

UNIVERSIDAD DE CHILE
FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS Y FARMACÉUTICAS



**Dinámica e identidad de bacterias portadoras de
proteorodopsina en aguas costeras de Bahía Chile,
Antártica**

**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 de Bioquímico por:**

JERÓNIMO ANTONIO CIFUENTES ANTICEVIC

**Directores de tesis
Dra. Beatriz Díez
Dr. Davor Cotoras**

**Santiago-Chile
Abril 2019**

UNIVERSIDAD DE CHILE
FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS Y FARMACÉUTICAS

**INFORME DE APROBACIÓN DE TESIS DE MAGISTER Y MEMORIA DE
TÍTULO**

Se informa a la Dirección de la Escuela de Graduados de la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas que la Tesis de Magíster y Memoria de Título presentada por el candidato

JERÓNIMO ANTONIO CIFUENTES ANTICEVIC

Ha sido aprobada por la Comisión de Evaluadora de Tesis como requisito para optar al grado de Magíster en Bioquímica, Área de Especialización: Bioquímica Ambiental y Título de Bioquímica, en el examen público rendido el día _____

Director de Tesis:

Dra. Beatriz Díez

Co-director de Tesis:

Dr. Davor Cotoras

Comisión Evaluadora de Tesis:

Dra. Julieta Orlando

Dr. Carlos Santiviago

Dr. Jorge Osman

Agradecimientos

Quisiera agradecer en primer lugar a la Dra. Beatriz Díez por darme la oportunidad de descubrir el maravilloso mundo de la microbiología ambiental de sistemas extremos. A todos los miembros de BD Lab, a Sebastián, a Blanca, a Sergio, a Oscar, a Javier, a Octavio, a Jaime, a Pablo, a Camila. Agradecer en particular a Estrella y a Tomás por su enorme disposición para enseñar y escuchar.

Agradecer a mi familia; por fomentar desde pequeño la curiosidad y la constante búsqueda de respuestas.

Agradezco haber conocido a María Emperatriz Ahumada.

Agradecer también a mis amigos y amigas, por acompañarme durante todos estos años.

Agracer a Carlos Trapp, por su orientación, cariño y revolución.

A mis gatos y perros.

A Valentina, compañera de vida

“Andábamos sin buscarnos, pero sabiendo que andábamos para encontrarnos”

— Julio Cortazar

Esta tesis fue desarrollada en el Laboratorio de Ecología Microbiana y Microbiología Ambiental de Sistemas Extremos, de la Facultad de Ciencias Biológicas de la Pontificia Universidad Católica de Chile, bajo la dirección de la Dra. Beatriz Díez y del Dr. Davor Cotoras.

La tesis contó con el financiamiento de los proyectos: Programa de Cooperación Internacional DPI 20140044 (CONICYT), FONDAP 15110009 (CONICYT) y la Beca de Magíster Nacional, año académico 2017 (CONICYT), N° Folio 22172327.

Presentaciones a congresos

Proteorhodopsin phototrophy in Antarctic coastal waters. **Jerónimo Cifuentes**, María Estrella Alcamán-Arias, Tomás Alarcón-Schumacher, Beatriz Díez (2019). EMBO Workshop “Integrative biology: From molecules to ecosystems in extreme environments”. Santiago, Chile 22 – 25 de abril 2019.

Microbial community in extreme environments. Beatriz Díez , María Estrella Alcamán-Arias, Sergio Guajardo, Oscar Salgado, Jaime Alcorta, Tomás Alarcón-Schumacher, **Jerónimo Cifuentes**, Sebastian Fuentes (2019). EMBO Workshop “Integrative biology: From molecules to ecosystems in extreme environments”. Santiago, Chile 22 – 25 de abril 2019.

Green or blue? Describing the Antarctic Proteorhodopsin photosystem. **Cifuentes Jerónimo**, Alcamán-Arias María Estrella, Alarcón-Schumacher Tomás, Díez Beatriz (2018). XXIV Congreso Latinoamericano de Microbiología. XL Congreso Chileno De Microbiología. Santiago, Chile. 13-16 de noviembre 2018.

Identity and expression of Proteorhodopsin genes in Chile Bay, Antarctica. **Cifuentes J**, Alcamán ME, Díez B (2017). XXXIX Congreso Chileno De Microbiología. La Serena, Chile. 14-17 de diciembre 2017.

Marine observatory of Chile Bay: a model study of coastal microbial ecology and biogeochemistry in Antarctica Díez B, Alcamán ME, Guajardo S, Alarcón-Schumacher T, **Cifuentes J**, Fuentes Alburquenque S, Farías L (2017). XXXIX Congreso Chileno De Microbiología. La Serena, Chile. 14-17 de diciembre 2017.

Índice

Presentaciones a congresos	ii
Índice.....	iv
Índice de figuras	viii
Índice de figuras suplementarias.....	x
Índice de tablas suplementarias.....	xii
Abreviaturas	xiii
Resumen.....	xiv
Summary.....	xviii
1. Introducción.....	1
1.1 Fotoheterotrofia en sistemas marinos	1
1.2. Fotoheterotrofia mediada por proteorodopsina	2
1.3 Rol fisiológico de la fototrofia mediada por proteorodopsina en bacterias marinas	4
1.4 Ocurrencia de microorganismos que presentan proteorodopsina en sistemas marinos.....	5
1.5 Diversidad y composición de microorganismos que presentan proteorodopsina en sistemas marinos.....	6
1.6 Efecto de las variables ambientales sobre la abundancia y actividad transcripcional del gen PR en microorganismos de sistemas marinos	7
1.7 Diversidad y actividad de microorganismos que presentan proteorodopsina en sistemas marinos polares.....	8
2. Hipótesis.....	11
3. Objetivo General	11
4. Objetivos Específicos.....	11

5. Metodología.....	12
5.1 Sitio de muestreo para el estudio de proteorodopsinas marinas: Bahía Chile, Antártica.....	12
5.2 Experimentos de microcosmos de disminución de salinidad (verano 2016).....	13
5.3 Variables ambientales	14
5.4 Extracción de ADN	14
5.5 Secuenciación masiva de ARN de experimentos de microcosmos de disminución de salinidad en Antártica (verano 2016).....	15
5.6 Cuantificación de la abundancia del gen de proteorodopsina en muestras de ADN de aguas de Bahía Chile	17
5.7 Identificación de secuencias de genes PR en metagenomas de Bahía Chile ...	19
5.8 Determinación de abundancia y actividad transcripcional del gen PR proteorodopsina en Bahía Chile	21
5.9 Anotación taxonómica	24
5.10 Determinación de aminoácidos en el sitio activo.....	24
6.- Resultados	25
6.1 Identidad y diversidad de bacterias que portan y transcriben el gen PR en aguas costeras superficiales de Bahía Chile durante el periodo estival de 2014	25
6.1.1 Identificación y abundancia de secuencias del gen PR desde el catálogo de genes de los metagenomas de aguas costeras de Bahía Chile durante el periodo estival de 2014.....	25
6.1.2 Identidad taxonómica de secuencias del gen PR de aguas costeras de Bahía Chile durante el periodo estival de 2014.....	27
6.1.3 Identidad taxonómica de transcritos de secuencias del gen PR de aguas costeras de Bahía Chile (Antártica) durante el periodo estival de 2014.	28
6.1.4 Diversidad y abundancia de tipos de dominios funcionales de secuencias del gen PR en aguas costeras de Bahía Chile durante el periodo estival de 2014... ..	31

6.2 Efecto de la salinidad y disponibilidad de luz sobre la abundancia de bacterias portadoras del gen PR en aguas costeras de Bahía Chile.....	33
6.2.1 Efecto de la salinidad sobre la abundancia de bacterias portadoras del gen PR en aguas costeras de Bahía Chile	34
6.2.2 Efecto de la disponibilidad de luz sobre la abundancia de bacterias portadoras del gen PR en aguas costeras de Bahía Chile	36
6.2.3 Evaluación del efecto de otras variables ambientales sobre la abundancia del gen PR en bacterias de aguas costeras de Bahía Chile.	38
6.3 Efecto de los cambios en la salinidad y disponibilidad lumínica sobre la actividad transcripcional del gen PR en bacterias de aguas costeras de Bahía Chile	40
6.3.1 Efecto de la disponibilidad de luz sobre la actividad transcripcional del gen PR en bacterias de aguas costeras de Bahía Chile	40
6.3.2 Efecto de los cambios en la salinidad sobre la actividad transcripcional del gen PR en bacterias de aguas costeras de Bahía Chile	44
6.4 Evaluación de la actividad transcripcional de los genes de biosíntesis de retinal en bacterias de aguas costeras de Bahía Chile	48
7. Discusión.....	50
7.1 Diversidad taxonómica de bacterias que portan el gen PR y abundancia relativa de los genes PR-verdes y PR-azules en aguas costeras de Bahía Chile	50
7.2 Comparación de la abundancia relativa de bacterias que portan el gen PR en Bahía Chile con otros ambientes marinos	54
7.3 Abundancia y actividad transcripcional del gen PR frente a gradientes salinos	55
7.4 Efecto de la disponibilidad lumínica sobre la abundancia y actividad transcripcional del gen PR en Bahía Chile	57
7.5 Correlación de la abundancia de bacterias portadoras del gen PR con otras variables ambientales en Bahía Chile	60

7.6 Contribución de la fototrofia mediada por PR a la biósfera de la Península Antártica Occidental.....	62
8. Conclusiones.....	64
9. Referencias	66
10. Anexo	77

Índice de figuras

Figura 1	Mapa de Bahía Chile, Isla Greenwich, Islas Shetland del Sur, Península Antártica.....	26
Figura 2	Afiliación taxonómica y color de longitud de onda asociada a los genes PR y transcritos del gen PR en Bahía Chile en el verano Austral de 2014.....	29
Figura 3	Abundancia relativa de bacterias portadoras del gen PR en muestras de diferente salinidad en Bahía Chile para los periodos estivales de 2016 y 2017.....	35
Figura 4	Abundancia relativa de bacterias portadoras del gen PR en la comunidad de bacterias de Bahía Chile, en muestras obtenidas durante el día o la noche durante los periodos estivales de 2016 y 2017	37
Figura 5	Abundancia relativa de bacterias portadoras del gen PR en Bahía Chile, en muestras obtenidas en aguas superficiales (2-3m) y profundas (30m) durante el periodo estival 2017.....	39

Figura 6	Abundancia relativa de bacterias del clado SAR11 portadoras del gen PR en la comunidad de bacterias de Bahía Chile frente a dos escenarios con niveles diferentes de Chla durante los periodos estivales de 2016 y 2017.....	41
Figura 7	Niveles normalizados de la actividad transcripcional del gen PR frente a escenarios con diferente disponibilidad de luz en 2014.....	43
Figura 8	Afiliación taxonómica y color de la PR para lecturas identificadas como transcritos del gen PR en los microcosmos de disminución de salinidad	45
Figura 9	Niveles normalizados de actividad transcripcional del gen PR frente a la disminución de salinidad	47
Figura 10	Niveles normalizados de actividad transcripcional de los genes de las enzimas de la ruta de biosíntesis del retinal en aguas superficiales de Bahía Chile 2014.	49

Índice de figuras suplementarias

Figura suplementaria 1	Curvas de calibración utilizadas para la cuantificación absoluta mediante qPCR de los tres genes PR y el gen ARNr 16S.....	80
Figura suplementaria 2	Logo del dominio funcional comprendido entre las posiciones 97 a 108 de las proteínas predichas de los genes PR identificados en el catálogo de genes de los metagenomas de Bahía Chile.....	81
Figura suplementaria 3	Niveles normalizados de actividad transcripcional del gen PR frente a escenarios de diferente disponibilidad de luz a lo largo del verano Austral de (2014).....	84

Índice de tablas suplementarias

Tabla suplementaria 1	Muestras de agua de mar de Bahía Chile utilizadas en esta tesis para la cuantificación absoluta de los genes PR y el gen 16S ARNr en la comunidad de bacterias marinas en los periodos estivales de 2016 y 2017.....77
Tabla suplementaria 2	Partidores utilizados para determinar abundancia relativa del gen PR mediante qPCR, en muestras de ADN de aguas costeras de Bahía Chile.....79
Tabla suplementaria 3	Abundancia relativa de bacterias portadoras del gen PR en aguas costeras de Bahía Chile, agrupadas por variable ambiental evaluada.....82

Abreviaturas

AAPb	<i>Aerobic anoxygenic phototrophic bacteria</i> (Bacterias fototróficas anoxigénicas aeróbicas)
ADN	Ácido desoxirribonucleico
ADNc	ADN complementario
ARN	Ácido ribonucleico
ARNr	Ácido ribonucleico ribosomal
ATP	Adenosín trifosfato
BChla	Bacterioclorofila <i>a</i>
cm	Centímetros
Chla	Clorofila <i>a</i>
DMSO	Dimetilsulfóxido
EDTA	Ácido etilendiaminotetraacético
g	Gramos
h	Horas
HCl	Ácido clorhídrico
HMM	<i>Hidden Markov Models</i> (Modelos ocultos de Markov)
INACH	Instituto Antártico Chileno
kb	Kilobases
L	Litros
m	Metros
mg	Miligramos

min	Minutos
mL	Mililitros
nm	Nanómetros
NR	<i>Non Redundant</i> (Base de datos de proteínas no redundantes de NCBI)
°C	Grados Celsius
ORF	<i>Open Reading Frame</i> (Marco de lectura abierto)
pb	Pares de bases
PAR	<i>Photosynthetically active radiation</i> (Radiación fotosintéticamente activa)
PCR	<i>Polymerase chain reaction</i> (Reacción en cadena de polimerasa)
PR	Proteorodopsina
PSU	<i>Practical salinity unit</i> (Unidades prácticas de salinidad)
qPCR	<i>Quantitative PCR</i> (PCR cuantitativo)
SDS	<i>Sodium dodecyl sulphate</i> (Dodecilsulfato de sodio)
UV A/B	Ultravioleta A/B
μL	Microlitros
μm	Micrómetros

Resumen

La luz es uno de los recursos energéticos más abundantes en la Tierra, por lo que los organismos han desarrollado diversas estrategias para transformar la luz en energía química. A la fecha, se han descrito dos mecanismos moleculares para la captación y uso de la energía proveniente de la luz solar mediante el uso de pigmentos: los sistemas basados en clorofila/bacterioclorofila y las rodopsinas de tipo 1 transportadoras de protones.

La primera rodopsina de bacterias se descubrió en una Gammaproteobacteria marina y se le denominó proteorodopsina (PR). La PR es una bomba de protones impulsada por la luz, por lo que las bacterias que utilizan PR son capaces de utilizar tanto compuestos orgánicos como luz, como fuentes de energía. A pesar de que entre el 15 y 70% de las bacterias de aguas marinas superficiales portan un gen cuya anotación funcional es PR (gen PR), la fototrofía mediada por PR aún no es considerada en los modelos de flujo de carbono orgánico en los océanos. Desde su descubrimiento, se ha reportado que la abundancia del gen PR y la transcripción de este mismo gen se ve afectada por diversas variables ambientales, siendo la más reportada la disponibilidad de luz y la salinidad.

En particular, en los ambientes marinos polares, los ciclos anuales de luz y la presencia de hielo marino estacional, modulan la entrada de luz como recurso energético al ecosistema marino. Además, en estos ambientes se generan gradientes de salinidad debido a los continuos ciclos de congelamiento-descongelamiento del hielo marino y al

aporte de agua dulce de los glaciares próximos a las bahías polares. A la fecha, la presencia del gen PR en aguas costeras polares ha sido reportado en el Océano Ártico y Antártico. Sin embargo, la diversidad, abundancia relativa de las bacterias portadoras del gen PR, y la transcripción de este gen, ha sido sólo reportado en el Océano Ártico. A la fecha, en el sistema marino Antártico aún no se ha evaluado de qué manera las variables ambientales como luz y salinidad son capaces de modular la abundancia relativa o actividad transcripcional del gen PR.

Bahía Chile puede considerarse como una bahía polar modelo en Antártica, donde en este trabajo de tesis se determinó la diversidad de microorganismos que presentan el gen PR. Además, se evaluó si la abundancia y actividad transcripcional del gen PR, se veía afectada por las condiciones de disponibilidad de luz y salinidad durante el periodo estival. Para esto, se utilizó una aproximación metagenómica y metatranscriptómica, así como también la cuantificación absoluta mediante qPCR del gen PR en muestras de ADN de aguas de Bahía Chile en los periodos estivales de los años 2014, 2016 y 2017. Mediante metagenómica se logró identificar la presencia del gen PR durante el año 2014, así como también su identidad taxonómica, estimándose que el 16.7% de los microorganismos en esta bahía presentan este gen. En muestras de aguas de los periodos estivales 2016 y 2017, se determinó mediante amplificación del gen PR en muestras de DNA por qPCR que las variables ambientales de salinidad y luz no afectan su abundancia relativa en la comunidad de bacterias marinas, bajo las condiciones observadas en Bahía Chile para esos años. Sin embargo, a través de metatranscriptómica se logró observar que la actividad transcripcional del gen PR sí se ve afectada por la disponibilidad lumínica (observándose mayor actividad

transcripcional durante el día), así como por la salinidad (observándose mayor actividad transcripcional en escenarios de disminución de salinidad).

La descripción de la alta presencia del gen PR en diversos taxones pertenecientes a la comunidad planctónica de Bahía Chile, así como la evidencia de la actividad transcripcional del gen PR en este sistema marino antártico, puede tener un impacto significativo en el diseño de nuevos modelos de flujo de energía para esta región marina. Estos resultados apoyan la necesidad de considerar la fototrofia mediada por PR como una estrategia mediante la cual la energía de la luz ingresa a la biosfera Antártica. Además, en el escenario de cambio climático actual, el derretimiento acelerado de las capas de hielo y la formación de gradientes salinos en esta región, que afectan tanto la disponibilidad de luz como la salinidad de estos sistemas marinos, podría a su vez afectar la fototrofia mediada por PR en el frágil sistema marino antártico.

Summary

Sunlight is the most abundant source of energy in the biosphere, so microorganisms have developed an array of different strategies to transform light into chemical energy. To date, two molecular mechanisms have been described for the capture and use of energy from sunlight through the use of pigments: chlorophyll/bacteriochlorophyll-based photosystems and proton-pumping type 1 rhodopsins. The first bacterial rhodopsin was discovered in a marine Gammaproteobacteria and was named proteorhodopsin (PR). PR is a light driven proton pump, so PR-bearing bacteria are able to use both organic compounds and light, as energy sources. Despite the fact that between 15 and 70% of surface seawater bacteria carry a gene whose functional annotation is PR (PR gene), PR-mediated phototrophy is not yet considered in the models of organic carbon flow in the oceans. Since its discovery, it has been reported that the abundance of the PR gene and the transcription of this same gene is affected by several environmental variables, the most reported being the light availability and salinity.

In particular, in polar marine environments, the annual light cycles and the presence of seasonal sea ice modulate the entrance of light as an energy resource to the marine ecosystem. In addition, salinity gradients are generated in these environments due to the continuous freeze-thaw cycles of sea ice and the contribution of fresh water from the glaciers near the polar bays. To date, the presence of the PR gene in polar coastal waters has been reported in the Arctic and Antarctic Oceans. However, the

diversity, relative abundance of the PR-bearing bacteria, and the transcription of the PR-gene, has only been reported in the Arctic Ocean. To date, in the Antarctic marine system, has not yet been studied how environmental variables such as light availability or salinity are able to modulate the relative abundance or transcriptional activity of the PR gene.

Chile Bay can be considered as a model polar bay in Antarctica, where in this thesis the diversity of microorganisms that present the PR gene was determined. In addition, it was evaluated whether the abundance and transcriptional activity of the PR gene is affected by the conditions of light availability and salinity during the austral summer period. For this, a metagenomic and metatranscriptomic approach was used, as well as the absolute quantification by qPCR of the PR gene in DNA samples from waters of Chile Bay in the summer periods of 2014, 2016 and 2017. Through metagenomic it was possible to identify the presence of the PR gene during 2014, as well as its taxonomic identity, estimating that 16.7% of the microorganisms in this bay have this gene. In water samples from the 2016 and 2017 summer periods, it was determined by amplification of the PR gene in DNA samples by qPCR that the environmental variables of salinity and light do not affect their relative abundance in the community of marine bacteria, under the conditions observed in Chile Bay for those years. However, through metatranscriptomics it was possible to observe that the transcriptional activity of the PR gene is affected by the light availability (observing higher transcriptional activity during the day), as well as by the salinity (observing higher transcriptional activity in salinity reduction scenarios).

The description of the high presence of the PR gene in various taxa belonging to the planktonic community of Chile Bay, as well as the evidence of the transcriptional activity of the PR gene in this Antarctic marine system, can have a significant impact on the design of new energy flow models for this marine region. These results support the need to consider phototrophy mediated PR as a strategy by which light energy enters to the Antarctic biosphere. In addition, in the actual climate change scenario, the accelerated melting of the ice sheets and the formation of saline gradients in this region, which affect both light availability and salinity of these marine systems, could in turn affect the PR-mediated phototrophy in the fragile Antarctic marine system.

1. Introducción

1.1 Fotoheterotrofia en sistemas marinos

La fuente de energía más abundante en la biosfera es la luz solar, por lo tanto, los microorganismos han desarrollado diferentes estrategias para obtener energía de la luz (Field *et al.*, 1998). Sin embargo, además existen microorganismos que son capaces de utilizar compuestos orgánicos (Maranger *et al.*, 2015), compuestos inorgánicos (Schink *et al.*, 2017), o una combinación de estos recursos con la luz para obtener energía como se ha observado en sistemas marinos (Evans *et al.*, 2015; Pedrós-Alió *et al.*, 2015). Los microorganismos que son capaces de utilizar la luz y compuestos orgánicos como fuente de energía, pero que dependen de una fuente externa de carbono, se denominan fotoheterótrofos (Kirchman & Hanson, 2013).

A la fecha, se han descrito dos mecanismos moleculares en microorganismos fotoheterótrofos para la captación y uso de la energía proveniente de la luz solar: los sistemas basados en clorofila (Boeuf *et al.*, 2014), y las rodopsinas de tipo 1 transportadoras de protones (Pinhassi *et al.*, 2016). Las bacterias fototróficas anoxigénicas aeróbicas (AAPb; *Aerobic anoxygenic phototrophic bacteria*) utilizan bacterioclorofila *a* (BChl*a*) para captar la luz (Boeuf *et al.*, 2014). A la vez, las AAPb necesitan una serie de mecanismos diferentes para la obtención de poder reductor, transporte de protones y posterior síntesis de ATP (Kolber *et al.*, 2001). Por otro lado, la fototrofia mediada por rodopsinas consiste en una única proteína integral de membrana que utiliza retinal unido covalentemente como cromóforo (Béjà *et al.*, 2000). Esta

proteína es capaz de bombear protones a través de la membrana generando una gradiente electroquímica de protones, la cual puede ser utilizada para la síntesis de ATP, por lo que es considerada la estrategia más simple para la obtención de energía entre los microorganismos fotoheterotróficos (Pinhassi *et al.*, 2016).

1.2. Fotoheterotrofia mediada por proteorodopsina

Las rodopsinas capaces de generar un gradiente de protones a través de la membrana han sido identificadas en genomas de los tres dominios celulares de la vida (Philosof & Béjà, 2013; Vader *et al.*, 2018), así como también en virus (Yutin & Koonin, 2012). La presencia de estas rodopsinas ha sido reportada en sistemas terrestres (Guerrero *et al.*, 2017), en aguas dulces (Keffer *et al.*, 2015) y aguas marinas (de la Torre *et al.*, 2003). La primera rodopsina con la capacidad de bombear protones fue descrita en el año 1971 en una arquea halófila (*Halobacterium salinarum*) y se denominó bacteriorodopsina (Oesterhelt & Stoeckenius, 1971). En el año 2000, en un fragmento genómico de una Gammaproteobacteria marina se identificó la presencia de una rodopsina con la capacidad de bombear protones a la que se denominó proteorodopsina (Béjà *et al.*, 2000).

La proteorodopsina (PR) necesita *trans*-retinal como pigmento para ser totalmente funcional, por lo tanto los microorganismos necesitan adquirirlo del ambiente o sintetizarlo a partir de β -caroteno (Martinez *et al.*, 2007). Se ha descrito que los microorganismos que presentan PR, también presentan los genes que codifican las enzimas involucradas en la ruta de biosíntesis del retinal (McCarren & DeLong, 2007).

Además, se ha reportado *in vitro* (Martinez *et al.*, 2007), así como en sistemas marinos de aguas abiertas (Olson *et al.*, 2018) que estos genes se transcriben activamente, por lo que las bacterias que portan PR en sistemas marinos podrían ser capaces de sintetizar el retinal para que PR pueda captar la luz y actuar como una bomba de protones accionada por luz (McCarren & DeLong, 2007). Frente a la absorción de luz, el *trans*-retinal isomeriza a 13-*cis*-retinal induciendo un cambio conformacional que provoca la movilización de un protón a través de la membrana (Fuhrman *et al.*, 2008). El bombeo de protones accionado por luz genera un gradiente electroquímico de protones a través de la membrana que puede ser utilizado para diversos procesos metabólicos como: síntesis de ATP, rotación flagelar y transporte de solutos a través de la membrana, entre otros (Inoue *et al.*, 2015).

Las PRs se dividen en dos grupos de proteínas que comparten más del 78% en identidad de secuencia aminoacídica (Sabehi *et al.*, 2003), y se diferencian porque absorben luz en diferentes longitudes de onda: 525 nm (espectro del verde) y 490 nm (espectro del azul) (Man *et al.*, 2003). Esta capacidad de absorber luz en diferentes longitudes de onda les confiere una ventaja adaptativa, ya que les permite aprovechar a cada una de las variantes un espectro diferente de la luz solar (Béjà *et al.*, 2001). Este cambio en la longitud de onda a la cual la PR absorbe la luz, se debe a la diferencia en un sólo aminoácido en la posición 105: glutamina para la PR que absorbe en el espectro del azul (PR-azul) y leucina o metionina para la PR que absorbe en el espectro del verde (PR-verde) (Man *et al.*, 2003). También se han reportado otras sustituciones en la posición 105, pero en una menor abundancia (Sabehi *et al.*, 2003).

1.3 Rol fisiológico de la fototrofia mediada por proteorodopsina en bacterias marinas

La expresión heteróloga de PR en *Escherichia coli* demostró que bajo condiciones de iluminación las células que expresan PR y las enzimas de la ruta biosintética del retinal, fueron capaces de generar un gradiente electroquímico de protones a través de la membrana, que les permitió realizar síntesis de ATP (Martinez *et al.*, 2007). En bacterias que presentan PR de manera nativa, como *Vibrio* sp. AND4 y *Candidatus Pelagibacter* ubique, los cultivos expuestos a la luz presentaron mayores tasas de supervivencia bajo condiciones de escasez de nutrientes (Gómez-Consarnau *et al.*, 2010; Steindler *et al.*, 2011). En *Dokdonia* sp. MED134, bajo condiciones de iluminación, la tasa de crecimiento fue mayor que cuando se creció en condiciones de oscuridad (Gómez-Consarnau *et al.*, 2007). Sin embargo, lo observado en *Dokdonia* sp. MED134 no es extrapolable a todos los miembros de la clase Flavobacteriia, ya que *Polaribacter* sp. MED152 no presentó mayor crecimiento bajo una condición de luz frente a oscuridad. A pesar de esto, *Polaribacter* sp. fijó más bicarbonato bajo condición de luz que cuando fue crecido en oscuridad, lo cual sugiere que *Polaribacter* sp. puede usar la luz para satisfacer la demanda de ATP a través de PR, permitiéndole aumentar la fijación anaplerótica de carbono para la biosíntesis de compuestos carbonados (González *et al.*, 2008). Todas estas evidencias sugieren que el uso de la luz como recurso energético por parte de estas bacterias marinas es una estrategia común, pero que es aprovechada de diferentes maneras.

1.4 Ocurrencia de microorganismos que presentan proteorodopsina en sistemas marinos

Se estima que entre un 15% y 70% de todas las bacterias planctónicas de las aguas superficiales del océano presentan un gen cuya anotación funcional es PR (gen PR), variando de una región oceánica a otra (Pinhassi *et al.*, 2016). Análisis basados en PCR han identificado la presencia del gen PR en muestras de agua de la bahía de Monterrey (Béjà *et al.*, 2000), en la estación ALOHA (*The Hawaii Ocean Times-series, A Long-term Oligotrophic Habitat Assessment*) en el Océano Pacífico (Béjà *et al.*, 2001), el Mar Mediterráneo (Sabeji *et al.*, 2003), el Mar Rojo (Man *et al.*, 2003), el Atlántico Norte (Campbell *et al.*, 2008), el Océano Ártico occidental (Cottrell & Kirchman, 2009, Boeuf *et al.*, 2016), el hielo marino del Mar de Ross (Antártica) (Koh *et al.*, 2010) y en aguas de la Península Antártica (Béjà *et al.*, 2001). Mediante análisis basados en la secuenciación masiva de muestras de ADN (metagenómica) de la comunidad planctónica, se ha identificado el gen PR y sus dos variantes, PR-azul y PR-verde, en aguas superficiales del Mar Báltico (Brindefalk *et al.*, 2016), en el giro del Pacífico Norte (Olson *et al.*, 2018), en el Mar de los Sargazos (Venter *et al.*, 2004), en el Océano Austral (Grzymiski *et al.*, 2012), y durante toda la expedición *Global Ocean Sampling* (GOS) desde el Atlántico Norte al Pacífico Sur (Rusch *et al.*, 2007). Esto sugiere que el uso de luz mediado por PR como fuente suplementaria de energía, es una estrategia generalizada tanto en la costa como en mar abierto en todas las cuencas marinas. Sin embargo, a pesar de la evidencia de la presencia del gen PR en diferentes mares y océanos, la función ecológica de PR sigue siendo difícil de establecer (Kirchman & Hanson, 2013).

1.5 Diversidad y composición de microorganismos que presentan proteorodopsina en sistemas marinos

La afiliación taxonómica del gen PR ha sido determinada en diferentes sistemas marinos (de la Torre *et al.*, 2003). En un sistema oligotrófico como el Giro del Pacífico Norte, las secuencias de gen PR de Alfabroteobacteria representaron el 65,3% mientras que las secuencias del gen PR de Bacteroidetes y de Gammaproteobacterias, sólo representan el 7% y el 3,4%, respectivamente (Olson *et al.*, 2018). En el Mar del Norte, el 67% de las secuencias de gen PR provenían de Alfabroteobacteria, el 4% de Gammaproteobacteria y el 29% fueron taxonómicamente afiliadas a Bacteroidetes (Riedel *et al.*, 2010). En el gradiente salino estudiado en el Mar Báltico, Brindefalk *et al.* (2016) determinaron que las secuencias del gen PR provenientes de Proteobacterias fueron las más abundantes, representando en promedio el 46%, mientras que las secuencias del gen PR de Bacteroidetes representaban el 19%. En la Bahía Chesapeake, Maresca *et al.* (2018) identificaron que en la fracción <0,8 μm el gen PR de Alfabroteobacteria representaba el 50% de los genes PR, mientras PR de Actinobacteria y Bacteroidetes, representaban el 5% y 20% del total de secuencias del gen PR, respectivamente. En el Ártico, se ha determinado que durante el invierno las secuencias del gen PR de Gammaproteobacteria representan el 73%, mientras que las PR de Alfabroteobacteria y Bacteroidetes representan sólo el 12,6% y 19%, respectivamente (Nguyen *et al.*, 2015), mientras que en el verano los PR de Alfabroteobacteria aumentaron al 43%, y PR de Gammaproteobacteria y Bacteroidetes disminuyeron a 46 y 7%, respectivamente (Boeuf *et al.*, 2016). Sin embargo, en el

sistema marino de Antártica aún no se ha determinado la diversidad de microorganismos portadores del gen PR.

1.6 Efecto de las variables ambientales sobre la abundancia y actividad transcripcional del gen PR en microorganismos de sistemas marinos

La abundancia de los microorganismos que presentan PR se ha observado que se ve modulada por determinados parámetros ambientales (Pinhassi *et al.*, 2016). En océanos abiertos se ha reportado que la abundancia del gen PR del clado SAR11 (Alfaproteobacteria) se correlaciona negativamente con los niveles de clorofila *a* (Chl*a*) en el agua (Cottrell & Kirchman, 2009; Boeuf *et al.*, 2016). También, se ha reportado que la abundancia del gen PR se correlaciona con la profundidad y con otras variables ambientales como oxígeno, pH, nitrito, nitrato, amonio, silicato, carbono orgánico disuelto, disponibilidad de luz y salinidad (Boeuf *et al.*, 2016).

En particular, el efecto de la disponibilidad de luz y salinidad sobre la abundancia y actividad transcripcional del gen PR han sido las más estudiadas en los sistemas marinos. En el Mar Báltico y en la Bahía de Chesapeake, se ha observado que, frente a cambios en la salinidad, hay modificaciones en la abundancia relativa de determinados taxones portadores del gen PR (Brindefalk *et al.*, 2016; Maresca *et al.*, 2018). Además, en estos dos sistemas marinos se evaluó si diferentes salinidades afectan la transcripción del gen PR, reportándose que no existía una correlación entre la salinidad y los niveles de transcrito del gen PR a lo largo del gradiente de salinidad muestreado en el Mar Báltico (Brindefalk *et al.*, 2016), pero que en la fracción <0.8µm en la Bahía de

Chesapeake, la actividad transcripcional del gen PR era mayor a salinidades medias (15 PSU) que a salinidades mayores (31 PSU) en estas aguas costeras (Maresca *et al.*, 2018).

Por su parte, en metatranscriptomas del Giro del Pacífico Norte (Poretsky *et al.*, 2009; Ottesen *et al.*, 2014) y a través de experimentos de microcosmos (Lami *et al.*, 2009), se ha observado que la disponibilidad de luz aumenta la transcripción del gen PR. Sin embargo, en metatranscriptomas de la costa de California (EE. UU.), se observó que la transcripción del gen PR fue mayor durante la noche (Ottesen *et al.*, 2011).

1.7 Diversidad y actividad de microorganismos que presentan proteorodopsina en sistemas marinos polares

En los ambientes marinos polares, los ciclos anuales de luz y la presencia de hielo marino estacional modulan la entrada de luz como recurso energético al ecosistema marino. Además, en estos ambientes constantemente se generan gradientes salinos debido a los continuos ciclos de congelamiento-descongelamiento del hielo marino y al aporte de los glaciares que rodean las bahías polares. Por las características que presentan los sistemas marinos de altas latitudes, el efecto de los cambios en la disponibilidad de luz y la salinidad podrían afectar la fototrofía mediada por PR, al modular la actividad transcripcional del gen PR. A pesar de esto, son pocos los estudios que han investigado la abundancia y actividad transcripcional del gen PR en sistemas marinos polares. Cottrell y Kirchman (2009) reportaron la presencia del gen PR en el Océano Ártico, durante el verano e invierno en aguas costeras del Mar de Beaufort y

Chukchi. Posteriormente, Nguyen *et al.* (2015) también reportaron que durante invierno y verano, el gen PR estuvo siempre presente en el Golfo de Amundsen (Mar de Beaufort), siendo la transcripción del gen PR consistente con la sucesión de la comunidad bacteriana, disminuyendo desde noviembre a enero a una expresión constitutiva durante la oscuridad invernal. Recientemente, durante el verano ártico, Boeuf *et al.* (2016), reportaron que las bacterias portadoras del gen PR eran abundantes en toda la zona fótica a lo largo del Mar de Beaufort (oscilando entre 1-45% de la comunidad de bacterias marinas). Además, estos autores describen que la abundancia y distribución de los genes PR se correlacionan de mejor manera con las concentraciones de nutrientes que con la disponibilidad de la luz (Boeuf *et al.*, 2016).

En el caso del ecosistema marino antártico, la presencia y expresión del gen PR ha sido muy poco explorada. El primer reporte de la presencia de una secuencia correspondiente al gen PR, fue en aguas costeras de la Isla Anvers (Palmer Station) en la Península Antártica (Béjà *et al.*, 2001). Posteriormente, Koh *et al.* (2010) describieron a través de una biblioteca de clones de ADN y ADNc, la presencia y expresión de genes de PR en la comunidad de bacterias del hielo marino de la región del Mar de Ross durante el verano austral de 2007-2008, reportando genes PR y transcritos relacionadas con Flavobacteriia (*Polaribacter*), y Alifaproteobacterias, Gammaproteobacterias (clados SAR11 y SAR92, respectivamente). Más tarde Grzymiski *et al.* (2012) y Williams *et al.* (2012) determinaron a través de metagenómica y metaproteómica la presencia del gen PR de *Polaribacter*, SAR11 y SAR92, y la presencia de la proteína PR en aguas costeras superficiales de la Península Antártica (Palmer Station). Recientemente, nuestro laboratorio reportó mediante metagenomas obtenidos durante un episodio de aumento

de niveles de Chla en aguas costeras superficiales en Bahía Chile (Islas Shetland del sur) Península Antártica, la presencia de géneros de bacterias que se han descrito como portadoras del gen PR, tales como *Polaribacter*, *Flavobacterium* y *Candidatus Pelagibacter* (Alcamán-Arias *et al.*, 2018). Alcamán-Arias *et al.* (2018) determinaron que cuando la productividad del sistema aumenta (estimado mediante el aumento de los niveles de Chla), la composición de la comunidad bacteriana se mantiene similar, pero la abundancia y la actividad transcripcional de algunos microorganismos que comúnmente son descritos como portadores del gen PR se ven modificadas con los niveles de Chla y periodos día-noche (Alcamán-Arias *et al.*, 2018). Sin embargo, la abundancia de bacterias portadoras del gen PR y la actividad transcripcional de este gen durante el período estival, no se ha estudiado en el ambiente marino antártico. En aguas costeras de Antártica, tampoco se ha determinado el efecto de la disponibilidad de luz o salinidad del agua en la distribución, diversidad o actividad transcripcional del gen PR.

Tomando en cuenta todos estos antecedentes, consideramos que una descripción enfocada en bacterias portadoras de PR a lo largo de diferentes períodos estivales en la Antártica proporcionaría información relevante para entender cómo la fototrofia mediada por PR contribuye al ecosistema marino antártico. En esta tesis nos propusimos por tanto identificar la identidad y actividad transcripcional del gen PR en aguas costeras antárticas, para tratar además de dar respuesta a cómo las variables ambientales de salinidad y disponibilidad de luz, son agentes moduladores de la abundancia y/o actividad transcripcional del gen PR, usando el sistema marino polar de Bahía Chile en Antártica como modelo.

2. Hipótesis

“En aguas costeras de Bahía Chile, Antártica, existe diversidad de bacterias portadoras del gen PR, cuya abundancia y actividad transcripcional son moduladas por cambios en las condiciones ambientales de salinidad y luz incidente durante el periodo estival”.

3. Objetivo General

Determinar la diversidad y composición de bacterias portadoras del gen PR, así como la abundancia y actividad transcripcional de este gen bajo diferentes condiciones de disponibilidad de luz y salinidad en aguas costeras antárticas de Bahía Chile durante el periodo estival.

4. Objetivos Específicos

1. Determinar la identidad y diversidad de bacterias que portan y transcriben el gen PR en aguas costeras superficiales de Bahía Chile durante el periodo estival.
2. Determinar el efecto de las condiciones ambientales salinidad y luz incidente sobre la abundancia del gen PR en bacterias de aguas costeras de Bahía Chile.
3. Determinar el efecto de cambios en las condiciones ambientales salinidad y luz incidente sobre la actividad transcripcional del gen PR en bacterias de aguas costeras de Bahía Chile.

5. Metodología

5.1 Sitio de muestreo para el estudio de proteorodopsinas marinas: Bahía Chile, Antártica

Las muestras de agua de mar se obtuvieron durante los períodos de verano tardío de 2014, 2016 y 2017 en Bahía Chile, Isla Greenwich, Isla Shetland del Sur, Antártica (**Figura 1**; sección resultados). Las muestras corresponden a una serie de tiempo durante los periodos estivales de 2014 (14 de febrero a 4 de marzo), 2016 (18 de febrero a 4 de marzo) y 2017 (8 de febrero a 25 de febrero), contemplando muestras obtenidas durante el día y la noche (**Tabla S1**; muestras y metadatos asociados). Cada muestra corresponde a una réplica única de 20L de agua obtenidas desde un punto de muestreo, a una profundidad, hora y fecha específica. Se tomaron muestras de agua desde dos puntos de muestreo con diferentes salinidades para los años 2016 y 2017 dentro de Bahía Chile: 1) P1, punto de menor salinidad (33.4 PSU), ubicado a 800 m del glaciar "Fuerza Aérea" (62° 29' 2" S - 59° 40' 6" W), y 2) P3, punto expuesto a aguas abiertas con una salinidad de 34.4 PSU (62° 27' 6" S - 59° 40' 6" W). Durante 2016, sólo se tomaron muestras a 2-3 m de profundidad (superficial), mientras que en 2017 se tomaron muestras de agua superficial y profunda (30 m). Para el año 2014 solo fue muestreado el punto P3 a 2-3 m de profundidad. Mientras que P1 está directamente afectado por la entrada de agua dulce debido al derretimiento del glaciar, P3 está más expuesto a las condiciones de aguas abiertas, presentándose un gradiente de salinidad entre ambos puntos de muestreo, que aumenta desde 33.4 PSU (P1) a 34.4 (P3). Para la obtención del agua de mar, se utilizó una bomba de membrana manual a bordo de un bote y el

agua se almacenó en bidones transparentes de 20 L, tratadas previamente con HCl al 10%. Las muestras de agua se transportaron al laboratorio de INACH en la base Arturo Prat donde fue filtrada de manera seriada para obtener la fracción microbiana mayor a 0.22 μm utilizando filtros Sterivex (Durapore; Millipore). Los filtros se mantuvieron a -80 °C hasta su procesamiento en el laboratorio de Ecología Microbiana y Microbiología Ambiental de Sistemas Extremos de la Pontificia Universidad Católica de Chile en Santiago.

5.2 Experimentos de microcosmos de disminución de salinidad (verano 2016)

Para determinar la influencia de la salinidad sobre la actividad transcripcional del gen PR, se realizaron experimentos de microcosmos de disminución de salinidad en terreno. Para dichos experimentos, se mezcló agua de mar (sitio de muestreo P3: 34.4 PSU) con agua dulce proveniente del glaciar Fuerza Aérea. Se realizaron dos experimentos de disminución de salinidad: 1) agua de mar más agua dulce; y 2) agua de mar más agua dulce filtrada para remover la fracción microbiana mayor a 0.22 μm . En ambos experimentos se agregó agua dulce hasta que se redujo la salinidad del agua de 34.4 PSU a 24 PSU. Como control, se realizaron dos microcosmos adicionales: 1) sólo agua de mar, y 2) sólo agua dulce. Los cuatro experimentos fueron mantenidos en condiciones ambientales *in situ* de luminosidad y temperatura en Bahía Chile durante 7 días. Posteriormente, el agua de los microcosmos fue filtrada de manera seriada para obtener la fracción microbiana mayor a 0.22 μm utilizando filtros Sterivex (Durapore; Millipore). Los filtros fueron preservados en RNAlater (Thermo Fisher Scientific, Inc.) y

se mantuvieron a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ hasta su procesamiento en el laboratorio de Ecología Microbiana y Microbiología Ambiental de Sistemas Extremos.

5.3 Variables ambientales

Durante el período de muestreo, las variables ambientales como la temperatura, la salinidad y oxígeno se midieron utilizando un sensor multiparámetro (OAKTON PCD650). Para determinar los nutrientes NO_2^- , NO_3^- , PO_4^{3-} y $\text{Si}(\text{OH})_4$, se tomaron muestras de agua de mar en tubos de polietileno de 15 ml y se almacenaron a -20°C hasta su posterior análisis siguiendo el protocolo descrito en el *World ocean circulation experiment* (Gordon *et al.*, 1993). Para la determinación de los niveles de Chla, se filtró 1L de agua de mar a través de un filtro de fibra de vidrio de $0.7\text{ }\mu\text{m}$ y las muestras se congelaron hasta su determinación fluorométrica siguiendo la metodología descrita por Strickland y Parsons (1972). Para la determinación de NH_4^+ , las muestras se recolectaron en matraces de vidrio y se analizaron según lo descrito en Solorzano (1969).

5.4 Extracción de ADN

Para el análisis de ADN, la biomasa microbiana de las muestras de agua de mar de 2014, 2016 y 2017 se concentró en filtros Sterivex (con diámetro de poro de $0,22\text{ }\mu\text{m}$) (Durapore; Millipore). El agua de mar (3–4 L) fue filtrada previamente a través de una malla de nylon de tamaño de poro de $200\text{ }\mu\text{m}$ seguida de un filtro de policarbonato de tamaño de poro de $20\text{ }\mu\text{m}$ con una bomba peristáltica (Cole Palmer System Modelo no.

7553–70 6–600 rpm) a 50–100 mL min⁻¹. El ADN se extrajo siguiendo el protocolo descrito por Tillet y Neillan (2000), con modificaciones. Brevemente, los filtros se extrajeron desde el Sterivex y se cortaron en fragmentos de alrededor de 1 cm². Luego, se les añadió *Buffer* xantogenato (etil xantogenato potásico 1% (Sigma-Aldrich), Tris-HCl 100 mM, EDTA 20 mM, acetato de amonio 800 mM) y perlas de vidrio estériles. La mezcla se homogeneizó en *BeadBeater* durante tres ciclos de 30 s de agitación y luego se añadió SDS para alcanzar una concentración final del 1% y se incubó a 65 °C durante 2 h (se agitó manualmente cada 30 minutos para asegurar una lisis homogénea de la muestra). Después de la incubación, los tubos se agitaron durante 10 s antes de colocarlos en hielo durante 30 min. La mezcla se centrifugó durante 15 min a 13.000 g para descartar los residuos celulares, restos de filtro y las perlas de vidrio. El ADN se extrajo con fenol-cloroformo-alcohol isoamílico (25:24:1), y el fenol residual se eliminó con cloroformo-alcohol isoamílico (24:1). El ADN extraído se precipitó durante la noche con isopropanol frío y se lavó en etanol al 70%. El ADN se cuantificó utilizando el fluorómetro Qubit® 2.0 (Thermo Fisher Scientific, Inc.), la calidad se evaluó mediante espectrofotometría (relación Absorbancia 260nm / Absorbancia 280nm), y la integridad mediante electroforesis en gel de agarosa al 1% en *buffer* TAE 1X (Tris-HCl 40mM, Ácido acético 20mM, EDTA 1 mM) a voltaje constante (110V) durante 30 min.

5.5 Secuenciación masiva de ARN de experimentos de microcosmos de disminución de salinidad en Antártica (verano 2016)

La secuenciación masiva de ARN para los experimentos de microcosmos de disminución de salinidad realizados en 2016 se obtuvo a partir del ARN extraído desde

filtros Sterivex con la fracción microbiana mayor a 0.22 μm . Brevemente, los filtros fueron lavados de RNAlater de forma sucesiva con agua destilada (5 mL), luego se cortaron en fragmentos de 1 cm^2 , y el ARN se extrajo con TRIzol® (Invitrogen). El ARN obtenido se purificó y concentró usando el kit RNA Clean & Concentrator (Zymo Research, EE. UU.). La calidad y cantidad del ARN total extraído se determinó utilizando el fluorómetro Qubit® 2.0 (ThermoFisher Scientific, Inc.), y se verificó la integridad mediante electroforesis en gel de agarosa al 1% libre de RNasa en *buffer* TAE 1X, como se describió anteriormente. El ADN remanente se eliminó mediante un tratamiento con DNAasa (TURBO, Applied Biosystems, EE. UU.). En un paso anterior a la construcción de la biblioteca de secuenciación, se removió el ARNr utilizando el kit Ribozero (Illumina). Las bibliotecas se prepararon con el kit TruSeq Stranded mRNAseq de Illumina (Illumina) y se cuantificaron mediante qPCR. La secuenciación se realizó en el Roy J. Carver Biotechnology Center (Illinois, EE. UU.) en un equipo Hi-Seq 4000 utilizando un kit Hi-Seq 4000 sequencing version 1 por 151 ciclos en un sólo sentido. A partir de la secuenciación se generaron los respectivos archivos FastQ y se desmultiplexaron con el software bcl2fastq v2.17.1.14 (Illumina). Se obtuvieron lecturas de 150 pb de longitud. Se realizó una evaluación de la calidad de los datos metatranscriptómicos con el software FastQC (Andrews, 2010). Las secuencias fueron filtradas por calidad utilizando el software Cutadapt (Martin, 2011), cortando las primeras nueve bases del extremo 5' y un recorte de calidad del extremo 3' y con un Qscore >30 (certeza mínima de un 99,9% en la asignación de la base de la lectura). Las secuencias de ARNr remanentes se eliminaron utilizando el software SortMeRNA (Kopylova *et al.*, 2012) con las bases de datos SILVA versión 128 SSU y LSU (Quast *et al.*, 2013).

5.6 Cuantificación de la abundancia del gen de proteorodopsina en muestras de ADN de aguas de Bahía Chile

Para determinar si la abundancia del gen PR se ve afectada por la salinidad y disponibilidad lumínica (día/noche) durante el periodo estival, se cuantificó mediante qPCR la abundancia de genes que codifican PR en muestras costeras de agua de mar de Bahía Chile de los periodos estivales interanuales consecutivos 2016 y 2017. Dada la complejidad de diseñar partidores universales para qPCR que permitan cubrir la mayoría de los diferentes géneros que presentan el gen PR (Boeuf *et al.*, 2016), se utilizaron partidores ya descritos para el gen PR de los tres principales taxones que presentan el gen PR en la comunidad de bacterias de Bahía Chile: clado SAR11 (Lami *et al.*, 2009), clado SAR92 (Boeuf *et al.*, 2016) y clase Flavobacteriia (Campbell *et al.*, 2008) (Tabla S1). La abundancia de estos tres grupos de genes PR se normalizó por la abundancia del gen 16S rRNA de bacterias, asumiendo que las bacterias que portan el gen PR lo presentan en copia única (Boeuf *et al.*, 2016; Maresca *et al.*, 2018), y en promedio las bacterias marinas presentan 1.9 copias del gen 16S rRNA (Venter *et al.*, 2004; Campbell *et al.*, 2008; Riedel *et al.*, 2010). Esto permitió calcular la abundancia relativa de cada uno de los taxones que presentan el gen PR en la comunidad de bacterias de aguas costeras de Bahía Chile.

Para la cuantificación del gen ARNr 16S de bacterias en las muestras de ADN de 2016 y 2017, se utilizaron los partidores descritos por Kenwell *et al.*, (2016). Para obtener la curva estándar (10^8 - 10^2 copias) para la cuantificación del gen PR, los tres genes PR se clonaron en el vector pGEM®-T Easy (Promega). El ADN plasmidial se extrajo

utilizando el kit GeneJET Plasmid Miniprep (Thermo Fisher Scientific, Inc.), se linealizó utilizando la enzima *SacI* (Thermo Fisher Scientific, Inc.), y se cuantificó utilizando NanoDrop (Thermo Fisher Scientific, Inc.). La curva estándar para el gen ARNr 16S, se generó a partir de la amplificación de ADN de *Escherichia coli* y luego se purificó el amplicón con el kit GeneJET Gel Extraction (Thermo Fisher Scientific, Inc.). El producto fue cuantificado mediante NanoDrop (Thermo Fisher Scientific, Inc.), y luego diluido de forma seriada hasta obtener el rango de 10^8 a 10^2 copias utilizado en la curva estándar. La cuantificación mediante qPCR se realizó en triplicado con 1 μ L de ADN (1 ng/ μ L) en un volumen final de 15 μ L de reacción. Se utilizó el kit SensiMix SYBR® & Fluorescein (Bioline) para obtener la señal de fluorescencia, y el termociclador en tiempo real Roche LC 480 (Roche diagnostics Ltd.). La concentración de partidores en la mezcla de reacción 1x fue de 0,5 mM para los tres genes PR y de 0,3 mM para la cuantificación del gen ARNr 16S. Además, en la cuantificación del gen PR de Flavobacteriia y del gen ARNr 16S se utilizó DMSO 100% (Thermo Fisher Scientific, Inc.), a una concentración del 2% en la mezcla de reacción. El programa de amplificación y medición de fluorescencia se realizó de la siguiente manera: 95 °C durante 10 min, 40 ciclos de desnaturalización del ADN a 95 °C durante 10 s; luego la temperatura específica para el apareamiento de la pareja de partidores a su respectivo gen (**Tabla S2**) durante 20 s; y finalmente la extensión de la polimerasa a 72 °C durante 30 s. La medición de la fluorescencia se realizó al finalizar cada ciclo. Al finalizar los 40 ciclos, se realizó un gradiente ascendente de temperatura (65° a 90° C) con obtención de fluorescencia cada 0,5 °C para obtener la curva de disociación para cada cuantificación. Sólo las muestras con fluorescencia dentro del rango dado por la curva estándar, y con picos únicos observados en las curvas de disociación como lo describen Boeuf *et al.* (2016), se

consideraron para posteriores análisis. Las eficiencias de amplificación fueron las siguientes: Flavobacteriia-PR 104%, SAR11-PR 92%, SAR92-PR 91% y ARNr 16S de bacteria 94% (**Figura S1**). Para determinar el número de copias de cada gen en las muestras de ADN, se realizó una interpolación del punto de cruce (CP) de cada muestra en la curva estándar. Para estimar la abundancia relativa del gen PR en la comunidad bacteriana marina, las cuantificaciones de la abundancia de este gen se normalizaron por la abundancia del gen 16S ARNr, suponiendo 1.9 copias del ARNr 16S por genoma de bacterias marinas y una copia del gen PR por genoma (Venter *et al.*, 2004; Boeuf *et al.*, 2016).

5.7 Identificación de secuencias de genes PR en metagenomas de Bahía Chile

La identificación del gen que codifica la proteína cuya anotación funcional es la de PR y el análisis de la actividad transcripcional del gen PR se realizó a partir de los datos de secuenciación masiva obtenidos para el año 2014 desde aguas marinas superficiales de Bahía Chile (Alcamán-Arias *et al.*, 2018). Brevemente, las muestras de agua de mar superficial de Bahía de Chile se recolectaron el 11 (noche) y el 14 (día) de febrero, y los días 03 (día) y 04 (noche) de marzo de 2014. Cada muestra corresponde a una toma única de 20 L de agua superficial. De este muestreo, se obtuvieron 4 muestras de agua de mar las cuales fueron filtrados de manera seriada para después realizar la extracción de ADN y ARN como se describe anteriormente en la sección 5.5.4. Las muestras de ADN (14 de febrero y 04 de marzo) se secuenciaron mediante la tecnología *Illumina HiSeq* utilizando un kit Hi-Seq 4000 sequencing version 1 por 151 ciclos en un sólo sentido. Las muestras de ARN (diurno y nocturno, de febrero y marzo)

se secuenciaron mediante la tecnología *Illumina HiSeq* como se describe anteriormente en la sección 5.5.5. Los datos de las secuencias utilizados en este estudio están disponibles en el NCBI: Bioproject no. PRJNA421008.

El filtro por calidad de las lecturas de metagenomas y metatranscriptomas se realizó con una calidad de *Qscore* >30. Las lecturas de los metagenomas se ensamblaron con el software SPAdes v3.10.1 utilizando la opción "meta" (Bankevich *et al.*, 2012). Luego, la predicción de los marcos de lectura abierto (ORFs) se realizó, a partir de los *contigs* mayores a 500 pb, con Prodigal v2.6.3 utilizando el modo "meta", y pasando por alto la secuencia Shine-Dalgarno (Hyatt *et al.*, 2010). La identificación de los candidatos a PR se realizó con las proteínas predichas de ambos metagenomas mediante el análisis de homología utilizando DIAMOND (BLASTp) (Buchfink *et al.*, 2015) con la base de datos curada MicRhoDE (Boeuf *et al.*, 2015), y en particular con aquellas proteínas anotadas como PR. Luego, la potencial funcionalidad de estas proteínas predichas como candidatas a PR, se evaluó con las bases de datos de P-fam (Finn *et al.*, 2016) mediante HMMScan (HMMER 3.0; <http://hmmer.org/>), identificando el modelo oculto de Markov (HMM) Bac_rhodopsin (PF01036), y mediante DIAMOND (BLASTp) contra la base de datos NR de NCBI, seleccionando las proteínas que pertenecen a la familia InterPro: Proteorhodopsin (IPR017402) (Finn *et al.*, 2017). Las proteínas resultantes se curaron manualmente identificando la presencia del dominio funcional ubicado en la tercera alfa-hélice (hélice C), que participa del bombeo de protones, y para aquellas que además tenían un tamaño mínimo de más de 100 aminoácidos. Las proteínas PR que no se asignaron taxonómicamente, se examinaron en busca del dominio funcional en la hélice C junto con la presencia de una lisina en la séptima alfa-

hélice, la cual se une de forma covalente con el retinal, para confirmar su asignación funcional como PR.

5.8 Determinación de abundancia y actividad transcripcional del gen PR proteorodopsina en Bahía Chile

Para determinar la abundancia relativa del gen PR en los metagenomas de Bahía Chile, se generó una base de datos que reunía los genes PR identificados con el procedimiento descrito anteriormente. Mediante el uso del software Bowtie2 v2.2.6 (Langmead y Salzberg, 2012), con parámetros predeterminados, se realizó el reclutamiento (mapeo) de las lecturas del metagenoma a su correspondiente gen PR. Luego, se identificaron 4 genes de copia única y de actividad transcripcional constitutiva (HK): *recA*, *rplB*, *rpoB* y EF-Tu en las proteínas predichas de los metagenomas utilizando *hmmsearch* con los modelos HMM: RecA (PF00154.20), Ribosomal_L2 (PF00181.22), RNA_pol_Rpb2_1 (PF04563.14) y GTP_EFTU (PF00009.26), verificando que las proteínas predichas pertenezcan a las familias de InterPro: IPR013765, IPR002171, IPR015712 y IPR004541, respectivamente. (Dubinsky *et al.*, 2017; Maresca *et al.*, 2018).

$$r_{PR} = \frac{\sum \frac{\text{lecturas gen PR}_i}{\text{largo gen PR}_i}}{\sum \frac{\text{lecturas gen HK}_i}{\text{largo gen HK}_i}}$$

Ecuación 1.- Razón para el cálculo de la abundancia relativa del gen PR en los metagenomas de Bahía Chile.

r_{PR} corresponde a la razón entre la sumatoria de número de lecturas del gen PR_i normalizado por el largo del gen PR_i (en pb), y la sumatoria del número de lecturas del gen HK_i normalizado por el largo del gen HK_i (en pb). La abundancia relativa se expresó como el promedio entre las razones r_{PR} obtenidas para cada gen HK.

La abundancia normalizada promedio del gen PR en los metagenomas se calculó como el promedio de cada razón entre el número de lecturas del gen PR y el número de lecturas de genes HK, y estos genes, a su vez, se normalizaron por su tamaño (**Ecuación 1**, basada en lo descrito por Maresca *et al.*, 2018).

Para la determinación de la actividad transcripcional del gen PR, se analizaron los datos de secuenciación de ARN obtenidos de Bahía Chile durante febrero y marzo, en periodos de luz (día) y oscuridad (noche). Las secuencias de ARNr remanentes en la secuenciación se eliminaron utilizando SortMeRNA (Kopylova y Noe, 2012) y se filtró cada muestra con todos los parámetros predeterminados. Las lecturas que no alinearon contra la base de datos de ARNr se mapearon con Bowtie2 v2.2.6 con parámetros predeterminados contra el conjunto de genes PR identificados en 5.5.5.

Para evaluar si existía diferencia en los niveles de actividad transcripcional del gen PR entre los metatranscriptomas de día/noche o febrero/marzo, se analizaron los niveles de actividad transcripcional de los genes *rplB*, *rpoB* y EF-Tu, para normalizar la actividad transcripcional del gen PR. Las lecturas de los genes HK en los metatranscriptomas se obtuvieron con el mismo procedimiento que las lecturas del gen PR, y luego la relación entre la actividad transcripcional del gen PR y la de los genes HK se estimó de la misma manera que en los metagenomas (**Ecuación 1**). Luego, para los valores de cada razón PR/HK del metatranscriptoma de febrero/día se asumió un valor arbitrario de 1, y se calcularon las respectivas razones PR/HK para cada gen HK en los demás metatranscriptomas. Una vez se escalaron las razones PR/HK calculadas en relación a la actividad transcripcional reportada en febrero/día, se obtuvo el promedio

entre los 3 genes HK escalados a un valor de 1. De la misma manera, para los metatranscriptomas provenientes de los experimentos de microcosmos, se reclutaron las lecturas identificadas como transcritos del gen PR y genes HK, y se calcularon las razones PR/HK para cada uno de los genes HK en los metatranscriptomas de 1) agua de mar, 2) agua de mar más agua dulce, y 3) agua de mar más agua dulce filtrada. Para los experimentos de microcosmos, se calculó la actividad transcripcional asumiendo un valor arbitrario de 1 para las razones PR/HK obtenidas en el metatranscriptoma 1) agua de mar.

A pesar de que el gen *recA* se ha utilizado como un gen de copia única y de actividad transcripcional constitutiva para normalizar la expresión de genes funcionales desde metatranscriptomas (Palovaara *et al.*, 2014), se ha reportado que en el sistema marino antártico, la transcripción de este gen se ve inducida en microorganismos marinos cuando éstos son expuestos a radiación UV (UVA / UVB) (Booth *et al.*, 2001a, 2001b). Además, en el sistema marino antártico (Bahía Fildes, Península Antártica Occidental) se observó una transparencia del agua relativamente alta y una penetración más profunda de UV-B en proporción a UV-A / visible, lo que sugiere un mayor riesgo de daño biológico por radiación UV para el bacterioplancton de la Antártica en comparación con otros ambientes marinos (Huovinen *et al.*, 2016). Teniendo en cuenta esta evidencia, sólo utilizamos el gen *recA* para normalizar la abundancia del gen PR en los metagenomas, pero no para normalizar la actividad transcripcional del gen PR en los metatranscriptomas. Las enzimas de la ruta biosintética del retinal: 15,15'- β -caroteno dioxigenasa (*blh*), fitoeno sintasa (*crtB*) y licopeno ciclasa (*crtY*) se identificaron de la misma forma que los genes HK, pero utilizando los modelos HMM BCD (PF15461),

SQS_PSY (PF00494) y Lycopene cyclase (PF05834) (Olson *et al.*, 2018). El cálculo de la actividad transcripcional se llevó a cabo de la misma forma que para el gen HK, considerando un valor arbitrario de 1 para las razones obtenidas entre los genes de las enzimas de la ruta de biosíntesis de retinal y los genes HK en el metatranscriptoma de Febrero Día.

5.9 Anotación taxonómica

Los genes de PR identificados en los metagenomas de Bahía Chile 2014, se anotaron taxonómicamente utilizando análisis de homología de secuencia BLASTn contra la base de datos RefSeq de NCBI (marzo 2018). En lugar de identificar la afiliación taxonómica del gen, utilizamos el *contig* que contenía el ORF correspondiente al gen PR para determinar su identidad taxonómica usando el algoritmo *Last Common Ancestor* implementado en MEGAN 6, con una puntuación mínima de 50.

5.10 Determinación de aminoácidos en el sitio activo

Las secuencias de proteínas predichas identificadas como PR en Bahía Chile 2014 se alinearon con MAFFT utilizando el método G-INS-i (Kato *et al.*, 2018), incluyendo además las PR de referencia obtenidas de la base de datos MicRhoDE (Boeuf *et al.*, 2015). De manera manual, se analizó el alineamiento para detectar los aminoácidos involucrados en el bombeo de protones (ubicados en las posiciones 97, 101 y 108) y el aminoácido involucrado en definir el espectro de longitud de onda al cual PR absorbe la luz (aminoácido λ , ubicado en la posición 105).

6.- Resultados

6.1 Identidad y diversidad de bacterias que portan y transcriben el gen PR en aguas costeras superficiales de Bahía Chile durante el periodo estival de 2014

6.1.1 Identificación y abundancia de secuencias del gen PR desde el catálogo de genes de los metagenomas de aguas costeras de Bahía Chile durante el periodo estival de 2014

La Bahía Chile está localizada en la isla Greenwich que forma parte de las Islas Shetland del Sur, en la Península Antártica Occidental (**Figura 1**). Los parámetros biológicos y fisicoquímicos de las aguas superficiales (2-3 m de profundidad) del punto P3 (62° 27' 6" S; 59° 40' 6" O) de la bahía fueron monitoreados desde el 14 de febrero al 4 de marzo del verano de 2014. La temperatura superficial del agua de mar aumentó desde -0,1 °C en febrero a 0,3 °C en marzo, y se registró un aumento de Chla durante este período, con niveles de Chla de 0,3 mg m⁻³ en febrero y hasta 2,5 mg m⁻³ en marzo (Alcamán-Arias *et al.*, 2018).

Desde el catálogo de genes de los metagenomas de la comunidad microbiana costera de la Bahía Chile en 2014 se lograron identificar 66 secuencias de proteínas que correspondían a proteínas predichas de genes PR. Estos genes representan el 0,0078% del total del catalogo de genes de Bahía Chile. Los genes que codifican estas PR predichas representan el 0,0017% y el 0,0025% de las lecturas totales en los metagenomas de febrero y marzo, respectivamente.

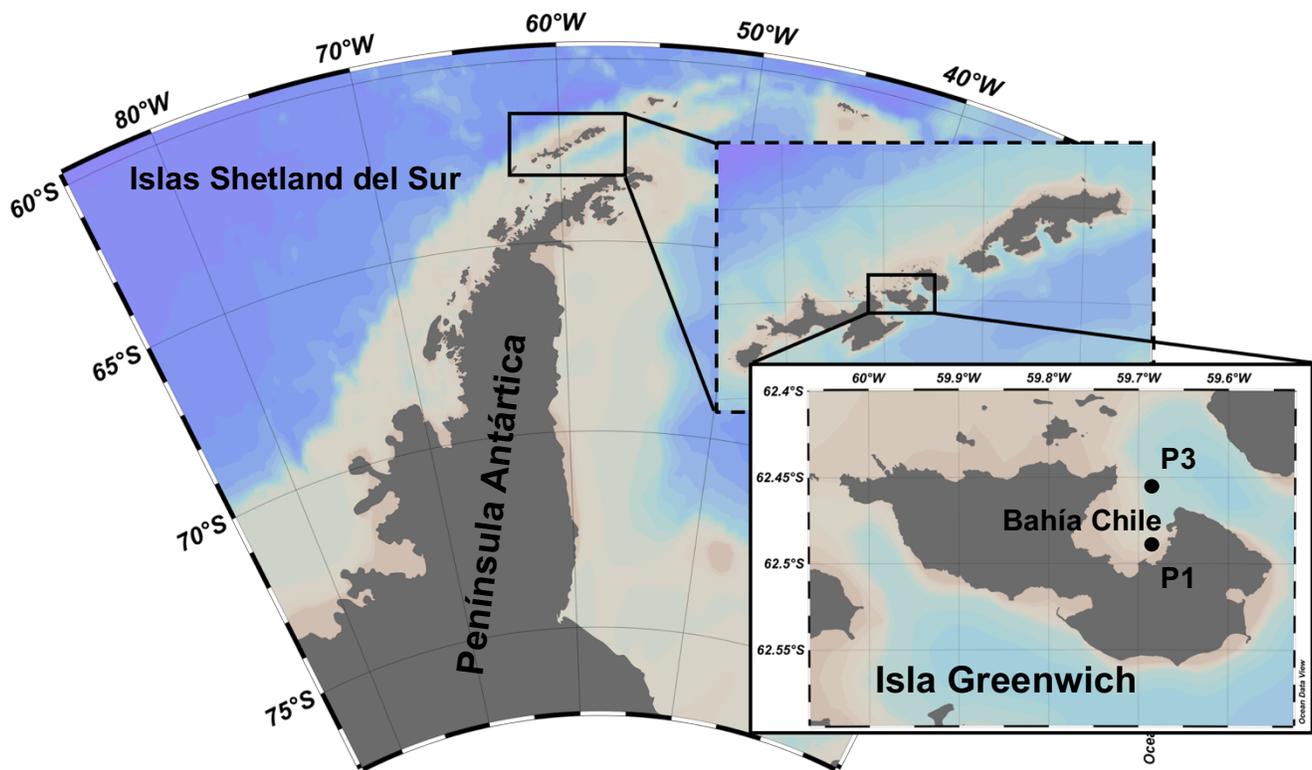


Figura 1.- Mapa de Bahía Chile, Isla Greenwich, Islas Shetland del Sur, Península Antártica. Localización de los dos puntos de muestreo P1 (62.49° S , 59.66° W) y P3 (62.45° S , 59.66° W) en el mapa de la bahía.

La abundancia del gen PR en la Bahía Chile en ambos períodos de muestreo (metagenomas de febrero y marzo), fue normalizada por la abundancia de genes de expresión constitutiva de copia única: *recA*, *rpIB*, *rpoB* y EF-Tu (genes HK) (Venter *et al.*, 2004; Dubinsky *et al.*, 2017; Maresca *et al.*, 2018). En promedio, el $16,6 \pm 4,1\%$ y el $16,8 \pm 6,5\%$ de las bacterias presentaron el gen PR en febrero y marzo 2014, respectivamente. Estos resultados de abundancia relativa del gen PR en la comunidad de bacterias marinas de Bahía Chile, constituyen la primera estimación de la abundancia de este gen en el sistema marino antártico.

6.1.2 Identidad taxonómica de secuencias del gen PR de aguas costeras de Bahía Chile durante el periodo estival de 2014

En los metagenoma de Bahía Chile de febrero y de marzo, la abundancia relativa de los taxones portadores del gen PR fue similar durante ambos meses, a pesar que durante el mes de marzo los niveles de Chla aumentaron hasta $2,5 \text{ mg m}^{-3}$. En promedio, durante ambos meses la abundancia relativa de las secuencias del gen PR se atribuyó en un 67,8% a Flavobacteriia, 9,2% a Alfarproteobacteria y 4,5% a Gammaproteobacteria (**Figura 2**).

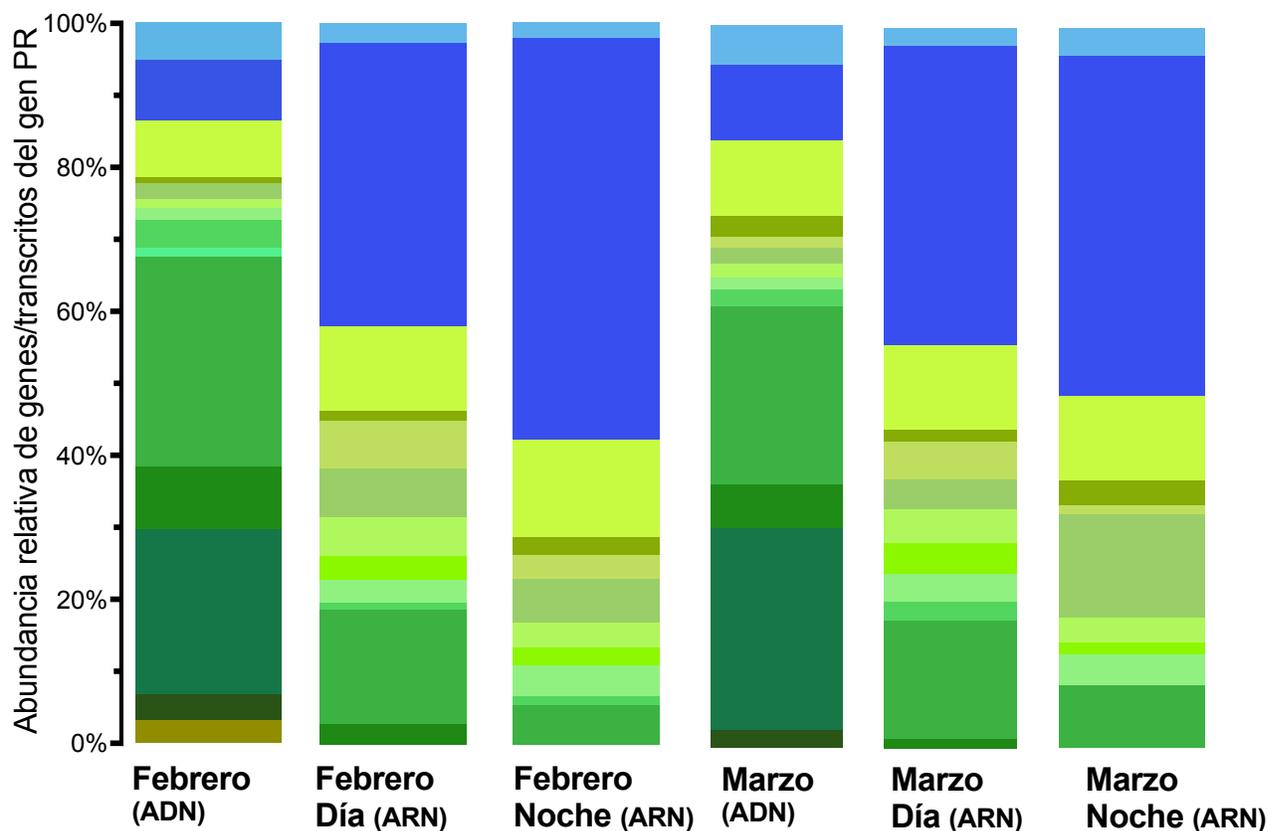
En febrero, en la clase Flavobacteriia, el gen PR se asignó principalmente a los géneros *Polaribacter* (30,1%), *Flavobacterium* (22,7%), *Formosa* (8,6%) y *Aquimarina* (3,8%), mientras que en las clases Alfarproteobacteria y Gammaproteobacteria, se asignó a *Candidatus Pelagibacter* (8,8%) y al clado SAR92 (2,2%), respectivamente (**Figura 2**). Durante marzo, se observó un patrón similar a febrero, pero con un incremento en la

abundancia relativa de secuencias del gen PR de Proteobacterias. Dentro de las Flavobacteriia, las secuencias del gen PR se asignaron a los géneros *Flavobacterium* (29,3%), *Polaribacter* (23,6%), *Formosa* (5,9%) y *Aquimarina* (2,6%). Dentro de las Alfaproteobacterias, las secuencias del gen PR se asignaron principalmente al género *Candidatus Pelagibacter* (10,8%), mientras que en las Gammaproteobacteria, se asignaron al género *Vibrio* (1,6%) y al clado SAR92 (2.1%) (**Figura 2**). También, se logró identificar una secuencia del gen PR asignada taxonómicamente al género *Exiguobacterium* (Firmicutes) (3.1%), la cual fue identificada sólo en el metagenoma de febrero. Finalmente, un 7,6% y 11,6% de secuencias del gen PR no pudieron asociarse con ningún taxón específico durante febrero o marzo, respectivamente (**Figura 2**).

6.1.3 Identidad taxonómica de transcritos de secuencias del gen PR de aguas costeras de Bahía Chile (Antártica) durante el periodo estival de 2014.

Para identificar qué microorganismos transcribían de manera activa el gen PR durante el periodo estival en Bahía Chile, se analizaron los datos de secuenciación masiva de ADNc (metatranscriptomas) de las muestras de ARN obtenidas desde aguas superficiales en febrero y marzo 2014, en horas de luz y oscuridad.

Hasta la fecha, la determinación de la afiliación taxonómica de las lecturas de los metatranscriptomas identificadas como provenientes del gen PR del catálogo de genes de Bahía Chile, corresponde a la primera aproximación realizada para evaluar la transcripción del gen PR en la comunidad bacteriana en aguas marinas antárticas.



Taxa

- | | |
|--|--|
| ■ <i>Candidatus Pelagibacter</i> (L105) | ■ unknown (Q105) |
| ■ unclassified Flavobacteriia | ■ <i>Candidatus Pelagibacter</i> (Q105) |
| ■ <i>Sediminicola</i> | ■ unknown (L/M 105) |
| ■ <i>Polaribacter</i> | ■ <1% (L/M 105) |
| ■ <i>Formosa</i> | ■ SAR92 |
| ■ <i>Flavobacterium</i> | ■ <i>Vibrio</i> |
| ■ <i>Aquimarina</i> | ■ <i>Candidatus Puniceispirillum</i> |
| ■ <i>Exiguobacterium</i> | ■ unclassified Rhodobacterales |

Figura 2.- Afiliación taxonómica y color de longitud de onda asociada a los genes PR y transcritos del gen PR en Bahía Chile en el verano Austral de 2014. Gráfico de barras apiladas que representa la abundancia relativa de los genes PR asignados taxonómicamente identificados en los metagenomas de febrero y marzo de 2014, junto a la abundancia relativa de los transcritos de los genes PR en los periodos de día y noche, en los metatranscriptomas de febrero y marzo. Se identificó en cada taxa si el gen presentaba Leucina, Metionina o Glutamina en la posición 105 de la proteína PR predicha. Aquellas taxas en colores verdes, presentan Leu/Met (PR-verde), mientras que aquellas taxas en azules presentan Glu (PR-azul). Las lecturas identificadas como transcritos de gen PR fueron reclutadas a las secuencias de los genes obtenidos desde el catálogo de genes de Bahía Chile. La asignación taxonómica de los genes PR se realizó mediante análisis de homología de secuencias (BLASTn) contra la base de datos del NCBI: RefSeq de marzo de 2018.

A partir de este análisis se observó que miembros de los filos Bacteroidetes y Proteobacteria transcribían activamente el gen de PR en los meses de febrero y marzo, bajo diferente escenario de bajo y alto nivel de Chla, durante el día y la noche en la Península Antártica Occidental (**Figura 2**). En febrero, miembros de las Flavobacteriia como *Polaribacter*, *Formosa* y *Flavobacterium*, representaron 35,9% de los transcritos totales del gen PR durante el día, mientras que el 23,9% del total de transcritos del gen PR se asignaron al género *Ca. Pelagibacter* (**Figura 2**). Sin embargo, en la noche los transcritos del gen PR provenientes de las Flavobacteriia representaron sólo el 8% mientras que *Ca. Pelagibacter* representó el 63% del total de lecturas identificadas como transcritos del gen PR en los metatranscriptomas de febrero. En marzo, los transcritos del gen PR de Flavobacteriia siguieron siendo más altas durante el día (22,5%) que durante la noche (16,2%), mientras que la abundancia relativa de las lecturas de transcritos del gen PR del género *Ca. Pelagibacter* representaron niveles similares durante el día (39,7%) y la noche (38,8%) (**Figura 2**). Las lecturas identificadas como transcritos del gen PR de miembros de Flavobacteriia como *Formosa* y *Polaribacter* fueron los géneros más abundantes en todos los períodos de muestreo; aunque también se detectaran transcritos asignados taxonómicamente a *Flavobacterium* y *Maribacter*. Entre los miembros de las Alfabroteobacteria, se identificaron en los metatranscriptomas de día y de noche transcritos del gen PR asociados con el representante del clado SAR116: *Candidatus Puniceispirillum*, así como con *unclassified Rhodobacterales*, los cuales estuvieron presentes en ambos meses de muestreo. Además, se identificaron transcritos de miembros del clado SAR92 y del género *Vibrio*. La abundancia relativa del clado SAR92 representó en promedio el 5,3% del total de transcritos del gen PR, pero en el metatranscriptoma de la noche de marzo contribuyeron con tres veces más lecturas

(15,3%) respecto del total de transcritos del gen PR. La abundancia relativa de los transcritos del gen PR del género *Vibrio* mostraron un patrón similar al observado para *Flavobacteriia*, con un ligero aumento en su abundancia relativa durante el día respecto a la noche, oscilando entre el 4,9% (día) y 3,7% (noche) en febrero, y 5,5% (día) y 1,3% (noche) en marzo (**Figura 2**).

Además, a lo largo de todo el período de muestreo se identificaron transcritos del gen PR pertenecientes a géneros (ej. *Aquimarina*, *Dokdonia*, *Marivirga*, *Nonlabens*, *Psychroflexus*, *Sediminicola* y *Glaciacola*) que representaron cada uno menos del 1% del total de los transcritos del gen PR en los metatranscriptomas de Bahía Chile. Además, en promedio el 12% de las lecturas identificadas como transcritos del gen PR no se pudieron asignar taxonómicamente, y se anotaron como desconocidas.

6.1.4 Diversidad y abundancia de tipos de dominios funcionales de secuencias del gen PR en aguas costeras de Bahía Chile durante el periodo estival de 2014.

En este trabajo de tesis se presenta el primer análisis realizado sobre los aminoácidos involucrados en el bombeo de protones, y el aminoácido que define la longitud de onda (aminoácido λ) a la cual PR absorbe luz, en secuencias de la proteína PR obtenida desde aguas costeras en Antártica.

El análisis de las proteínas predichas de los genes PR, reveló que todas las secuencias incluían el dominio involucrado en el bombeo de protones. Los aminoácidos de las posiciones 97, 101 y 108 que conforman este dominio, correspondían a

aminoácidos que confieren a la PR la capacidad funcional de transportar protones a través de la membrana. Las secuencias de proteínas predichas del gen PR presentaban en su mayoría: ácido aspártico, treonina y ácido glutámico en las posiciones 97, 101 y 108, a excepción de una secuencia que presentaba una lisina en la posición 108 (presente en la secuencia predicha de PR de *Exiguobacterium*) (**Figura S2**).

En las proteínas predichas de los genes PR del catálogo de genes de Bahía Chile, también se identificó el aminoácido λ en la posición 105: glutamina, leucina o metionina. Las secuencias del gen PR que codifica para la proteína predicha PR-verde, se asignaron taxonómicamente a los filos Bacteroidetes, Proteobacteria y Firmicutes. De manera exclusiva, las secuencias del gen PR que codificaban para PR que absorbe en el espectro de longitud de onda del verde (PR-verde), que presentaban una metionina en la posición 105, se asignaron taxonómicamente a miembros de la clase Flavobacteriia (*Polaribacter*, *Formosa*, *Flavobacterium* y *Psychroflexus*), mientras que aquellas PR-verde que presentaban una leucina en la posición 105, pertenecían a secuencias de proteínas predichas del gen PR que fueron asignados a la clase Bacilli (*Exiguobacterium*), Alfacaproteobacteria (clado SAR116 y *Ca. Pelagibacter* (L105)) y Gammaproteobacteria (clado SAR92, *Vibrio*). Por otro lado, aquellas que correspondían a PR predichas con glutamina en la posición 105, y que por tanto deberían absorber en el espectro de longitud de onda del azul (PR-azul), pertenecían exclusivamente a secuencias de proteínas predichas del gen PR de *Ca. Pelagibacter* (Q105) (Alfacaproteobacteria), y a secuencias que no se lograron asignar taxonómicamente (desconocidas).

En el metagenoma de febrero, el 90% de las lecturas identificadas como gen PR, mapearon a secuencias del gen PR-verde mientras que sólo un 10% del total de lecturas mapeadas al gen PR-azul). En el metagenoma de marzo, el 86% de las lecturas mapeadas a secuencias del gen PR eran PR-verde, mientras que el 14% de las lecturas identificadas como del gen PR corresponden a PR-azul (**Figura 2**).

Se analizó la abundancia relativa de las lecturas identificadas como transcritos de las variantes verdes y azul del gen PR en ambos períodos de muestreo, para determinar si tanto la variante verde como la azul son transcritas en los escenarios de bajos y altos niveles de Chla, así como también en el día y la noche. En los metatranscriptomas de febrero, cuando los niveles de Chla eran bajos, alrededor de 0,3 mg m⁻³, durante el día el 76% de las lecturas identificadas como transcritos del gen PR correspondían a PR-verde, mientras que el 24% de las lecturas correspondían a PR-azul (**Figura 2**). Sin embargo, durante la noche las lecturas correspondientes a los transcritos del gen PR-azul y PR-verde alcanzaron ambos un 50% del total para estas dos variantes. En los metatranscriptomas de marzo, cuando los niveles de Chla fueron más altos, alrededor de 2,5 mg m⁻³, la proporción de lecturas identificadas como transcritos del gen PR-verde representaron una abundancia relativa del 65%, mientras que las lecturas de PR-azul representaron un 35%, aumentando con respecto al periodo de menor Chla. Estas proporciones (65/35) de marzo fueron observadas tanto en el metatranscriptoma de día como en el de noche (**Figura 2**).

6.2 Efecto de la salinidad y disponibilidad de luz sobre la abundancia de bacterias portadoras del gen PR en aguas costeras de Bahía Chile.

6.2.1 Efecto de la salinidad sobre la abundancia de bacterias portadoras del gen PR en aguas costeras de Bahía Chile

Para evaluar el efecto de la salinidad sobre la abundancia de las bacterias marinas antárticas portadoras del gen PR, se cuantificó mediante qPCR la abundancia de los genes PR en muestras de DNA de agua de mar con diferente salinidad en Bahía Chile en 2016 y 2017: P3 (34.4 PSU) y P1 (33.4 PSU). El reporte de la abundancia relativa del gen PR en los veranos 2016-2017 (junto al realizado por metagenómica para el año 2014) en esta tesis representan la primera estimación de abundancia del gen PR en la comunidad bacteriana de aguas costeras en Antártica.

Nuestros resultados muestran que el gen PR del clado SAR11 fue el más abundante de los tres genes PR específicos para SAR11, SAR92 y Flavobacteriia cuantificados, con abundancias relativas que variaron entre el 2,5 – 22,3% en 2016, sin encontrarse diferencias significativas entre puntos con diferente salinidad (**Figura 3**). Durante 2017, la abundancia relativa del gen PR de SAR11 fue del 12,2 al 59,7%, sin diferencias significativas entre puntos de muestreo (**Figura 3 y Tabla S3**). Por otro lado, el gen PR de SAR92 fue el segundo más abundante, con valores promedio entre 1,2% y 1,7% en 2016 y 2017, sin diferencias significativas entre puntos con diferente salinidad (**Figura 3 y Tabla S3**). Por último, el gen PR de Flavobacteriia fue el menos abundante, con valores bajo el límite de detección (máximos de 0,17% y 0,2% en 2016 y 2017, respectivamente), sin diferencias significativas entre sitios o periodos de muestreo (**Figura 3 y Tabla S3**).

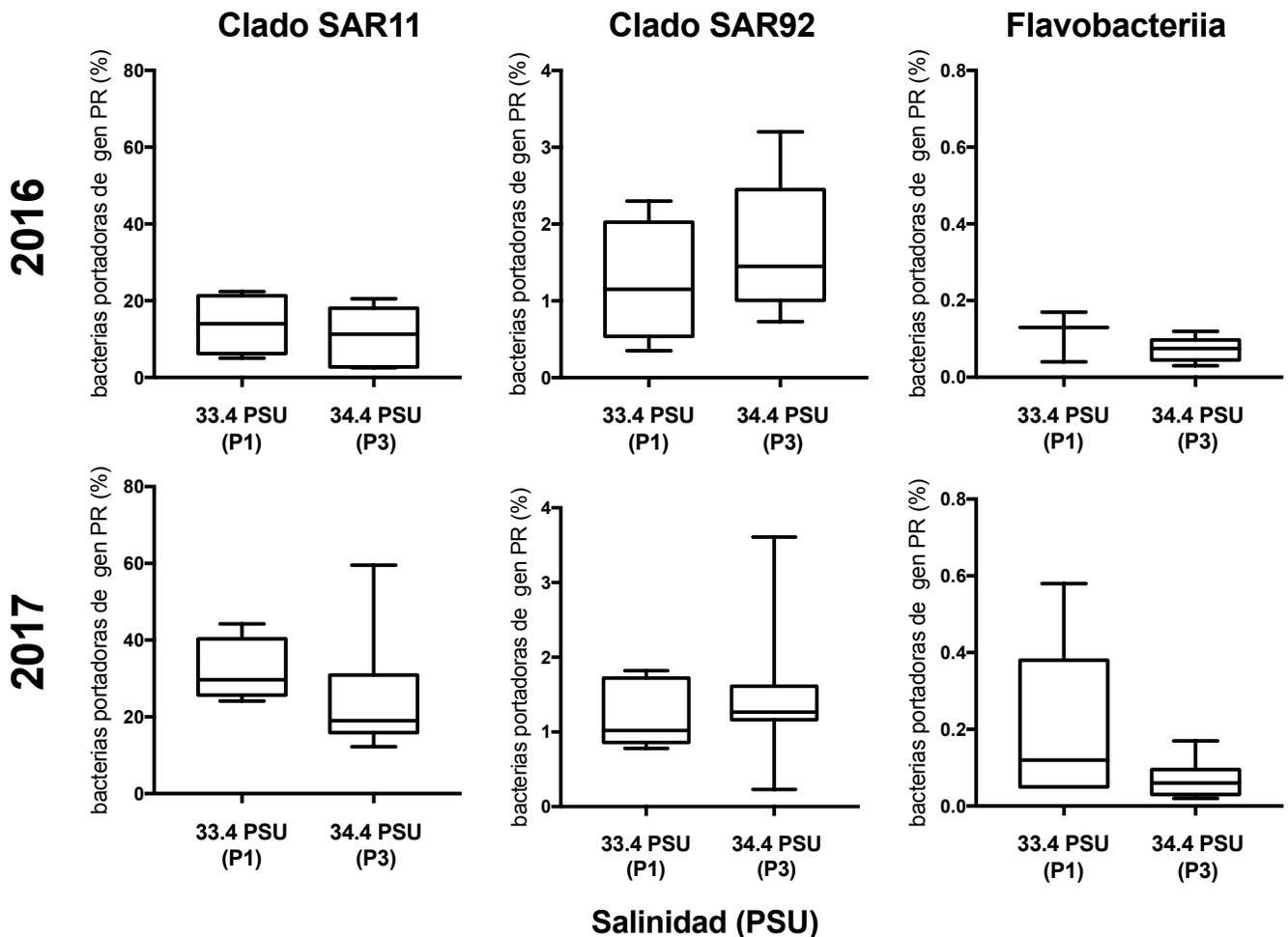


Figura 3.- Abundancia relativa de bacterias portadoras del gen PR en muestras de diferente salinidad en Bahía Chile para los periodos estivales de 2016 y 2017. Se graficó la abundancia relativa de cada taxón que porta el gen PR en las muestras obtenidas desde los sitios de muestreo 33.4 PSU (P1) y 34.4 PSU (P3). De izquierda a derecha se graficó la abundancia relativa del gen PR afiliado al clado SAR11 (triángulos), clado SAR92 (cuadrados) y Flavobacteriia (círculos). Para el año 2016, el número de muestras fue de 10 (4 de P1, más 6 de P3), mientras que para 2017 fue de 19 (5 de P1, más 14 de P3). No se observaron diferencias significativas entre las abundancias de cada gen PR entre los dos puntos de diferente salinidad (t-test, $p > 0,05$)

Si bien la abundancia del gen PR afiliado al clado SAR11 fue significativamente mayor (t-test, $p < 0,05$) durante el periodo estival de 2017 en ambos sitios de muestreo, no se observaron diferencias en la abundancia relativa del gen PR de los tres taxones entre los sitios P1 y P3, para ninguno de los dos años (**Figura 3**). Al calcular y comparar la abundancia relativa total del gen PR (suma de la abundancia relativa de los tres taxones portadoras del gen PR), entre sitios con diferente salinidad y periodos de muestreo, tampoco se encontraron diferencias significativas en aguas costeras de Bahía Chile (**Tabla S3**).

6.2.2 Efecto de la disponibilidad de luz sobre la abundancia de bacterias portadoras del gen PR en aguas costeras de Bahía Chile

Para determinar si la disponibilidad de luz modula la abundancia de las bacterias portadoras del gen PR, se cuantificó la abundancia de este gen en muestras de agua superficial (2-3 m) obtenidas durante el día o la noche, en los periodos estivales de 2016 y 2017, y también en aguas profundas (30 m) durante 2017. Al realizar la cuantificación y comparación de las muestras con diferente disponibilidad lumínica (día/noche), no se observó una diferencia en la abundancia relativa de ninguno de los tres taxones portadores del gen PR en Bahía Chile (**Figura 4**). Estas abundancias relativas presentaron valores promedio de 13,3% y 14,7% en muestras obtenidas de día y noche en el periodo estival 2016, mientras que en 2017 fueron del 27,7% y 29,2%, respectivamente. En ambos periodos estivales no hubo diferencias significativas en la abundancia relativa de cada taxón (**Figura 4**) o en el total (**Tabla S3**) entre el día y la noche.

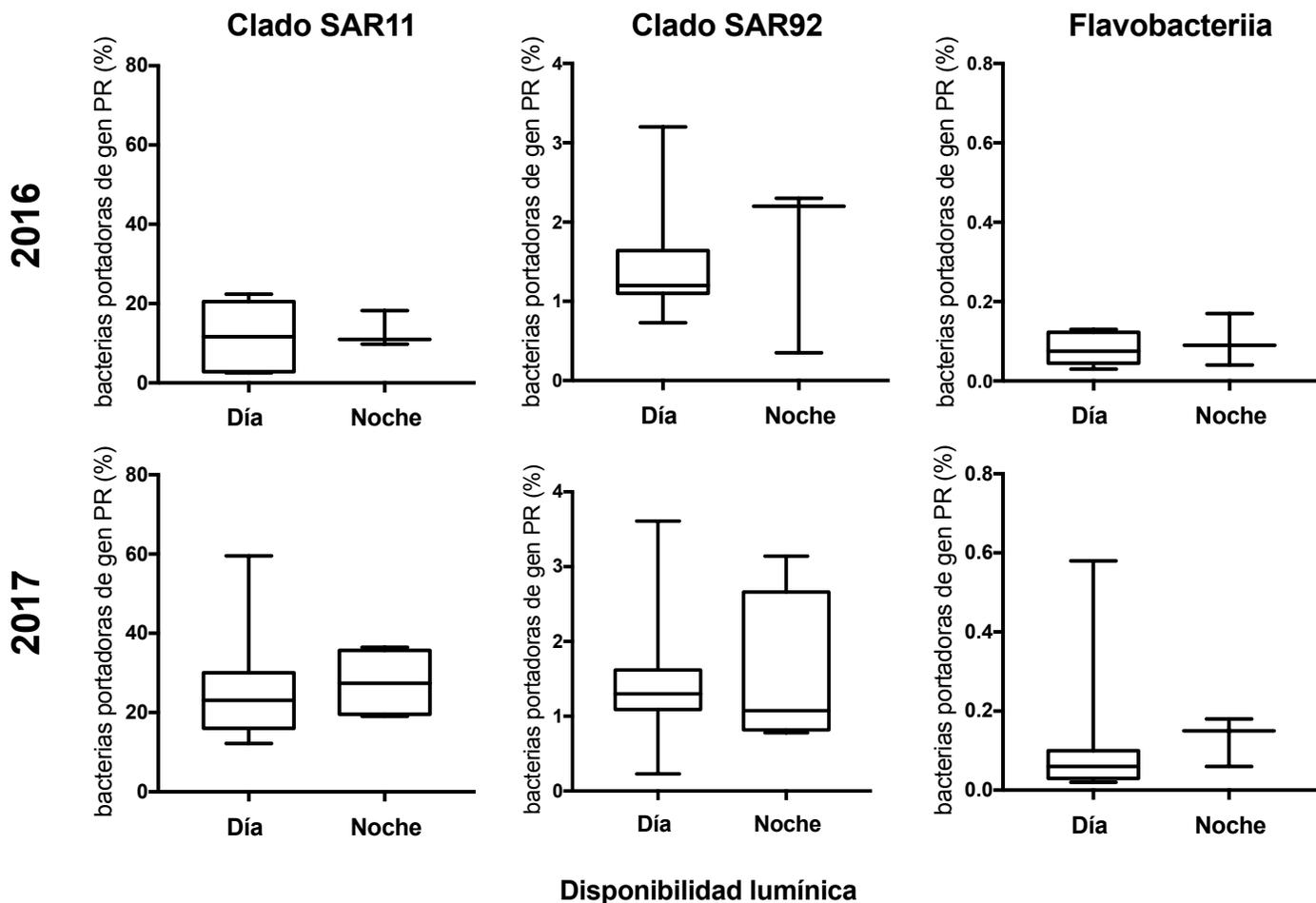


Figura 4.- Abundancia relativa de bacterias portadoras del gen PR en la comunidad de bacterias de Bahía Chile, en muestras obtenidas durante el día o la noche durante los periodos estivales de 2016 y 2017. Se graficó la abundancia relativa de cada taxón que porta el gen PR, en las muestras obtenidas durante el día y la noche. De izquierda a derecha se graficó la abundancia relativa del gen PR afiliado al clado SAR11 (triángulos), clado SAR92 (cuadrados) y Flavobacteriia (círculos). Para el año 2016, el número de muestras fue de 10 (7 de día, más 3 de noche), mientras que para 2017 fue de 19 (15 de día, más 4 de noche). No se observaron diferencias significativas entre las abundancias de cada gen PR entre las muestras obtenidas durante el día o la noche (t-test, $p > 0,05$)

En aguas costeras de Bahía Chile la disponibilidad lumínica también puede verse afectada por la profundidad de la columna de agua, disminuyendo la disponibilidad de luz a medida que aumenta la profundidad de la columna de agua. Este parámetro solo pudo evaluarse en el periodo estival de 2017, ya que durante 2016 sólo se cuenta con muestras de agua superficial. Para comparar el efecto de la atenuación de la luz en función del aumento en la profundidad de la columna de agua entre aguas superficiales (2-3 m) y profundas (30 m), sólo se consideraron muestras obtenidas durante el día. Al comparar la abundancia relativa del gen PR de los tres taxones SAR11, SAR92 y Flavobacteriia, en las muestras de agua de mar superficiales (PAR) y profundas (oscuridad), no se observaron diferencias (**Figura 5 y Tabla S3**).

6.2.3 Evaluación del efecto de otras variables ambientales sobre la abundancia del gen PR en bacterias de aguas costeras de Bahía Chile.

Al no observarse diferencias entre las abundancias relativas del gen PR explicadas por las variables salinidad y disponibilidad de luz en las muestras de 2016 y 2017, se realizó un *test* de correlación de Pearson para evaluar si existe relación entre otras variables ambientales (temperatura, oxígeno, nitrito, pH, fosfato, o Chla) y la abundancia del gen PR cuantificada mediante qPCR en las muestras de aguas costeras de Bahía Chile. Dentro de las correlaciones significativas ($p < 0,05$), se encontró que los niveles de Chla ($r = -0,4$; $p < 0,05$) y nitrito ($r = -0,71$; $p < 0,005$) se correlacionaron negativamente con la abundancia relativa de bacterias del clado SAR11 portadoras del gen PR, mientras que el pH ($r = 0,68$; $p < 0,05$), la temperatura ($r = 0,58$; $p < 0,05$) y los niveles de amonio en el agua ($r = 0,54$; $p < 0,05$) se correlacionaron positivamente con

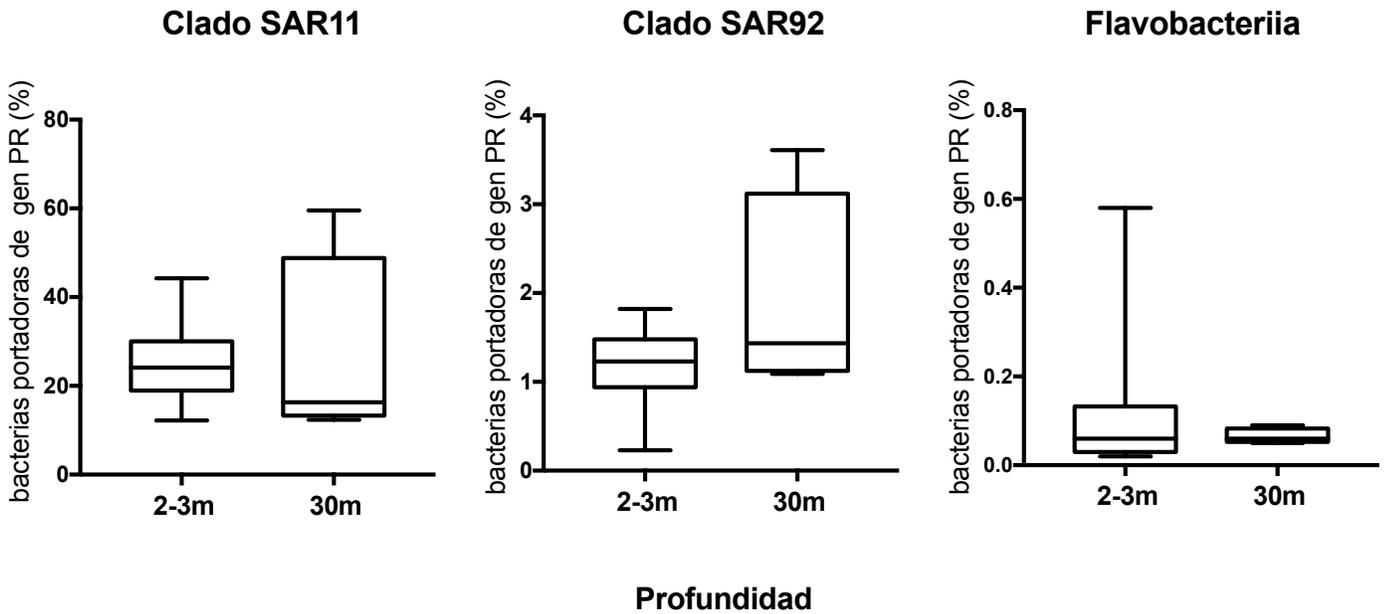


Figura 5.- Abundancia relativa de bacterias portadoras del gen PR en Bahía Chile, en muestras obtenidas en aguas superficiales (2-3m) y profundas (30m) durante el periodo estival 2017. Se graficó la abundancia relativa de cada taxón que porta el gen PR, en muestras de aguas superficiales y profundas. De izquierda a derecha, se graficó la abundancia relativa del gen PR afiliado al clado SAR11, clado SAR92 y Flavobacteriia. Se consideraron sólo las 15 (11 de 5 m, más 4 de 30 m) muestras obtenidas durante el día para este periodo. No se observaron diferencias significativas (t-test, $p > 0.05$) entre aguas superficiales o profundas.

la abundancia del gen PR del clado SAR11. La abundancia relativa del gen PR perteneciente a la clase Flavobacteriia presentó una correlación positiva con los niveles de amonio ($r = 0,5$; $p < 0,05$), mientras que el clado SAR92 presentó una correlación positiva con los niveles de fosfato ($r = 0,62$; $p < 0,05$). Las otras variables ambientales como salinidad, profundidad, nitrato, o silicato no presentaron correlaciones significativas ($p > 0,05$) con la abundancia relativa de ninguno de los tres taxones portadores del gen PR. Al comparar los años 2016 y 2017, la abundancia relativa de bacterias del clado SAR11 portadoras del gen PR fue significativamente mayor en 2017 que en 2016 (t-test, $p < 0,05$), lo cual podría correlacionarse con los niveles de Chla de cada uno de los periodos estivales, ya que durante el 2017 los niveles de Chla fueron significativamente menores que durante el 2016, para ambos puntos (P1 y P3) de muestreo (t-test, $p < 0,05$) (Figura 6).

6.3 Efecto de los cambios en la salinidad y disponibilidad lumínica sobre la actividad transcripcional del gen PR en bacterias de aguas costeras de Bahía Chile

6.3.1 Efecto de la disponibilidad de luz sobre la actividad transcripcional del gen PR en bacterias de aguas costeras de Bahía Chile

Utilizando los datos de la secuenciación de ARN (metatranscriptomas) de las muestras de agua superficial de febrero y marzo 2014, se evaluaron los niveles de transcrito del gen PR en diferentes escenarios de disponibilidad lumínica en muestras de día y de noche. La abundancia de las lecturas identificadas como transcritos del gen

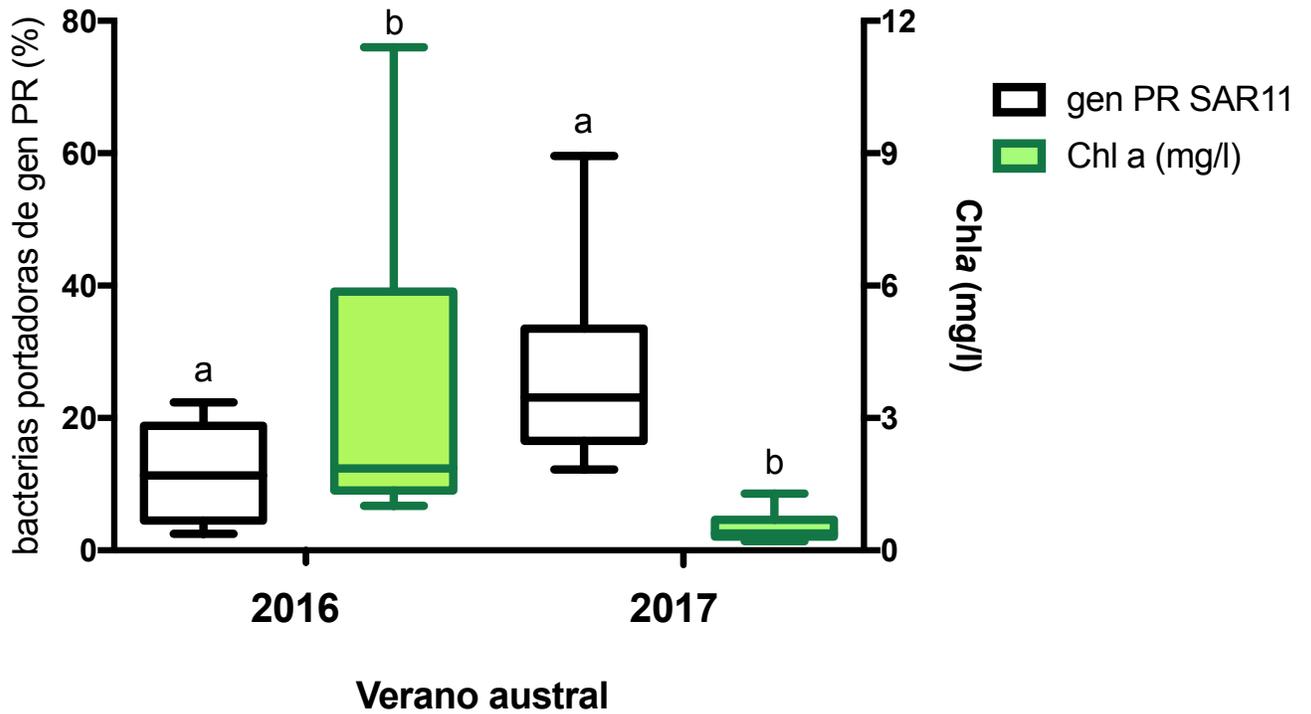


Figura 6.- Abundancia relativa de bacterias del clado SAR11 portadoras del gen PR en la comunidad de bacterias de Bahía Chile frente a dos escenarios con niveles diferentes de Chl a durante los periodos estivales de 2016 y 2017. A la izquierda se graficó la abundancia relativa del gen PR del clado SAR11, y a la derecha los niveles de Chl a correlativos a los dos años de muestreo. Al compararlos se observaron diferencias significativas en la abundancia relativa (a: t-test, $p < 0,05$), así como también en los niveles de Chl a de ambos periodos (b: t-test, $p < 0,05$).

PR en los cuatro metatranscriptomas, se normalizaron por la abundancia de las lecturas indentificadas como transcritos de los genes HK de los mismos metatranscriptomas. La presencia de transcritos del gen PR y de los genes *rplB*, *rpoB*, y EF-Tu, fue detectada en periodos bajos y altos de Chla, tanto de día como de noche. Los valores obtenidos de actividad transcripcional del gen PR obtenidos en esta tesis, constituyen la primera estimación realizada para los niveles de actividad transcripcional del gen PR en el sistema marino antártico, donde además se presenta un escenario único de variabilidad bajo niveles diferentes de Chla, y bajo diferentes condiciones de disponibilidad de luz.

La normalización de las lecturas identificadas como transcritos del gen PR por las de los genes HK, indica que al menos los transcritos del gen PR son igual de abundantes que los transcritos del gen HK EF-Tu (razón de lecturas PR/EF-Tu). En el caso de los genes HK *rplB* y *rpoB*, el número de lecturas identificadas como transcritos del gen PR fueron siempre valores superiores a 1, indicando que la actividad transcripcional de este gen es siempre mayor que la de estos otros genes HK. En febrero, los transcritos normalizados del gen PR fueron en promedio 2 veces más altos durante el día que durante la noche (**Figura 7**). En el metatranscriptoma de febrero de día, se asumió un valor arbitrario de actividad transcripcional de 1 unidad arbitraria (U.A.) para las tres razones PR/HK. En base a esto, se obtuvo que en promedio, la actividad transcripcional del gen PR era de 0,49 U.A. para febrero en la noche. De la misma manera que en febrero, durante marzo se obtuvo que la actividad transcripcional del gen PR era de 0,79 U.A. durante el día y 0,41 U.A. durante la noche (**Figura 7**). A modo de ejemplo, al calcular cada una de las razones PR/HK, los transcritos del gen PR fueron 5,8 veces el número de lecturas del gen *rpoB* durante el día, mientras que durante la

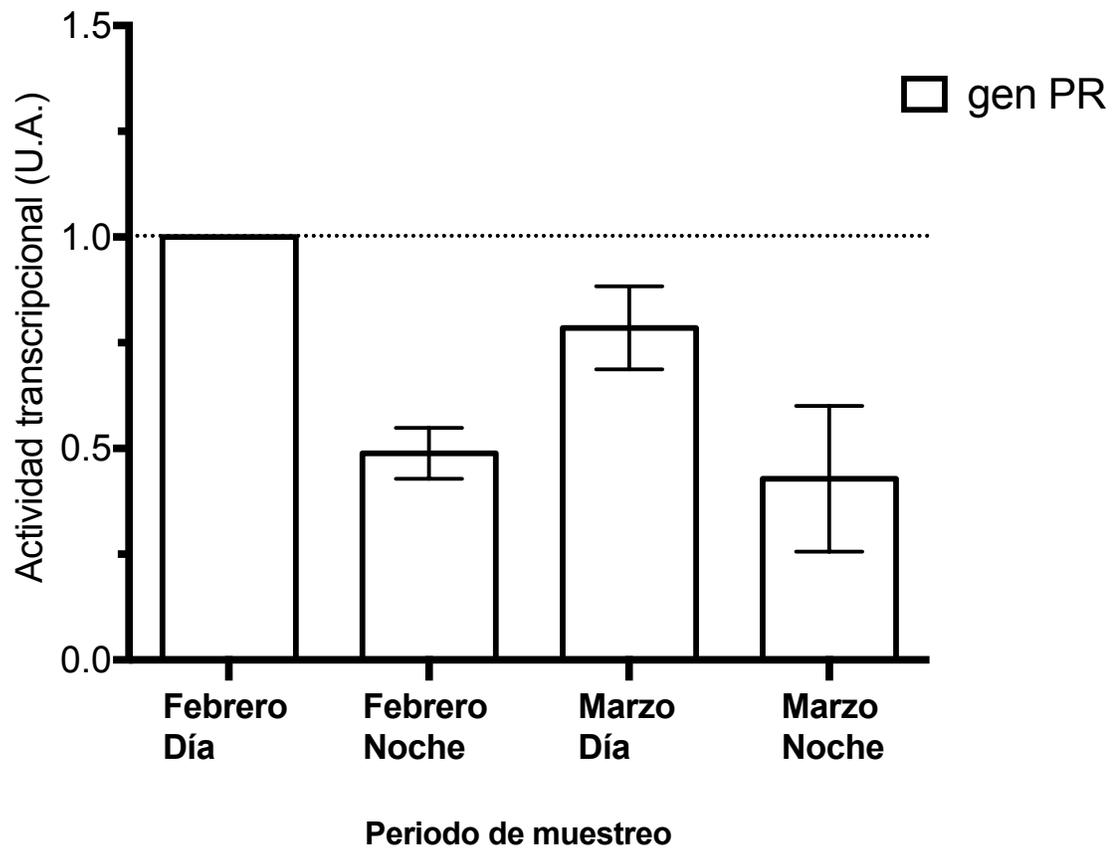
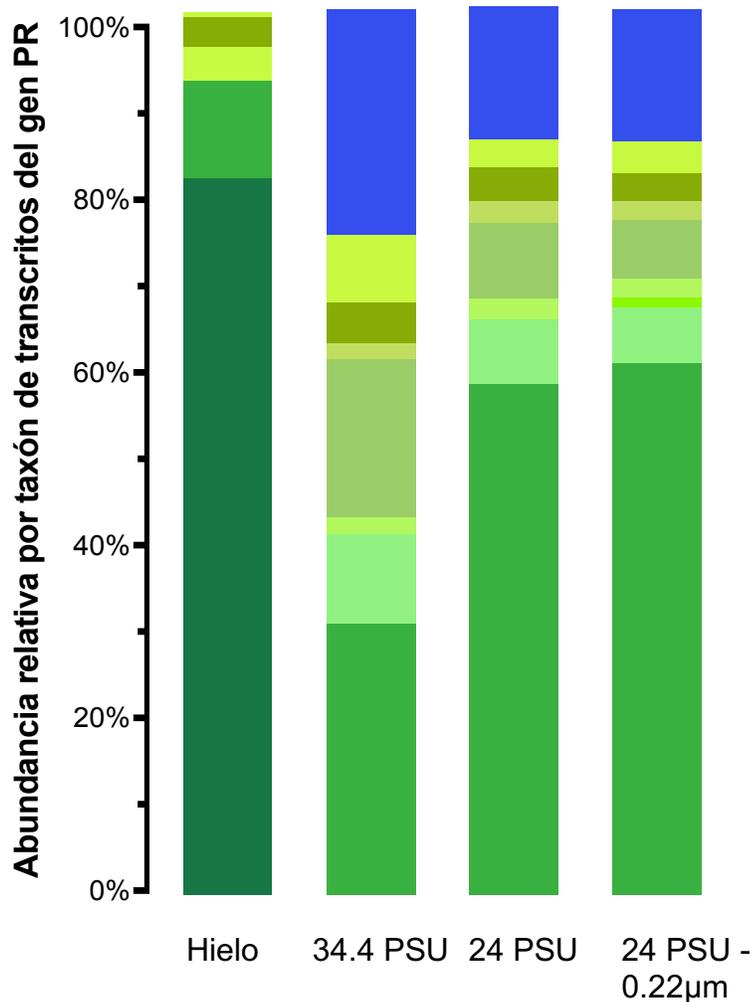


Figura 7.- Niveles normalizados de la actividad transcripcional del gen PR frente a escenarios con diferente disponibilidad de luz en 2014. La actividad transcripcional se expresa en unidades arbitrarias (U.A.) como un promedio de la razón entre el número de lecturas identificadas como transcritos del gen PR y el número de lecturas identificadas como transcritos de los genes de copia única y actividad transcripcional constitutiva (genes HK) (**Ecuación 1**). Para realizar el cálculo de la razón PR/HK, se utilizaron tres genes HK (*rpoB*, *rplB* y EF-Tu). La actividad transcripcional del gen PR se evaluó en los metatranscriptomas de día y noche, obtenidos para febrero y marzo. Se asumió un valor arbitrario de 1 para las razones PR/HK obtenidas en el metatranscriptoma de febrero en el día.

noche fueron 2,5 veces más abundantes. En marzo, los transcritos del gen PR fueron 2,7 veces el número de lecturas del gen *rplB* durante el día y 1,5 veces durante la noche. De manera similar a febrero, durante marzo los transcritos normalizados del gen PR fueron en promedio 1,7 veces más abundantes en el metatranscriptoma de día que en el de noche, independiente del hecho que durante marzo los niveles de Chla aumentaron hasta $2,5 \text{ mg m}^{-3}$ (**Figura S3**).

6.3.2 Efecto de los cambios en la salinidad sobre la actividad transcripcional del gen PR en bacterias de aguas costeras de Bahía Chile

Para determinar el efecto de cambios en la salinidad del agua sobre la actividad transcripcional del gen PR en Bahía Chile, se llevaron a cabo experimentos de microcosmos de disminución de salinidad en el periodo estival de 2016. Desde los metatranscriptomas obtenidos de los experimentos de microcosmos del 2016, se reclutaron las lecturas correspondientes a los transcritos del gen PR, así como también las lecturas correspondientes a los transcritos de los genes HK. En el hielo, la transcripción del gen PR fue atribuida principalmente al género *Flavobacterium*, aunque también se encontraron transcritos del gen PR afiliados a *Polaribacter* y *Psychroflexus* (**Figura 8**). Además, se identificaron exclusivamente transcritos del gen PR-verde (**Figura 8**). En estos microcosmos de agua de mar, agua de mar con agua dulce, y agua de mar con agua dulce filtrada del 2016, al igual que en los metatranscriptomas del 2014, la transcripción del gen PR en la clase Flavobacteriia fue asociada a *Polaribacter*, mientras que en Proteobacteria se asoció a *Ca. Pelagibacter*, *Ca. Puniceispirillum*, clado SAR92 y *Vibrio* (**Figura 8**).



Taxa

- *Flavobacterium*
- *Polaribacter*
- *Psychroflexus*
- *Candidatus Pelagibacter (L105)*

Microcosmos

- *Candidatus Puniceispirillum (SAR116)*
- *unclassified Rhodobacterales*
- SAR92
- *Vibrio*
- <1%
- Unknown
- *Candidatus Pelagibacter (Q105)*

Figura 8.- Afiliación taxonómica y color de la PR para lecturas identificadas como transcritos del gen PR en los microcosmos de disminución de salinidad.

Gráfico de barras apiladas que representa la abundancia relativa de los transcritos de genes PR en los metatranscriptomas de los microcosmos de disminución de salinidad. De izquierda a derecha se grafica: hielo, 34.4 PSU (agua de mar), 24.4 PSU (agua de mar más agua dulce de hielo) y 24.4 PSU – filtrado por 0.22 µm (agua de mar más agua dulce filtrada por 0.22 µm). Las lecturas identificadas como transcritos del gen PR en los metatranscriptomas fueron obtenidas mapeando contra una base de datos de genes PR. Se identificó en cada taxa si el gen presentaba Leucina, Metionina o Glutamina en la posición 105 de la proteína PR predicha. Aquellas taxas que presentan Leu/Met son designadas como PR-verde, mientras que taxas azules que presentan Glu son designadas como PR-azul. Los genes utilizados para identificar las lecturas corresponden a una base de datos que considera los genes PR de los metagenomas de Bahía Chile, más genes PR obtenidos de la base de datos MicRhoDE (Boeuf *et al.*, 2015). Los genes utilizados como base de datos fueron asignados taxonómicamente mediante análisis de homología de secuencias (BLASTn) contra la base de datos del NCBI: RefSeq de marzo de 2018.

De la misma forma que durante 2014, se identificaron transcritos del gen PR provenientes de *Ca. Pelagibacter* en sus dos variantes L105 y Q105, observándose mayoritariamente transcritos del gen PR-azul de *Ca. Pelagibacter* en los tres experimentos de microcosmos. Además, *Ca. Pelagibacter* fue el único taxón que transcribía activamente la variante azul de PR en estos experimentos de disminución de salinidad en 2016.

Para determinar cómo se ve afectada la actividad transcripcional del gen PR frente a escenarios con diferente salinidad, se normalizó la abundancia de las lecturas identificadas como transcritos del gen PR por la abundancia de las lecturas identificadas como transcritos de los genes HK. Tras la normalización, se observa un aumento en los niveles de transcrito del gen PR en los experimentos con disminución de salinidad mediante mezcla con agua dulce, respecto a los niveles de transcrito de este gen en el microcosmo de agua de mar (**Figura 9**). Además, se observa que en el microcosmos donde fue removida la fracción microbiana mayor a 0,22 μm del agua dulce, la actividad transcripcional del gen PR fue mayor que en la del microcosmo con agua de mar más agua dulce sin filtrar, el cual conservó la comunidad de microorganismos del hielo glaciar desde el cual se obtuvo el agua dulce en Bahía Chile (**Figura 9**). A pesar de lo anterior, el efecto de la disminución de la salinidad sobre la actividad transcripcional del gen PR no pudo ser confirmado a través de estos experimentos de microcosmos. Esto fue debido a que tras los 7 días de experimento, los niveles de Chla en el agua se elevaron de ~1 mg/L a ~20 mg/L en todos los microcosmos incluido el control (solo agua de mar). Si bien esto permite comparar la situación observada entre los experimentos de agua de

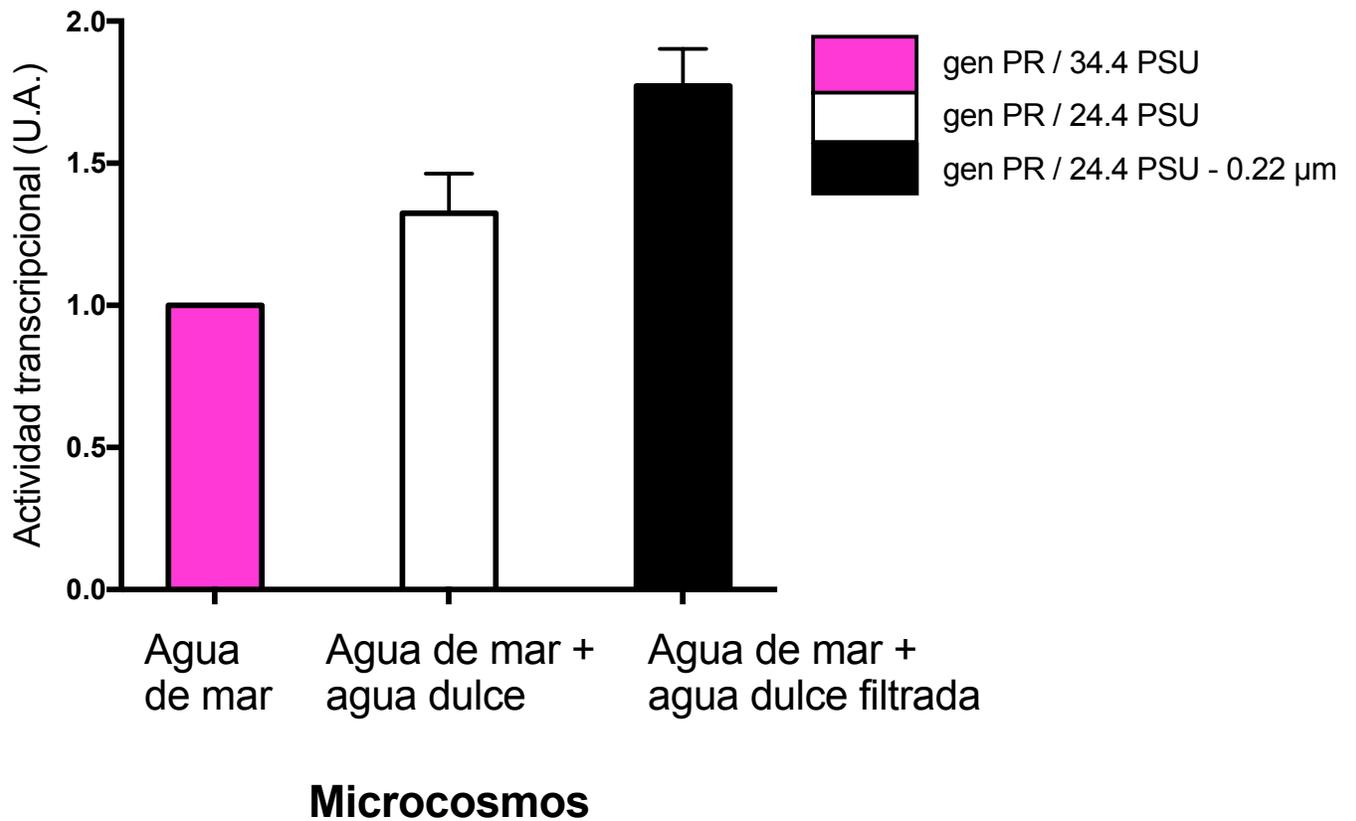


Figura 9.- Niveles normalizados de actividad transcripcional del gen PR frente a la disminución de salinidad. La actividad transcripcional se expresa en unidades arbitrarias (U.A.) como un promedio entre las razones del número de lecturas identificadas como transcritos del gen PR y el número de lecturas identificadas como transcritos de los genes de copia única y actividad transcripcional constitutiva (gen HK) (**Ecuación 1**). Para realizar el cálculo de la razón PR/HK, se utilizaron tres genes HK (*rpoB*, *rplB* y EF-Tu). Se grafica la actividad transcripcional del gen PR en los metatranscriptomas de disminución de salinidad. Se asumió un valor arbitrario de 1 para las razones PR/HK obtenidas en el metatranscriptoma de agua de mar (34.4 PSU).

mar con los de disminución de salinidad, que poseen valores similares de Chla, el escenario de aumento de los niveles de Chla podría enmascarar el verdadero efecto de la salinidad sobre la actividad transcripcional del gen PR.

6.4 Evaluación de la actividad transcripcional de los genes de biosíntesis de retinal en bacterias de aguas costeras de Bahía Chile

La transcripción del gen PR en bacterias marinas de aguas superficiales de Bahía Chile indica que hubo transcripción de este gen. Sin embargo, PR necesita retinal para absorber la luz, y así actuar como una bomba de protones accionada por la luz. Para evaluar si en las aguas superficiales de Bahía Chile podría estar presente el cofactor de PR, y así ser funcional, se evaluó la actividad transcripcional de los genes de las enzimas de la ruta de biosíntesis del retinal en la comunidad de bacterias marinas de Bahía Chile. Los genes codificantes para las enzimas 15,15'- β -caroteno dioxigenasa (*blh*), licopeno ciclasa (*crtY*) y fitoeno sintasa (*crtB*) fueron identificados en el catálogo de genes de Bahía Chile 2014. Luego, se determinó que la actividad transcripcional de los genes de las enzimas de la ruta de biosíntesis del retinal en los metatranscriptomas de febrero y marzo fue menor que la del gen PR en estos mismos meses, ya que el número de lecturas identificadas como transcritos de los genes *blh*, *crtY* y *crtB* fue menor que las lecturas identificadas como transcritos de los genes HK. Durante febrero, los genes *blh*, *crtY* y *crtB* presentaron una mayor actividad transcripcional durante el día que durante la noche (**Figura 10**). Sin embargo, en marzo la actividad transcripcional de los genes de las enzimas de la ruta de biosíntesis del retinal no presentó diferencias entre día y noche (**Figura 10**).

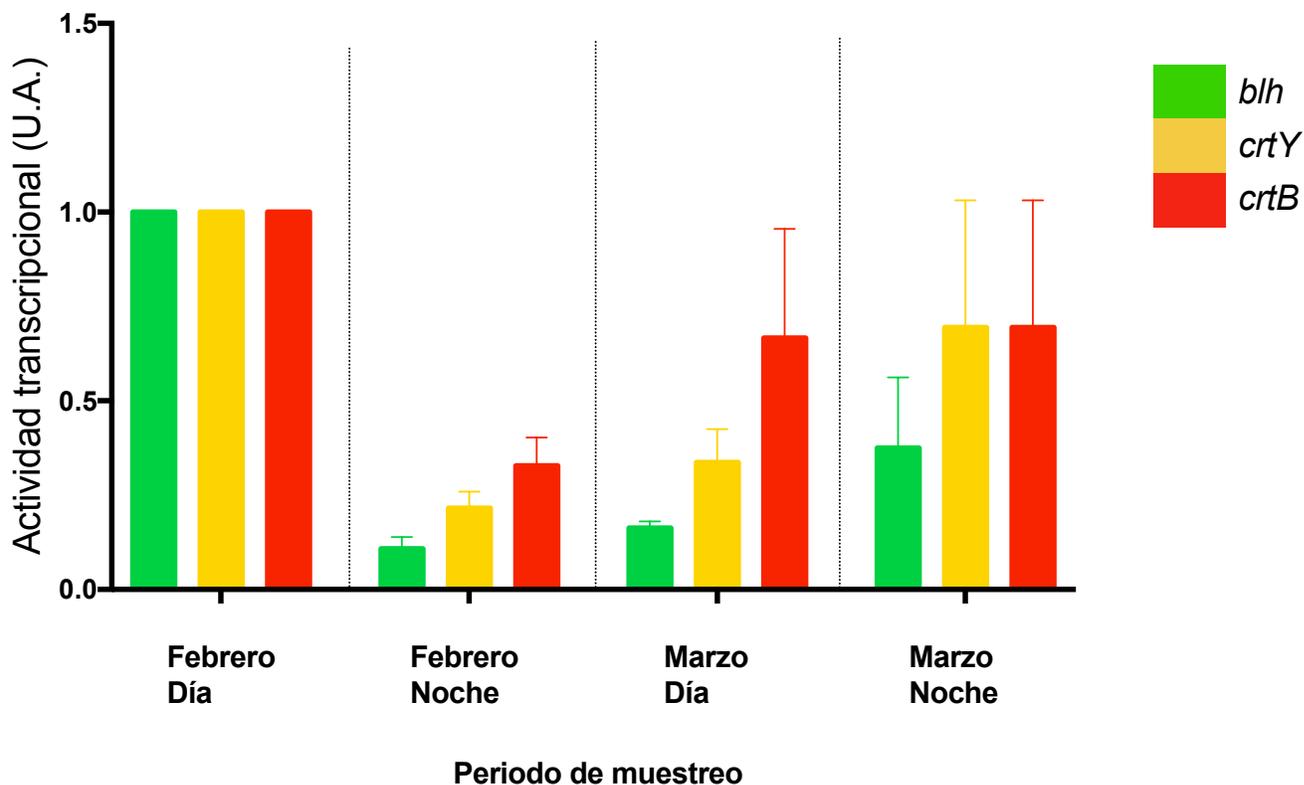


Figura 10.- Niveles normalizados de actividad transcripcional de los genes de las enzimas de la ruta de biosíntesis del retinal en aguas superficiales de Bahía Chile 2014. La actividad transcripcional se expresa en unidades arbitrarias (U.A.) como un promedio entre las razones del número de lecturas identificadas como transcritos del gen *blh*, *crtY* o *crtB* y el número de lecturas identificadas como transcritos de los genes de copia única y actividad transcripcional constitutiva (gen HK) (**Ecuación 1**). Para realizar el cálculo de estas razones se utilizaron tres genes HK (*rpoB*, *rplB* y EF-Tu). La actividad transcripcional de los genes de las enzimas de la ruta de biosíntesis del retinal *blh* (verde), *crtY* (amarillo) y *crtB* (rojo) se evaluó en los metatranscriptomas de día y noche de los meses febrero y marzo. Se asumió un valor arbitrario de 1 para las razones *blh*/HK, *crtY*/HK y *crtB*/HK obtenidas en el metatranscriptoma de febrero de día.

7. Discusión

Considerando el actual escenario del cambio climático, uno de los sistemas naturales y sus comunidades microbianas que más están siendo afectados son los polares, y en particular el sistema marino antártico (Steig *et al.*, 2009; Alcamán-Arias *et al.*, 2018). Por esta razón, es fundamental comprender cómo en este ambiente la disminución de cubierta de hielo marino y/o la formación de gradientes salinos (como consecuencia del calentamiento global) pueden afectar la fototrofia mediada por PR, afectando la diversidad de microorganismos que presentan el gen PR y/o la medida en que utilizan PR como estrategia para obtener energía. En este trabajo de tesis se describe por primera vez en la Península Antártica Occidental, la diversidad y abundancia de bacterias que presentan y transcriben el gen PR, dimensionándose el potencial aporte que puede significar la fototrofia mediada por PR para la biósfera en el sistema marino antártico.

7.1 Diversidad taxonómica de bacterias que portan el gen PR y abundancia relativa de los genes PR-verdes y PR-azules en aguas costeras de Bahía Chile

En varios sistemas marinos (por ejemplo, el Giro del Pacífico Norte, el Mar Báltico, el Mar del Norte, la Bahía de Chesapeake y el Mar de Beaufort en el Océano Ártico) se ha determinado la abundancia relativa de microorganismos que presentan el gen PR, estableciéndose su afiliación taxonómica. Todos estos sistemas marinos, tienen en común que las secuencias del gen PR afiliadas a Alfabroteobacterias son más abundantes que las afiliadas a Gammaproteobacterias y Flavobacteriia (Venter *et al.*,

2004; Sabehi *et al.*, 2005; Rusch *et al.*, 2007; Campbell *et al.*, 2008; Riedel *et al.*, 2010, Brindefalk *et al.*, 2016; Olson *et al.*, 2018; Maresca *et al.*, 2018). Sin embargo, en la Bahía Chile en Antártica nuestro estudio durante el periodo estival 2014 muestra un escenario diferente a lo observado en todos los sistemas marinos mencionados anteriormente. En Bahía Chile, la afiliación taxonómica de las secuencias del gen PR a fines del verano de 2014, estuvo dominada por las Flavobacteriia (*Polaribacter* y *Formosa*) por sobre las Alfabroteobacteria (clado SAR11 y clado SAR116) y Gammaproteobacteria (clado SAR92 y *Vibrio*). Sin embargo, al comparar la taxonomía y la abundancia relativa de las lecturas identificadas como transcritos del gen PR se observa que las Alfabroteobacteria fueron dominantes frente a los Bacteroidetes y Gammaproteobacteria, de manera opuesta a lo observado a nivel del gen en muestras de DNA. Todos los taxones a los cuales se asignaron los transcritos del gen PR ya han sido reportados para otros sistemas marinos polares y subtropicales (Ottesen *et al.*, 2011, 2014; Boeuf *et al.*, 2016; Brindefalk *et al.*, 2016; Maresca *et al.*, 2018), por lo que la transcripción del gen PR es un fenómeno ubicuo y la presencia de los taxones reportados en esta tesis no es exclusiva del sistema marino antártico. Dado que, en los meses de febrero y marzo un porcentaje importante de las secuencias no se lograron asignar taxonómicamente, aún es necesario poner más esfuerzo para en un futuro lograr identificar estas secuencias y así poder dimensionar la taxonomía de organismos que presentan este gen en este sistema marino.

Al comparar la abundancia del gen PR en las muestras colectadas en aguas superficiales estivales en Bahía Chile durante los años 2014, 2016 y 2017, la secuencia del gen PR del clado SAR11 domina en las muestras cuantificadas mediante qPCR para

los años 2016-2017 por sobre la abundancia relativa del gen PR afiliado a Flavobacteriia, que fue como se mencionó anteriormente más abundante en 2014. Esta diferencia entre diferentes periodos estivales se podría deber a que durante el 2014 en Bahía Chile la comunidad de bacterias marinas estuvo dominada por miembros del filo Bacteroidetes por sobre las Proteobacterias (Fuentes *et al.*, 2018), lo que se condice con la mayor abundancia de genes PR afiliados a Bacteroidetes para ese año. Sin embargo, también hay que considerar que esta diferencia se podría explicar por un sesgo en la elección de los partidores para amplificar el gen PR de Flavobacteriia por qPCR. Para confirmar esta posible explicación, se evaluó mediante PCR *in silico* con los softwares “Primer-BLAST/NCBI” (Ye *et al.*, 2012), e “*in silico* PCR amplification” (San Millán *et al.*, 2013), los partidores FlavoF2/R2 (Lami *et al.*, 2009) usados en nuestros experimentos de qPCR, los cuales no amplificaron las secuencias de los genes PR afiliadas a Flavobacteriia identificadas en los metagenomas de 2014 de Bahía Chile. Esto último podría significar que la abundancia relativa de secuencias del gen PR afiliado a Flavobacteriia en antártica fue subestimada, pudiendo existir una mayor diversidad de genes PR para este grupo de bacterias, que no fue cuantificada por qPCR. Así en el futuro otros primers diseñados a partir de las secuencias del 2014 podrían ser usadas para la mejor cuantificación de este filo de bacterias y poder así hacer estimaciones y comparaciones con genes PR de otros filos.

Por otro lado, al analizar en Bahía Chile el dominio de las proteínas PR predichas donde se encuentran los aminoácidos involucrados en el transporte de protones, identificamos dos tríadas de aminoácidos: ácido aspártico-treonina-ácido glutámico (DTE) y ácido aspártico-treonina-lisina (DTK). La tríada DTK se identificó exclusivamente

en la secuencia PR predicha afiliada a *Exiguobacterium*. Esta triada corresponde a la reportada por Gushchin *et al.*, (2013), que fue identificada en el genoma de *Exiguobacterium sibiricum* aislada del permafrost de Siberia, Rusia. El resto de las secuencias del gen PR en Bahía Chile codificaban para una PR que presentaba la triada más conservada en sistemas marinos: DTE (Olson *et al.*, 2018). Todas las secuencias del gen PR identificados en Bahía Chile podrían ser capaces de codificar una PR que es capaz de ser funcional como bomba de protones impulsada por la luz, ya que estas dos triadas se han descrito como capaces de generar una gradiente de protones a través de la membrana (Béjà *et al.*, 2001; Gushchin *et al.*, 2013; Olson *et al.*, 2018).

Adicionalmente, en este mismo dominio se encuentra el aminoácido λ , el cual define si PR absorbe en el espectro de luz verde o azul (Man *et al.*, 2003). En las aguas superficiales costeras, se ha descrito que las PR-verdes son más abundantes que las PR-azules, mientras que en aguas abiertas las PR-azules son más abundantes, aumentando estas últimas con la profundidad de la columna de agua (Fuhrman *et al.*, 2008). Así, en aguas superficiales y hasta 200 m de profundidad, los sistemas marinos de aguas abiertas como el Giro del Pacífico Norte, el Mar de los Sargazos y el Mar Rojo están dominados por bacterias portadoras del gen PR-azul (Sabeji *et al.*, 2007; Filosof y Béjà, 2013; Olson *et al.*, 2018).

Se ha descrito además que la profundidad, junto con la presencia de microorganismos fotosintéticos basados en clorofila, son factores que afectan la abundancia relativa de cada una de las variantes del aminoácido 105 en PR de sistemas marinos (Pinhassi *et al.*, 2016). Por ejemplo, las aguas superficiales del Mar del Norte y

el Mar Mediterráneo están dominadas por bacterias portadoras del gen PR que codifican una PR que presenta L o M en la posición 105, aumentando la presencia de Q en esta posición a medida que aumenta la profundidad (Sabehi *et al.*, 2007; Riedel *et al.*, 2010). La presencia de microorganismos fotosintéticos con clorofila parece favorecer la presencia de bacterias portadoras de PR-verde sobre PR-azul en aguas costeras (Fuhrman *et al.*, 2008; Koh *et al.*, 2010; Pinhassi *et al.*, 2016). Considerando que las muestras de agua de Bahía Chile son de origen superficial y costero, y que además durante el 2014 se observó un aumento en los niveles de Chla en la bahía, nuestros resultados demuestran una correlación con los datos reportados anteriormente en la literatura, con una mayor presencia de secuencias que codifican PR-verdes respecto a PR-azules. Las abundancias relativas del gen PR-verde y PR-azul, así como la abundancia de los transcritos identificados como provenientes de genes PR-verde o PR-azul en estas muestras antárticas, constituyen el primer reporte en la literatura donde se demuestra la transcripción de ambos genes PR en este ambiente marino.

7.2 Comparación de la abundancia relativa de bacterias que portan el gen PR en Bahía Chile con otros ambientes marinos

Mediante qPCR se ha determinado la abundancia relativa de microorganismos portadores del gen PR en sistemas marinos subtropicales como el Mar de los Sargazos (65%) (Rusch *et al.*, 2007), el Mar Mediterráneo (13%) (Sabehi *et al.*, 2005), el Mar del Norte (35%) (Riedel *et al.*, 2010), en aguas abiertas del Océano Atlántico Norte (7-57%) (Campbell *et al.*, 2008), la Bahía de Chesapeake en el Océano Atlántico Norte (74%) (Maresca *et al.*, 2018), y en el Océano Ártico (1-45%) (Boeuf *et al.*, 2016). Durante el

verano ártico, Boeuf *et al.*, (2016) demuestran que las bacterias portadoras del gen PR están presentes en toda la zona fótica de la columna de agua, representando en promedio el 15,4% de la comunidad bacteriana en el mar de Beaufort y Chukchi. Además, Boeuf *et al.*, (2016) reportaron que las secuencias del gen PR afiliadas a Alfaproteobacteria predominaban por sobre las de Flavobacteriia y SAR92, como sucede para el resto de sistemas marinos. En Bahía Chile durante los veranos del 2016 y 2017 se observaron valores promedios de abundancia relativa de bacterias portadoras del gen PR comparables a los reportados en el Ártico por Boeuf *et al.*, (2016). Además, al comparar las abundancias relativas medidas por qPCR de los taxones portadores del gen PR se observó un escenario similar al descrito en el Océano Ártico por Boeuf *et al.*, (2016), donde la abundancia del gen PR afiliado al clado SAR11 fue mayor que la del afiliado a Flavobacteriia y al clado SAR92. Sin embargo, existen limitaciones para lograr determinar la diversidad de secuencias del gen PR por lo que la abundancia de este gen en la comunidad de bacterias podría ser aún mayor en los sistemas marinos. Esto es debido, entre otras cosas, a que aún no se han diseñado partidores universales capaces de amplificar las secuencias del gen PR de los distintos géneros dentro de la clase Flavobacteriia, para poder así determinar la abundancia de este gen en estos sistemas marinos.

7.3 Abundancia y actividad transcripcional del gen PR frente a gradientes salinos

El efecto de la salinidad sobre la abundancia del gen PR en la comunidad de bacterias marinas ha sido evaluado hasta la fecha en dos estudios realizados en los sistemas marinos del Mar Báltico y la Bahía de Chesapeake en el Océano Atlántico

(Brindefalk *et al.*, 2016; Maresca *et al.*, 2018). En estos dos estudios se logró identificar que, a lo largo de gradientes salinos (~0 PSU a ~33 PSU), la abundancia del gen PR se veía afectada a medida que variaba la salinidad. En la Bahía de Chesapeake, Maresca *et al.*, (2018) cuantificaron la abundancia del gen PR (y microorganismos que utilizan rodopsinas) en la fracción <0.8µm utilizando tres técnicas: qPCR, microscopía de fluorescencia de reflexión interna total (TIRF; por sus siglas en inglés) y metagenómica. Mediante qPCR y microscopía TIRF, la abundancia del gen PR y de rodopsinas era mayor a salinidades más altas (31 PSU), mientras que al cuantificar la abundancia relativa del gen PR por metagenómica, ésta era mayor a salinidades intermedias (15 PSU). A diferencia de lo observado en la Bahía de Chesapeake, en el Mar Báltico se determinó a través de metagenómica que la salinidad y la abundancia del gen PR en la fracción <0.8µm se correlacionaban positivamente, aumentando la abundancia de este gen a medida que aumentaba la salinidad (Brindefalk *et al.*, 2016). En nuestro estudio en Bahía Chile, al evaluar si existían diferencias en la abundancia del gen PR en la comunidad de bacterias marinas en los puntos P1 y P3 de dos años consecutivos, que presentan diferente salinidad, no se observó mediante cuantificación por qPCR diferencia en la abundancia relativa de este gen. Esto puede deberse a que las diferencias de salinidad necesaria para que ocurra un cambio en la abundancia relativa del gen PR son mayores a las que presentan los puntos P1 y P3 evaluados en Bahía Chile, la cual es de 33.1 PSU próxima al Glaciar Fuerza Aérea (P1) y de 33.9 PSU en el punto más expuesto a aguas abiertas (P3).

Por otro lado, Maresca *et al.*, (2018) reportaron a través de metatranscriptómica para el gradiente de salinidad que se genera en la Bahía Chesapeake, que este

parámetro ambiental modificaba la actividad transcripcional del gen PR con mayores niveles normalizados de actividad transcripcional a salinidades intermedias (15 PSU). Este antecedente coincide con lo observado en los experimentos de microcosmos con disminución de salinidad realizados en Bahía Chile para el año 2016. En este estudio, los niveles normalizados de actividad transcripcional del gen PR fueron mayores bajo un escenario de menor salinidad (24 PSU) con respecto a la salinidad del agua de mar de la bahía representada en nuestro estudio por agua colectada en el punto P3 (34.4 PSU). Al realizar la comparación entre los experimentos de microcosmos de 2016 y lo reportado por Maresca *et al.*, (2018), es necesario tener en consideración que en nuestro estudio los niveles de Chla aumentaron hasta 20 mg m^{-3} , mientras que los niveles de Chla reportados por Maresca *et al.*, (2018) para los sitios de salinidad media (15 PSU) y alta (31.1 PSU) no superaron los 5 mg m^{-3} . A pesar de estas diferencias, los resultados sugieren que la mayor actividad transcripcional del gen PR frente a escenarios de reducción de salinidad es independiente de las diferencias en los niveles de Chla. Esto podría a su vez sugerir que bajo el actual escenario de calentamiento global, con aumento de deglaciación en antártica, los microorganismos que utilizan PR podrían verse beneficiados por la bajada en salinidad del agua de mar, aumentando su actividad y potencial rol en este sistema marino.

7.4 Efecto de la disponibilidad lumínica sobre la abundancia y actividad transcripcional del gen PR en Bahía Chile

El efecto de la disponibilidad de luz sobre la abundancia de bacterias marinas que portan el gen PR fue evaluado por primera vez en aguas de las costas árticas del Mar de Chukchi y Beaufort durante el verano e invierno del 2008 (Cottrell y Kirchman

2009). Más recientemente, análisis metatranscriptómicos han revelado que la mayoría de los microorganismos que se describen como portadores del gen PR en sistemas marinos transcriben activamente este gen durante periodos de luz y oscuridad (Pinhassi *et al.*, 2016).

En sistemas marinos polares, la transcripción del gen PR ha sido reportada por Nguyen *et al.*, (2015) y Boeuf *et al.*, (2016) en el Ártico y por Koh *et al.*, (2010) y Williams *et al.*, (2012) en la Antártica. Sin embargo, Nguyen *et al.*, (2015) han sido los únicos autores que han reportado para sistemas polares el efecto de la disponibilidad de luz sobre la actividad transcripcional del gen PR. Estos autores cuantificaron los niveles del gen PR en la transición invierno-verano en el Golfo de Amundsen (Océano Ártico) durante periodos de completa oscuridad en el invierno y en periodos de luz a comienzo del verano, sin mayores diferencias en la abundancia de este gen entre ambos periodos (Nguyen *et al.*, 2015). Sin embargo, estos autores reportan que la actividad transcripcional del gen PR decae conforme inicia el invierno Ártico, y ésta disminuye a niveles constantes durante el periodo de oscuridad, para luego aumentar los niveles de transcrito apenas aumenta la radiación PAR sobre las aguas del mar de Chukchi (Nguyen *et al.*, 2015). Más recientemente, Boeuf *et al.*, (2016) determinó que más que la disponibilidad de luz, lo que estaría regulando la abundancia y distribución de las bacterias que portan el gen PR en el ártico sería la condición de escasos nutrientes. En nuestro estudio en Bahía Chile se evaluó la variabilidad en la abundancia relativa del gen PR en la comunidad de bacterias en muestras de aguas obtenidas durante el día y la noche, y muestras obtenidas desde la superficie o profundidad de la columna de agua. Nuestros resultados demuestran que, a pesar de que en ambos casos existe diferencia

en la disponibilidad de luz, no se observaron diferencias en la abundancia relativa del gen PR entre las diferentes muestras en base a DNA. Por tanto, al igual que en el Ártico, las diferencias en las condiciones de disponibilidad de luz presentes en Bahía Chile durante el periodo estival, no parecen modular la abundancia del gen PR en la comunidad bacteriana, mientras que otras variables ambientales como los niveles de Chla y nutrientes podrían tener un efecto mayor en la abundancia relativa de las bacterias portadoras del gen PR. Por otro lado, aún hay que hacer un esfuerzo mayor por determinar en el futuro, de qué manera se ven afectadas las bacterias portadoras del gen PR durante el periodo invernal en Antártica.

Por otra parte, se ha reportado un aumento en la actividad transcripcional del gen PR durante el día (luz) respecto a la noche (oscuridad) en sistemas subtropicales a través de experimentos de microcosmos (Lami *et al.*, 2009) y en metatranscriptomas del Giro del Pacífico Norte (Poretsky *et al.*, 2009; Ottesen *et al.*, 2014). Sin embargo, y contrariamente a estos estudios anteriores con metatranscriptomas de la costa de California, en 2011 se observó que la actividad transcripcional del gen PR fue mayor durante la noche (Ottesen *et al.*, 2011). En las aguas superficiales antárticas de Bahía Chile, al evaluar la actividad transcripcional del gen PR durante el periodo estival del 2014, este presentó niveles mayores durante el día que en la noche al ser normalizada por la actividad transcripcional de los genes de expresión constitutiva de copia única. Este comportamiento fue independiente del gen HK elegido para realizar la normalización e independiente del periodo de muestreo (febrero o marzo). Adicionalmente, se logró identificar la actividad transcripcional de los genes de las enzimas de la ruta de biosíntesis del retinal en aguas superficiales de Bahía Chile

durante el periodo estival de 2014, indicando que los microorganismos que presentan el gen PR también podrían ser capaces de sintetizar el cofactor de PR. Sin embargo, a diferencia de lo observado para el gen PR, la transcripción de estos genes no presentan un comportamiento modulado por la luz. Esta discordancia entre la inducción diurna y nocturna de la transcripción del gen PR se ha observado también en algunos cultivos *in vitro* y en sistemas marinos donde aquellas bacterias portadoras de este gen lo transcriben con mayor actividad durante el día (o bajo iluminación) (Gómez-Consarnau *et al* 2007; Ottesen *et al.*, 2014). Sin embargo, esto es todavía muy controversial, ya que también hay reportes que observan que lo hacen durante la noche (Ottesen *et al.*, 2011) e incluso que la transcripción del gen PR puede ser mayor bajo oscuridad completa (Steindler *et al.*, 2011). De nuevo, al no existir consenso respecto al efecto de la luz sobre la transcripción del gen PR, se ha sugerido que ésta puede deberse a una diferencia en la biodisponibilidad y/o calidad de la fuente de carbono orgánico, u otras variables ambientales en estos sistemas marinos (Palovaara *et al.*, 2014; Brindfolk *et al.*, 2016).

7.5 Correlación de la abundancia de bacterias portadoras del gen PR con otras variables ambientales en Bahía Chile

Se han descrito una serie de parámetros ambientales como moduladores de la abundancia de bacterias portadoras del gen PR (Pinhassi *et al.*, 2016). En ambientes polares, se ha reportado una correlación negativa entre la abundancia relativa del gen PR afiliado taxonómicamente al clado SAR11 y los niveles de Chl_a en el agua (Cottrell y Kirchman, 2009; Boeuf *et al.*, 2016). En Bahía Chile, se observó que durante el verano de 2014 el aumento en los niveles de Chl_a del agua de mar (ocurrido en el transcurso de

febrero a marzo), no provocó cambios en la abundancia relativa de las bacterias portadores del gen PR respecto a la comunidad bacteriana total. En este mismo periodo, la abundancia relativa de los diferentes taxones portadores del gen PR, y de la asignación taxonómica de las lecturas identificadas como transcritos del gen PR, fue similar en ambos periodos de muestreo (febrero-marzo). Al evaluar el efecto de la Chla sobre la actividad transcripcional del gen PR no se observaron modificaciones en los niveles normalizados de la transcripción del gen PR, presentando valores similares durante febrero y marzo. Cabe mencionar que, a pesar que en los experimentos de microcosmos de disminución de salinidad presentaron valores de Chla de hasta 10 veces más que durante el 2014, aún cuando se lograron identificar transcritos del gen PR a los mismos niveles que los genes HK, las razones (PR / HK) fueron menores a las encontradas en 2014. Sin embargo, al analizar los valores de abundancia relativa de bacterias portadoras del gen PR se observó que la mayor diferencia entre los dos periodos de muestreo, lo presentaron bacterias del clado SAR11 portadoras del gen PR. Estas variaciones se podrían deber a que durante el año 2016 los valores de Chla fueron mayores que durante el 2017, lo que se condice con lo reportado en la literatura para sistemas polares (Boeuf *et al.*, 2016), ya que la abundancia del clado SAR11 portadoras del gen PR fue significativamente mayor durante el 2017 respecto al 2016. Sin embargo, a pesar que durante febrero y marzo de 2014 se presentaron diferencias en los niveles de Chla (Alcamán-Arias *et al.*, 2018), la abundancia relativa de secuencias asignadas como clado SAR11 portadoras del gen PR fue similar entre ambos periodos. Así, es necesario continuar investigando sobre la abundancia relativa de miembros del clado SAR11, para lograr explicar el efecto de variables ambientales sobre este grupo tan relevante de bacterias portadoras del gen PR en sistemas polares.

Finalmente, nuestros resultados también demuestran que el oxígeno, pH, nitrito y amonio se correlacionan con la abundancia del gen PR. Sin embargo, para este estudio no contamos con los niveles de carbono orgánico particulado, carbono orgánico disuelto, nitrógeno orgánico disuelto, ni niveles de radiación fotoactiva, por lo que no fue posible determinar si existe alguna relación entre la abundancia de los distintos taxones portadores del gen PR y la calidad o biodisponibilidad de la fuente de carbono, nitrógeno, o la radiación PAR.

7.6 Contribución de la fototrofia mediada por PR a la biósfera de la Península Antártica Occidental

Nuestros resultados en Bahía Chile demuestran que las bacterias portadoras del gen PR son un grupo ubicuo de microorganismos fototróficos durante el periodo estival en aguas marinas costeras de la Península Antártica Occidental, cuya abundancia relativa podría verse afectado por diferentes parámetros ambientales. Los niveles de Chla es uno de los parámetros ambientales principales que se ha descrito como predictor de la abundancia relativa de bacterias portadoras del gen PR, en particular de aquellos miembros del clado SAR11 en sistemas marinos subtropicales y polares (Sabehi *et al.*, 2007; Boeuf *et al.*, 2016). El sistema marino de la Península Antártica Occidental es considerado como una región de altos niveles de nutrientes y bajos niveles de clorofila (Nolting *et al.*, 1998). En este sistema marino las bacterias fotótrofas, como las Cianobacterias, son un componente menor (Ghiglione y Murray, 2012; Williams *et al.*, 2012) y las AAPb representan alrededor del 10% de la comunidad bacteriana marina de

la Península Antártica (Kirchman *et al.*, 2014). En este ambiente, la producción primaria y la captación de luz solar son procesos realizados principalmente por microorganismos fototróficos eucarióticos, cuya actividad aumenta durante los eventos de floración en el verano (Alcamán-Arias *et al.*, 2018), limitados por parámetros ambientales particulares y la estratificación de la columna de agua de mar (Fuentes *et al.*, 2018). Teniendo en cuenta que se ha reportado que bacterias portadoras del gen PR son más abundantes a niveles bajos de Chla (Fuhrman *et al.*, 2008; Koh *et al.*, 2010), esto podría indicar que en el agua de mar de la Península Antártica Occidental (donde estos niveles de Chla son comúnmente bajos) estos microorganismos están activamente utilizando la energía de la luz solar a través de PR y en particular PR-verde. Por lo tanto, la fototrofia mediada por PR en la Antártica podría permitir el uso de la energía de la luz para procesos metabólicos, contribuyendo a la producción primaria y a la entrada de energía solar a la biósfera del Océano Austral. Por otro lado, la fototrofia mediada por PR es capaz de utilizar dos diferentes longitudes de onda de la luz solar, lo que expande el repertorio de recurso energético por bacterias portadoras de PR maximizando los beneficios que pueden ser obtenidos desde el sol en estos ambientes polares.

8. Conclusiones

- A través de metagenómica, metatranscriptómica y qPCR se determinó por primera vez la identidad, abundancia relativa y actividad transcripcional del gen PR en aguas superficiales costeras de la Península Antártica.
- Se logró determinar que en el sistema marino de Bahía Chile existen microorganismos que portan el gen PR, indicando que en este ambiente marino antártico la fototrofia mediada por PR es una estrategia que está distribuida entre las clases más abundantes de bacterias marinas.
- Al comparar la abundancia relativa del gen PR con otras regiones marinas polares, como el Mar de Beaufort y Chukchi en el Océano Ártico, la abundancia relativa del gen PR en la comunidad de bacterias es ligeramente mayor durante el periodo estival en Bahía Chile, Antártica.
- En el caso de Bahía Chile, que es una bahía poco profunda, nuestros resultados son consistentes con lo reportado en la literatura, existe una mayor abundancia de secuencias de PR verde frente a secuencias de PR azul.
- Bajo las condiciones ambientales que presenta Bahía Chile, la abundancia relativa de las bacterias portadoras del gen PR no se ve afectada por las diferencias de salinidad ni disponibilidad de luz propias de esta bahía.

- La actividad transcripcional del gen PR es modulada por la luz, ya que en Bahía Chile se observó una actividad transcripcional del gen PR más alta durante el día que durante la noche.
- Frente a una disminución en la salinidad del agua, simulada a través de experimentos en microcosmos, se observó que la salinidad modula la actividad transcripcional del gen PR, el que presenta una actividad transcripcional más alta durante escenarios de disminución de salinidad que respecto a la salinidad del agua de mar de Bahía Chile.

9. Referencias

- Alcamán-Arias ME, Farías L, Verdugo J, Alarcón-Schumacher T, Díez B. (2018). Microbial activity during a coastal phytoplankton bloom on the Western Antarctic Peninsula in late summer. *FEMS Microbiol Lett.* 365: fny090.
- Andrews S. FastQC: a quality control tool for high throughput sequence data. (2010). <http://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc>
- Bankevich A, Nurk S, Antipov D, Gurevich AA, Dvorkin M, Kulikov AS, Lesin VM, Nikolenko SI, Pham S, Prjibelski AD, Pyskhin AV, Sirotkin AV, Vyahhi N, Tesler G, Alekseyev MA, Pevzner P. (2012). SPAdes: A New Genome Assembly Algorithm and Its Applications to Single-Cell Sequencing. *J Comput Biol* 19: 455–477.
- Béjà O, Aravind L, Koonin E V, Suzuki MT, Hadd A, Nguyen LP, Jovanovich SB, Gates CM, Feldman RA, Spudich JL, Spudich EN, DeLong EF (2000). Bacterial rhodopsin: evidence for a new type of phototrophy in the sea. *Science* 289: 1902–1906.
- Béjà O, Spudich EN, Spudich JL, Leclerc M, DeLong EF. (2001). Proteorhodopsin phototrophy in the ocean. *Nature* 411: 786–789.
- Boeuf D, Humily F, Jeanthon C. (2014). Diversity of arctic pelagic bacteria with an emphasis on photoheterotrophs: A review. *Biogeosciences* 11: 3309–3322.
- Boeuf D, Audic S, Brillet-Guéguen L, Caron C, Jeanthon C. (2015). MicRhoDE: A curated database for the analysis of microbial rhodopsin diversity and evolution. *Database* 2015: 1–8.
- Boeuf D, Lami R, Cunnington E, Jeanthon C. (2016). Summer abundance and distribution

- of proteorhodopsin genes in the western arctic ocean. *Front Microbiol* 7: 1584
- Booth MG, Hutchinson LA, Brumsted M, Aas P, Coffin RB, Downer RC, Kelley CA, Lyons MM, Pakulski J, Holder Sandvik SL, Jeffrey WH, Miller RV (2001a). Quantification of *recA* gene expression as an indicator of repair potential in marine bacterioplankton communities of Antarctica. *Aquat Microb Ecol* 24: 51–59.
- Booth MG, Jeffrey WH, Miller R V. (2001b). RecA expression in response to solar UVR in the marine bacterium *Vibrio natriegens*. *Microb Ecol* 42: 531–539.
- Brindefalk B, Ekman M, Ininbergs K, Dupont CL, Yooseph S, Pinhassi J, Bergman B. (2016). Distribution and expression of microbial rhodopsins in the Baltic Sea and adjacent waters. *Environ Microbiol* 18: 4442–4455.
- Buchfink B, Xie C, Huson DH. (2015). Fast and sensitive protein alignment using DIAMOND. *Nat Methods* 12: 59-60.
- Campbell BJ, Waidner LA, Cottrell MT, Kirchman DL. (2008). Abundant proteorhodopsin genes in the North Atlantic Ocean. *Environ Microbiol* 10: 99–109.
- Cottrell MT, Kirchman DL. (2009). Photoheterotrophic microbes in the arctic ocean in summer and winter. *Appl Environ Microbiol* 75: 4958–4966.
- Dubinsky V, Haber M, Burgsdorf I, Saurav K, Lehahn Y, Malik A, Sher D, Aharonovich D, Steindler L. (2017). Metagenomic analysis reveals unusually high incidence of proteorhodopsin genes in the ultra oligotrophic Eastern Mediterranean Sea. *Environ Microbiol* 19: 1077–1090.
- Evans C, Gómez-Pereira PR, Martin AP, Scanlan DJ, Zubkov M V. (2015). Photoheterotrophy of bacterioplankton is ubiquitous in the surface oligotrophic ocean. *Prog Oceanogr* 135: 139–145.
- Field CB, Behrenfeld MJ, Randerson JT, Falkowski P. (1998). Primary Production of the

Biosphere: Integrating Terrestrial and Oceanic Components. *Science* 281: 237–240.

Finn RD, Coggill P, Eberhardt RY, Eddy SR, Mistry J, Mitchell AL, Potter SC, Punta M, Qureshi M, Sangrador-Vegas A, Salazar GA, Tate J, Bateman A. (2016). The Pfam protein families database: Towards a more sustainable future. *Nucleic Acids Res* 44: D279–D285.

Finn RD, Attwood TK, Babbitt PC, Bateman A, Bork P, Bridge AJ, Chang HY, Dosztányi Z, El-Gebali S, Fraser M, Gough J, Haft D, Holliday GL, Huang H, Huang X, Letunic I, Lopez R, Lu S, Marchler-Bauer A, Mi H, Mistry J, Natale DA, Necci M, Nuka G, Orengo CA, Park Y, Pesseat S, Piovesan D, Potter SC, Rawlings ND, Redaschi N, Richardson L, Rivoire C, Sangrador-Vegas A, Sigrist C, Sillitoe I, Simithers B, Squizzato S, Sutton G, Thanki N, Thomas PD, Tosatto SC, Wu CH, Xenarios I, Yeh Ls, Young SY, Mitchell AL. (2017). InterPro in 2017-beyond protein family and domain annotations. *Nucleic Acids Res* 45: D190–D199.

Fuentes S, Arroyo JI, Rodríguez-Marconi S, Masotti I, Alarcón-Schumacher T, Polz MF, Trefault N, De la Iglesia R, Díez B. (2019). Summer phyto- and bacterioplankton communities during low and high productivity scenarios in the Western Antarctic Peninsula. *Polar Biol* 42: 159-169.

Fuhrman J, Schwalbach MS, Stingl U. (2008). Proteorhodopsins: an array of physiological roles? *Nat Rev Microbiol* 6: 488–494.

Ghiglione JF, Murray AE. (2012). Pronounced summer to winter differences and higher wintertime richness in coastal Antarctic marine bacterioplankton. *Environmental Microbiology* 14: 617–629.

Giovannoni SJ, Bibbs L, Cho J-C, Stapels MD, Desiderio R, Vergin KL, Rappé MS, Laney

- S, J.Wilhelm, Tripp HJ, Mathur EJ, Barofsky D. (2005). Proteorhodopsin in the ubiquitous marine bacterium SAR11. *Nature* 438: 82–85.
- Gómez-Consarnau L, González JM, Coll-Lladó M, Gourdon P, Pascher T, Neutze R, Pedrós-Alió C, Pinhassi J. (2007). Light stimulates growth of proteorhodopsin-containing marine Flavobacteria. *Nature* 445: 210–3.
- Gómez-Consarnau L, Akram N, Lindell K, Pedersen A, Neutze R, Milton DL, González JM, Pinhassi J. (2010). Proteorhodopsin phototrophy promotes survival of marine bacteria during starvation. *PLoS Biol* 8: e1000358.
- González JM, Fernández-Gómez B, Fernández-Guerra A, Gómez-Consarnau L, Sánchez O, Coll-Lladó M, del Campo J, Escudero L, Rodríguez-Martínez R, Alonso-Sáez L, Latasa M, Paulsen I, Nedashkovskaya O, Lekunberri I, Pinhassi J, Pedrós-Alió C. (2008). Genome analysis of the proteorhodopsin-containing marine bacterium *Polaribacter* sp. MED152 (Flavobacteria). *Proc Natl Acad Sci U S A* 105: 8724–8729.
- González JM, Pinhassi J, Fernández-Gómez B, Coll-Lladó M, González-Velázquez M, Puigbó P, Jeanicke S, Gómez-Consarnau L, Fernández-Guerra A, Goesmann A, Pedrós-Alió C.(2011). Genomics of the proteorhodopsin-containing marine flavobacterium *Dokdonia* sp. strain MED134. *Appl Environ Microbiol* 77: 8676–8686.
- Gordon L, Jennings J, Ross A, Krest J. (1993). A Suggested Protocol for Continuous Flow Automated Analysis of Seawater Nutrients. In: *World ocean circulation experiment. WOCE operations manual*.
- Grzymski JJ, Riesenfeld CS, Williams TJ, Dussaq AM, Ducklow H, Erickson M, Cavicchioli R, Murray AE. (2012). A metagenomic assessment of winter and

- summer bacterioplankton from Antarctica Peninsula coastal surface waters. *ISME J* 6: 1901–1915.
- Guerrero LD, Vikram S, Makhalanyane TP, Cowan DA. (2017). Evidence of microbial rhodopsins in Antarctic Dry Valley edaphic systems. *Environ Microbiol* 19: 3755–3767.
- Gushchin I, Chervakov P, Kuzmichev P, Popov AN, Round E, Borshchevskiy V, Ishchenko A, Petrovskaya L, Chupin V, Dolgikh DA, Arseniev AS, Kirpichnikov M, Gordeliy V . (2013). Structural insights into the proton pumping by unusual proteorhodopsin from nonmarine bacteria. *Proc Natl Acad Sci* 110: 12631–12636.
- Huovinen P, Ramírez J, Gómez I. (2016). Underwater Optics in Sub-Antarctic and Antarctic Coastal Ecosystems. *PLoS One* 11: e0154887.
- Hyatt D, Chen G, Locascio PF, Land ML, Larimer FW, Hauser LJ. (2010). Prodigal : prokaryotic gene recognition and translation initiation site identification. *BMC Bioinformatics* 11.
- Inoue K, Kato Y, Kandori H. (2015). Light-driven ion-translocating rhodopsins in marine bacteria. *Trends Microbiol* 23: 91–98.
- Katoh K, Rozewicki J, Yamada KD. (2018). MAFFT online service : multiple sequence alignment , interactive sequence choice and visualization. *Brief Bioinform* 1–7.
- Keffer JL, Hahn MW, Maresca JA. (2015). Characterization of an unconventional rhodopsin from the freshwater actinobacterium *Rhodoluna lacicola*. *J Bacteriol* 197: 2704–2712.
- Kirchman DL, Hanson TE. (2013). Bioenergetics of photoheterotrophic bacteria in the oceans. *Environ Microbiol Rep* 5: 188–199.
- Kirchman D, Stegman M, Nikrad M, Cottrell M. (2014). Abundance, size, and activity of

- aerobic anoxygenic phototrophic bacteria in coastal waters of the West Antarctic Peninsula. *Aquat Microb Ecol* 73: 41–49.
- Koh EY, Atamna-Ismaeel N, Martin A, Cowie ROM, Beja O, Davy SK, Maas EW, Ryan KG. (2010). Proteorhodopsin-bearing bacteria in Antarctic sea ice. *Appl Environ Microbiol* 76: 5918–5925.
- Kolber ZS, Plumley FG, Lang AS, Beatty JT, Blankenship RE, VanDover CL, Vetriani C, Koblizek M, Rathgeber C, Falkowski. (2001). Contribution of aerobic photoheterotrophic bacteria to the carbon cycle in the ocean. *Science* 292: 2492–2495.
- Kopylova E, Noe L. (2012). Sequence analysis SortMeRNA: fast and accurate filtering of ribosomal RNAs in metatranscriptomic data. *Bioinformatics* 28: 3211–3217.
- de la Torre JR, Christianson LM, Bèjà O, Suzuki MT, Karl DM, Heidelberg JF, DeLong E. (2003). Proteorhodopsin genes are distributed among divergent marine bacterial taxa. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100: 12830–12835.
- Lami R, Cottrell MT, Campbell BJ, Kirchman DL. (2009). Light-dependent growth and proteorhodopsin expression by Flavobacteria and SAR11 in experiments with Delaware coastal waters. *Environ Microbiol* 11: 3201–3209.
- Langmead B, Salzberg SL. (2012). Fast gapped-read alignment with Bowtie 2. *Nat Methods* 9: 357–359.
- Man D, Wang W, Sabehi G, Aravind L, Post AF, Massana R, Spudich EN, Spudich JL, Bèjà O. (2003). Diversification and spectral tuning in marine proteorhodopsins. *EMBO J* 22: 1725–1731.
- Maranger R, Vaqué D, Nguyen D, Hébert MP, Lara E. (2015). Pan-Arctic patterns of planktonic heterotrophic microbial abundance and processes: Controlling factors

- and potential impacts of warming. *Prog Oceanogr* 139: 221–232.
- Martin M. (2010). Cutadapt removes adapter sequences from high-throughput sequencing reads. *EMBnet J* 2011;17:1–10.
- Maresca JA, Miller KJ, Keffer JL, Sabanayagam CR, Campbell BJ. (2018). Distribution and diversity of rhodopsin-producing microbes in the Chesapeake Bay. *Appl Environ Microbiol* 84: e00137-18.
- Martinez A, Bradley AS, Waldbauer JR, Summons RE, DeLong EF. (2007). Proteorhodopsin photosystem gene expression enables photophosphorylation in a heterologous host. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104: 5590–5595.
- McCarren J, DeLong EF. (2007). Proteorhodopsin photosystem gene clusters exhibit co-evolutionary trends and shared ancestry among diverse marine microbial phyla. *Environ Microbiol* 9: 846–858.
- Nguyen D, Maranger R, Balagué V, Coll-Lladó M, Lovejoy C, Pedrós-Alió C. (2015). Winter diversity and expression of proteorhodopsin genes in a polar ocean. *ISME J* 9: 1835–1845.
- Nolting RF, Gerringa LJA, Swagerman MJW, Timmermans KR, De Baar HJW. (1998). Fe (III) speciation in the high nutrient, low chlorophyll Pacific region of the Southern Ocean. *Mar Chem* 62: 335–352.
- Oesterhelt D, Stoeckenius W. (1973). Functions of a New Photoreceptor Membrane. *Proc Natl Acad Sci U S A* 70: 2853–2857.
- Olson DK, Yoshizawa S, Boeuf D, Iwasaki W, DeLong EF. (2018). Proteorhodopsin variability and distribution in the North Pacific Subtropical Gyre. *ISME J* 12: 1047-1060.
- Ottesen EA, Marin R, Preston CM, Young CR, Ryan JP, Scholin CA, DeLong EF. (2011).

- Metatranscriptomic analysis of autonomously collected and preserved marine bacterioplankton. *ISME J* 5: 1881–1895.
- Ottesen EA, Young CR, Gifford SM, Eppley JM, Marin R, Schuster SC, Scholin CA, DeLong EF. (2014). Multispecies diel transcriptional oscillations in open ocean heterotrophic bacterial assemblages. *Science* 345: 207-212.
- Palovaara J, Akram N, Baltar F, Bunse C, Forsberg J, Pedrós-Alió C, González JM, Pinhassi J. (2014). Stimulation of growth by proteorhodopsin phototrophy involves regulation of central metabolic pathways in marine planktonic bacteria. *Proc Natl Acad Sci U S A* 111: E3650-E3658.
- Pedrós-Alió C, Potvin M, Lovejoy C. (2015). Diversity of planktonic microorganisms in the Arctic Ocean. *Prog Oceanogr* 139: 233–243.
- Philosof A, Bèjà O. (2013). Bacterial, archaeal and viral-like rhodopsins from the Red Sea. *Environ Microbiol Rep* 5: 475–482.
- Pinhassi J, DeLong EF, Bèjà O, González JM, Pedrós-Alió C. (2016). Marine Bacterial and Archaeal Ion-Pumping Rhodopsins: Genetic Diversity, Physiology, and Ecology. *Microbiol Mol Biol Rev* 80: 929–54.
- Poretsky RS, Hewson I, Sun S, Allen AE, Zehr JP, Moran MA. (2009). Comparative day/night metatranscriptomic analysis of microbial communities in the North Pacific subtropical gyre. *Environ Microbiol* 11: 1358–1375.
- Pushkarev A, Inoue K, Larom S, Flores-uribe J, Singh M, Konno M, Tomida S, Ito S, Nakamura R, Tsunoda SP, Philosof A, Sharon I, Yutin N, Koonin EV, Kandori H, Bèjà O. (2018). A distinct abundant group of microbial rhodopsins discovered using functional metagenomics. *Nature* 558: 595–599.
- Quast C, Pruesse E, Yilmaz P, Gerken J, Schweer T, Yarza P, Peplies J, Glöckner FO.

- (2013). The SILVA ribosomal RNA gene database project: Improved data processing and web-based tools. *Nucleic Acids Res* 41: 590–596.
- Riedel T, Buchholz I, Jacobs J, Kollenberg M, Gerdts G, Wichels A, Brinkhoff T, Cypionka H, Wagner-Döbler I. (2010). Constitutive Expression of the Proteorhodopsin Gene by a Flavobacterium Strain Representative of the Proteorhodopsin-Producing Microbial Community in the North Sea. *Appl Environ Microbiol* 76: 3187–3197.
- Ruch S, Beyer P, Ernst H, Al-Babili S. (2005). Retinal biosynthesis in Eubacteria: In vitro characterization of a novel carotenoid oxygenase from *Synechocystis* sp. PCC 6803. *Mol Microbiol* 55: 1015–1024.
- Rusch DB, Halpern AL, Sutton G, Heidelberg KB, Williamson S, Yooseph S, Wu D, Eisen JA, Hoffman JM, Remington K, Beeson K, Tran B, Smith H, Baden-Tillson H, Stewart C, Thorpe J, Freeman J, Andrews-Pfannkoch CA, Venter JE, Li K, Kravitz S, Heidelberg JF, Utterback T, Rogers YH, Falcón LI, Souza V, Bonilla-Rosso G, Equiarte LE, Karl DM, Sathyvendranath S, Platt T, Bermingham E, Gallardo V, Tamayo-Castillo G, Ferrari MR, Strausberg RL, Nealson K, Friedman R, Frazier M, Venter JC. (2007). The Sorcerer II Global Ocean Sampling Expedition : Northwest Atlantic through Eastern Tropical Pacific. *PLoS Biol* 5: 77.
- Sabehi G, Massana R, Bielawski JP, Rosenberg M, DeLong EF, Béjà O. (2003). Novel proteorhodopsin variants from the Mediterranean and Red Seas. *Environ Microbiol* 5: 842–849.
- Sabehi G, Béjà O, Suzuki MT, Preston CM, DeLong EF. (2004). Different SAR86 subgroups harbour divergent proteorhodopsins. *Environ Microbiol* 6: 903–910.
- Sabehi G, Loy A, Jung KH, Partha R, Spudich JL, Isaacson T, Hirschberg J, Wagner M, Béjà O. (2005). New insights into metabolic properties of marine bacteria

- encoding proteorhodopsins. *PLoS Biol* 3: e273.
- Sabehi G, Kirkup BC, Rozenberg M, Stambler N, Polz MF, Béja O. (2007). Adaptation and spectral tuning in divergent marine proteorhodopsins from the eastern Mediterranean and the Sargasso Seas. *ISME J* 1: 48–55.
- San Millán RM, Martínez-Ballesteros I, Rementeria A, Garaizar J, Bikandi J. (2013). Online exercise for the design and simulation of PCR and PCR-RFLP experiments. *BMC Res Notes* 6: 2–5.
- Schink B, Montag D, Keller A, Müller N. (2017). Hydrogen or formate: Alternative key players in methanogenic degradation. *Environ Microbiol Rep* 9: 189–202.
- Shi Y, Tyson GW, Eppley JM, Delong EF. (2011). Integrated metatranscriptomic and metagenomic analyses of stratified microbial assemblages in the open ocean. *ISME J* 5: 999–1013.
- Soloranzo L. (1969). Determination of Ammonia in Natural Waters by the Phenolhypochlorite Method. *Limnol Oceanogr* 14: 799–801.
- Steig E, Schneider DP, Rutherford SD, Mann ME, Comiso JC, Shindell, Drew T. (2009). Warming of the Antarctic ice-sheet surface since the 1957 International Geophysical Year. *Nature*: 457: 459–462
- Steindler L, Schwalbach MS, Smith DP, Chan F, Giovannoni SJ. (2011). Energy starved candidatus Pelagibacter ubique substitutes light-mediated ATP production for endogenous carbon respiration. *PLoS One* 6: e19725.
- Strickland JDH, Parsons TR. (1972). A Practical Handbook of Seawater Analysis. 2nd Edition, Fisheries Research Board of Canada Bulletin, No. 167, Fisheries Research Board of Canada.
- Vader A, Laughinghouse HD, Griffiths C, Jakobsen KS, Gabrielsen TM. (2018). Proton-

pumping rhodopsins are abundantly expressed by microbial eukaryotes in a high-Arctic fjord. *Environ Microbiol* 20: 890–902.

Venter JC, Remington K, Heidelberg JF, Halpern AL, Rusch D, Eisen JA, Wu D, Paulsen I, Nelson KE, Nelson W, Fouts DE, Levy S, Knap AH, Lomas MW, Nealson K, White O, Peterson J, Hoffman J, Parsons R, Baden-Tillson H, Pfannkoch C, Rogers YH, Smith HO .(2004). Environmental Genome Shotgun Sequencing of the Sargasso Sea. *Science* 304: 66–74.

Williams TJ, Long E, Evans F, DemMaere MZ, Lauro FM, Raftery MJ, Ducklow H, Grzymiski JJ, Murray AE, Cavicchioli R. (2012). A metaproteomic assessment of winter and summer bacterioplankton from Antarctic Peninsula coastal surface waters. *ISME J* 6: 1883–1900.

Ye J, Coulouris G, Zaretskaya I, Cutcutache I, Rozen S, Madden TL. (2012). Primer-BLAST: a tool to design target-specific primers for polymerase chain reaction. *BMC Bioinformatics* 13: 134.

Yutin N, Koonin E V. (2012). Proteorhodopsin genes in giant viruses. *Biol Direct* 7: 1.

10. Anexo

Tabla suplementaria 1 (siguiente página).- Muestras de agua de mar de Bahía Chile utilizadas en esta tesis para la cuantificación absoluta de los genes PR y el gen 16S ARNr en la comunidad de bacterias marinas en los periodos estivales de 2016 y 2017. La tabla se organiza en tres secciones, Verde: Nombre de la muestra, Azul: Descripción de la muestra (cuándo y desde dónde se obtuvo la muestra de agua de mar), Amarillo: respectivos valores de las variables ambientales de cada muestra al momento de ser obtenidas.

Nombre	Fecha	Hora	Periodo	Sitio muestreo	Profundidad (m)	Año	Temperatura (°C)	pH	Salinidad (ppm)	Oxígeno (%)	Chl a (mg/l)	NO2	NO3	PO4	Silicate	NH4
P1-03	2016-02-18	10:10	Día	P1	5	2016	0,5	7,99	NA	NA	11,4	0,245	12,359	1,1129	41,443	NA
P1-04	2016-02-18	23:00	Noche	P1	5	2016	-0,1	6,59	NA	NA	6,4	0,305	17,808	1,522	58,247	NA
P2-02	2016-02-22	10:30	Día	P3	5	2016	-0,1	6,59	NA	NA	3,56	0,207	12,208	1,227	49,167	0,015
P3-57	2016-02-23	13:30	Día	P3	5	2016	-0,2	6,71	NA	NA	1,01	0,286	14,561	1,571	38,676	0,015
P3-58	2016-02-24	22:00	Noche	P3	5	2016	-0,2	6,99	NA	NA	1,54	0,260	18,457	1,616	52,946	0,013
P3-59	2016-02-25	17:30	Día	P3	5	2016	NA	6,98	NA	NA	2,13	0,329	21,101	1,788	60,760	NA
P1-05	2016-02-26	22:30	Noche	P1	5	2016	-0,2	6,6	NA	NA	1,30	0,302	18,319	1,634	59,401	NA
P3-60	2016-02-27	04:00	Noche	P3	5	2016	-0,1	6,6	NA	NA	1,07	0,233	13,305	1,398	36,775	NA
P1-06	2016-02-29	11:00	Día	P1	5	2016	0,2	6,8	NA	NA	4,27	0,289	13,765	1,147	47,193	0,01
P3-61	2016-03-02	11:00	Día	P3	5	2016	1	6,8	NA	NA	1,59	0,273	15,733	1,293	50,532	0,01
P3-62	2016-03-04	15:00	Día	P3	5	2016	0,5	6,8	NA	NA	NA	0,312	15,966	1,243	55,603	NA
P3-63	2017-02-08	13:00	Día	P3	2	2017	2,36	8,15	34,06	7,56	1,29	0,23	23,29	1,48	54,75	1,36
P2-03	2017-02-08	13:00	Día	P3	2	2017	2,59	8,15	33,74	8,01	1,21	0,22	17,91	1,27	53,63	0,57
P1-07	2017-02-08	13:00	Día	P1	2	2017	2,66	8,13	33,87	44	0,69	0,23	22,86	1,51	61,44	0,92
P3-64	2017-02-09	15:00	Día	P3	2	2017	2,23	7,8	34,03	7,62	0,69	0,22	21,64	1,43	52,59	0,96
P3-65	2017-02-09	15:00	Día	P3	25	2017	1,74	7,99	34,14	7,36	0,623	0,211	25,81	1,56	58,01	2,45
P3-66	2017-02-13	10:00	Día	P3	2	2017	2,06	NA	34,06	7,45	0,323	0,184	20,79	1,51	51,01	4,07
P3-67	2017-02-13	10:00	Día	P3	30	2017	1,52	NA	34,18	7,55	0,233	0,142	15,637	1,44	46,99	3,83
P1-08	2017-02-13	10:00	Día	P1	2	2017	2,26	NA	33,56	7,5	1,08	0,183	18,626	1,41	46,19	na
P3-68	2017-02-14	23:00	Noche	P3	2	2017	NA	NA	NA	NA	0,310	0,216	25,58	1,76	60,63	4,14
P3-69	2017-02-14	23:00	Noche	P3	30	2017	NA	NA	NA	NA	0,207	0,222	27,10	1,78	61,47	4,48
P3-70	2017-02-16	10:00	Día	P3	2	2017	2,22	NA	33,88	7,31	0,470	0,222	24,81	1,57	54,51	5,61
P3-71	2017-02-20	10:30	Día	P3	2	2017	1,75	NA	33,88	7,25	0,363	0,215	22,79	1,539	39,58	5,22
P3-72	2017-02-20	10:30	Día	P3	30	2017	1,71	NA	33,77	7,29	0,250	0,215	25,18	1,694	52,30	3,99
P1-09	2017-02-20	10:30	Día	P1	2	2017	1,89	NA	33,87	7,2	0,433	0,210	22,53	1,52	52,12	6,53
P3-73	2017-02-21	10:30	Día	P3	2	2017	1,71	8,13	33,77	7,29	0,393	0,194	19,96	1,43	37,06	5,48
P3-74	2017-02-21	10:30	Día	P3	30	2017	1,42	8,35	34,16	7,08	0,327	0,204	23,30	1,61	47,34	4,24
P1-10	2017-02-21	10:30	Día	P1	2	2017	1,84	NA	33,59	7,4	0,363	0,166	15,64	1,22	39,73	5,77
P1-11	2017-02-23	23:00	Noche	P1	2	2017	1,72	NA	33,89	7,16	0,383	0,200	20,75	1,52	49,49	6,90
P3-75	2017-02-23	23:00	Noche	P3	2	2017	1,68	NA	33,99	7,27	0,383	0,198	20,95	1,49	49,50	6,85
P3-76	2017-02-25	10:00	Día	P3	2	2017	1,93	NA	34,01	7,15	0,263	0,233	25,43	1,66	55,93	4,85
P1-12	2017-02-25	10:00	Día	P1	2	2017	1,68	NA	33,86	7,23	NA	NA	NA	NA	NA	7,03

Tabla suplementaria 2. Partidores utilizados para determinar abundancia relativa del gen PR mediante qPCR, en muestras de ADN de aguas costeras de Bahía Chile.

Gen objetivo	Nombre partidior: secuencia (5'-3')	Tamaño (pb)	Temp. (°C)	Referencia
Flavobacteriia PR	Flavo_F2: 5'-GGATACTAACAGTTCCWTTTRATGTGTG-3'	127	58	(Campbell <i>et al.</i> , 2008)
	Flavo_R2: 5'-CCRAAGTAACCWGTRACAAGCAT-3'			
Alphaproteobacteria PR (SAR11)	SARPR_125F: 5'-THGGWGGATAYTTAGGWGAAGC-3'	185	54	(Lami <i>et al.</i> , 2009)
	SARPR_203R: 5'-ACCTACTGTAACRATCATTCTYA-3'			
Gamaproteobacteria PR (SAR92)	OTU11-f6: 5'-CTGTGCCGCTGCTAATGA-3'	193	57	(Boeuf <i>et al.</i> , 2016)
	OTU11-r2: 5'-TCCCAGATAATGAAGCCC-3'			
Bacteria 16S rRNA (Universal)	S-D-Bact-0337-a-S-20: 5'-ACTCCTACGGGAGGCAGCAG-3'	197	53	(Kenwell <i>et al.</i> , 2016)
	S-D-Bact-0518-a-A-17: 5'-CCAGCAGCCGCGGTAAT-3'			

Temp.; temperatura de apareamiento de los partidiores

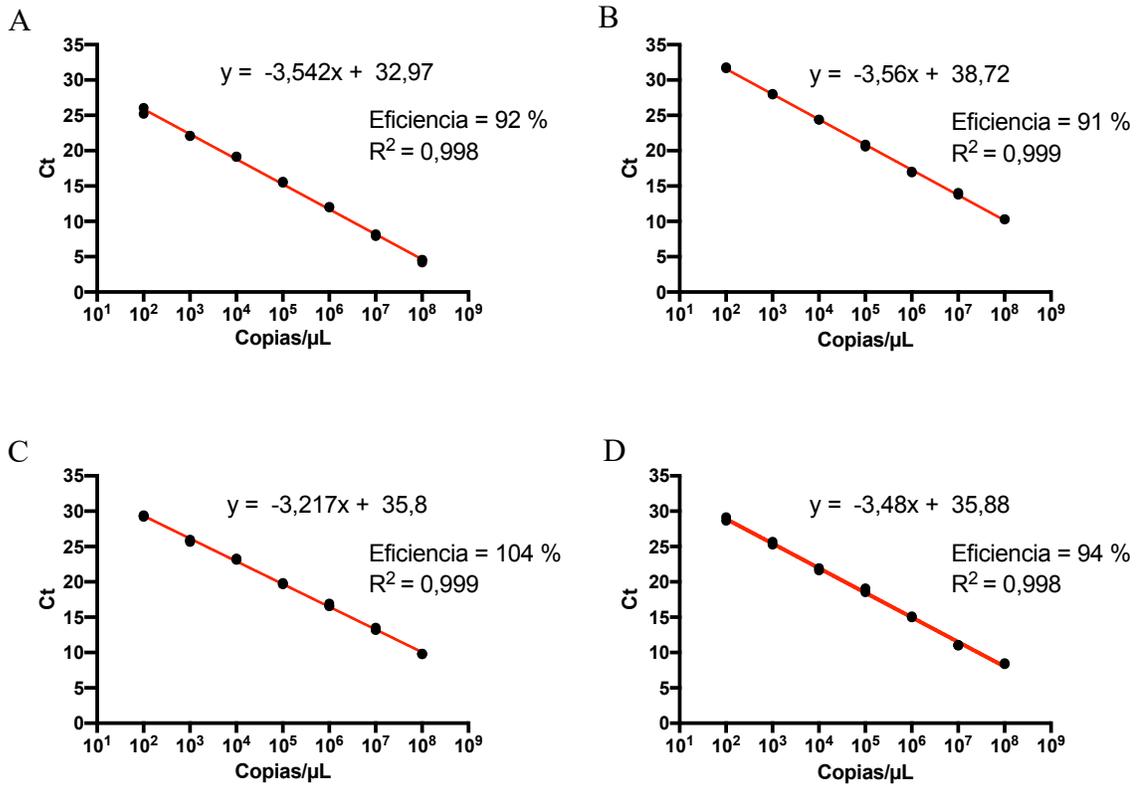


Figura suplementaria 1.- Curvas de calibración utilizadas para la cuantificación absoluta mediante qPCR de los tres genes PR y el gen ARNr 16S. Las curvas comprenden el rango lineal de 10^8 a 10^2 copias/ μ L y corresponden: A) gen PR de clado SAR11, B) gen PR de clado SAR92, C) gen PR de Flavobacteriia, y D) gen ARNr 16S.

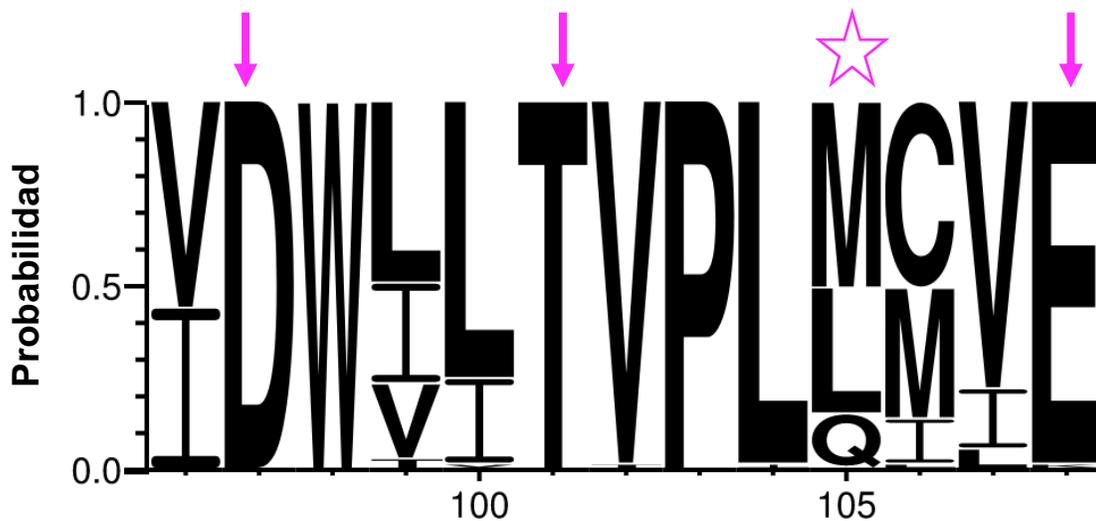


Figura suplementaria 2.- Logo del dominio funcional comprendido entre las posiciones 97 a 108 de las proteínas predichas de los genes PR identificados en el catálogo de genes de los metagenomas de Bahía Chile. Se grafica la probabilidad de identificar dicho aminoácido en las posiciones indicadas en las secuencias de proteínas predichas desde los genes PR. Se indica con flechas los aminoácidos involucrados en el transporte de protones a través de la membrana (en las posiciones 97, 101, y 108). Se indica con una estrella el aminoácido que determina el espectro de longitud de onda a la cual la proteína PR es capaz de absorber la luz (en la posición 105).

Tabla suplementaria 3.- Abundancia relativa de bacterias portadoras del gen PR en aguas costeras de Bahía Chile, agrupadas por variable ambiental evaluada.

Variable ambiental	Gen PR	Año de Verano Austral					
		2016			2017		
		Media	DE	Min - Max	Media	DE	Min - Max
33.4 PSU	SAR11	13.9	7.8	5.1 - 22.3	32.4	8.1	24.1 - 44.3
	SAR92	1.2	0.8	0.4 - 2.3	1.2	0.5	0.8 - 1.8
	Flavo	0.1	0.07	BLD - 0.17	0.2	0.2	0.05 - 0.6
	Total	15.2	8.3	6.2 - 23.7	33.8	7.8	25.8 - 45.3
34.4 PSU	SAR11	11.0	7.3	2.5 - 20.5	24.3	13.4	12.2 - 59.7
	SAR92	1.7	0.9	0.7 - 3.2	1.5	0.8	0.2 - 3.6
	Flavo	0.07	0.03	0.03 - 0.1	0.07	0.04	BLD - 0.2
	Total	12.7	7.7	3.3 - 22.3	25.91	13.9	12.6 - 63.3
Día	SAR11	11.7	8.5	2.5 - 22.4	26.1	13.6	12.2 - 59.6
	SAR92	1.5	0.8	0.7 - 3.2	1.4	0.7	0.2 - 3.6
	Flavo	0.08	0.04	BLD - 0.13	0.1	0.1	0.02 - 0.6
	Total	13.3	8.7	3.3 - 23.7	27.7	14.1	12.6 - 63.3
Noche	SAR11	13	4.6	9.8 - 18.2	27.6	8.7	19 - 36.5
	SAR92	1.6	1.0	0.4 - 2.3	1.5	1.0	0.8 - 3.1
	Flavo	0.1	0.06	0.04 - 0.17	0.1	0.06	BLD - 0.2
	Total	14.7	5.4	10.2 - 20.7	29.2	8.3	19.9 - 37.4
2-3 mts	SAR11	12.1	7.3	2.5 - 22.4	26.9	9.9	12.2 - 44.3
	SAR92	1.5	0.8	0.4 - 3.2	1.2	0.4	0.2 - 1.82
	Flavo	0.08	0.04	BLD - 0.17	0.12	0.1	BLD - 0.6
	Total	13.7	7.6	3.3 - 23.7	28.2	10.1	12.6 - 45.3

Tabla suplementaria 3 (continuación).- Abundancia relativa de bacterias portadoras del gen PR en aguas costeras de Bahía Chile, agrupadas por variable ambiental evaluada.

Variable ambiental	Gen PR	Año de Verano Austral					
		2016			2017		
		Media	DE	Min - Max	Media	DE	Min - Max
30 mts	SAR11	ND	ND	ND	25.2	19.5	12.4 - 59.6
	SAR92	ND	ND	ND	2.1	1.1	1.1 - 3.6
	Flavo	ND	ND	ND	0.06	0.01	0.05 - 0.1
	Total	ND	ND	ND	27.4	20.4	13.5 - 63.3

Flavo; Flavobacteriia, DE; Desviación estándar, ND; no determinado BLD; bajo límite de detección

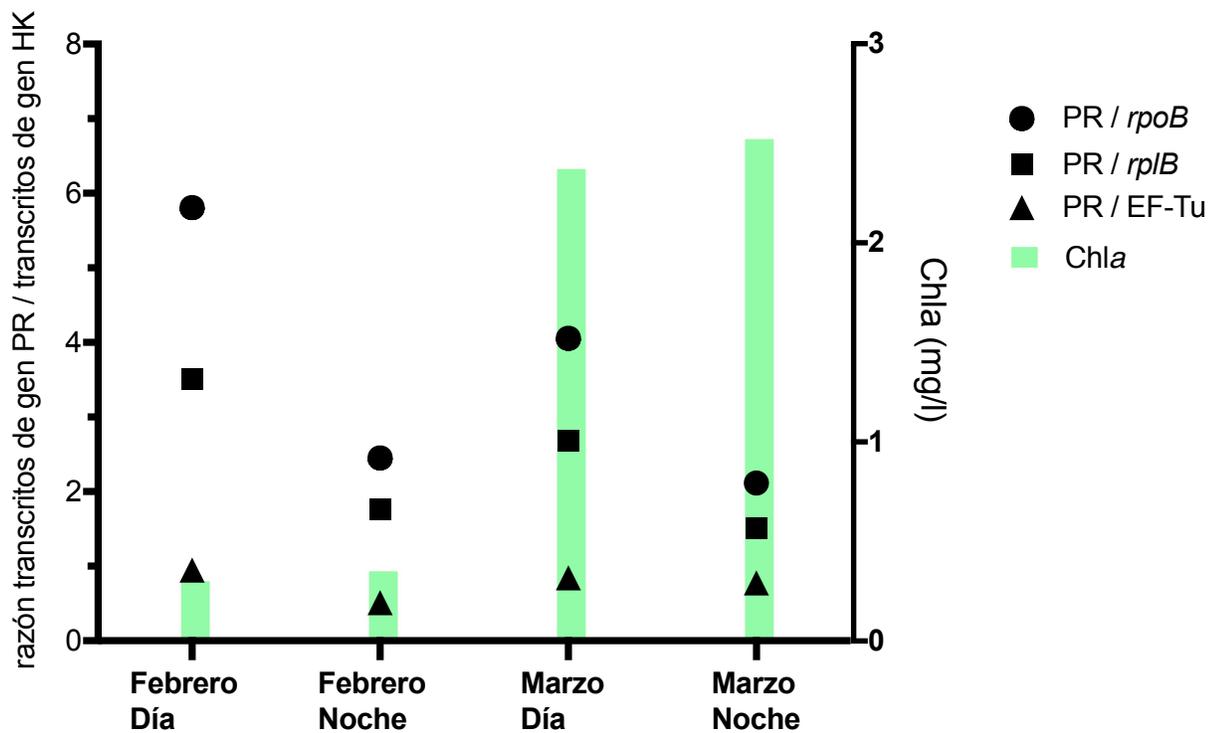


Figura suplementaria 3.- Niveles normalizados de actividad transcripcional del gen PR frente a escenarios de diferente disponibilidad de luz a lo largo del verano Austral de (2014). La actividad transcripcional del gen PR se evaluó en los metatranscriptomas de día y noche, obtenidos desde los meses febrero y marzo, donde se reportaron niveles bajos y altos de Chla, respectivamente. La actividad transcripcional se expresa como una razón entre el número de lecturas identificadas como transcritos del gen PR y el número de lecturas identificadas como transcritos de los genes de copia única y actividad transcripcional constitutiva (gen HK)(Ecuación 1). Para realizar el cálculo de la razón PR/HK, se utilizaron tres genes HK (*rpoB*; círculo, *rplB*; cuadrado, y EF-Tu; triangulo).