Vol 47 (4) 345-352.
- 27) Lau, E. et al. (2005) Molecular diversity of cyanobacteria inhabiting coniform structures and surrounding mat in a Yellowstone hot spring. *Astrobiology* 5: 83–92.
- 28) Lin, L. et al. (2010). Isolation and characterization of an extremely long tail *Thermus* bacteriophage from Tengchong hot springs in China. *Journal of Basic Microbiology*, 50(5), 452–456.
- 29) Lu et al. (2001). Distribution, isolation, host specificity, and diversity of cyanophages infecting marine *Synechococcus* spp. in river estuaries. *Applied and environmental microbiology* 67 (7), 3285-3290.
- 30) Mackenzie, R. et al. (2013). Bacterial composition of microbial mats in hot springs in Northern Patagonia: variations with seasons and temperature. *Extremophiles* (17):123–136.
- 31) Mann N.H. et al. (2005). The genome of S-PM2, a photosynthetic T4-type bacteriophage that infects marine *Synechococcus*. *Journal of Bacteriology*. 187: 3188–3200
- 32) Mann and Clokie (2012). Cyanophages. In: Bryan A. Whitton, Ecology of cyanobacteria II: their diversity in space and time. Springer 535-559.
- 33) Marei E.M., et al (2013) Induction of Temperate Cyanophages Using Heavy Metal - Copper. *International Journal of Microbiology Research*, Volume 5(5),472-475
- 34) Marston, M. (2013). Marine cyanophages exhibit local and regional biogeography. *Environmental Microbiology* 15(5), 1452–1463.

- 35) Nierzwicki-Bauer, S. et al. (1984). Heterocyst differentiation in the cyanobacterium *Mastigocladus laminosus*. *Journal of bacteriology*, 157(2), 514–525.
- 36) Ortmann, C. et al. (2002). Lysogeny and lytic viral production during a bloom of the cyanobacterium *Synechococcus* spp. *Microbial ecology*, 43(2), 225–231.
- 37) Paul, J. H. et al. (2010). Detection of lysogeny in marine environments. *Manual of Aquatic Viral Ecology*, 4:30–33.
- 38) Pereira, S. et al. (2009). Complexity of cyanobacterial exopolysaccharides: composition, structures, inducing factors and putative genes involved in their biosynthesis and assembly. *FEMS microbiology reviews*, 33(5), 917–41.
- 39) Proctor, L. M. et al. (1990). Viral mortality of marine bacteria and cyanobacteria. *Nature* 343, 60–62.
- 40) Quistad, S. D. et al. (2016). Viruses and the origin of microbiome selection and immunity. *The ISME journal*, 11(4):835-840.
- 41) Rachel, R. et al. (2002). Remarkable morphological diversity of viruses and virus-like particles in hot terrestrial environments. *Archives of virology*, 147(12), 2419–2429.
- 42) Redder, P. et al. (2009). Four newly isolated fuselloviruses from extreme geothermal environments reveal unusual morphologies and a possible interviral recombination mechanism. *Environmental microbiology*, 11(11), 2849–2862.
- 43) Rice, G. et al. (2001). Viruses from extreme thermal environments. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 98(23), 13341–13345.
- 44) Rippka, R. et al. (1979). Generic assignments, strain histories and properties of pure cultures of cyanobacteria. *Journal of General Microbiology*, 111, 1–61.
- 45) Rossi, F. et al. (2015). Role of cyanobacterial exopolysaccharides in phototrophic biofilms and in complex microbial mats. *Life (Basel, Switzerland)*, 5(2), 1218–1238.
- 46) Rusch, D.B. et al. (2007) The Sorcerer II global ocean sampling expedition: Northwest Atlantic through Eastern Tropical Pacific. *PLoS Biol* 5(3): e77.
- 47) Safferman, R. S. et al. (1983). Classification and Nomenclature of Viruses of Cyanobacteria. *Intervirology* 19: 61-66.

- 48) Sieburth, J. M. et al. (1988). Ultrastructure and ecology of *Aureococcus anophagefferens* gen. et sp. nov. (Chrysophyseae): the dominant picoplankton during a bloom in Narragansett Bay, Rhode Island, Summer 1985. *Journal of Phycology* 24(3), 416–425
- 49) Singh, J. et al. (2009). Metagenomics: Concept, methodology, ecological inference and recent advances. *Biotechnology Journal*, 4(4), 480–494.
- 50) Singh, P. et al. (2012). Structural, functional and molecular basis of cyanophage-cyanobacterial interactions and its significance. *African Journal of Biotechnology* 11(11), 2591–2608.
- 51) Skinner, et al. (2013) Measuring mRNA copy number in individual *Escherichia coli* cells using single-molecule fluorescent in situ hybridization. *Nature Protocols* 8, 1100–1113.
- 52) Stal, L.J et al. (2007). Cyanobacteria: Diversity and Versatility, Clues to Life in Extreme Environments. Springer. 659–680.
- 53) Sullivan, M. et al. (2006). Prevalence and evolution of core photosystem II genes in marine cyanobacterial viruses and their hosts. *PLoS biology*, 4(8), e234.
- 54) Sullivan, M. B. et al. (2008). Portal protein diversity and phage ecology. *Environmental Microbiology*, 10(10), 2810–2823.
- 55) Suttle, C.A, et al. (1993) Marine cyanophages infecting oceanic and coastal strains of *Synechococcus*: abundance, morphology, cross-reactivity and growth characteristics. *Marine Ecology Progress Series*, 92: 99-109.
- 56) Suttle, C. A. et al. (1996). Potential significance of lysogeny to bacteriophage production and bacterial mortality in coastal waters of the Gulf of Mexico. *Significance of Lysogeny to Bacteriophage Production and Bacterial Mortality in Coastal Waters of the Gulf of Mexico. Applied and Environmental Microbiology*. 62(12): 4374–4380.
- 57) Suttle, C. (2000). Cyanophages and their role in the ecology of cyanobacteria, Chapter 20. In: *The ecology of cyanobacteria: their diversity in time and space*. Bryan A Whitton and Malcolm Potts. *Kluwer Academic Publisher* 564-588

- 58) Vieille, C. et al. (2001) Hyperthermophilic enzymes: sources, uses, and molecular mechanisms for thermostability. *Microbiology and Molecular biology reviews*. Vol 65 (1) 1-43
- 59) Wang, K. et al. (2011). Abundance and distribution of *Synechococcus* spp. and cyanophages in the Chesapeake Bay. *Applied and environmental microbiology* 77(21), 7459–68.
- 60) Ward, D.M. et al. (2000). Cyanobacteria in geothermal habitats. In Ecology of Cyanobacteria: Their Diversity in Time and Space, ed. B.A. Whitton and M. Potts, 37-59.
- 61) Wiedenheft B. et al. (2004) Comparative genomic analysis of hyperthermophilic archaeal Fuselloviridae viruses. *Journal of Virology*, Vol 78 (4) 1954-1961.
- 62) Williamson, S.J. et al. (2008) The Sorcerer II global ocean sampling expedition: metagenomic characterization of viruses within aquatic microbial samples. *PLoS ONE* 3(1): e1456.
- 63) Wilson, W. et al. (1999). Analysis of cyanophage diversity in the marine environment using denaturing gradient gel electrophoresis. *Microbial Biosystems: New frontiers*.
- 64) Wommack et al. (2000). Virioplankton: viruses in aquatic ecosystems. *Microbiology and Molecular Biology reviews*. 64(1), 69–114
- 65) Yu, M. et al. (2006). Isolation and characterization of Thermus bacteriophages. *Archives of virology*, 151(4), 663–679.
- 66) Zeidner, G. et al. (2003). Molecular diversity among marine picophytoplankton as revealed by psbA analyses. *Environmental microbiology*, 5(3), 212–216.
- 67) Zhong, Y. et al. (2002). Phylogenetic Diversity of Marine Cyanophage Isolates and Natural Virus Communities as Revealed by Sequences of Viral Capsid Assembly Protein Gene g20. *Applied and Environmental Microbiology* 68 (4): 1576-1584.
- 68) Zhou, Y. et al. (2011). PHAST: a fast phage search tool. *Nucleic acids research*, 39(Web Server issue), W:347–352.

ANEXOS

1) Composición del medio BG11 para el crecimiento de cianobacterias

Componentes	Cantidad (gr/litro de medio BG11)
NaNO ₃	1.5
K ₂ HPO ₄ ·3H ₂ O	0.04
MgSO ₄ ·7H ₂ O	0.075
CaCl ₂ ·2H ₂ O	0.036
Ácido cítrico	0.006
Citrato de amonio férrico	0.006
EDTA (sal disódica)	0.001
Na ₂ CO ₃	0.02
Mix de metales trazas A5+ Co*	1ml/litro de medio
Agua desionizada	1000 ml
pH después de autoclavar	7.4

* Mix de metales trazas A5+Co contiene (gr/l): H₃BO₃, 2.86 gr; MnCl₂ · 4H₂O, 1.81 gr; ZnSO₄ · 7H₂O, 0.222 gr; Na₂MoO₄ · 2H₂O, 0.390 gr; CuSO₄ · 5H₂O, 0.079 gr; Co(NO₃)₂ · 6H₂O, 0.0494 gr.

2) Composición buffer X para la extracción de DNA de cianobacterias

Para la preparación de 50 mL de buffer X disponer de:

- 0.5 gr de Potassium ethyl Xanthogenate
- 10 mL de Acetato de amonio 4M
- 5 mL Tris-HCl 1M pH 7.4
- 1.8 mL EDTA 0.45M pH 8
- Agua desionizada hasta completar los 50 mL

Dicha solución puede permanecer estable a 4°C durante 7 días.